

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL HERBICIDA DO GLIFOSATO E  
SEUS COMPLEXOS METÁLICOS ATRAVÉS DE ESTUDO  
ENZIMÁTICO E DE METABÓLITOS EM GLYCINE MAX E  
BRACHIARIA DECUMBENS**

**SORAIA JOHN DA SILVA**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
BIOQUÍMICA**

**COMPARAÇÃO DO POTENCIAL HERBICIDA DO GLIFOSATO E  
SEUS COMPLEXOS METÁLICOS ATRAVÉS DE ESTUDO  
ENZIMÁTICO E DE METABÓLITOS EM GLYCINE MAX E  
BRACHIARIA DECUMBENS**

**SORAIA JOHN DA SILVA**

*Sob a orientação da Professora*  
**Cristiane Martins Cardoso de Salles**

*e Co-orientação do Professor*  
**André Marques dos Santos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Bioquímica

Seropédica, RJ  
Agosto, 2015

632.954

S586c

Silva, Soraia John da, 1990-

T

Comparação do potencial herbicida do glifosfato e seus complexos metálicos através de estudo enzimático e de metabólitos em *Glycine max* e *Brachiaria decumbens* / Soraia John da Silva. – 2015.

91 f.: il.

Orientador: Cristiane Martins Cardoso de Salles.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 77-83.

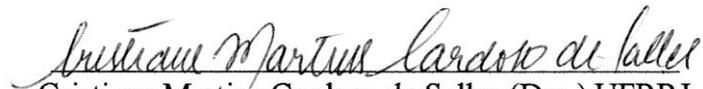
1. Herbicidas - Análise - Teses. 2. Plantas – Efeito dos herbicidas - Teses. 3. Fenilalanina – Teses. 4. Bioquímica – Teses. I. Salles, Cristiane Martins Cardoso de, 1973- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

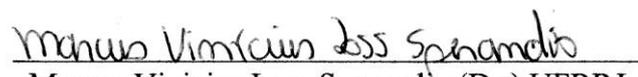
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO - UFRRJ**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

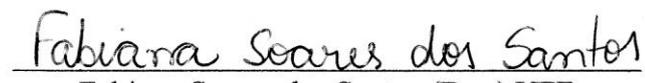
**SORAIA JOHN DA SILVA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,  
no Programa de Pós-Graduação Química, área de Concentração Química Biológica.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/08/2015

  
Cristiane Martins Cardoso de Salles (Dra.) UFRRJ  
(Orientador)

  
Marcus Vinicius Loss Sperandio (Dr.) UFRRJ

  
Fabiana Soares dos Santos (Dra.) UFF

*Com gratidão e amor, dedico este trabalho aos meus pais, Jose Claudio Flauzino da Silva e Ira Rodrigues John da Silva, por terem batalhado sempre pelo meu futuro e o das minhas irmãs.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu Amor, por nunca desistir de mim e por estar presente em todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao meu amado esposo, Edson Soares Gomes, por ser este grande companheiro que caminha ao meu lado todos os dias. Por toda ajuda que me deu nos dias de experimento e no preparo desta dissertação. Por sua paciência e compreensão, por suas palavras sempre motivadoras, por suas orações e por permitir que nosso amor seja eterno.

Agradeço aos meus amados pais, Ira John da Silva e Jose Claudio da Silva, pelo amor infinito e por terem me ensinado a importância de uma família. Por serem pais incríveis. Por terem batalhado tanto para que eu chegasse até aqui e por acreditarem em mim até mesmo quando eu deixei de acreditar.

Agradeço à minha irmã, Sarah, por ter colocado muitas vezes a minha educação à frente dos seus projetos pessoais. Agradeço a ela, a meu cunhado Leandro e à minha irmã Silvini, por todo amor, amizade e apoio. Agradeço à minha sobrinha, Helena, por encher nossas vidas de alegria e luz.

Agradeço aos meus sogros pelas orações e palavras de carinho. E agradeço a toda minha família de Paracatu, meus sobrinhos e cunhados, por estarmos sempre juntos, um apoiando o outro, mesmo com a distância física.

Agradeço à minha orientadora, Cristiane Salles, por ter me ajudado e me ensinado tanto nestes 5 anos de caminhada. Por ser tão compreensiva, por ser uma grande amiga e por unir sabedoria e humildade. Agradeço ao meu co-orientador, André Marques, por todo auxílio, ensinamentos, apoio e amizade.

Agradeço a todos do Programa de Pós-graduação em Química e à CAPES pela oportunidade de fazer este Mestrado. Agradeço ao Grupo de Síntese Inorgânica e Materiais da UFRRJ pela possibilidade de trabalharmos juntos nesta pesquisa.

Agradeço aos meus amigos do Ministério Universidades Renovadas e os da Medicina Veterinária pelas orações, amizade, apoio e amor. Aos amigos da Bioquímica pela amizade, por aprendermos tanto uns com os outros, por toda ajuda com palavras e ações e por alegrarem nossos dias de trabalho. Em especial, Tiago, João, Daniele, Marcela, Taís, Iury, Gabriel e Izaura.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada!

## RESUMO

DA SILVA, Soraia John. **Comparação do potencial herbicida do glifosato e seus complexos metálicos através de estudo enzimático e de metabólitos em *Glycine max* e *Brachiaria decumbens***. 2015. 92 p. Dissertação (Mestrado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O glifosato, herbicida usado mundialmente, atua inibindo a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs), bloqueando a síntese de aminoácidos aromáticos. Com isso, ainda influencia a atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) e a concentração de metabólitos nas plantas. A sua primeira ação reportada foi como agente quelante de metais. Portanto, ao fazer uso deste herbicida, pode haver formação de complexos com metais do solo, ocorrendo alteração da eficácia do produto e deficiência mineral. Assim, de modo a evitar tais problemas, este trabalho teve como objetivo, comparar a eficiência de três formas de glifosato: purificado, previamente complexado com metais, e uma das suas formas comerciais (Roundup WG®). Os efeitos de complexos de glifosato com cobre, cobalto e níquel, sintetizados sob diferentes estequiometrias e valores de pH, foram avaliados sobre a atividade *in vitro* de EPSPs. Os complexos selecionados para o primeiro experimento *in vivo* foram: Cu421 e Co821 (primeiro número referente ao pH e os dois últimos à estequiometria glifosato:metal). Estes complexos foram usados no experimento *in vivo* I, assim como água destilada (controle), Roundup e glifosato purificado, sobre soja transgênica e *Brachiaria decumbens*. Nos experimentos seguintes utilizou-se óleo mineral em todos os tratamentos para reduzir a lixiviação dos compostos. O complexo selecionado para continuação deste estudo foi o Cu421 devido a seu destaque nos resultados obtidos no primeiro experimento *in vivo*. Ao comparar o efeito dos compostos no Índice de Clorofila Falker (ICF) de *B. decumbens* em relação ao controle, observou-se queda deste índice ao usar Roundup, Cu421 e glifosato purificado (este último, somente no segundo experimento). Posteriormente foi analisado acúmulo de massa fresca e coletado material fresco para determinação das atividades enzimáticas e dos teores N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O complexo Cu421 foi o que provocou maior redução da massa fresca e ainda possibilitou o aumento no teor solúvel de nitrato em *B. decumbens*, provavelmente devido à presença de nitrato neste complexo. No caso da soja transgênica não houve alteração significativa de ICF. O uso de Roundup e dos complexos não alterou de forma significativa o acúmulo de massa fresca nesta espécie. A aplicação do glifosato purificado, entretanto, causou incremento no acúmulo de massa e todos os tratamentos alteraram o teor de nitrato em soja. Nos experimentos com óleo mineral em *B. decumbens*, o complexo Cu421 inibiu de forma significativa a atividade de EPSPs, assim como Roundup e glifosato purificado (este último, somente no experimento III). Em soja transgênica não houve inibição. Todos os tratamentos *in vivo* estimularam a atividade de PAL somente na gramínea, permitindo sugerir que o aumento nesta atividade seja consequência da inibição de EPSPs e de outros efeitos deletérios dos compostos sobre plantas susceptíveis. O presente estudo mostrou que principalmente o complexo Cu421 pode vir a ser utilizado de forma eficaz como herbicida, uma vez que inibe a EPSPs, ativa a PAL, reduz acúmulo de massa fresca e influencia a fotossíntese na planta daninha testada. E, em contrapartida, a soja transgênica mostrou-se pouco sensível a este composto, o que aumenta ainda mais a perspectiva do uso do mesmo como herbicida.

**Palavras-chave:** 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase, Fenilalanina amônia liase, Índice de Clorofila Falker.

## ABSTRACT

DA SILVA, Soraia John. **Comparison of herbicide potential of glyphosate and its metal complexes by enzymatic and metabolites studies in *Glycine max* and *Brachiaria decumbens***. 2015. 92 p. Dissertation (Master Science in Chemistry, Biochemistry). Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The glyphosate, herbicide used in different countries, inhibits the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), blocking the synthesis of aromatic amino acids. With this, it still affects the activity of phenylalanine ammonia lyase (PAL) and the concentration of metabolites in plants. Its activity was first reported as a metal chelator. Therefore, to make use of this herbicide, may be formation of complexes with metals from soil, occurring change in the effectiveness of the product and loss of minerals. Thus, to avoid such problems, this study aimed to compare the effectiveness of three forms of glyphosate: purified, previously complexed with metals, and a commercial form (Roundup WG®). The effects of glyphosate complexes with copper, cobalt and nickel with different stoichiometries and different pH values on the *in vitro* activity of EPSPs were evaluated. Selected complex for the first experiment *in vivo* were Cu421 and Co821 (first number for pH and the latter two to stoichiometry glyphosate: metal). These complexes were used in the *in vivo* experiment I, as well as distilled water (control), purified Roundup and glyphosate on transgenic soybean and *B. decumbens*. In the following experiments (II and III), mineral oil was used in all treatments to reduce leaching of the compounds. The complex selected for continuation of this study was Cu421 due to its emphasis on the results obtained in the first experiment *in vivo*. When comparing the effect of the compounds in Falker Chlorophyll Index (ICF) of *B. decumbens* compared to control, there was fall of this index when using Roundup, Cu421 and purified glyphosate (the latter only in the second experiment). Later it was analyzed fresh mass accumulation and collected fresh material for determination of enzyme activities and N-NO<sup>3-</sup> levels. The complex Cu421 caused a more significant fresh mass reduction and still allowed the increase in the content of soluble nitrate in *Brachiaria decumbens*, probably due to the presence of nitrate in this complex. In the case of transgenic soybean there was no significant change in ICF. The use of Roundup and the complex did not change significantly the fresh mass accumulation in this species. The application of the purified glyphosate, however, caused increase in mass accumulation and all treatments altered soybeans in nitrate content. In experiments with mineral oil in *B. decumbens*, the Cu421 complex inhibited significantly the EPSPs activity, as well as purified Roundup and glyphosate (the latter only in the experiment III). No inhibition occurred in transgenic soybean. All treatments *in vivo* stimulated PAL activity only on weed, which suggests that the increase in this activity is a consequence of the inhibition of EPSPs and other deleterious effects of compounds on susceptible plants. This study showed that especially Cu421 complex might be used effectively as a herbicide since it inhibits EPSPs, activates the PAL, reduces fresh mass accumulation and influences photosynthesis in the tested weed. Besides, the transgenic soybean showed little sensitive to this compound, which further increases the prospect of using the same as herbicide.

**Keywords:** 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, Phenylalanine ammonia lyase, Falker Chlorophyll Index.

## LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Co821	complexo de glifosato com cobalto (II), pH 8, estequiometria 2:1, respectivamente
Cu421	complexo de glifosato com cobre (II), pH 4, estequiometria 2:1, respectivamente
IARC	International Agency for Research on Cancer
Ni821	complexo de glifosato com níquel (II), pH 8, estequiometria 2:1, respectivamente.
EPSPs	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
GLI	glifosato purificado
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEP	fosfoenolpiruvato (phosphoenolpyruvate)
Pi	Fosfato inorgânico
PPGQ	Programa de Pós-Graduação em Química
ROUN	Roundup WG®
S3P	chiquimato 3-fosfato (shikimate 3-phosphate)
SPD	Sistema de Plantio Direto
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 O herbicida glifosato</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2 Polêmica sobre proibição do glifosato</b> .....	<b>4</b>
<b>2.3 Mecanismo de ação do glifosato</b> .....	<b>5</b>
<b>2.4 Diferentes efeitos do glifosato e seus surfactantes</b> .....	<b>7</b>
<b>2.5 Degradação do glifosato</b> .....	<b>8</b>
<b>2.6 Formação de complexos metálicos</b> .....	<b>9</b>
<b>2.7 <i>Brachiaria decumbens</i></b> .....	<b>11</b>
<b>2.8 <i>Glycine max</i> (soja)</b> .....	<b>12</b>
<b>2.9 Consórcio de soja e <i>Brachiaria decumbens</i></b> .....	<b>13</b>
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1 Síntese de complexos metálicos de glifosato</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 Preparo de soluções de Roundup WG®, glifosato purificado e complexos glifosato-íon metálico</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3 Preparo dos homogeneizados de soja transgênica e de <i>B. decumbens</i></b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Determinação da concentração proteica dos homogeneizados</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 Procedimentos necessários para quantificação de Pi</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5.1 Preparo da solução colorimétrica</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5.2 Construção da curva-padrão de Pi</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6 Determinação da atividade de EPSPs</b> .....	<b>21</b>
<b>3.7 Análise do efeito <i>in vitro</i> dos compostos sobre a atividade de EPSPs</b> .....	<b>22</b>
<b>3.8 Determinação da atividade de PAL</b> .....	<b>22</b>
<b>3.9 Análise do efeito <i>in vitro</i> dos compostos sobre a atividade de PAL</b> .....	<b>23</b>
<b>3.10 Análise da presença de nitrato no complexo Cu421</b> .....	<b>24</b>
<b>3.11 Experimento <i>in vivo</i> I</b> .....	<b>24</b>
<b>3.11.1 Determinação do Índice de Clorofila Falker (ICF)</b> .....	<b>27</b>
<b>3.11.2 Coleta das plantas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.11.3 Extração alcoólica seguida de partição com clorofórmio</b> .....	<b>28</b>
<b>3.11.4 Determinação dos teores de nitrogênio-nitrato (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)</b> .....	<b>29</b>
<b>3.12 Experimento <i>in vivo</i> II</b> .....	<b>29</b>

3.13 Experimento <i>in vivo</i> III .....	30
3.14 Análise estatística.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Determinação da concentração proteica dos homogeneizados .....	31
4.2 Quantificação de fosfato inorgânico livre .....	31
4.3 Construção da curva de concentração proteica <i>versus</i> atividade de EPSPs .....	34
4.4 Construção da curva de concentração proteica <i>versus</i> atividade de PAL.	35
4.5 Determinação do efeito <i>in vitro</i> de complexos metálicos sobre atividade de EPSPs.....	36
4.6 Determinação do efeito <i>in vitro</i> de complexos metálicos sobre atividade de PAL .....	41
4.7 Experimentos <i>in vivo</i> I, II e III.....	44
4.7.1 Análise visual em <i>B. decumbens</i> .....	44
4.7.2 Análise visual em soja transgênica .....	48
4.7.3 Determinação de ICF em <i>B. decumbens</i> .....	50
4.7.4 Determinação de ICF em soja transgênica .....	53
4.7.5 Determinação dos teores de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e de massa fresca em <i>B. decumbens</i> .....	56
4.7.6 Determinação dos teores de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e de massa fresca em soja transgênica .....	57
4.7.7 Análise da presença de nitrato no complexo Cu421 .....	58
4.7.8 Determinação da concentração de proteínas em <i>B. decumbens</i> .....	59
4.7.9 Determinação da concentração de proteínas em soja transgênica .....	61
4.7.10 Determinação da atividade de EPSPs em <i>B. decumbens</i> .....	63
4.7.11 Determinação da atividade de EPSPs em soja transgênica .....	66
4.7.12 Determinação da atividade de PAL em <i>B. decumbens</i> .....	68
4.7.13 Determinação da atividade de PAL em soja transgênica.....	72
5 CONCLUSÕES .....	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	76
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

# 1 INTRODUÇÃO

Produtos químicos na agricultura moderna vêm sendo cada vez mais utilizados e o herbicida glifosato, de acordo com Roustan et al. (2014), é o herbicida mais vendido no mundo. Este produto tem como mecanismo de ação a inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos, essenciais para a vida vegetal. À medida que os sintomas causados pelo glifosato na planta se agravam, observa-se o amarelecimento progressivo das folhas, seguido de necrose dos tecidos (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005). Corroborando com a observação destes autores, Brighenti et al. (2011) mostrou efeito negativo do glifosato sobre o teor de clorofila.

Nos estudos de Marchiosi (2008) foi encontrado aumento da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) após o tratamento com glifosato em soja suscetível. Isto mostra o efeito deste herbicida em outra atividade enzimática, no caso de plantas sensíveis a ele. A PAL é responsável pela conversão de fenilalanina em ácido cinâmico (com liberação de amônia), sendo assim, está diretamente envolvida no processo de produção de compostos fenólicos, por exemplo.

Apesar de sua boa eficácia, um dos problemas relatados para o uso deste produto químico está relacionado ao fato de ser um agente quelante. Desta forma, o glifosato naturalmente é capaz de formar complexos com metais presentes no solo. Esta complexação tem sido apontada como causadora de deficiências minerais no solo e, além disso, tem causado alteração na eficácia do herbicida, como foi mostrado nos estudos de Wills e McWhorter (1985) e Baley et al. (2002).

Como forma de minimizar estes problemas, o presente estudo buscou estudar o efeito de glifosato previamente complexado com certos metais sobre o consórcio de soja transgênica (resistente ao glifosato) e *Brachiaria decumbens*. Alguns complexos já haviam sido sintetizados em estudos de outros pesquisadores, como complexos de glifosato com ferro, níquel e cobalto. Complexos com cobre também tem sido bastante estudados, uma vez que este íon tem grande importância para plantas e animais na formação, por exemplo, de metaloproteínas (LEE, 1999).

O Brasil é um grande produtor e exportador de soja e esta cultura pode ser implantada em áreas de pastagens degradadas. Esta prática evita a derrubada de novas áreas

de florestas e vegetação de Cerrado, por exemplo. Quando a implantação da cultura de soja ocorre em áreas de pastagens degradadas, o uso do glifosato é intensificado devido à necessidade de controle de ervas daninhas, principalmente plantas do gênero *Brachiaria*, que ocupavam anteriormente a área de implantação. A soja tem um alto potencial produtivo e uma composição química com teor proteico bastante elevado, o que faz com que sua produção venha aumentando ao longo do tempo.

Este trabalho estudou o efeito de complexos de glifosato com metais comuns do solo, comparando-os ao glifosato purificado e ao Roundup (produto comercial à base de glifosato). Este efeito foi avaliado através do estudo enzimático de duas enzimas influenciadas pelo princípio ativo aqui estudado: EPSPs e PAL. Além disso, foi estudado o efeito destes compostos sobre índice de clorofila, massa fresca e teor de N-nitrato. Baseando-se nestes diferentes dados, buscou-se observar se estes compostos previamente complexados seriam capazes de funcionar como eficazes herbicidas, minimizando os problemas demonstrados pelo uso do princípio ativo isolado ou na forma como é atualmente comercializado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O estudo de produtos químicos utilizados na agricultura moderna têm sido de grande importância na produção mundial de alimentos principalmente no que diz respeito ao controle de pragas, entre elas, as plantas daninhas. O glifosato é o herbicida mais vendido no mundo, segundo Roustan et al. (2014).

### 2.1 O herbicida glifosato

O glifosato tem fórmula molecular  $C_3H_8NO_5P$  e sua massa molar é de 169,1 g/mol. Em condições ambientais, tanto glifosato quanto seus sais são sólidos cristalinos muito solúveis em água (12 g/L a 25 °C, para glifosato) e quase insolúveis em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, entre outros (AMARANTE et al., 2002).

O glifosato apresenta amplo espectro de ação, o que possibilita excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas (GALLI e MONTESUMA, 2005). Uma das mais importantes características do glifosato é sua rápida translocação das folhas da planta tratada para as raízes, rizomas e meristemas apicais. Dados da literatura mostram que o glifosato possui a capacidade de controlar efetivamente 76 das 78 plantas invasoras mais agressivas (FRANZ, 1985; QUINN, 1993; GRUYS e SIKORSKI, 1999).

O glifosato [N-(fosfonometil)glicina] é um herbicida sistêmico, pós-emergente, não seletivo, pertencente ao grupo químico dos organofosforados e das glicinas substituídas que visa o controle de ervas daninhas em áreas agrícolas e também não cultivadas (ANDRIGHETTI, 2011).

Atualmente este produto é comercializado em muitos países, sendo registrado para uso em mais de uma centena de culturas. Sua fórmula está representada na Figura 1.

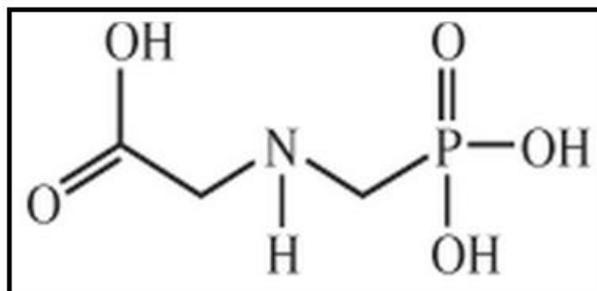


Figura 1: Fórmula estrutural do glifosato. (COUTINHO & MAZO, 2005).

As plantas tratadas com glifosato morrem lentamente, em poucos dias ou semanas, e devido ao transporte por todo o sistema, nenhuma parte da planta sobrevive (COUTINHO & MAZO, 2005). Existem, entretanto, plantas resistentes ao glifosato, como a soja transgênica Roundup Ready (soja RR) (SERRA et al., 2011). Roundup Original foi o produto pioneiro da Monsanto e possui o glifosato como princípio ativo.

## 2.2 Polêmica sobre proibição do glifosato

O glifosato é avaliado como produto de alta importância para a agricultura, entretanto, devido a seu possível envolvimento com o câncer em seres humanos, vêm sofrendo muitas críticas. Em março de 2015, a Organização Mundial de Saúde (OMS), por meio da International Agency for Research on Cancer (IARC), reconheceu que o glifosato é, muito provavelmente, causador de câncer em seres humanos. E, em abril de 2015, o Ministério Público Federal fez uma nova recomendação à ANVISA para concluir a reavaliação toxicológica do ingrediente ativo glifosato e banir a substância do território nacional (CANAL RURAL, 2015a).

Devido à importância e benefícios do glifosato para a agricultura, acredita-se que a proibição do uso do glifosato poderá causar diversos prejuízos como, por exemplo, redução da produtividade, mencionada por Pedro Cristoffoleti (CANAL RURAL, 2015b). A Câmara Setorial da Soja do Ministério da Agricultura em seu documento “Proibição do glifosato” de 28/04/15 citou importâncias deste herbicida como o favorecimento do plantio direto na palha que, por sua vez, reduz a erosão. Neste documento também se menciona que o manejo de ervas daninhas requer uso de produtos a base de ingredientes ativos como o glifosato.

Desta forma, devido à sua grande importância e a seus malefícios, muitos debates ainda devem ocorrer sobre o uso de glifosato na agricultura.

### 2.3 Mecanismo de ação do glifosato

O glifosato age através de inibição enzimática nas plantas. Este herbicida inibe a 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), bloqueando assim, a síntese de aminoácidos aromáticos - fenilalanina, tirosina e triptofano - os quais são precursores de outros produtos, como lignina, alcalóides, flavonóides e ácidos benzóicos (AMARANTE et al., 2002).

Em condições normais, a enzima EPSPs catalisa, na planta, a reação que envolve a transferência do enolpiruvil do fosfoenolpiruvato (PEP) para o chiquimato-3-fosfato (S3P), formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fosfato inorgânico (Pi). Esta reação, juntamente com o herbicida do presente estudo, está representada na Figura 2.

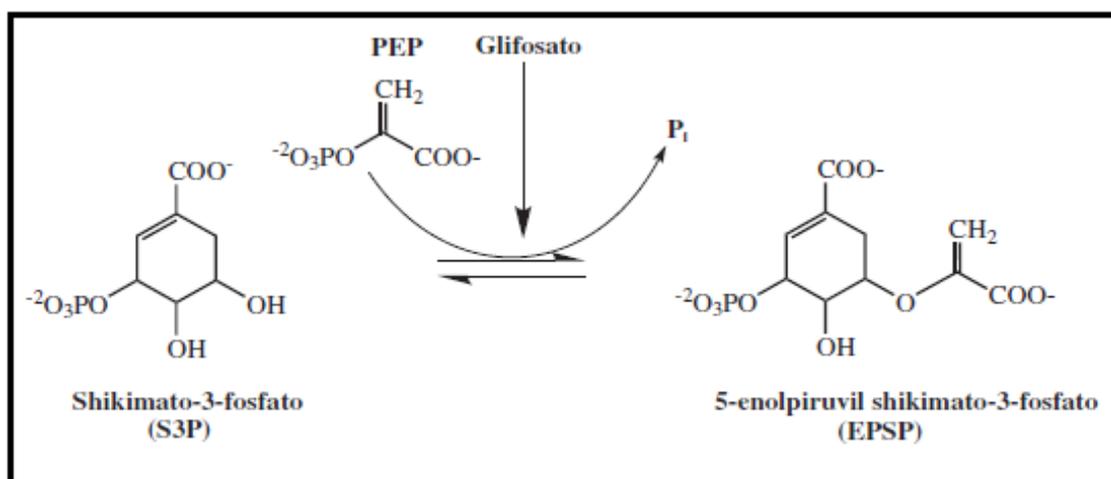


Figura 2: Reação enzimática utilizada como alvo de inibição para o herbicida glifosato (COUTINHO & MAZO, 2005).

Além de inibir a síntese de EPSP, o glifosato também interfere na concentração de outros componentes das plantas, como a clorofila (SILVA et al., 2014a), pigmento de grande importância no processo de fotossíntese. Glifosato também é capaz de reduzir a assimilação de nitrato e a fixação de nitrogênio (BELALLOUI et al., 2006). Serra et al. (2011) observaram que este herbicida é capaz de interferir de forma negativa na absorção, uso e teores totais de nitrogênio até mesmo em plantas consideradas resistentes ao glifosato.

Diferentes pesquisas, portanto, têm demonstrado diversas alterações causadas pelo glifosato no metabolismo vegetal. Nos estudos de Marchiosi (2008) foi encontrado aumento da atividade da fenilalanina amônia liase (PAL) após o tratamento com glifosato em soja

suscetível. Isto mostra um efeito deste herbicida em outra atividade enzimática. A PAL é responsável pela conversão de fenilalanina em ácido cinâmico (com liberação de amônia), sendo assim, está diretamente envolvida no processo de produção de compostos fenólicos e lignificação da parede celular (NAKAZAWA et al., 2001). A reação catalisada pela PAL é mostrada na Figura 3, onde também é possível observar a relação existente entre a fenilalanina amônia liase e a enzima-alvo do glifosato, a EPSPs.

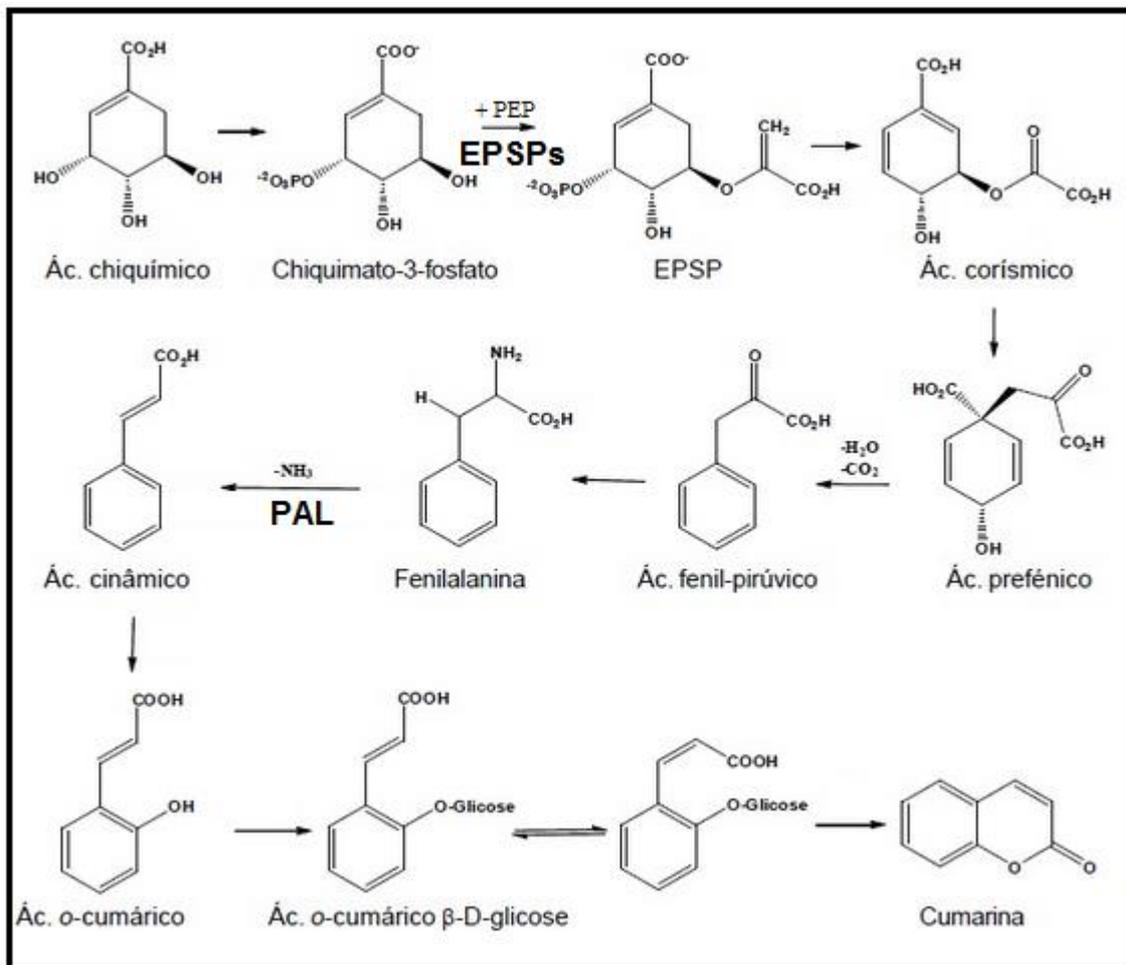


Figura 3: Biossíntese da Cumarina após catálises realizadas pela EPSPs e PAL. [Adaptado de Czelusniak et al. (2012)].

Com o aumento da atividade da PAL, os níveis tóxicos de produtos desta enzima podem exacerbar os processos metabólicos da célula vegetal (DUKE & HOAGLAND, 1985). A PAL também é uma enzima que tem sido relacionada à defesa das plantas, ou seja, sua atividade pode ser estimulada em situações adversas para os vegetais. Isto também explicaria

o aumento desta atividade enzimática na presença do herbicida. Esta relação da PAL com a defesa das plantas foi mencionada em estudo realizado por Edagi et al. (2011).

Segundo Nakazawa et al. (2001), a PAL está relacionada com a resistência de plantas a patógenos por estar envolvida na síntese de fenilpropanóides, resultando em compostos como fitoalexinas e lignina, que confere maior resistência à parede celular dos vegetais aos patógenos.

## **2.4 Diferentes efeitos do glifosato e seus surfactantes**

Infelizmente, a toxicidade de glifosato vai além das espécies vegetais. Richard et al. (2005), por exemplo, mostraram efeitos tóxicos de Roundup sobre células da placenta humana. O trabalho de Cavalli et al. (2013) mostrou que o uso deste herbicida foi capaz de causar morte de células de Sertoli em testículos de ratos.

Diversos estudos têm mostrado a toxicidade de produtos à base de glifosato sobre outras espécies animais, como o trabalho de Lajmanovich et al. (2011) com sapo-de-areia. O trabalho de Dutra et al. (2011) também mostrou que Roundup apresentou-se como um produto tóxico para crustáceos utilizados como indicadores da qualidade de ecossistemas aquáticos.

Esta gama de efeitos diversos do glifosato também já possibilitou a observação de efeitos interessantes deste herbicida. Segundo Maly et al. (2006), doses baixas de glifosato podem até contribuir para o crescimento de alguns microorganismos simbiotróficos da soja. Li et al. (2013) também forneceram evidências de que o glifosato pode inibir a proliferação e promover a apoptose de células cancerosas, mas não de células normais, o que sugere que ele tem alto potencial para ser desenvolvido em uma nova terapia contra o câncer. Como é possível observar, o glifosato é capaz de causar diferentes tipos de efeitos com resultados muitas vezes contraditórios. Portanto, é um composto de grande relevância para o mundo científico e os estudos envolvendo esta molécula devem ser incentivados.

Além disso, efeitos diversos têm sido descritos também para outros ingredientes colocados no preparo de herbicidas à base de glifosato.

Segundo Lajmanovich et al. (2011), diferentes formulações contendo este princípio ativo podem produzir diferentes toxicidades e esta diferença pode também ser decorrente do uso de surfactantes não especificados nos rótulos, muitas vezes referidos como

“inertes” ou que permanecem como “segredos comerciais”. Estudos experimentais apontam que a toxicidade do surfactante polyoxyethyleneamine (POEA), por exemplo, é maior que a toxicidade do glifosato sozinho (BRADBERRY et al., 2004). Navarro e Martinez (2014) também mostraram efeitos tóxicos deste surfactante sobre peixes.

## 2.5 Degradação do glifosato

A degradação de pesticidas no solo pode ser realizada por meios abióticos ou bióticos; estes últimos ocorrendo através da participação de microrganismos. A transformação abiótica ocorre quando a molécula é transformada por ação de componentes físicos ou químicos do solo como, por exemplo, através de hidrólise.

Quanto à degradação microbiana do glifosato, existem duas vias principais de ocorrência. A primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase). A sarcosina entra no metabolismo destes microrganismos e de outros, degradando-se. Esta rota é, no entanto, pouco citada na literatura. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico, AMPA (Figura 4) (AMARANTE et al., 2002).

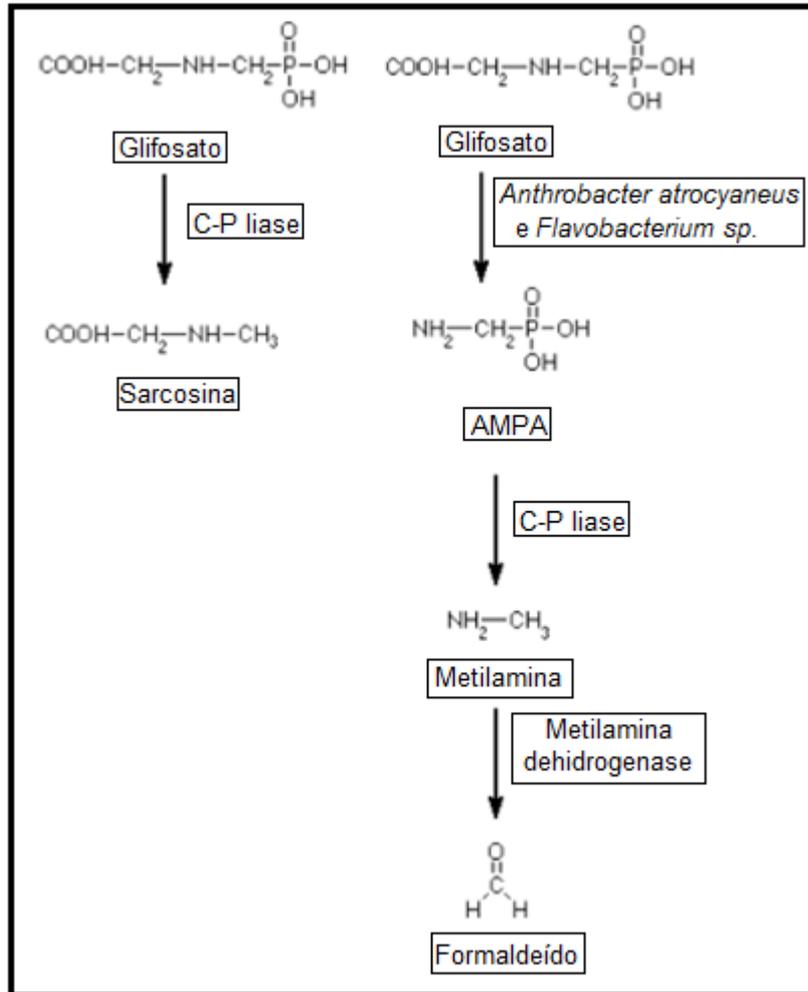


Figura 4: Decomposição microbiológica do glifosato (AMARANTE et al., 2002).

## 2.6 Formação de complexos metálicos

O glifosato foi originalmente sintetizado em 1964, como potencial quelante industrial e seu uso como herbicida foi descrito apenas em 1971 (YAMADA & CASTRO, 2007).

O grupo fosfonato  $\text{R-PO(OH)}_2$  deste herbicida tem a capacidade de formar complexos fortes com metais, sendo que os processos de adsorção, fotodegradação e biodegradação destes grupos são modificados pela presença de íons metálicos, devido à formação de complexos solúveis e não solúveis (BARJA et al., 2001).

Além do grupo fosfonato, o herbicida possui outros dois grupos funcionais, amino e carboxilato, que podem se coordenar fortemente com íons metálicos, especialmente com os de transição, em pH próximo de neutro, onde os grupos carboxilato e fosfonato estão

desprotonados. A capacidade para se coordenar como um ligante tridentado deixa o glifosato numa posição privilegiada entre os herbicidas (SUBRAMANIAN & HOGGARD, 1988).

Muitos complexos de glifosato já foram sintetizados. Entre eles, complexos de glifosato com ferro (III) e níquel (II) (SUBRAMANIAM & HOGGARD, 1988), com cobalto (III) e cromo (III) (HEINEKE et al., 1994) e com zinco (II) (SUNDARAM & SUNDARAM, 1997). Como destacado por Lee (1999), o cobre é um metal de grande importância para animais e vegetais devido ao seu envolvimento com a formação de metaloproteínas, assim, complexos de glifosato com cobre também tem sido amplamente estudados.

Estudos mostraram que a ligação de glifosato com cátions pode tanto favorecer quanto desfavorecer a sua eficácia. De acordo com Wills e McWhorter (1985) a adição de cátions monovalentes, como amônio, sódio e potássio, na solução de glifosato, causou aumento da fitotoxicidade do produto. Enquanto isso, a adição de cátions di e trivalentes, como zinco (II) e ferro (III), diminuiu a atividade do herbicida.

Baley et al. (2002) descreveram que a presença de água dura, contendo cátions como ferro, zinco, cálcio e magnésio, na solução de glifosato, pode resultar na formação de sais de complexos insolúveis que não são absorvidos pelas plantas. Com isso, haveria redução da eficácia do produto.

Estudos mostram que a intoxicação das culturas pela aplicação de glifosato pode induzir a deficiências de certos minerais (FRANZEN et al., 2003). Segundo Eker et al. (2006), a característica quelante do glifosato poderia ser a causadora da imobilização de nutrientes no solo e nas plantas. Esse problema foi identificado no Brasil e nos Estados Unidos através de observações em campo de sintomas de amarelecimento das folhas após a aplicação do herbicida (HUBER, 2006). Segundo Jolley et al. (2004), em plantas resistentes ao glifosato, essa sintomatologia pode estar relacionada ao efeito do herbicida como fator de indução a deficiência de Fe, Zn e Mn. O estudo de Serra et al. (2011) e Santos et al. (2007) mostraram que a aplicação de glifosato em soja transgênica também interfere de forma negativa na eficiência nutricional da planta e nos teores totais de elementos como o cobre.

O Grupo de Síntese Inorgânica e Materiais do PPGQ-UFRRJ realizou estudos sobre a capacidade complexante do glifosato frente a íons de níquel, cobalto e cobre, e assim, sintetizou diferentes complexos destes metais com o herbicida.

O cobalto é um elemento essencial para a fixação simbiótica de nitrogênio em soja (AHMED & EVANS, 1960). Sua deficiência levaria, portanto, a grandes prejuízos para esta cultura.

O níquel também é essencial para fixação de nitrogênio e, segundo Zobiolo (2010), quando ocorre interação entre glifosato e Ni(II) no solo, há diminuição da biodisponibilidade deste elemento-traço, causando prejuízos a importantes culturas, como a de soja.

Quanto ao cobre, este elemento está presente em várias proteínas que desempenham papel fundamental em processos como fotossíntese e desintoxicação de radicais superóxido. Sua deficiência no solo é, em alguns casos, resultado da interação negativa entre este elemento e outros nutrientes do próprio solo ou do adubo. Altos níveis de nitrogênio e excesso de fósforo podem reduzir a absorção do cobre (ALLOWAY, 1990).

Devido às possíveis interferências causadas pela complexação de glifosato com íons metálicos, incluindo a deficiência de certos minerais no solo, passa a ser importante o estudo da eficácia de complexos metálicos de glifosato sobre plantas daninhas, como a *Brachiaria decumbens*, e sobre plantas transgênicas, como a soja RR.

## **2.7 *Brachiaria decumbens***

A espécie *B. decumbens* é originária da África. É uma planta altamente aclimatada, sobretudo nos cerrados. Seu plantio é feito principalmente na estação das chuvas, após tombação e gradagem. Planta-se em linhas de 30 a 50 cm ou então a lanço, numa profundidade máxima de 2 cm, sendo necessárias de 10 a 12 kg de sementes por ha. Seu ciclo vegetativo é do tipo perene. É uma planta de porte baixo e com alta resistência ao pisoteio (CRISPIM & BRANCO, 2002).

O Brasil é o maior produtor, consumidor e exportador mundial de sementes de *Brachiaria* spp. Nas duas últimas décadas foi notável o aumento da área de pastagens formadas com gramíneas do gênero *Brachiaria*, acompanhado de um aumento proporcional na produção e comercialização das suas sementes (SILVA et al., 2014b). Devido a seu difícil controle e rusticidade, entretanto, torna-se uma das plantas daninhas mais indesejadas (SILVA et al., 2014c).

Considera-se que a revolução da pecuária nacional, alcançada na década de 70 pelos grandes projetos de desenvolvimento subsidiados pelo governo, somente foi possível através da introdução deste gênero forrageiro. A *Brachiaria* apresenta tolerância a solos de baixa a média fertilidade e a manejos inadequados. Além disso, possui elevada produção de

sementes de bom valor cultural e baixa susceptibilidade ao ataque de formigas e cupins (KARIA et al., 2006).

## 2.8 *Glycine max* (soja)

A soja [*G. max* (L)] é uma planta herbácea originária da China. As principais variedades comerciais possuem caule hispido, pouco ramificado e raiz com eixo principal e muitas ramificações. Possuem flores de fecundação autógama e desenvolvem vagens (legumes) levemente arqueadas. A estatura das plantas varia dependendo das condições do ambiente e do cultivar de soja. A estatura ideal está entre 60 a 110 cm. O ambiente também influencia sua floração e, conseqüentemente, seu ciclo. Diz-se que a soja é uma planta de dias curtos, embora alguns cultivares já possuam maior adaptabilidade a dias mais longos (NEPOMUCENO et al. [s.d.]).

A soja [*Glycine max* (L.)] é um dos principais cultivos da agricultura mundial por possuir composição química com alto teor protéico, além de elevado potencial produtivo. A cultura possui relevante papel socioeconômico devido à multiplicidade de aplicações na alimentação humana e animal, além de ser matéria-prima indispensável para impulsionar diversos complexos agroindustriais, tais como as indústrias de sementes, fertilizantes, agrotóxicos e máquinas agrícolas (MAUAD et al., 2010).

O complexo de soja (grão, óleo e farelo) é uma atividade agropecuária de importância altíssima para o país, tanto pela sua importância territorial, quanto econômico-comercial. Segundo dados da CONAB (2015), mais de 30 milhões de hectares foram plantados em safras de 2013/14 e 2014/15 e o Brasil é considerado o maior exportador de soja do mundo pela USDA (SAMORA, 2014).

Atualmente, grande parte da produção de soja é feita através da plantação de sementes de soja transgênica. A tolerância ao herbicida desse tipo de soja é obtida através da inserção de um gene (AroA) oriundo do genoma de *Agrobacterium* sp., estirpe CP4, a qual codifica uma variante da EPSPs (CP4 EPSPs) tolerante à inibição pelo glifosato (PADGETTE et al., 1995).

Segundo Monquero (2005), o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes a herbicidas ocorreu a partir da necessidade de facilitar o controle de plantas daninhas e racionalizar o uso de herbicidas na agricultura (MONQUERO, 2005).

O uso de plantas transgênicas traz muitas vantagens do ponto de vista produtivo. Gera maiores ganhos para empresas e agricultores, melhores rendimentos e permite um controle eficaz das ervas daninhas (VARGAS, 2014). Deve-se ressaltar, entretanto, que muitas também são as críticas ao uso destas plantas. Estas críticas baseiam-se em aspectos de segurança alimentar, ambientais e socioeconômicos (GIULIANI, 2013). Porém, uma vez que os transgênicos e os herbicidas têm sido amplamente usados, este trabalho utilizou a soja RR como objeto de estudo.

## 2.9 Consórcio de soja e *Brachiaria decumbens*

A escolha do estudo em *B. decumbens* e em soja foi feita por se tratarem de duas espécies de grande importância e pelo uso de glifosato ser comum no controle de plantas daninhas no cultivo de soja.

As espécies do gênero *Brachiaria*, de uma forma geral, vêm sendo consideradas opções proeminentes na formação da palhada para o sistema plantio direto (SPD), que possui como premissa, a presença de cobertura sobre o solo (PIRES et al., 2008). Este gênero vegetal possui destaque para o SPD devido à boa produção de matéria seca e à alta relação C/N de sua composição (NUNES et al., 2006).

Entre as estratégias comumente utilizadas no manejo da cobertura vegetal para a semeadura da soja em SPD, destaca-se o manejo químico, que pode ser realizado imediatamente antes da semeadura; entre sete e dez dias antes; ou, ainda, entre dez e vinte dias antes desta semeadura (OLIVEIRA JR. et al., 2006). A implantação do SPD, segundo Silva et al. (2009a), ocasionou o incremento do uso de herbicidas, em substituição ao controle efetuado por meios mecânicos, no cultivo convencional. E, segundo estes autores, o herbicida geralmente utilizado no SPD é o glifosato (SILVA et al., 2009a).

Devido à importância do glifosato no SPD para o controle da *Brachiaria* para o cultivo da soja, torna-se importante, a ampliação de estudos sobre o controle desta planta daninha em prol da maior otimização dos cultivos comerciais.

Desta forma, o presente trabalho visou analisar o efeito de complexos metálicos de glifosato sobre estas duas espécies vegetais, através de estudo enzimático e de metabólitos presentes nas mesmas.

## 3 METODOLOGIA

### 3.1 Síntese de complexos metálicos de glifosato

O Grupo de Síntese do professor Marcelo Herbst não conseguiu cristalizar os complexos utilizados neste trabalho, o que o impossibilitou de chegar às estruturas finais dos mesmos. O que se tem de alguns complexos são estruturas obtidas por outros autores, que possivelmente se repetem nos compostos sintetizados pelo grupo do PPGQ. Assim, o item 3.1 apresenta estruturas de complexos de glifosato com metais utilizados no presente trabalho.

#### 3.1.1 Complexos de glifosato e cobre

Complexos de cobre (II) e glifosato com diferentes extensões de protonação foram estudados por Daniele et al. (1997). Para o complexo de cobre de estequiometria 2:1 (ligante glifosato:Cu) ( $\text{CuL}_2^{-4}$ ), sugeriu-se que os nitrogênios dos grupos amina se coordenam um na posição axial e o outro na posição equatorial. Uma das duas moléculas de glifosato se liga ao íon cobre através do nitrogênio na posição axial, com um oxigênio carregado negativamente ocupando a quarta posição no plano equatorial. Isso foi mostrado através de dados termodinâmicos e espectrofotométricos.

Para os complexos de estequiometria 1:1 ( $\text{CuHL}$  e  $\text{CuL}^-$ ), foi sugerido que a complexação ocorre com a formação de dois anéis quelatos. A partir de dados de Sheals et al. (2001) foi possível concluir que os três sítios de coordenação do glifosato não se dispõem numa conformação tetraédrica ou quadrada ao redor do cobre (II). Na verdade, ocupam três das seis posições de um octaedro distorcido, onde a molécula de glifosato forma com o cobre (II), dois anéis quelatos de cinco membros orientados no plano equatorial. Completando este octaedro, ligam-se três moléculas de água: uma fechando o plano equatorial e as outras duas ocupando os vértices do octaedro. As estruturas dos complexos  $\text{CuHL}$  e  $\text{CuL}^-$  são essencialmente as mesmas, diferindo somente na protonação do grupo fosfonato (COUTINHO e MAZO, 2005). A Figura 5 apresenta a estrutura de um complexo 1:1.

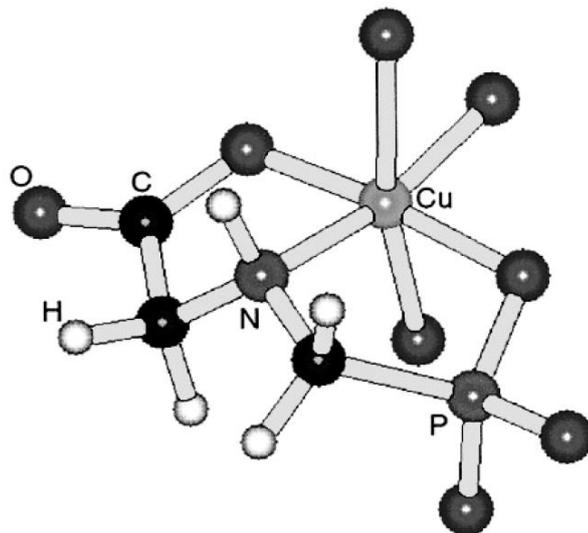


Figura 5: Estrutura molecular proposta do complexo  $\text{CuL}^-$  (SHEALS et al., 2001).

### 3.1.2 Complexos de glifosato e cobalto

Han et al (2008) sintetizaram dois novos polímeros de coordenação de Co (II) e glifosato e ambas as estruturas foram determinadas por difração de raios-X de monocristal.

A coordenação do cobalto em um destes polímeros pode ser mais bem descrita como um octaedro levemente distorcido composto por seis grupos fosfonato se ligando de forma monodentada, como apresentado na Figura 6. Todos os ligantes glifosato podem ser separados em dois tipos de acordo com o modo de coordenação do grupo fosfonato. Alguns deles atuam como ponte ligando de forma bidentada a dois átomos de cobalto para formar um anel de oito membros, os outros agem como ligantes monodentados e ocupam as posições de um octaedro.

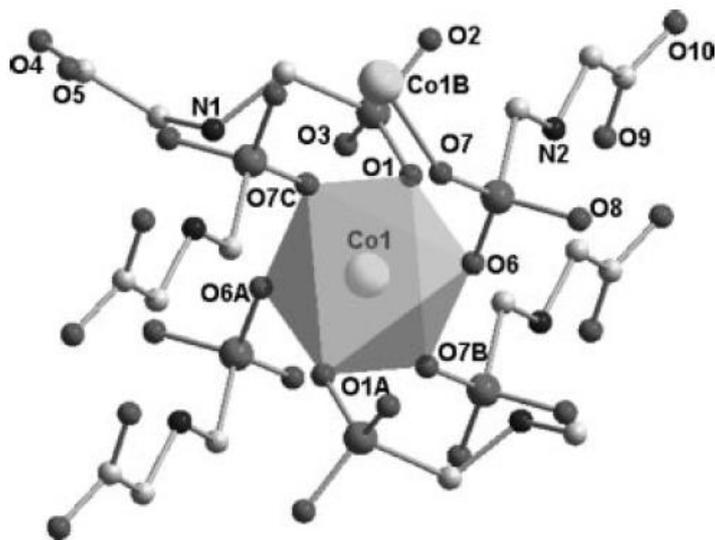


Figura 6: Representação poliédrica de Co(II) em um octaedro levemente distorcido (HAN et al., 2008).

Diferentemente do composto formado na Figura 6, outro tipo de complexo de cobalto que pode ser sintetizado, pode ser descrito como um composto octaédrico levemente distorcido que possui seis átomos de oxigênio a partir de três grupos fosfonatos se ligando de forma monodentada. O oxigênio do grupo carboxilato também se coordena de forma monodentada e completa este octaédrico com duas moléculas de água. A representação poliédrica deste composto é representada pela Figura 7.

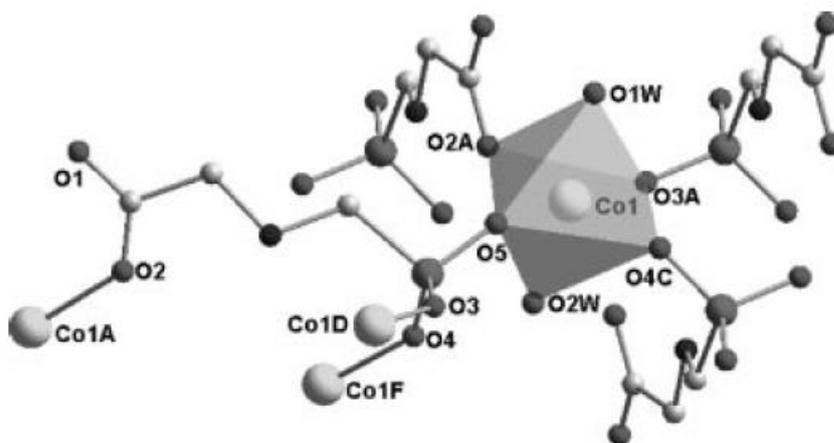


Figura 7: Representação poliédrica de um segundo composto de Co (II) em um octaedro levemente distorcido (HAN et al., 2008).

### 3.1.3 Complexos de glifosato e níquel

Menelaou et al. (2009) descreveram a síntese, o estudo espectroscópico e a estrutura cristalina do complexo de estequiometria 2:1 (glifosato:níquel II). Na síntese do complexo, certa quantidade de  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  foi misturada na solução de glifosato e o pH ajustado em 4,0. A mistura de cor azul foi agitada à temperatura ambiente e adicionado etanol a  $4^\circ\text{C}$ . Após algumas semanas, houve o aparecimento de cristais que então foram isolados por filtração. Este complexo foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, ultravioleta e análise térmica. A representação da estrutura cristalina do complexo de Ni(II) é mostrada na Figura 8.

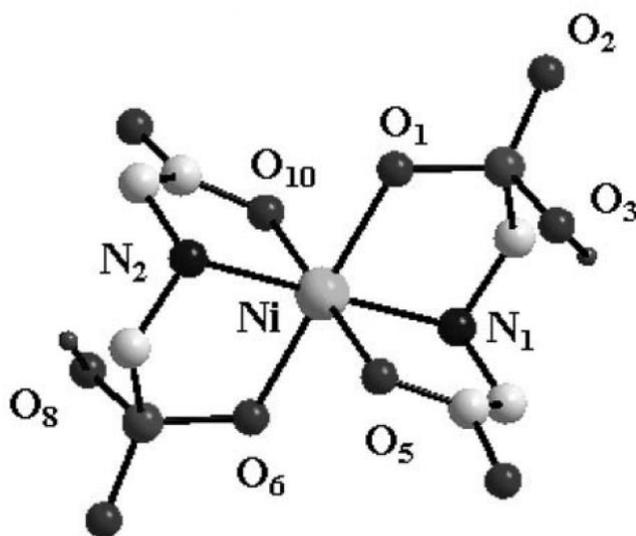


Figura 8: Representação da estrutura cristalina do complexo  $[\text{Ni}(\text{GlyP})_2]^{2-}$  (MENELAOU et al., 2009).

Desta forma, através do estudo das estruturas presentes na literatura e a partir dos compostos obtidos em colaboração com o Grupo de Síntese do PPGQ, foram realizados os ensaios *in vitro* e *in vitro*.

### 3.2 Preparo de soluções de Roundup WG®, glifosato purificado e complexos glifosato-íon metálico

Roundup WG, glifosato purificado e os complexos de glifosato com cobre ( $\text{Cu}^{+2}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{+2}$ ) e níquel ( $\text{Ni}^{+2}$ ) foram obtidos em colaboração com o grupo de Síntese Inorgânica e Materiais do PPGQ-UFRRJ coordenado pelo professor Marcelo Herbst. Estes complexos foram sintetizados a partir de sais de nitrato contendo os respectivos cátions de forma individual, sob diferentes valores de pH e estequiometria. A Tabela 1 apresenta os complexos de cobalto utilizados neste trabalho.

**Tabela 1. Complexos de glifosato com cobalto sintetizados sob diferentes valores de pH e estequiometria.**

<b>Complexos de cobalto</b>	<b>pH</b>	<b>Estequiometria glifosato:cobalto</b>
<b>C1 (Co411)</b>	4	1:1
<b>C2 (Co811)</b>	8	1:1
<b>C3 (Co421)</b>	4	2:1
<b>C4 (Co821)</b>	8	2:1

Quatro tipos de complexos de glifosato com cobalto foram utilizados, havendo dois diferentes valores de pH e duas formas estequiométricas distintas. A Tabela 2 apresenta os complexos de cobre.

**Tabela 2. Complexos de glifosato com cobre sintetizados sob diferentes valores de pH e estequiometria.**

<b>Complexos de cobre</b>	<b>pH</b>	<b>Estequiometria glifosato:níquel</b>
<b>C5 (Cu411)</b>	4	1:1
<b>C6 (Cu511)</b>	5	1:1
<b>C7 (Cu811)</b>	8	1:1
<b>C8 (Cu421)</b>	4	2:1
<b>C9 (Cu521)</b>	5	2:1
<b>C10 (Cu821)</b>	8	2:1

Seis tipos de complexos de glifosato com cobre foram utilizados neste trabalho, havendo três diferentes valores de pH e duas formas estequiométricas distintas. A Tabela 3, por sua vez, apresenta os complexos de níquel.

**Tabela 3. Complexos de glifosato com níquel sintetizados sob diferentes valores de pH e estequiometria.**

<b>Complexos de níquel</b>	<b>pH</b>	<b>Estequiometria glifosato:níquel</b>
<b>C11 (Ni411)</b>	4	1:1
<b>C12 (Ni811)</b>	8	1:1
<b>C13 (Ni421)</b>	4	2:1
<b>C14 (Ni821)</b>	8	2:1

Os complexos de níquel foram sintetizados com dois valores distintos de pH e duas formas estequiométricas diferentes.

Os 14 complexos, assim como Roundup WG e glifosato purificado, foram colocados em água Milli-Q para preparo de soluções a 0,25 mM.

Para o ensaio com doses maiores de tratamento, foram preparadas soluções de 2,5 mM de glifosato purificado, Roundup WG® e de dois complexos metálicos de glifosato: Cu421 e Co821. O primeiro número se refere ao pH utilizado no processo de síntese destes compostos e os dois números seguintes se referem à estequiometria glifosato:metal, como mostrado nas tabelas anteriores.

### **3.3 Preparo dos homogeneizados de soja transgênica e de *B. decumbens***

As folhas destas duas espécies foram maceradas em nitrogênio líquido. O homogeneizado, após maceração, foi preparado em tampão Hepes (ácido N-(2-hidroxi)etil)piperazina-N'-2-etanossulfônico) 57 mM pH 7,0 (1:4, p/v). Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados (1.500 rpm por 15 min a 2°C). Os homogeneizados de *B. decumbens* do segundo e do terceiro experimentos *in vivo* foram feitos com uma proporção de 1:10 (p/v) de modo a facilitar o processo de homogeneização.

Após centrifugação, os sobrenadantes foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até os ensaios de atividade. A Figura 9 apresenta as diferentes etapas do preparo do homogeneizado de *B. decumbens*.



Figura 9: Preparo do homogeneizado de *B. decumbens*: A) Folhas de *B. decumbens*. B) Folhas com tampão Hepes 57 mM pH 7,0 congeladas com nitrogênio líquido e homogeneizadas no graal com pistilo. C) Homogeneizado após centrifugação. A parte de cima, de coloração verde clara, é o sobrenadante e a parte de baixo, de coloração verde escura, é o precipitado.

### 3.4 Determinação da concentração proteica dos homogeneizados

Utilizou-se o método de Peterson (1977) para a determinação da concentração de proteínas presente nos homogeneizados. Albumina sérica bovina (10 e 100  $\mu\text{g}$ ) foi utilizada como padrão.

### 3.5 Procedimentos necessários para quantificação de Pi

Para a quantificação de fosfato inorgânico foi utilizada, inicialmente, a metodologia proposta por Lanzetta et al. (1979). Posteriormente, entretanto, foi adotada uma metodologia baseada em Itaya e Ui (1966).

### **3.5.1 Preparo da solução colorimétrica**

Para a quantificação de Pi foi preparada uma solução colorimétrica utilizando verde de malaquita 0,2% e molibdato de amônio 4,2% em ácido clorídrico 5N, na proporção de 3:1, respectivamente, como prescrito por Itaya e Ui (1966). Misturou-se com agitador mecânico durante 20 minutos. A solução foi centrifugada durante 5 minutos a 2.000 g. O precipitado foi descartado e o sobrenadante (solução colorimétrica) foi armazenado em armário e sob proteção de luz para uso posterior.

### **3.5.2 Construção da curva-padrão de Pi**

Para preparo da curva-padrão de Pi foram colocados: 100  $\mu$ L da amostra de fosfato (em diferentes concentrações), 500  $\mu$ L da solução colorimétrica e 150  $\mu$ L de Tween 20 a 1,5%, proporções estas, preconizadas por Itaya e Ui (1966). A solução final foi lida em espectrofotômetro a 655 nm.

### **3.6 Determinação da atividade de EPSPs**

A atividade de EPSPs foi estimada com base na curva-padrão de Pi, apresentada no item 3.4.2, seguindo-se a metodologia proposta por Forlani et al. (1994) e Gonçalves et al. (2002) com adaptações.

No meio reacional (50  $\mu$ L) foi adicionado inicialmente volume de amostra vegetal correspondente a 0,03 mg de proteína, 10  $\mu$ L de chiquimato-3-fosfato (S3P) 5 mM, 10  $\mu$ L de fosfoenolpiruvato (PEP) 5 mM e tampão Hepes 57 mM pH 7,0. Após 30 minutos de incubação a 37°C, a reação foi paralisada pela adição de 250  $\mu$ L da solução colorimétrica e 75  $\mu$ L de Tween 20 a 1,5 %, proporções usadas anteriormente na curva-padrão de fosfato. A absorvância foi medida em um leitor de ELISA a 655 nm, como mostra a Figura 10.

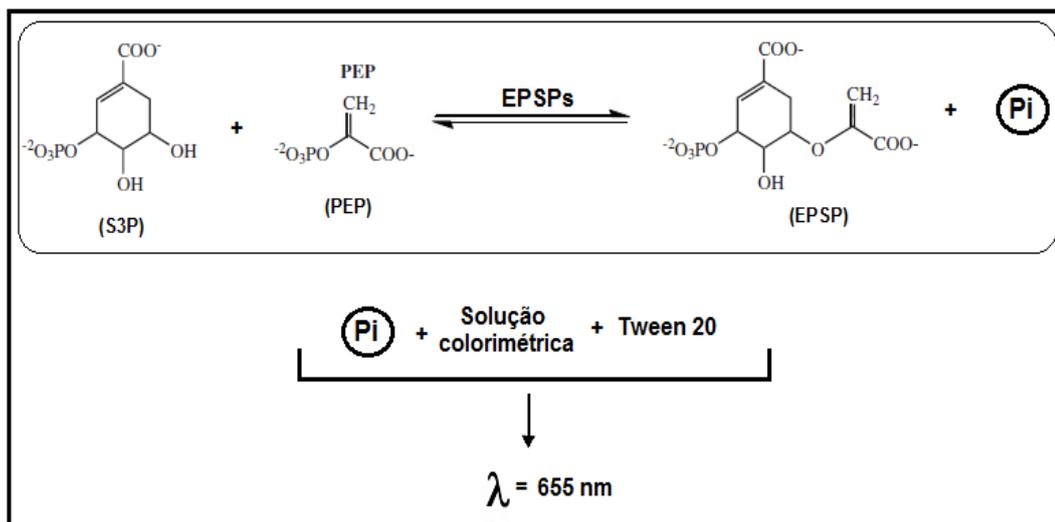


Figura 10: Ensaio de EPSPs. A catálise enzimática de EPSPs libera fosfato inorgânico livre. O ensaio desta enzima, portanto, consiste em quantificar este Pi através do uso de Tween 20 e de solução colorimétrica (verde de malaquita e molibdato de amônio em HCl) em um comprimento de onda de 655 nm.

A atividade enzimática foi determinada através do uso da equação da reta obtida a partir da curva-padrão de fosfato. O coeficiente de absorvidade molar nestas condições é de  $75.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

Branco foram feitos sem adição de chiquimato-3-fosfato e fosfoenolpiruvato.

### 3.7 Análise do efeito *in vitro* dos compostos sobre a atividade de EPSPs

Inicialmente foi avaliado o efeito *in vitro* de todos os compostos a 0,05 mM de concentração final sobre a atividade de EPSPs. Estes compostos foram o Roundup WG, glifosato purificado e os 14 complexos de glifosato com cobre, cobalto e níquel.

Após ser feita a seleção dos dois melhores complexos, Cu421 e Co821, foram adicionados volumes dos compostos suficientes para obter concentração final de 0,5 mM dos mesmos. Estas concentrações foram baseadas nos estudos de Rubin et al. (1984).

### 3.8 Determinação da atividade de PAL

A atividade da PAL foi estimada com base na diferença de absorvância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico, seguindo-se a metodologia proposta por Barreto e Neto (2011) com algumas modificações.

No meio reacional (1 mL) foi adicionado volume de amostra vegetal correspondente a 1 mg de proteína, tampão TRIS 0,5 M pH 8,5 e 160  $\mu$ L de fenilalanina 300  $\mu$ M. Após 30 minutos de incubação a 40°C, a reação foi paralisada com banho de gelo de 5 minutos. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro a 290 nm (Figura 11)

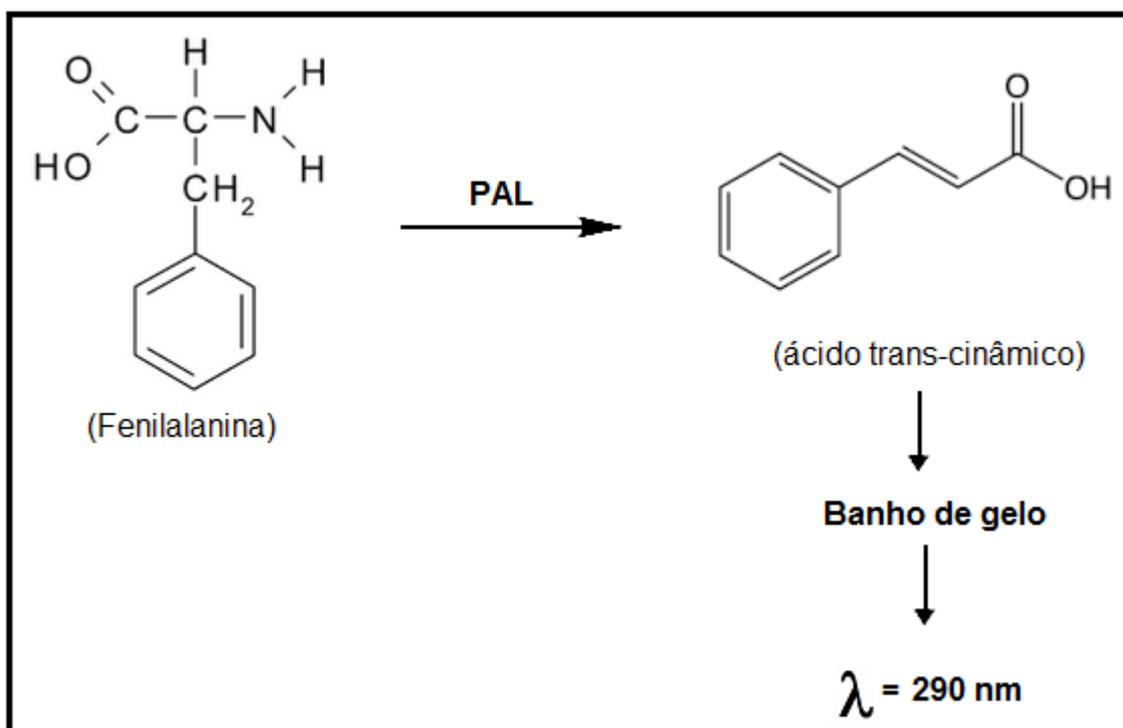


Figura 11: Ensaio de PAL. A catálise enzimática de PAL produz ácido trans-cinâmico e é paralisada através do banho de gelo. A leitura deste ensaio se dá no comprimento de onda de 655 nm.

A atividade enzimática foi determinada através do uso do coeficiente de absortividade molar  $10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965).

Branco foram feitos com adição de água destilada ao invés de fenilalanina.

### 3.9 Análise do efeito *in vitro* dos compostos sobre a atividade de PAL

Foram analisados os efeitos *in vitro* de Roundup WG, glifosato purificado e do complexo Cu421 sobre a atividade de PAL. Foram adicionados volumes destes compostos suficientes para obter uma concentração final de 0,5 mM dos mesmos.

Todos os ensaios enzimáticos foram realizados em duplicata.

### **3.10 Análise da presença de nitrato no complexo Cu421**

Para avaliar a presença de nitrato no complexo Cu421 utilizou-se a metodologia proposta por Miranda et al. (2001), que se baseia na conversão de nitrato (presente nas amostras) em nitrito. Para isto, foram preparados três reagentes que foram misturados na proporção 1:1:2, no momento da análise: N-naftil etilenodiamina 0,02%, sulfanilamida 0,4% em HCl 1 M e cloreto de vanádio 0,5% em HCl 1M, respectivamente.

No meio reacional foram adicionados 30 µL de amostra de Cu421 a 6,6% e 60 µL da mistura de reagentes descrita acima. A reação foi incubada a 40°C durante 50 minutos. E, após a adição de 100 µL de água milli-Q, as absorvâncias foram lidas a 540 nm. Para obter a concentração de nitrato no complexo, sua absorvância foi comparada com uma curva-padrão de nitrato de potássio preparada no mesmo dia do ensaio. Este ensaio foi realizado em duplicata.

### **3.11 Experimento *in vivo* I**

Foi realizado um experimento em casa de vegetação (Figura 12) na qual foram cultivados: *B. decumbens* e soja glifosato resistente (TMG133RR).

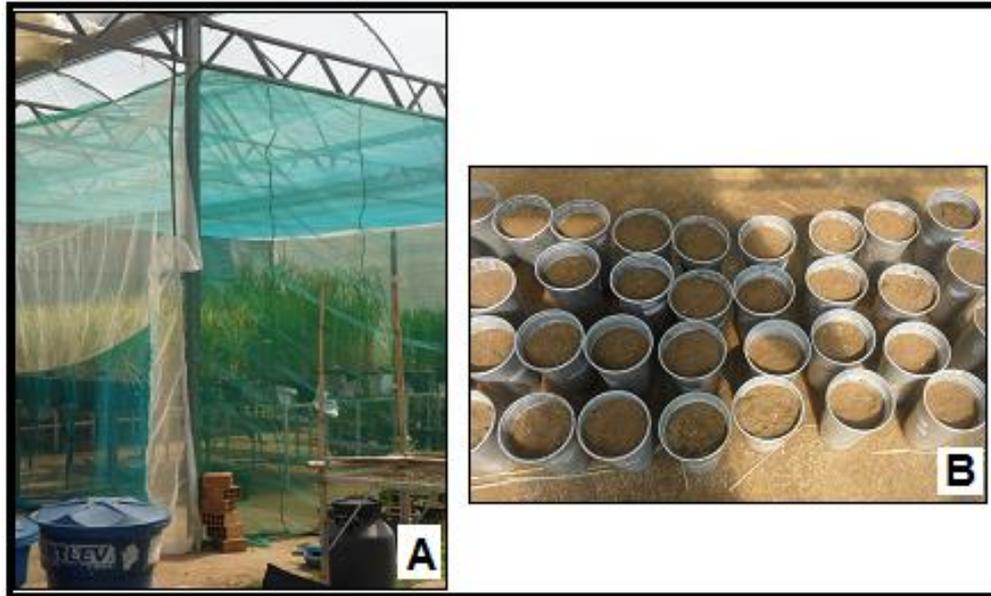


Figura 12: A) Casa de Vegetação do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ. B) Vasos contendo sementes de *B. decumbens* e soja resistente ao Roundup.

As unidades experimentais foram constituídas por vasos com capacidade de 5 dm<sup>3</sup>, preenchidos com amostras de solo, provenientes da camada de 0-20 cm de profundidade, coletadas na área do Campus Universitário, peneiradas em malha de 2 mm para separações de torrões, raízes e palhas. O solo foi adubado e teve sua acidez corrigida conforme recomendação para a cultura, com base na análise química de fertilidade do solo.

Foram aplicados quatro tratamentos: Roundup WG®, glifosato purificado, complexo Cu421 e complexo Co821, além do tratamento controle (somente água destilada). As plantas com tamanho adequado para o tratamento são apresentadas na Figura 13.



**Figura 13: Foto das plantas utilizadas no primeiro experimento *in vivo*. Ao lado direito, a soja cultivada com *Brachiaria decumbens*. Ao lado esquerdo *B. decumbens* cultivada individualmente.**

Foi plantado um número maior que o necessário das duas espécies, de modo a possibilitar o descarte de plantas mais heterogêneas. O uso de plantas muito distintas umas das outras como, por exemplo, no tamanho, poderia prejudicar as posteriores análises.

O experimento foi conduzido com quatro repetições, em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 20 unidades experimentais para cada um dos cultivares. Os tratamentos foram aplicados 30 dias após a germinação, utilizando-se borrifadores manuais (Figura 14) seguindo-se a recomendação de aplicação do produto comercial [2,5 kg.ha<sup>-1</sup> do produto comercial, correspondente a 2 kg de ingrediente ativo/ha (i.a. ha<sup>-1</sup>)].



Figura 14: Soja e *Brachiaria decumbens* sendo tratadas com glifosato através de borrifador manual.

### 3.11.1 Determinação do Índice de Clorofila Falker (ICF)

Foi determinado o Índice de Clorofila Falker (ICF) (Figura 15) antes da aplicação dos tratamentos (no dia 0) e no dia da coleta (dia 4) utilizando-se o aparelho clorofiLOG CFL1030 (FALKER Automação Agrícola, Brasil).



**Figura 15: Determinação do Índice de Clorofila Falker em folha de *B. decumbens* utilizando o aparelho clorofiLOG CFL1030 (FALKER Automação Agrícola, Brasil).**

Foi calculada a diferença entre ICF no primeiro e no último dia e as plantas tratadas foram comparadas com as plantas do grupo controle.

### **3.11.2 Coleta das plantas**

No quarto dia após a aplicação dos tratamentos foi avaliado o acúmulo de massa fresca e foi coletado 1 g de material fresco da parte aérea das plantas para determinação de concentração proteica e atividades enzimáticas (armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$ ) e 1 g para determinação dos teores de N-nitrato (CATALDO et al., 1975), após extração alcoólica seguida de partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984).

### **3.11.3 Extração alcoólica seguida de partição com clorofórmio**

Para realização da extração alcoólica, foi adicionado 1g de material fresco em 20 mL de etanol a 80% e o armazenamento se deu em frascos de vidro. Posteriormente, as amostras foram trituradas com politron e filtradas com quatro camadas de gaze e papel de filtro.

Foram feitas a transferência para funil de separação e a adição de clorofórmio (1:1). Após agitação leve, deixaram-se as amostras em repouso durante 40 minutos. Passado este tempo, foi feito o descarte da fração apolar. O sobrenadante, fração polar, foi avolumado para 25 mL através da adição de etanol 80%. Foi feito, então, o armazenamento das amostras para posterior determinação dos teores de  $N-NO_3^-$ .

#### **3.11.4 Determinação dos teores de nitrogênio-nitrato ( $N-NO_3^-$ )**

Para determinação do teor de nitrogênio, em forma de nitrato, utilizou-se a metodologia proposta por Cataldo et al. (1975).

Para esta análise preparou-se uma solução de ácido salicílico a 5% em ácido sulfúrico. Adicionou-se 0,4 mL desta solução em um tubo de ensaio, juntamente com 0,1 mL da fração solúvel obtida no item anterior. Deixou-se este tubo em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 9,5 mL de NaOH 2N, de forma lenta. A leitura foi feita a 410 nm, após resfriamento da solução final. Para obter o teor de  $N-NO_3^-$  nas amostras, as respectivas absorvâncias foram comparadas com uma curva-padrão de nitrato de potássio preparada no mesmo dia do ensaio.

#### **3.12 Experimento *in vivo* II**

No segundo experimento *in vivo* foram aplicados apenas três tratamentos: Roundup WG®, glifosato purificado e complexo Cu421, além do tratamento controle (somente água destilada). Todos os compostos tiveram a concentração de 2 kg i.a. ha<sup>-1</sup>. Nestes experimentos foi utilizado 0,5% de óleo mineral puro (Multilab) em todos os tratamentos como forma de reduzir a tensão superficial e a fim de evitar a perda da solução com os compostos por escorrimento.

No segundo experimento analisou-se o efeito dos tratamentos somente em *B. decumbens*, em dez dias de tratamento.

O ICF foi mensurado no dia 0, antes da aplicação dos respectivos tratamentos e no dia da coleta (dia 9). Após a coleta, as folhas foram congeladas e os ensaios de dosagem de proteína e atividade enzimática foram realizados.

Os experimentos foram conduzidos com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 12 unidades experimentais em cada.

### **3.13 Experimento *in vivo* III**

Os tratamentos utilizados neste terceiro experimento foram idênticos ao do experimento *in vivo* II. No terceiro experimento, entretanto, analisou-se *B. decumbens* e soja glifosato resistente (BRS FAVORITA), em oito dias de tratamento.

O ICF de soja foi mensurado no dia 0, antes da aplicação dos respectivos tratamentos e no dia da coleta (dia 7). O ICF de *B. decumbens* não foi mensurado no experimento *in vivo* III devido ao pequeno tamanho das folhas.

Após a coleta, todas as folhas foram congeladas e os ensaios de dosagem de proteína e atividade enzimática foram realizados.

Os experimentos foram conduzidos com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, totalizando 12 unidades experimentais em cada.

### **3.14 Análise estatística**

Para análise estatística dos resultados obtidos sobre atividades enzimáticas foi utilizado o teste T de student com limite de confiança de 95%.

Para análise estatística da determinação de concentração proteica e de teores de N-nitrato empregou-se o Teste de Tukey com limite de confiança de 95% utilizando-se o programa Sisvar para Windows versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da concentração proteica dos homogeneizados

Os primeiros ensaios foram realizados com amostras de folhas de *B. decumbens* e soja transgênica não tratadas com herbicidas, visando observar os efeitos *in vitro* dos compostos sobre enzimas destas duas espécies vegetais. Antes de dar início aos ensaios enzimáticos, entretanto, foi necessário a determinação da concentração proteica destas amostras.

A dosagem de proteína da amostra de *B. decumbens* revelou uma concentração proteica de 14,65 mg/mL e para o experimento de PAL a amostra apresentou uma concentração de 12,14 mg/mL. No caso de soja transgênica, utilizou-se o mesmo homogeneizado para os dois ensaios enzimáticos, o qual obteve concentração proteica de 12,69 mg/mL. Estes valores são apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4. Concentração de proteína dos homogeneizados utilizados nos ensaios *in vitro* de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) e fenilalanina amônia liase (PAL).**

	EPSPs	PAL
<i>Brachiaria decumbens</i>	14,65 mg/mL	12,14 mg/mL
Soja transgênica	12,69 mg/mL	12,69 mg/mL

Como se utiliza uma baixa quantidade de proteína no ensaio de EPSPs, os homogeneizados para a análise desta enzima foram diluídos cinco vezes.

### 4.2 Quantificação de fosfato inorgânico livre

A quantificação de Pi é uma metodologia que permite avaliar a atividade da EPSPs, uma vez que na catálise desta enzima há formação de Pi livre, com estequiometria 1:1. Para cada molécula de EPSP formada, há a liberação de 1 Pi.

O método de Itaya e Ui (1966), ao qual este trabalho se baseou, é simples, de baixo custo e sensível. Lanzetta et al. (1979), entretanto, mostraram que a adição de citrato, reagente ausente na metodologia de Itaya e Ui (1966), era capaz de tornar esta quantificação, insensível a Pi produzido posteriormente, como por hidrólise de ATP; tornando este método quantitativo mais estável e confiável. No entanto, ao adicionar citrato nas soluções do presente estudo, inesperadamente os valores de absorvância tornavam-se muito instáveis.

Lanzetta et al. (1979) preconizou que o citrato fosse adicionado após 1 minuto da adição da solução colorimétrica composta por verde de malaquita, molibdato de amônio e sterox (detergente) e, segundo os autores, a absorvância poderia ser lida imediatamente após a adição de citrato.

Neste trabalho o citrato foi adicionado conforme descrito por estes autores, entretanto, ao ser observada a instabilidade dos valores de absorvância, alterações na metodologia foram testadas também. Passou-se a adicionar o citrato após um tempo maior da adição de solução colorimétrica, como 20 minutos e 30 minutos, e a instabilidade permaneceu. Foi testada também a espera de 15 minutos após a adição de citrato para que fosse feita a leitura da absorvância, como realizado por Forlani et al. (1994) e Gonçalves et al. (2002) e ainda assim, a instabilidade permaneceu.

Desta forma, optou-se por testar a metodologia baseada em Itaya e Ui (1966) em quantidades de Pi entre 0,25 e 10 nmoL. A solução colorimétrica obtida após centrifugação e utilizada nestes ensaios é apresentada na Figura 16.

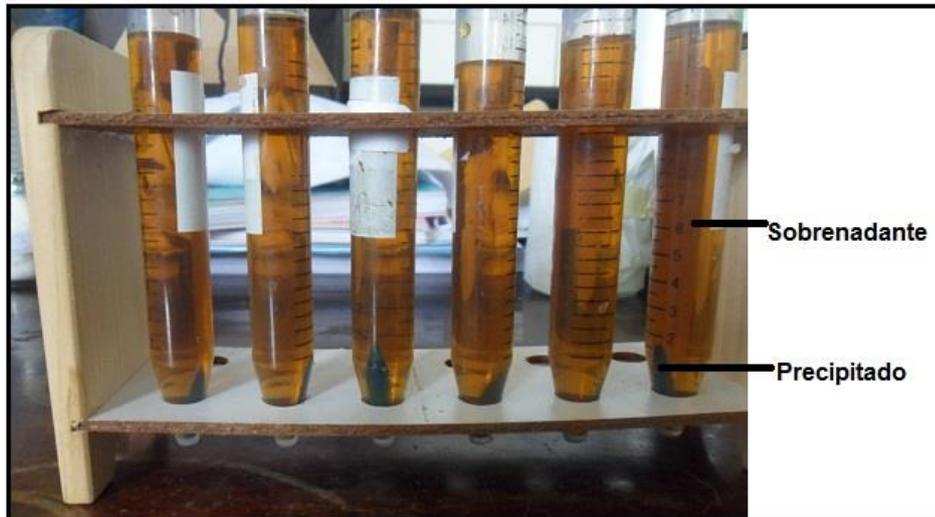


Figura 16: Solução colorimétrica (sobrenadante de coloração marrom) após centrifugação.

A curva padrão encontrada mostrou que este método apresentou boa precisão e sensibilidade, pois os valores de absorvância foram proporcionais à concentração de Pi, como mostra a Figura 17. Desta forma, passou-se a adotá-lo nos experimentos posteriores.

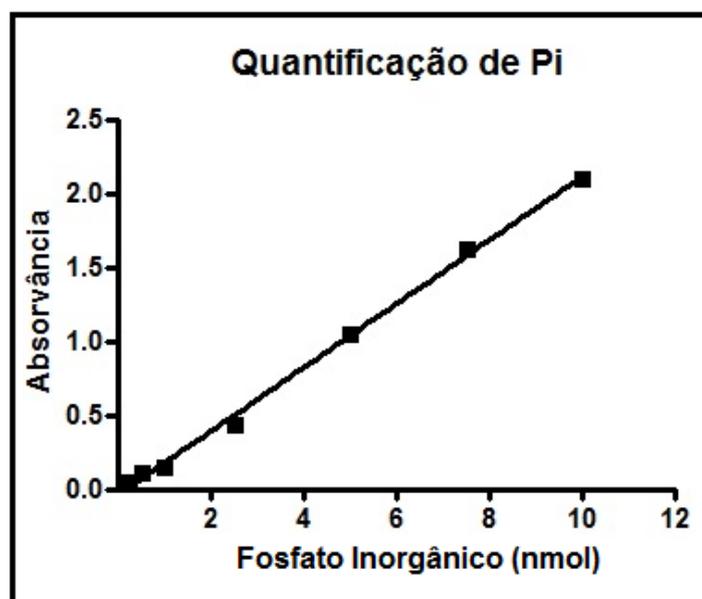


Figura 17: Curva-padrão de fosfato inorgânico. Metodologia baseada em Itaya e Ui (1966). O experimento foi realizado em duplicata.

Após a padronização da metodologia para quantificação de fosfato inorgânico e a partir da curva padrão apresentada na Figura 17, construiu-se a equação da reta (Figura 18).

$$[\text{Pi}] \text{ (nmol)} = (\text{Abs}_{655\text{nm}} + 0,03933) / 0,2154$$

Figura 18: Equação da reta determinada pela curva-padrão de fosfato inorgânico.

#### 4.3 Construção da curva de concentração proteica *versus* atividade de EPSPs

Para determinação da atividade da EPSPs, outros trabalhos, como de Gonçalves et al. (2002), também fizeram uso da quantificação de fosfato inorgânico. Outra forma de determinar a atividade da EPSPs é através da análise do acúmulo de chiquimato através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, como realizado no estudo de Cardinali et al. (2010). Entretanto, a quantificação de fosfato inorgânico através de espectrofotômetro é um método mais simples e de fácil execução que a cromatografia, tendo sido, por isso, utilizada neste trabalho.

Desta forma, as absorvâncias das soluções obtidas nos ensaios de EPSPs foram utilizadas na equação da reta apresentada na Figura 18. Para obter os valores da atividade enzimática em nmoL/min, foi construída uma planilha no programa EXCEL 2010 utilizando esta equação. Desta forma, foi possível obter o gráfico apresentado na Figura 19, através da adição de concentrações crescentes de proteína.

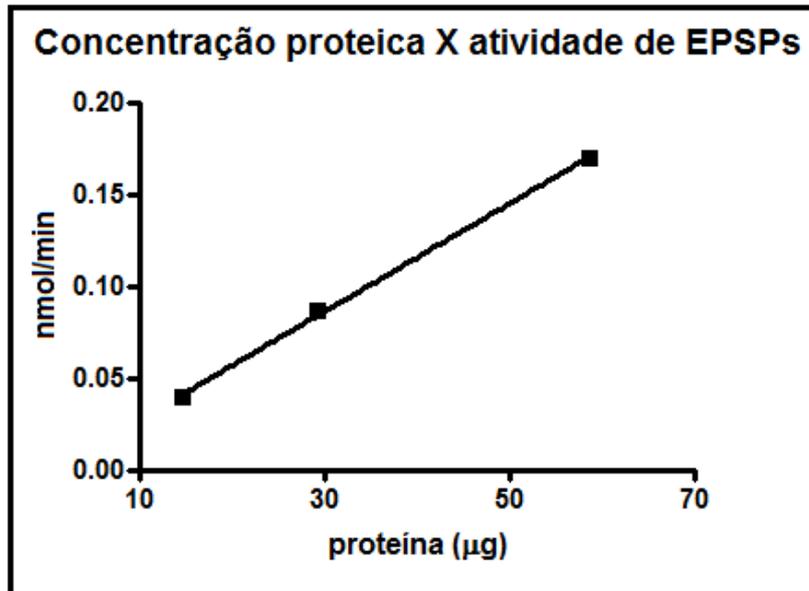


Figura 19: Curva de concentração de proteína versus atividade de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs) presente em amostra de *B. decumbens*. O experimento foi realizado em duplicata. O cálculo da atividade de EPSPs foi realizado através da equação da reta da curva-padrão de fosfato.

A Figura 19 mostra que a atividade da EPSPs de *B. decumbens* foi diretamente proporcional à concentração proteica, e que esta atividade é de aproximadamente 2,95 nmol de Pi.min<sup>-1</sup>.mg de proteína<sup>-1</sup>. Ao avaliar o gráfico acima, escolheu-se trabalhar com volumes de homogeneizado correspondentes a, em média, 30 µg de proteína para as posteriores análises de efeito dos compostos.

Após a realização da curva de concentração proteica *versus* atividade de EPSPs, foi construída uma curva semelhante para atividade da PAL.

#### 4.4 Construção da curva de concentração proteica *versus* atividade de PAL

Para o preparo da curva de concentração proteica *versus* atividade da PAL, foram lidas as absorvâncias das amostras (com concentrações crescentes de proteína) e foi construída uma planilha no programa EXCEL 2010 utilizando estes respectivos valores e o coeficiente de absorvidade molar 10<sup>4</sup> mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (ZUCKER, 1965). Com os respectivos valores de atividade enzimática obtidos, foi construído o gráfico abaixo (Figura 20).

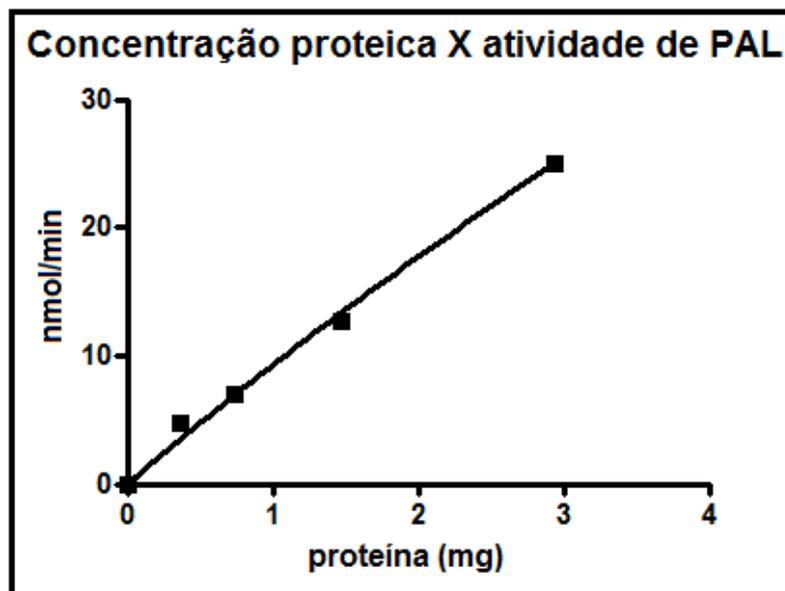


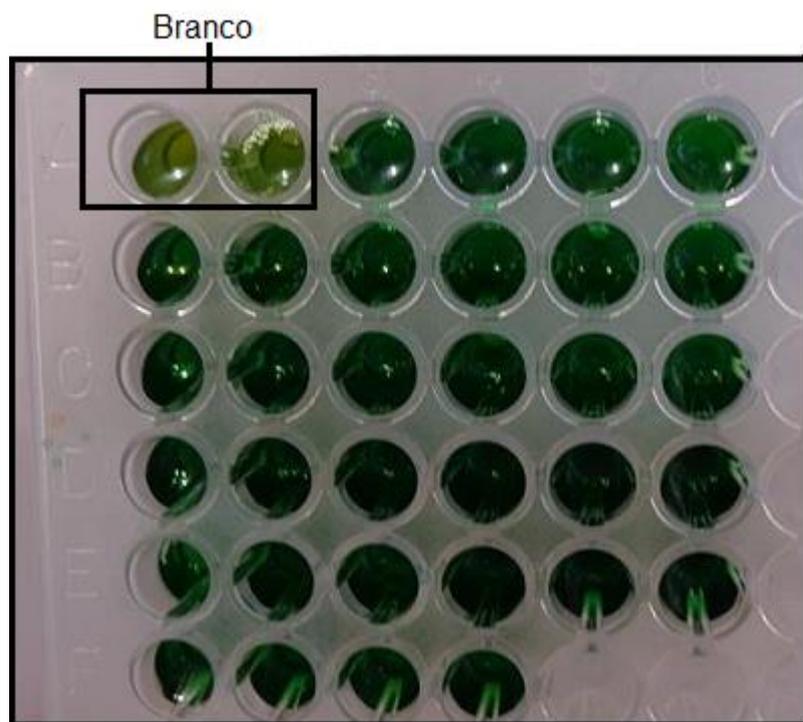
Figura 20: Curva de concentração de proteína versus atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) presente em amostra de *B. decumbens*. O experimento foi realizado em duplicata. O cálculo da atividade de PAL foi realizado através do coeficiente de extinção molar  $10^4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (ZUCKER, 1965).

A Figura 20 mostra que a atividade de PAL de *B. decumbens* foi diretamente proporcional à concentração proteica, e que esta atividade é de aproximadamente  $9,91 \text{ nmol ácido trans-cinâmico} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ . Ao avaliar o gráfico acima, escolheu-se trabalhar com volumes de homogeneizado correspondentes a, em média, 1 mg de proteína para as posteriores análises de efeito dos compostos.

Após a realização das curvas de concentração proteica *versus* atividade de EPSPs e de PAL, foram feitas as análises dos efeitos *in vitro* do glifosato purificado e dos complexos obtidos em colaboração com o Grupo de Síntese Inorgânica e Materiais do PPGQ.

#### 4.5 Determinação do efeito *in vitro* de complexos metálicos sobre atividade de EPSPs

A análise do efeito dos complexos metálicos sobre a atividade de EPSPs foi feita em microplaca como mostra a Figura 21. Também foi feito uma duplicata de brancos e uma duplicata de controles (sem tratamento) para comparação de atividade enzimática. Ainda foi avaliado o efeito do glifosato purificado sobre a atividade de EPSPs. O efeito de Roundup foi avaliado posteriormente.



**Figura 21: Microplaca com 34 poços ocupados. 1 duplicata de Brancos, 1 duplicata do controle (contendo todos os reagentes, sem nenhum tipo de tratamento), 1 duplicata com tratamento de glifosato purificado e 1 duplicata de cada complexo. Ao todo foram 14 complexos testados.**

A atividade obtida pelo controle de cada experimento (primeiramente com os complexos e o glifosato purificado; e posteriormente com Roundup) foi considerada 100% e as atividades obtidas com os tratamentos foram calculadas com base nesta porcentagem.

A partir dos dados obtidos nos dois experimentos e nos cálculos percentuais, foi possível obter o gráfico apresentado na Figura 22.

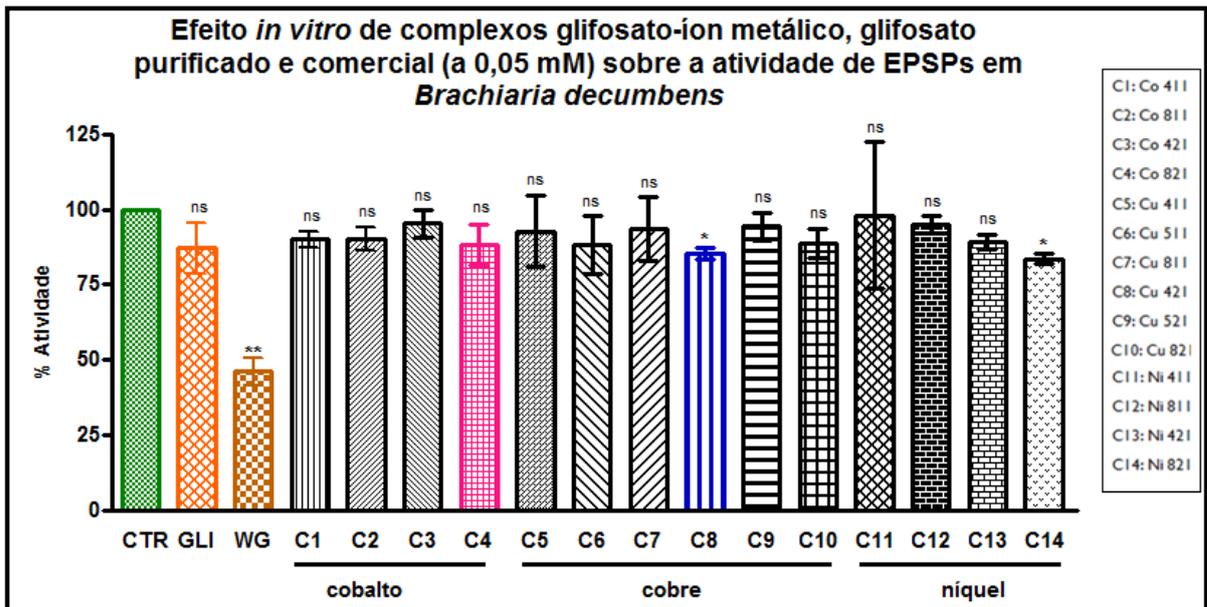


Figura 22: Efeito *in vitro* de glifosato e dos complexos metálicos sobre a atividade da EPSPs presente em homogeneizado de *B. decumbens*. CTR: Controle. GLI: glifosato. WG: Roundup WG®. C1 a C4: complexos de glifosato com cobalto. C5 a C10: complexos de glifosato com cobre. C11 a C14: complexos de glifosato com níquel. Na legenda que se encontra ao lado direito da figura, aparece o símbolo do elemento químico participante do complexo seguido de 3 números. O primeiro refere-se ao pH e os dois últimos à estequiometria (glifosato:metal). As colunas rosa (C4) e azul (C8) mostram os dois complexos selecionados para o experimento *in vivo*. O experimento foi realizado em duplicata. A média de atividade obtida no controle (CTR), 8,16 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Ao avaliar a Figura 22 é possível notar que além de Roundup WG® (com média de 53,69% de inibição), apenas os complexos Cu421 e Ni821 (C8 e C14 na Figura 21, respectivamente) inibiram de forma significativa a atividade de EPSPs. A atividade obtida no grupo controle foi, em média, de 8,16 nmoL/min/mg de proteína e a inibição média provocada pelos complexos de cobre e níquel foram percentualmente de 14,58 % e 16,39%, respectivamente.

É possível notar, portanto, que complexos utilizando um mesmo elemento podem apresentar resultados de eficácia distintos. Um exemplo disso ocorre com os complexos de cobre. Seis complexos de glifosato com cobre foram avaliados, e somente um deles foi capaz de inibir de forma significativa a atividade da EPSPs. Isto mostra que a forma como esta complexação ocorre interfere na eficácia do herbicida.

O complexo de cobre Cu421 foi selecionado para o experimento *in vivo*, entretanto, o complexo de níquel Ni821, que também inibiu de forma significativa a enzima-alvo, não pôde ser selecionado. Isto ocorreu porque o complexo Ni821 estava apresentando

dificuldade para a dissolução em água. Foi selecionado, então, o complexo de cobalto C4 (Co821), devido à facilidade em dissolvê-lo e uma vez que foi o complexo de cobalto que mais apresentou tendência inibitória (11,66%), embora esta não tenha sido estatisticamente significativa.

A síntese de complexos de glifosato com cobalto, cobre e níquel já havia sido feita. Heineke et al. (1994), por exemplo, sintetizaram complexo de glifosato com cobalto; Subramaniam e Hoggards (1988) sintetizaram complexos de glifosato com cobre e com níquel. Embora estes complexos sejam amplamente estudados, o efeito *in vitro* dos mesmos sobre a enzima-alvo do herbicida não foi estudado, não havendo dados disponíveis na literatura reportando estudos do seu efeito *in vitro*.

Alguns estudos, como de Wills e McWhorter (1985), mostraram que certos íons podem favorecer a fitotoxicidade do glifosato, como a adição de amônio e potássio. A adição de cátions di e trivalente, como o  $Zn^{+2}$  e  $Fe^{+3}$ , entretanto, podem vir a reduzi-la.

Todos os cátions deste estudo foram divalentes e dois deles (Cu421 e Ni821) foram capazes de aumentar, de forma significativa, o potencial inibitório de glifosato purificado sobre a EPSPs. Entretanto, o produto comercial foi o maior inibidor *in vitro* desta atividade enzimática neste primeiro ensaio.

Posteriormente, foi feito um novo ensaio com glifosato comercial (Roundup WG®) e purificado e com os dois complexos selecionados, Co821 e Cu421, com uma dosagem 10 vezes maior dos respectivos tratamentos, como mostra a Figura 23.

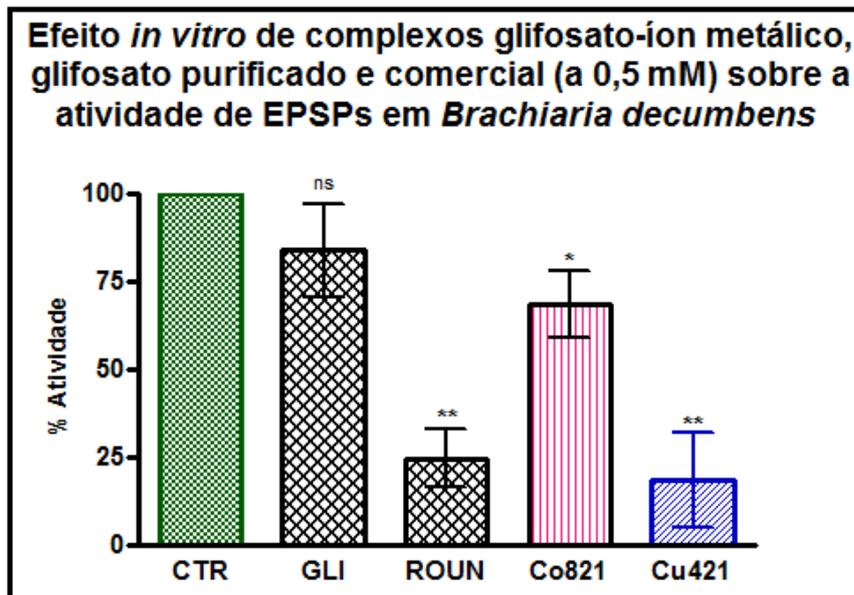


Figura 23: Porcentagem da atividade de EPSPs em amostra de *B. decumbens* na presença de glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexos glifosato-íon metálico (Co821 e Cu421). O experimento foi realizado em duplicata. A média de atividade obtida no controle (CTR), 2,34 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de EPSPs em comparação ao controle. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida pelo grupo controle neste experimento foi de 2,34 nmol/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 23, o complexo de cobalto na dose de 0,5 mM foi capaz de inibir de forma significativa a atividade enzimática (29,19%), embora esta percentagem tenha sido menor que a de Roundup (75,51%) e do complexo de cobre Cu421 (81,62%). Glifosato purificado não inibiu de forma significativa a atividade da enzima.

O fato de Roundup WG® mostrar-se mais eficaz na análise *in vitro* do que seu princípio ativo isolado (glifosato purificado) reforça a hipótese de que algum composto presente na formulação comercial possa aumentar o efeito do glifosato, através do processo de sinergismo. Este mecanismo ocorre quando a união de dois compostos diferentes promove um efeito maior do que quando estão isolados. No caso do presente estudo, supõe-se que a união de glifosato com o sal de amônio presente em Roundup WG®, torne a inibição da atividade da EPSPs mais pronunciada. No estudo de Carvalho et al. (2008), a adição de sulfato de amônio à calda do glifosato elevou o controle das plantas daninhas em campo, para as concentrações com até 10 g.L<sup>-1</sup>, o que fortalece esta hipótese.

O efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade de EPSPs em soja transgênica também foi avaliado. Os resultados são apresentados na Figura 24.

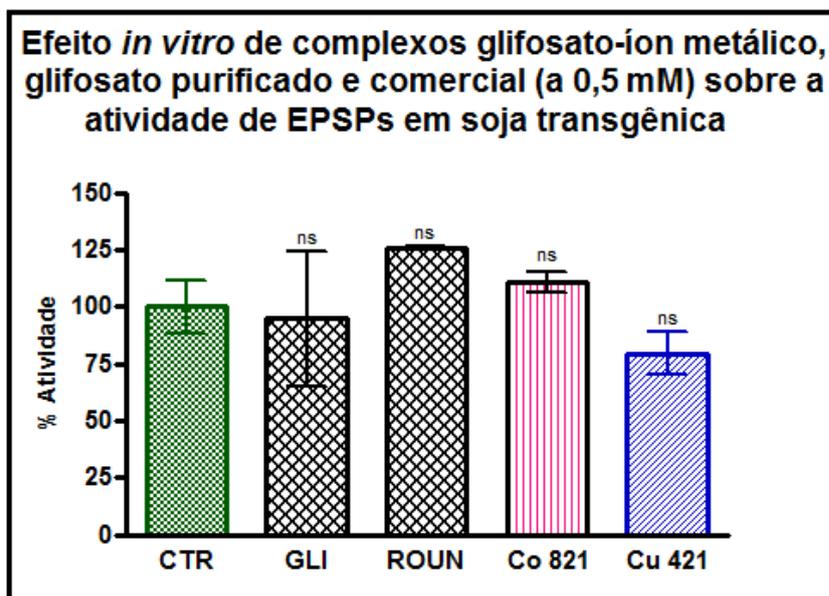


Figura 24: Porcentagem da atividade de EPSPs em amostra de soja transgênica (TMG133RR) na presença de glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexos glifosato-íon metálico (Co821 e Cu421). O experimento foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 6,02 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida pelo grupo controle foi de 6,02 nmol/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 23, nenhum dos tratamentos teve efeito significativo sobre a atividade de EPSPs em soja transgênica. Estes resultados já eram esperados, uma vez que a espécie vegetal usada consistia em uma planta resistente ao glifosato.

#### 4.6 Determinação do efeito *in vitro* de complexos metálicos sobre atividade de PAL

Outra enzima avaliada frente o uso dos tratamentos foi a fenilalanina amônia liase (PAL), uma vez que o glifosato, segundo alguns autores, pode apresentar efeito sobre a mesma. A Figura 25 apresenta o resultado dos tratamentos sobre esta enzima em *Brachiaria decumbens*.

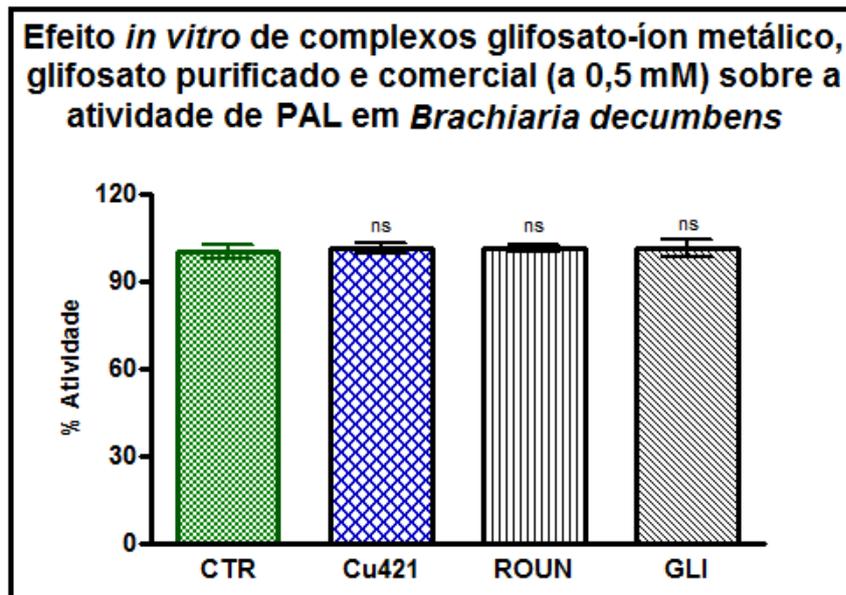


Figura 25: Porcentagem da atividade de PAL em amostra de *B. decumbens* na presença de glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421). O experimento foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 2,67 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida pelo grupo controle foi de 2,67 nmol/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 24, a atividade de PAL em *B. decumbens* não foi influenciada pelos tratamentos usados. Resultado semelhante é observado para soja transgênica, na Figura 26.

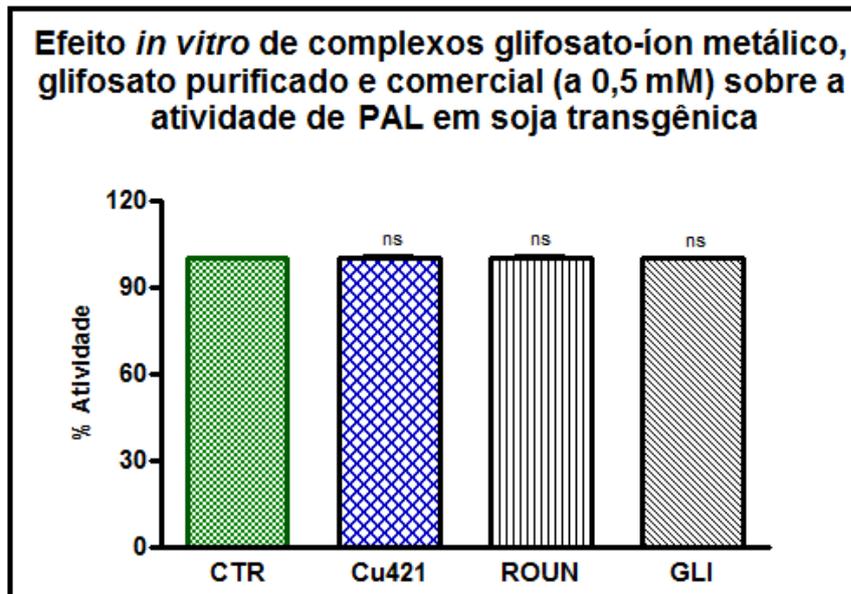


Figura 26: Porcentagem da atividade de PAL em amostra de soja transgênica (TMG133RR) na presença de glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421). O experimento foi realizado em duplicata. A atividade obtida no controle (CTR), 10,03 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade obtida no grupo controle de soja RR foi de 10,03 nmol/min/mg de proteína. Como evidenciado nas duas figuras acima, nenhuma das espécies vegetais teve a atividade de PAL influenciada pelo tratamento *in vitro* com os três compostos usados: complexo Cu421, Roundup WG® e glifosato purificado. Deve-se ressaltar que a baixa quantidade de complexo Co821 sintetizado fez com que este complexo não fosse utilizado em todos os experimentos. Esta baixa quantidade foi ocasionada por problemas no processo de síntese deste composto.

Os efeitos *in vitro* não significativos dos tratamentos sobre esta atividade enzimática eram esperados, uma vez que a PAL parece ser influenciada pelo glifosato como consequência da inibição da EPSPs. Segundo Silva et al. (2009b), o glifosato ao inibir a EPSPs, impede a formação de metabólitos secundários e, simultaneamente, a atividade da PAL é estimulada, promovendo elevação da síntese de compostos fenólicos.

Nos ensaios *in vitro*, ao colocar os tratamentos em contato com o homogeneizado das respectivas plantas, não houve condição suficiente para que ocorresse uma resposta metabólica de alteração da atividade da PAL posterior à inibição da EPSPs. Provavelmente por isso não houve alteração da atividade da fenilalanina amônia liase em *B. decumbens*. No

caso de soja transgênica, acredita-se que por ser uma planta resistente ao glifosato, não ocorreria uma alteração na atividade da PAL consequente à inibição de EPSPs.

Ao avaliar o efeito *in vitro* de glifosato sobre a PAL em uma planta não alterada geneticamente, Hoagland (1980) também não encontrou alteração na atividade desta enzima em concentrações de até 0,5 mM.

#### 4.7 Experimentos *in vivo* I, II e III

No experimento I foi avaliado o potencial herbicida de dois complexos: Cu421 e Co821. Nos experimentos seguintes, entretanto, manteve-se apenas o uso do complexo de cobre. Isto se deve a dois fatores: o complexo de Cu421 foi selecionado para os experimentos seguintes por ter apresentado maior potencial herbicida em comparação com o complexo de cobalto. Além disso, não foi possível a obtenção de complexo Co821 devido a problemas no processo de síntese deste composto.

Nos experimentos I e III foram utilizadas as duas espécies vegetais deste estudo: soja e *Brachiaria decumbens*. No experimento II, entretanto, somente foi utilizada a *Brachiaria*, devido a um problema na germinação de soja.

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise química da fertilidade do solo utilizado para cultivo de *B. decumbens* e soja transgênica nestes três experimentos. Não houve, portanto, necessidade de correção da fertilidade do solo.

**Tabela 5. Análise química da fertilidade do solo utilizado para cultivo das espécies vegetais utilizadas no experimento em casa de vegetação.**

I (H <sub>2</sub> O)	cmolc.dm <sup>3</sup>				mg.dm <sup>3</sup>		
	Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	H + Al <sup>+3</sup>	K <sup>+</sup>	Na <sup>+2</sup>	P
<b>6,17</b>	0,04	4,165	3,0825	1,3075	20,748	10,603	8,783

##### 4.7.1 Análise visual em *B. decumbens*

A primeira forma de avaliar o efeito dos diferentes tratamentos foi através da observação visual das folhas após a aplicação dos tratamentos. A Figura 27 apresenta as plantas tratadas com os diferentes compostos (experimento *in vivo* I), o que possibilita uma comparação com o grupo controle.

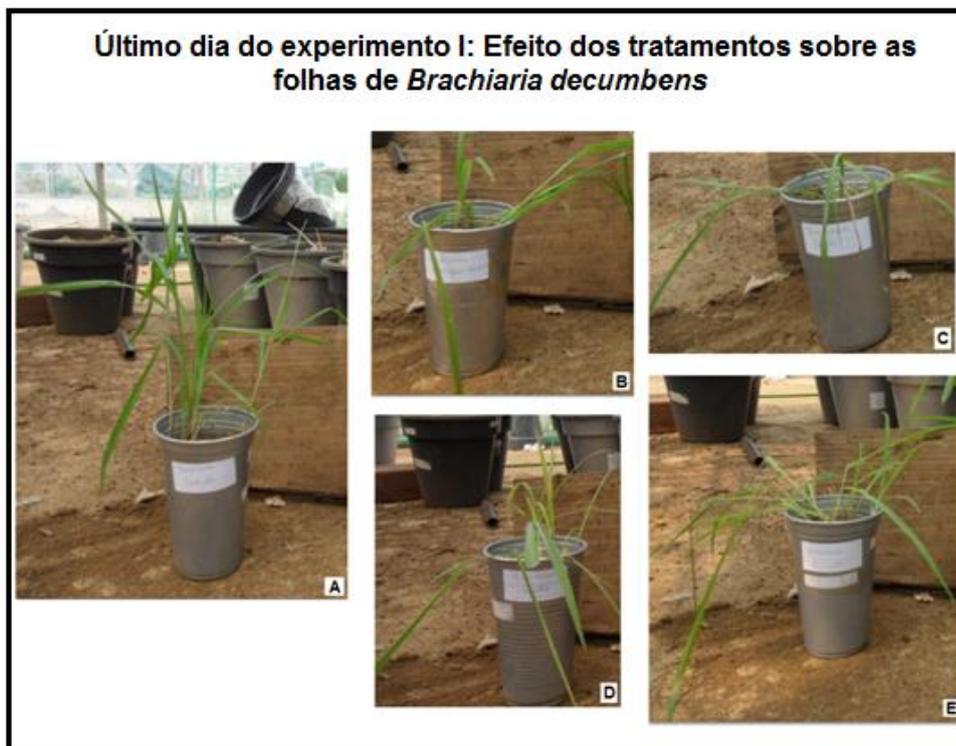


Figura 27: Plantas da espécie *B. decumbens* tratadas com água destilada (Controle) (A), glifosato purificado (B), Cu421 (C), Co821 (D) e Roundup WG® (E). Estas imagens foram obtidas no último dia do experimento *in vivo* I (Dia 4).

Como pode ser observado na Figura 27, as plantas tratadas com os quatro compostos apresentaram folhas mais quebradiças e encurvadas para baixo, além de coloração mais amarelada. Vale ressaltar que no dia em que as plantas foram tratadas, os cinco grupos possuíam plantas externamente semelhantes umas às outras. Segundo Rodrigues e Almeida (2005), a clorose (condição em que há baixa produção de clorofila), ocorre porque o glifosato, ao inibir a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, provoca o amarelecimento progressivo das folhas e morte das plantas.

No primeiro experimento em casa de vegetação, não foi utilizado óleo mineral, o que pode ter prejudicado o efeito dos tratamentos. Desta forma, as diferenças visuais entre plantas do grupo controle e as plantas tratadas com os compostos foram sutis.

Nos experimentos seguintes foi utilizado óleo, o que melhorou esta avaliação, assim como as outras que serão mostradas posteriormente. Além da adição de óleo mineral, outro aspecto positivo dos experimentos II e III foi o maior tempo de exposição aos tratamentos.

A Figura 28 mostra as plantas tratadas com Roundup, glifosato e complexo Cu421 no último dia do experimento III.

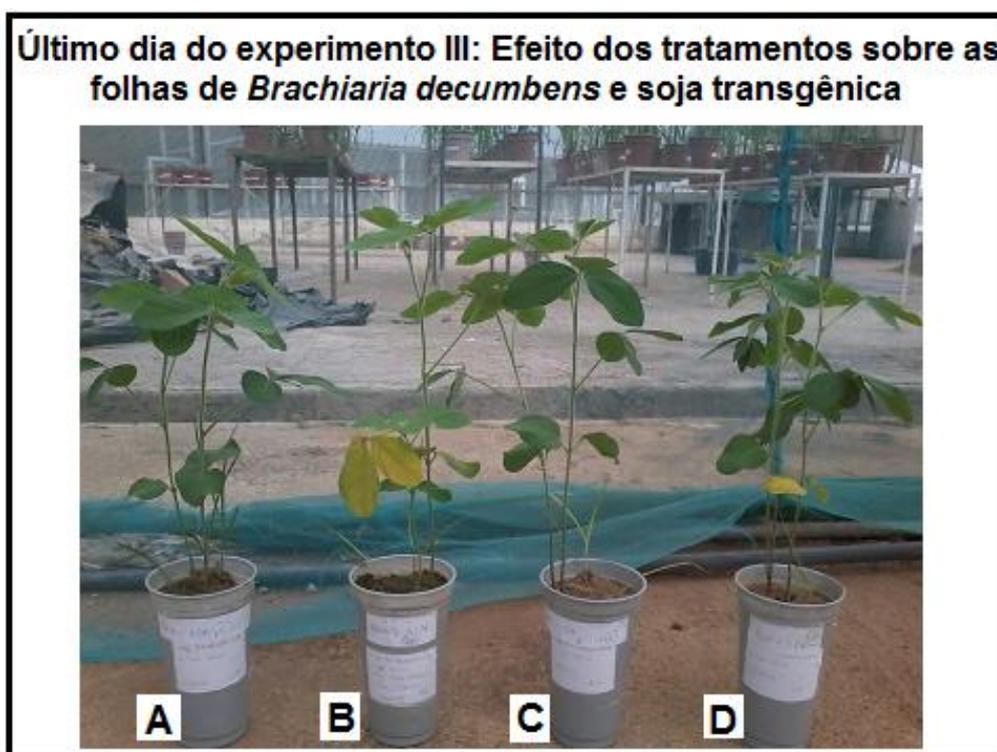


Figura 28: Plantas da espécie *B. decumbens* e *Glycine max* (variedade transgênica BRS FAVORITA) tratadas com água destilada (Controle) (A), Roundup WG® (B), glifosato purificado (C) e Cu421 (D). *Brachiaria decumbens* é o capim apresentado na fotografia, ou seja, as plantas mais baixas da figura. As plantas mais altas são soja transgênica. Estas imagens foram obtidas no último dia do experimento *in vivo* III (Dia 7).

É possível observar na Figura 28, que as folhas de *B. decumbens* estão em tamanho inferior às do experimento I, ambas fotografadas após o período de tratamento. A plantação de *B. decumbens* no experimento III demorou mais tempo para germinar do que as

plantas dos experimentos I e II. E, como o cultivo da braquiaria no terceiro experimento foi realizado utilizando-se o mesmo vaso de cultivo da soja transgênica, o tratamento precisou ser realizado imediatamente após os 30 dias de germinação da soja, para evitar o prejuízo desta cultura e sua posterior análise. Assim, no período de tratamento, as plantas do experimento III tiveram idade inferior às plantas dos experimentos anteriores.

A Figura 28 mostra que a soja transgênica é pouco influenciada pelos tratamentos, embora seja possível notar amarelecimento de algumas folhas nos tratamentos com Roundup (vaso B) e complexo Cu421 (vaso D). Esta mudança de coloração ocorrida em planta transgênica será melhor discutida no item seguinte, 4.7.2 “Análise visual em soja transgênica”.

A braquiaria, por sua vez, sofre efeito mais expressivo na presença dos três tratamentos, ocorrendo mudança significativa na coloração das folhas (algumas chegam a tornar-se amarronzadas). Além da alteração na coloração, é possível notar que as folhas apresentam-se caídas nos vasos relativos aos tratamentos com compostos de glifosato (B, C e D).

A Figura 29 apresenta, em destaque, o efeito do complexo Cu421 sobre os aspectos visuais das duas espécies vegetais estudadas neste trabalho.

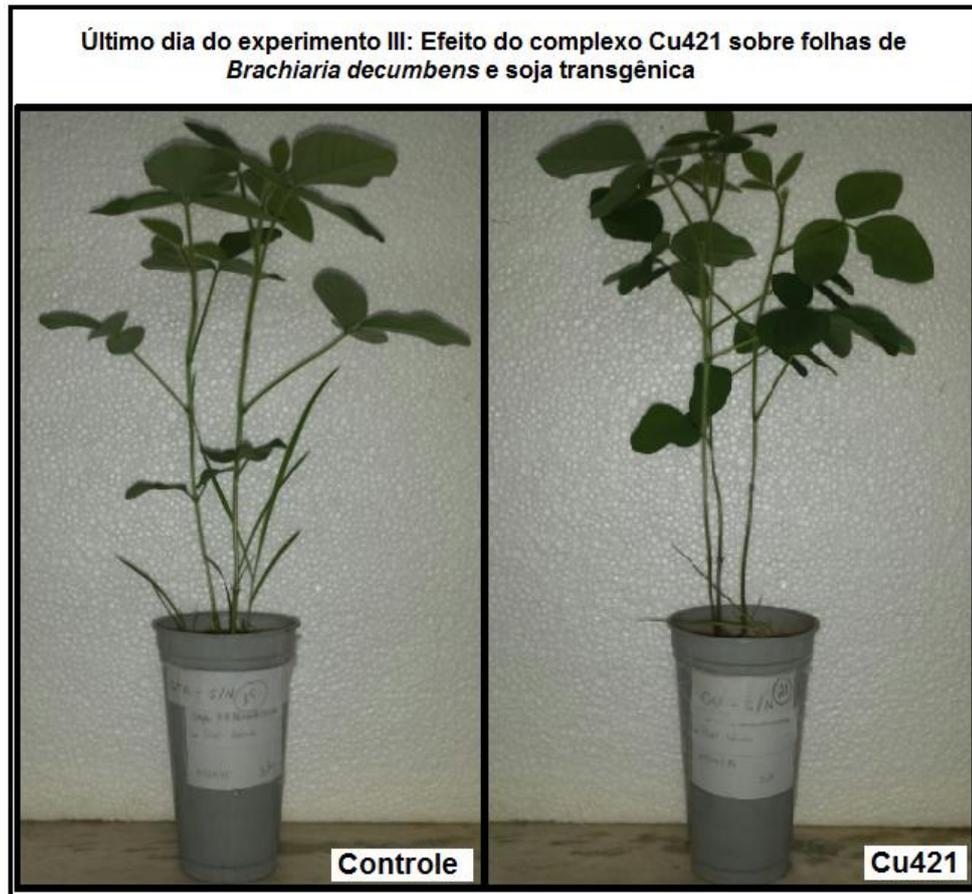
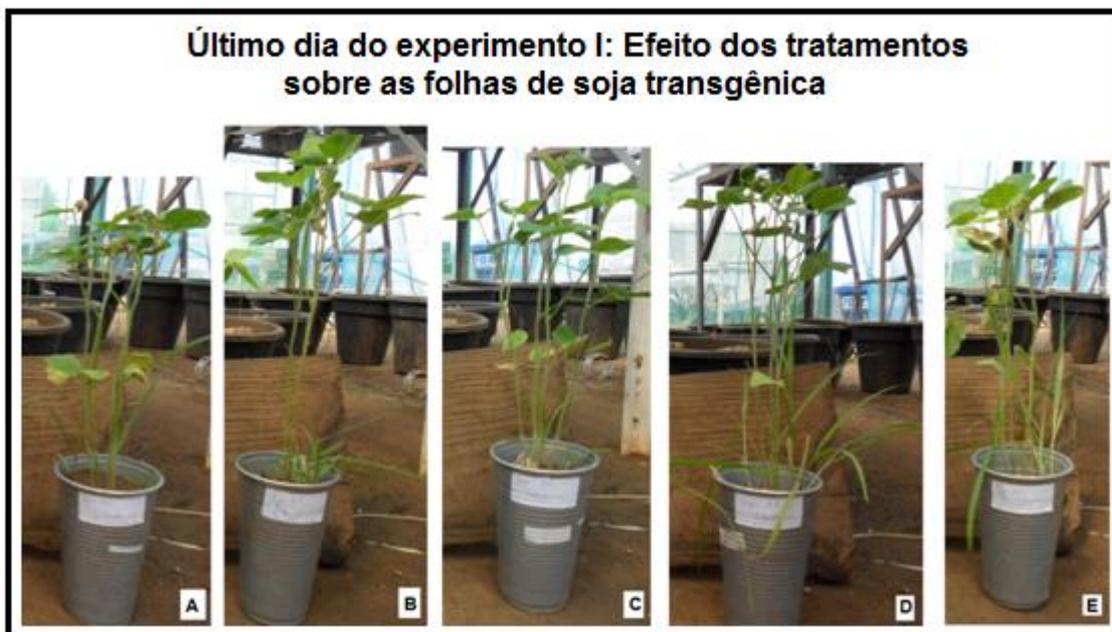


Figura 29: Plantas da espécie *B. decumbens* e *Glycine max* (variedade transgênica BRS FAVORITA) tratadas com água destilada (Controle) e Cu421. *Brachiaria decumbens* é o capim apresentado na fotografia, ou seja, as plantas mais baixas da figura. As plantas mais altas são soja transgênica. Estas imagens foram obtidas no último dia do experimento *in vivo* III (Dia 7).

#### 4.7.2 Análise visual em soja transgênica

Assim como foi feito em *B. decumbens*, a avaliação do efeito dos tratamentos sobre a soja transgênica iniciou-se na observação externa das folhas. A Figura 30 apresenta as plantas tratadas (variedade TMG133RR) no experimento I com os diferentes compostos, o que possibilita uma comparação com o grupo controle.



**Figura 30: Experimento I: Plantas de soja transgênica TMG133RR, consorciadas com *B. decumbens*, tratadas com água destilada (Controle) (A), glifosato purificado (B), Cu421 (C), Co821 (D) e Roundup WG® (E). O capim apresentado na fotografia é da espécie *B. decumbens*. As plantas mais altas são soja transgênica. Estas imagens foram obtidas no último dia do experimento *in vivo* I (Dia 4).**

Como pode ser observado na Figura 30, as plantas tratadas apresentam-se semelhantes às do grupo controle. É possível notar o amarelecimento de algumas folhas de soja. Segundo Basso et al. (2011), o amarelecimento da soja Roundup Ready após a aplicação do glifosato pode estar associado à deficiência momentânea de manganês. É possível que a adição do gene que dá a resistência ao herbicida possa ter alterado outros processos fisiológicos da planta. E ao fazer uso do glifosato em soja transgênica, este herbicida pode retardar o metabolismo do Mn, bem como ter um efeito adverso nas populações de microrganismos do solo que são responsáveis pela redução do elemento em forma disponível para a planta (GORDON, 2007).

No experimento *in vivo* II não foi feita análise de soja transgênica. No terceiro experimento foi utilizada soja de uma variedade diferente da utilizada no experimento I: variedade BRS FAVORITA.

No experimento III foi possível observar também um amarelecimento das folhas de soja transgênica tratadas com Cu421 e Roundup. Fotos referentes a este experimento foram apresentadas no item anterior “4.7.1 Análise visual em *B. decumbens*”.

Para confirmar as observações visuais das folhas, também foi feita a determinação de ICF, entre outras avaliações.

### 4.7.3 Determinação de ICF em *B. decumbens*

No primeiro experimento de *B. decumbens* não foi utilizado óleo mineral e o Índice de Clorofila Falker (ICF) foi mensurado no primeiro dia (dia 0) e no último dia (dia 4) de experimentos, como mostra a Figura 30.

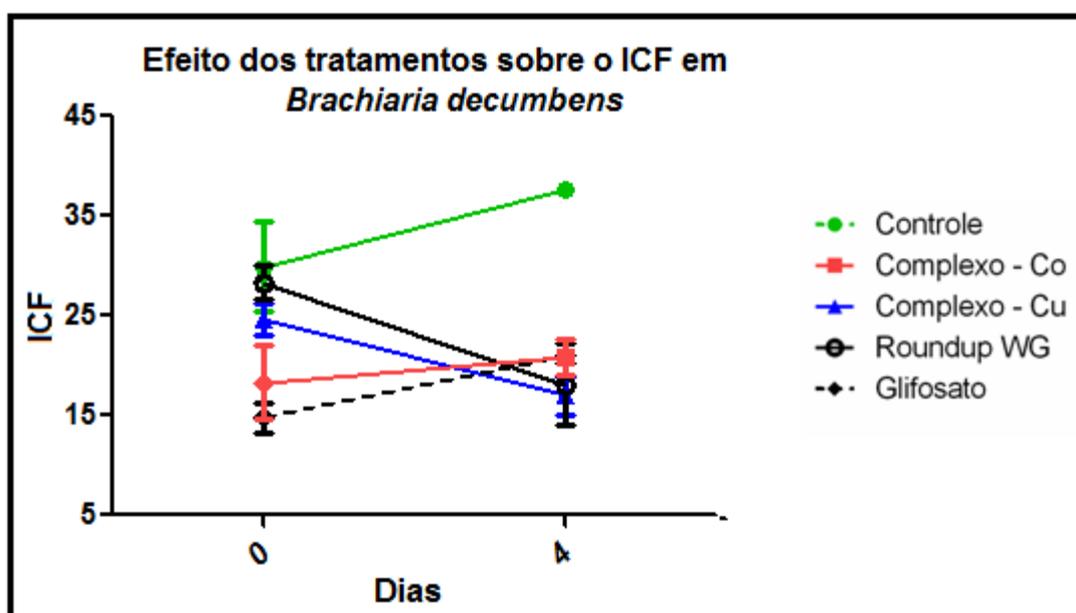


Figura 30: Experimento I: Índice de clorofila Falker (ICF) em *Brachiaria decumbens* tratadas com glifosato purificado, Roundup WG® e complexos de glifosato com cobre (Cu421) e cobalto (Co821). As barras verticais representam o  $\pm$  desvio padrão das quatro repetições.

Comparando-se os ICFs obtidos pelas plantas tratadas entre o último e o primeiro dias de experimento com o ICF das plantas do grupo controle foi possível observar uma queda neste índice ao fazer uso de Roundup WG® e complexo de cobre. A Tabela 6 apresenta a média dos ICFs das plantas e demonstra esta queda de forma mais clara.

**Tabela 6. Experimento I: Comparação do Índice de clorofila Falker (ICF) entre o último e o primeiro dias de experimento em *Brachiaria decumbens*.**

<b>Tratamentos</b>	<b>ICF<sub>0</sub> (Dia 0)</b>	<b>ICF<sub>4</sub> (Dia 4)</b>	<b>Comparativo (ICF<sub>4</sub> – ICF<sub>0</sub>)</b>
<b>Controle</b>	29,9	37,6	7,7
<b>Co821</b>	18,3	20,9	2,6
<b>Cu421</b>	24,7	17	- 7,7
<b>Roundup WG®</b>	28,3	18,1	- 10,2
<b>Glifosato</b>	14,8	21	6,2

É importante que se compare o último dia com o primeiro, para evitar falsos resultados positivos ou negativos. Ao fazer a comparação desta forma, tem-se um resultado mais confiável sobre o efeito dos tratamentos nos ICFs.

No segundo experimento *in vivo* foi colocado óleo mineral junto aos tratamentos. O óleo mineral é colocado com o objetivo de se reduzir a tensão superficial e, conseqüentemente, reduzir perdas dos compostos por escorrimento.

Com uso do óleo e com um aumento no tempo do tratamento (de cinco dias para dez dias), também foi possível observar inibição de ICF através do uso de glifosato purificado, como mostra a Figura 31.

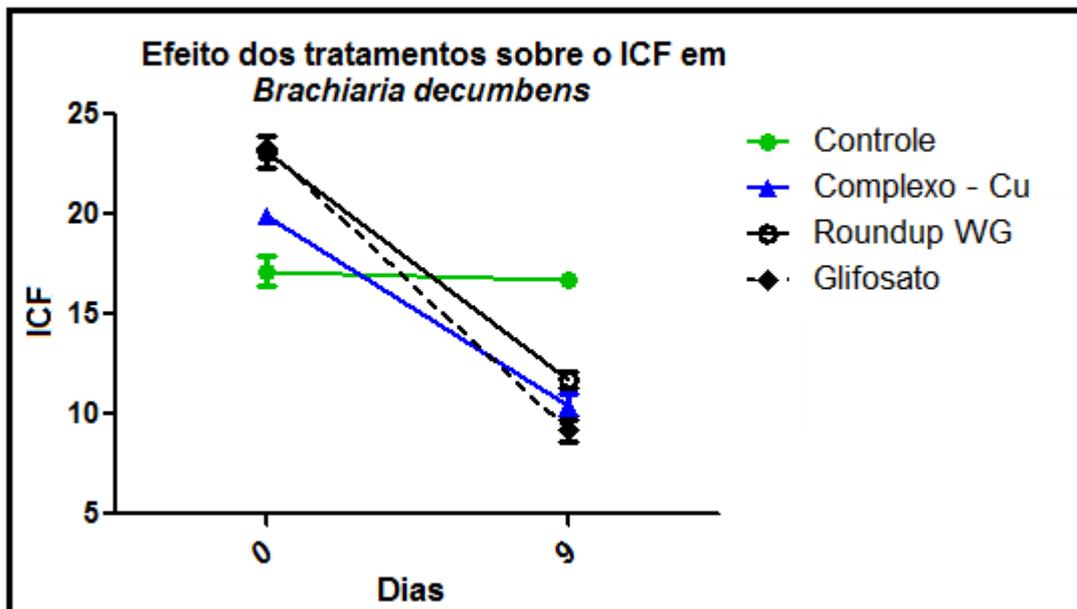


Figura 31: Experimento II: Índice de clorofila Falker (ICF) em *Brachiaria decumbens* tratadas com glifosato purificado, Roundup WG® e complexo de glifosato com cobre (Cu421). As barras verticais representam o  $\pm$  desvio padrão das três repetições.

Comparando-se os ICFs obtidos pelas plantas tratadas entre o último e o primeiro dias de experimento com os ICFs das plantas do grupo controle foi possível observar uma queda expressiva neste índice ao fazer uso dos três tratamentos (Roundup WG®, complexo de cobre e glifosato purificado). Hoagland (1980) também encontrou redução em clorofila total em plantas tratadas com glifosato. A Tabela 7 apresenta a média dos ICFs das plantas para demonstrar esta queda de forma mais clara.

**Tabela 7. Experimento II: Comparação do Índice de clorofila Falker (ICF) entre o último e o primeiro dias de experimento em *Brachiaria decumbens*.**

Tratamentos	ICF <sub>0</sub> (Dia 0)	ICF <sub>9</sub> (Dia 9)	Comparativo (ICF <sub>9</sub> – ICF <sub>0</sub> )
Controle	17,2	16,7	- 0,5
Cu421	19,9	10,5	- 9,4
Roundup WG®	23,1	11,7	- 11,4
Glifosato	23,3	9,2	- 14,1

Como é possível observar na Tabela 7, também há uma pequena queda de ICF no grupo controle. Esta queda, entretanto, pode ser considerada fisiológica e decorrente de estresse térmico. Apesar das plantas ficarem em uma casa de vegetação, muitas vezes o ambiente externo influencia no ambiente interno deste local, sobretudo em situações de calor excessivo.

Não foi possível avaliar o ICF nas folhas de *B. decumbens* do experimento III devido ao pequeno tamanho das mesmas.

#### 4.7.4 Determinação de ICF em soja transgênica

O ICF em folhas de soja foi mensurado no primeiro dia (dia 0) e no último dia (dia 4) de experimentos, como mostra a Figura 32.

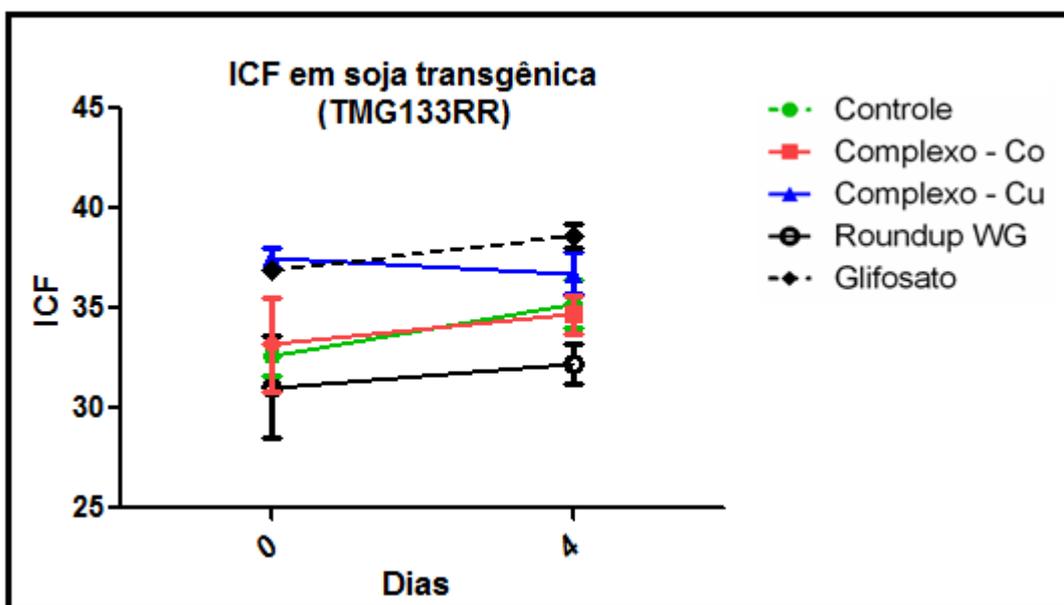


Figura 32: Experimento I: Índice de Clorofila Falker (ICF) em soja transgênica tratada com Roundup WG®, glifosato purificado e complexos de glifosato com cobre (Cu421) e cobalto (Co821). As barras verticais representam o  $\pm$  desvio padrão das quatro repetições.

Comparando-se os ICFs obtidos pelas plantas entre o último e o primeiro dias de experimento, foi possível observar que não ocorre alteração expressiva de ICF com nenhum

dos tratamentos utilizados. A Tabela 8 apresenta a média dos ICFs das plantas para demonstrar este fato de forma mais clara.

**Tabela 8. Experimento I: Comparação do Índice de clorofila Falker (ICF) entre o último e o primeiro dias de experimento em soja transgênica (TMG133RR)**

Tratamentos	ICF <sub>0</sub> (Dia 0)	ICF <sub>4</sub> (Dia 4)	ICF <sub>4</sub> – ICF <sub>0</sub>
<b>Controle</b>	32,6	35,2	2,6
<b>Co821</b>	33,2	34,7	1,5
<b>Cu421</b>	37,5	36,8	- 0,7
<b>Roundup WG®</b>	31,2	32,2	1
<b>Glifosato</b>	36,9	38,6	0,9

Como pode ser observado na Tabela 8, apenas o complexo de cobre gera uma leve queda no ICF. Esta leve redução, entretanto, pode ser considerada fisiológica uma vez que é expressa por um valor relativamente pequeno (- 0,7). No mesmo experimento realizado em *B. decumbens* (experimento I), este complexo reduziu o ICF em 7,7, ou seja, 11 vezes mais do que a redução provocada em soja transgênica.

No experimento III com soja transgênica de outra variedade (BRS FAVORITA) também foi avaliado o efeitos dos compostos sobre ICF, como mostra a Figura 33.

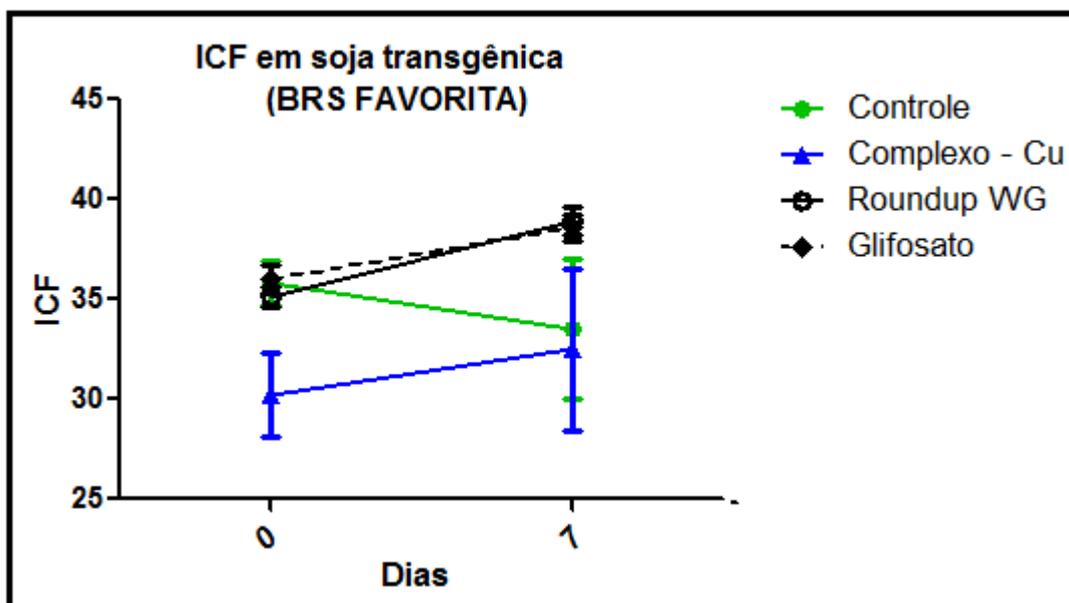


Figura 33: Experimento III: Índice de clorofila Falker (ICF) em soja transgênica tratada com Roundup WG®, glifosato purificado e complexo de glifosato com cobre (Cu421). As barras verticais representam o  $\pm$  desvio padrão das três repetições.

Comparando-se os ICFs obtidos pelas plantas entre o último e o primeiro dias de experimento, foi possível observar que não ocorre redução de ICF com nenhum dos tratamentos de glifosato utilizados. A Tabela 9 apresenta a média dos ICFs das plantas para demonstrar este fato de forma mais clara.

Tabela 9. Experimento III: Comparação do Índice de clorofila Falker (ICF) entre o último e o primeiro dias de experimento em soja transgênica (BRS FAVORITA)

Tratamentos	ICF <sub>0</sub> (Dia 0)	ICF <sub>7</sub> (Dia 7)	ICF <sub>7</sub> – ICF <sub>0</sub>
Controle	35,8	33,5	-2,3
Cu421	30,2	32,5	2,3
Roundup WG®	35,1	38,9	3,8
Glifosato	36	38,6	2,6

O fato dos tratamentos não alterarem de forma expressiva o ICF em duas variedades distintas de soja RR já era esperado, uma vez que se trata de culturas resistentes ao glifosato.

#### 4.7.5 Determinação dos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e de massa fresca em *B. decumbens*

No experimento I, avaliou-se o efeito dos diferentes tratamentos sobre teores de massa fresca e de N-nitrato na parte aérea de *B. decumbens*. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 10.

**Tabela 10. Experimento I: Massa fresca e teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na parte aérea de *Brachiaria decumbens* quatro dias após a aplicação dos tratamentos.**

Tratamentos	Massa fresca (g)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μmol.gmf <sup>-1</sup> )
Controle	1,47a	58,9b
Co821	0,98ab	63,65b
Cu421	0,43d	144,66a
Roundup WG®	0,60bc	61,75b
Glifosato	0,63bc	62,97b
CV (%)	27,47	6,45

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey, p<0,05).*

A Tabela 10 mostra que o complexo de cobre (Cu421) foi o que mais provocou redução da massa fresca e ainda possibilitou o aumento no teor solúvel de nitrato em partes aéreas de *B. decumbens*. Este aumento poderia ser devido a certos fatores como inibição na atividade de nitrato redutase ou à presença de nitrato nos complexos metálicos, uma vez que no preparo dos complexos são utilizados estes sais.

#### 4.7.6 Determinação dos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e de massa fresca em soja transgênica

Assim como em *B. decumbens* (experimento I), também foi analisado o efeito dos tratamentos sobre teores de nitrato e de massa fresca em soja transgênica. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11. Experimento I: Massa fresca e teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na parte aérea de soja transgênica (TG133RR) quatro dias após a aplicação dos tratamentos.**

Tratamentos	Massa fresca(g)	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μmol gmf <sup>-1</sup> )
Controle	1,25 b	18,18b
Complexo – Co	1,56b	21,93a
Complexo – Cu	1,62b	6,60d
Roundup WG®	1,32b	18,68ab
Glifosato	2,20a	11,60c
CV (%)	12,31	10,44

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey, p<0,05).*

Como é possível observar na Tabela 11, o uso de Roundup WG® e dos complexos não alterou de forma significativa o acúmulo de massa fresca em soja RR. A aplicação do glifosato purificado, entretanto, causou incremento significativo no acúmulo de massa fresca na soja transgênica. Maly et al (2006) ao estudar o efeito de glifosato sobre microorganismos simbiotróficos de soja também mostrou que este herbicida pode ter efeitos positivos sobre esta espécie vegetal, dependente da dose.

A aplicação do glifosato complexado com cobalto favoreceu o acúmulo de nitrato solúvel na soja, assim como o complexo de cobre em *B. decumbens*. Possivelmente também há presença de nitrato no complexo de cobalto. Entretanto, na soja RR, o complexo de cobre, assim como glifosato purificado, provocou redução no acúmulo de nitrato.

É possível sugerir que alterações na concentração de nitrato sejam devidas a influências dos tratamentos na atividade de nitrato redutase, como sugerido anteriormente por

Bellaloui et al. (2008) em seus trabalhos com soja RR e glifosato. Os resultados destes autores mostraram também que a assimilação de nitrato em soja RR foi mais afetada do que a fixação de nitrogênio por aplicação de glifosato e que a aplicação deste composto pode alterar o metabolismo do nitrogênio e carbono. Os estudos de Santos et al. (2007) também mostraram que glifosato é capaz de reduzir o teor de nitrogênio em soja resistente ao glifosato.

Devido às diferentes respostas das duas espécies na presença do complexo Cu421, procedeu-se com a análise de nitrato neste composto.

#### 4.7.7 Análise da presença de nitrato no complexo Cu421

Para analisar a presença de nitrato no complexo de glifosato com cobre (Cu421) foi necessária a realização da curva-padrão apresentada na Figura 34, utilizando-se nitrato de potássio.

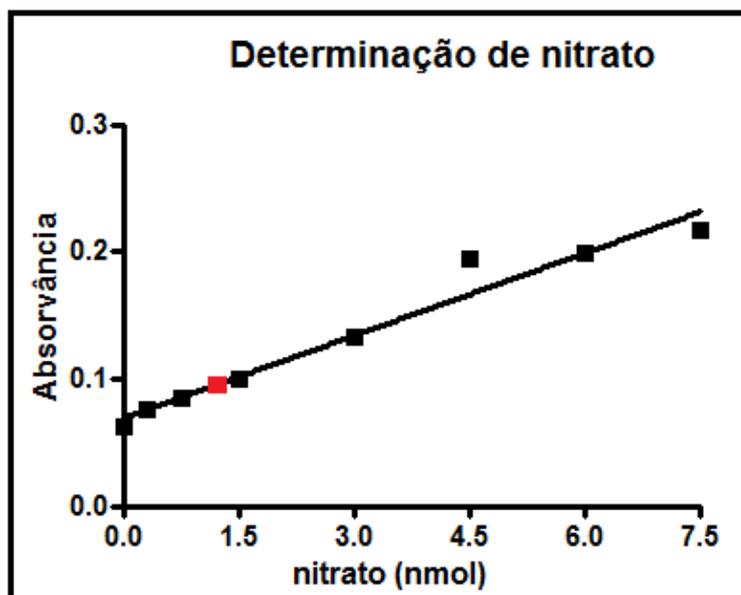


Figura 34: Curva-padrão de nitrato. Metodologia baseada em Miranda et al. (2001). O experimento foi realizado em duplicata. O quadrado vermelho simboliza a absorvância obtida pela solução do complexo Cu421.

A partir da curva-padrão acima, foi possível obter a equação da reta, demonstrada na Figura 35. Através desta equação, foi encontrada a quantidade de nitrato (nmol) presente em 2 mg de complexo Cu421.

$$[\text{NO}_3] \text{ (nmol)} = (\text{Abs}_{540} - 0,0695) / 0,0216$$

Figura 35: Equação da reta determinada pela curva-padrão de nitrato

Em 2 mg de complexo, portanto, há 1,2 nmol de nitrato, ou seja, aproximadamente 74 ng. Apesar de ser uma quantidade pequena de nitrato, sua presença no complexo Cu421 pode interferir no metabolismo vegetal, como foi observado pelo aumento do teor de  $\text{N-NO}_3^-$  na gramínea tratada com este complexo.

#### 4.7.8 Determinação da concentração de proteínas em *B. decumbens*

Antes de analisar o efeito dos diferentes tratamentos sobre as atividades enzimáticas, determinou-se a concentração de proteína dos homogeneizados. Os valores são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12. Concentração de proteína dos homogeneizados de *Brachiaria decumbens* nos experimentos *in vivo*.**

Tratamentos	Experimento I concentração proteica (mg/mL)	Experimento II concentração proteica (mg/mL)	Experimento III concentração proteica (mg/mL)
<b>Controle</b>	12,14a	4,87a	3,54b
<b>Co821</b>	10,4b	-	-
<b>Cu421</b>	8,24c	1,10d	5,38a
<b>Roundup WG®</b>	7,91c	2,16c	5,42a
<b>Glifosato</b>	6,49d	4,54b	3,53b
<b>CV (%)</b>	1,12	1,92	3,93

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey, p<0,05).*

É possível observar através da análise da Tabela 12 que os homogeneizados do primeiro experimento *in vivo* têm concentração proteica superior a dos homogeneizados dos experimentos seguintes. Esta diferença se deve ao fato das amostras do primeiro ensaio terem sido preparadas com a proporção de 1 g/4 mL de tampão, enquanto nos ensaios seguintes foram preparadas com a proporção de 1:10 (p/v), de modo a facilitar a homogeneização.

Também é possível notar uma diminuição significativa da concentração de proteínas na presença dos tratamentos nos experimentos I e II. Com exceção de glifosato purificado, esta redução é mais expressiva no segundo experimento, ou seja, na presença de óleo mineral e com um maior tempo de tratamento. Esta redução pode ser consequência do bloqueio da biossíntese de aminoácidos aromáticos decorrente da ação inibitória de glifosato sobre a formação do precursor EPSP. Este bloqueio, segundo Bervaldo et al. (2010), reduz os níveis de proteínas solúveis nos tecidos vegetais.

No caso do experimento III não houve redução na concentração de proteínas na presença dos tratamentos. Com uso de Roundup e complexo de cobre observou-se até um aumento desta concentração. Entretanto, é importante ressaltar que neste ensaio o preparo dos homogeneizados não foi feito de forma perfeitamente uniforme. Algumas amostras foram mais difíceis de serem trituradas após inserção do nitrogênio líquido do que outras. Assim,

algumas amostras precisaram de maior volume de tampão, o que pode ter prejudicado esta análise quantitativa.

Apesar de este aumento proteico poder decorrer do problema descrito sobre os volumes de tampão, há uma hipótese que poderia também justificar tal aumento. Diversos estudos têm mostrado que este fato pode ser consequência do sistema de defesa das plantas. No trabalho de Pazmiño et al. (2011) foi analisado o efeito de um herbicida sobre a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas ao estresse. Os resultados deste estudo mostraram aumento desta expressão na presença do herbicida. Desta forma, pode ter ocorrido o mesmo na presente pesquisa, o que justificaria o aumento encontrado na concentração de proteínas.

É importante ressaltar que a diferença entre os resultados encontrados nos experimentos pode ser justificada pela vasta gama de formas de defesa dos vegetais. Diversos fatores exercem influência sobre o sistema de defesa das plantas e um deles foi mostrado no trabalho de Pazmiño et al. (2011) e Yoon et al. (2011). Os resultados obtidos nos estudos destes autores mostraram que plantas de diferentes idades, por exemplo, podem reagir de formas distintas na presença de herbicidas. E, uma vez que as plantas do experimento III eram mais jovens do que as dos experimentos anteriores, esta justificativa se aplica ao resultado obtido.

#### **4.7.9 Determinação da concentração de proteínas em soja transgênica**

Assim como foi feito com *B. decumbens*, também foi necessária a dosagem de proteínas nas diferentes amostras de soja transgênica, antes da realização dos ensaios enzimáticos. Os valores desta dosagem são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13. Concentração de proteína dos homogeneizados de soja transgênica no experimento *in vivo*.**

Tratamentos	Soja TMG133RR	Soja BRS FAVORITA
	Experimento I	Experimento III
	Concentração proteica (mg/mL)	Concentração proteica (mg/mL)
Controle	12,69b	7,23b
Co821	16,01 <sup>a</sup>	-
Cu421	10,54c	3,61c
Roundup WG®	9,88c	10,88a
Glifosato	15,89 <sup>a</sup>	3,38c
CV (%)	1,79	3,50

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si (Teste de Tukey, p<0,05).*

Ao analisar a tabela 13 é possível observar que os tratamentos têm uma influência sobre a concentração proteica na planta transgênica. Devido ao problema no último experimento *in vivo*, mencionado no item anterior, 4.8.8 “Determinação da concentração de proteínas em *Brachiaria decumbens*”, é importante avaliar com maior atenção os resultados do primeiro experimento do que deste último. Pois no experimento III, houve prejuízo à uniformidade no preparo das amostras. Ainda assim, vale destacar que em ambos os ensaios realizados, foi possível observar tanto aumento quanto redução de concentração proteica na presença dos diferentes tratamentos à base de glifosato.

A redução significativa na concentração de proteína em soja RR com o complexo Cu421 (nos dois experimentos), Roundup WG (no primeiro) e glifosato purificado (no segundo) corrobora com os estudos de Albrecht et al. (2011). Estes autores também observaram redução significativa no teor de proteínas em soja transgênica ao fazer uso de Roundup Original®.

O aumento na concentração proteica com uso de glifosato purificado (primeiro experimento) e com Roundup (segundo experimento) também pode ser justificado pelo aumento no teor de proteínas relacionadas ao estresse, como descrito no item anterior.

É importante observar, portanto, que os compostos de glifosato foram capazes de interferir também nas sojas Roundup Ready, nas duas variedades avaliadas. Segundo Serra et

al. (2011) e Cavalieri et al. (2012), este herbicida afeta de forma negativa a eficiência de absorção e, conseqüentemente, o acúmulo de nutrientes, mesmo para cultivares RR.

Após determinação da concentração proteica, portanto, deu-se prosseguimento às análises enzimáticas.

#### 4.7.10 Determinação da atividade de EPSPs em *B. decumbens*

Após determinação da concentração proteica de cada homogeneizado, prosseguiu-se para o ensaio da atividade de EPSPs. Os resultados são apresentados na Figura 36.

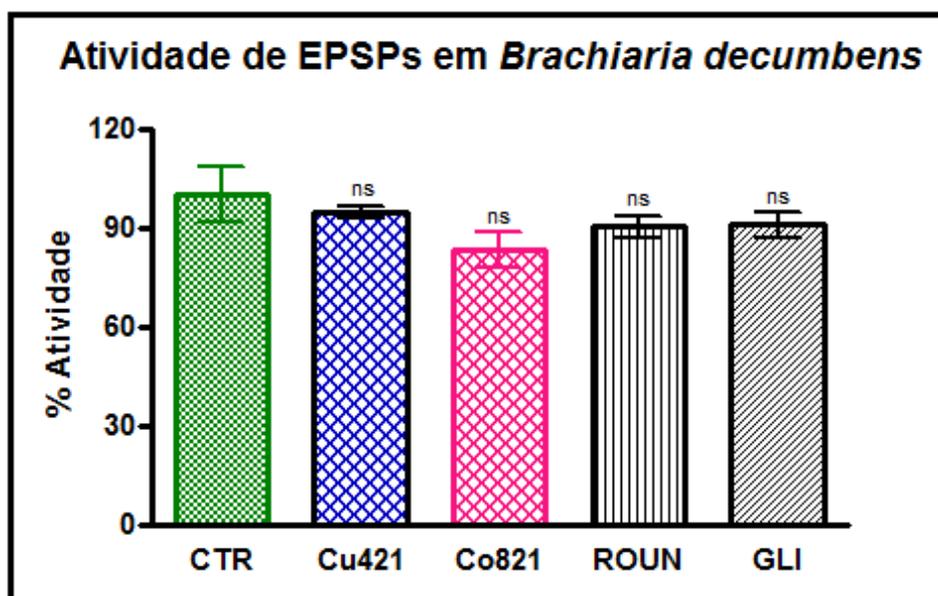


Figura 36: Experimento I: Porcentagem da atividade de EPSPs em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexos glifosato-íons metálicos (Cu421 e Co821). O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 3,44, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida no grupo controle foi de 3,44 nmoL/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 36, nenhum dos quatro tratamentos foi capaz de inibir de forma significativa a atividade de EPSPs, segundo a análise estatística. Entretanto, acredita-se

que tenha ocorrido uma inibição da enzima e que esta não tenha sido detectada devido a falhas do ensaio enzimático.

Como descrito anteriormente, a atividade da EPSPs é determinada através de quantificação de fosfato inorgânico. Um problema que poderia ter ocorrido, portanto, seria a alterações dos resultados devido ao acúmulo de fosfato nas plantas oriundo da metabolização dos tratamentos. Isto porque o glifosato, como descrito anteriormente, é um organofosforado. Assim, a presença expressiva de fosfato nas amostras poderia dificultar as análises de efeito dos compostos sobre a enzima.

No segundo experimento *in vivo*, ao colocar óleo mineral e ao aumentar o tempo do tratamento, foi possível obter resultados diferentes, como apresentado na Figura 37.

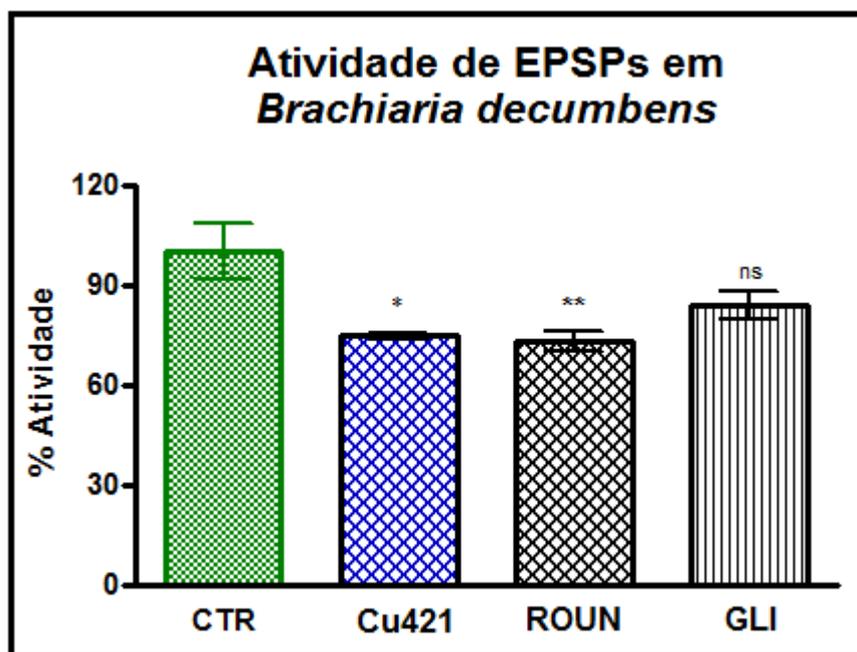


Figura 37: Experimento II: Porcentagem da atividade de EPSPs em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421). Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 2,89 nmol/min/mg, foi tida como 100%. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de EPSPs em comparação ao controle. ns: não significativo. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida no grupo controle foi de 2,89 nmoL/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 35, utilizando mesma dose dos tratamentos, mas frente o uso de óleo mineral e de um aumento no tempo do experimento, foi possível obter uma

inibição estatisticamente significativa de EPSPs com complexo de cobre e de Roundup WG®. O mesmo não foi verificado para glifosato, embora este composto purificado também tenha apresentado uma tendência inibitória.

A percentagem de inibição média por parte dos compostos foi de 25,48% com Cu421, 26,86% com Roundup e 16,12% com glifosato purificado. Quanto à diferença entre a inibição apresentada por Roundup e por glifosato purificado, novamente é possível supor que a união de glifosato com o sal de amônio presente no Roundup WG® torne a inibição da atividade da EPSPs mais eficaz.

Uma vez que a EPSPs é a enzima-alvo do glifosato, sua inibição era esperada. Marchiosi (2008) também encontrou resultado semelhante a este, ao avaliar o efeito de glifosato sobre o acúmulo de chiquimato em uma cultura susceptível ao glifosato. Este autor encontrou, portanto, um acúmulo deste substrato, decorrente da inibição de EPSPs causada por este produto químico.

Diferente do ocorrido no experimento II, no terceiro experimento foi possível observar inibição significativa causada pelo glifosato purificado. Este composto inibiu 57,4 % da atividade enzimática, frente uma inibição de 27,9% e 39,7% de Cu421 e Roundup, respectivamente (Figura 36). Vale ressaltar, entretanto, que estes graus de inibição distintos dos tratamentos, não tiveram diferença estatística significativa.

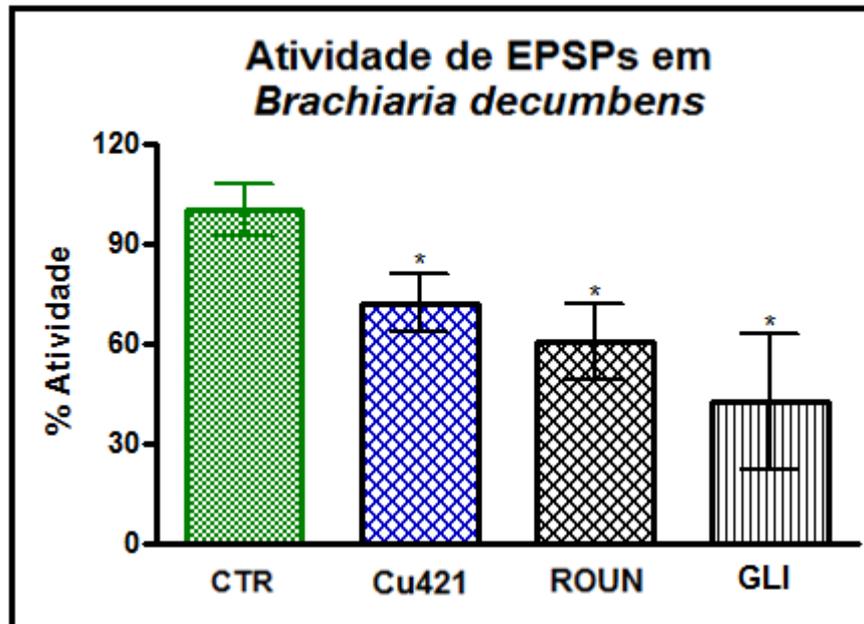
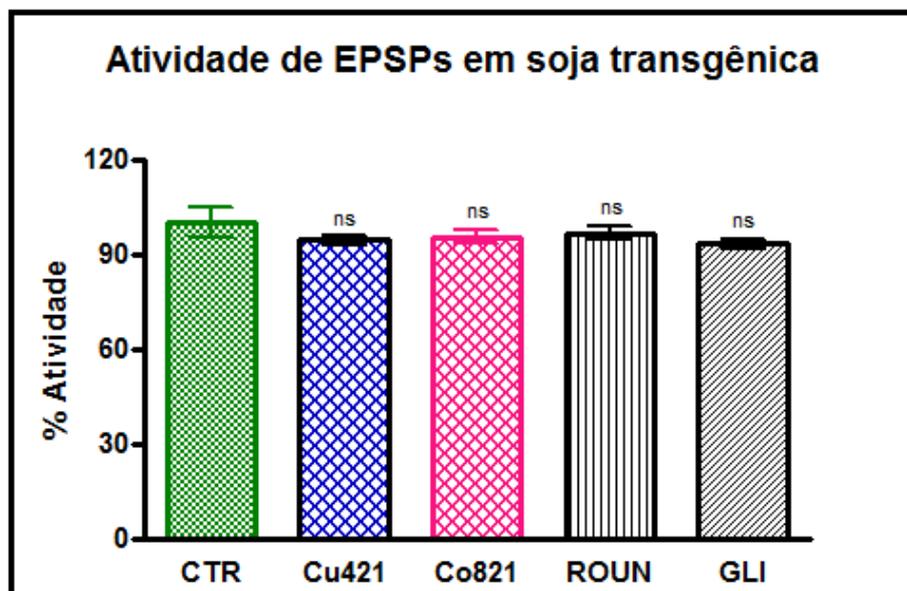


Figura 36: Experimento III: Porcentagem da atividade de EPSPs em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421). Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 3,19 nmol/min/mg, foi tida como 100%. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de EPSPs em comparação ao controle. \*  $p < 0,05$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

O terceiro experimento, onde a atividade obtida no controle foi de aproximadamente 3,19 nmol/min/mg, mostrou que nem sempre o glifosato purificado, por ser isento de aditivos, terá uma eficácia menor. Muitos fatores devem ser levados em consideração quando se pensa em controle de plantas daninhas, como por exemplo, a posição do sol e da sombra e a oferta de água. Embora nestes experimentos se tenha tido bastante cuidado em trocar diariamente os vasos de posição e em ofertar água de forma uniforme, estes fatores ainda podem estar presentes em experimentos realizados em casa de vegetação. Além disso, deve-se ressaltar que as plantas, assim como outros seres vivos, podem responder a fatores estressantes de maneiras distintas, mesmo se tratando de plantas de uma mesma espécie.

#### 4.7.11 Determinação da atividade de EPSPs em soja transgênica

Após determinar a concentração de proteína total nos homogeneizados de soja transgênica tratada com diferentes compostos de glifosato, também foi feita a análise da atividade de EPSPs. Os resultados do experimento I são apresentados na Figura 38.



**Figura 38:** Experimento I: Porcentagem da atividade de EPSPs em soja transgênica (TMG133RR) submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexos glifosato-íon metálico (Cu421 e Co821). O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 3,67 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

A atividade média obtida no grupo controle foi de 3,67 nmol/min/mg de proteína. Como pode ser observado na Figura 38, os tratamentos não foram capazes de inibir, de forma significativa, a atividade de EPSPs em soja transgênica variedade TMG133RR.

No experimento III, com soja transgênica variedade BRS FAVORITA, a atividade obtida no grupo controle foi de 3,43 nmol/min/mg de proteína e o efeito dos compostos estudados são apresentados na Figura 39.

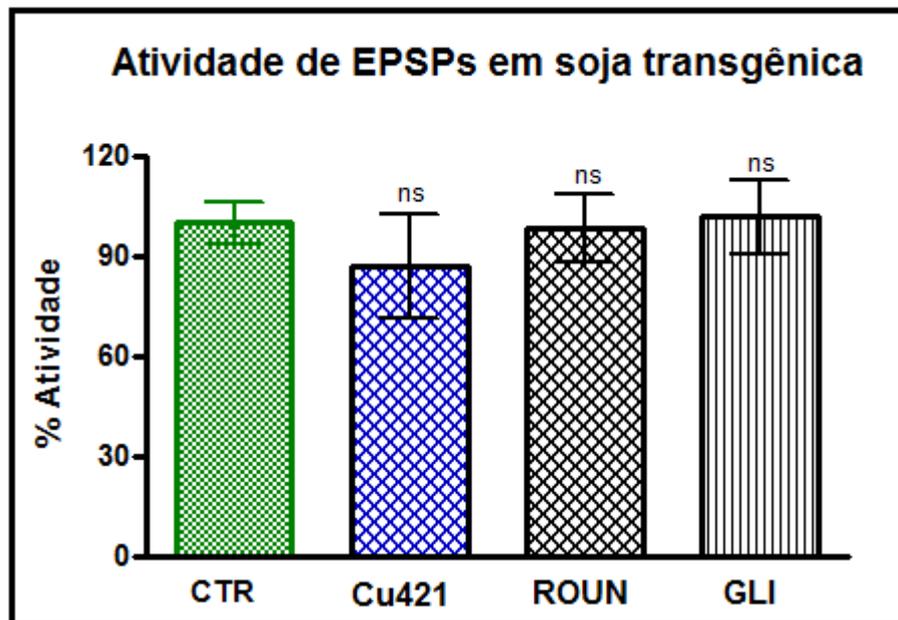


Figura 39: Experimento III: Porcentagem da atividade de EPSPs em soja transgênica (BRA FAVORITA) submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo Cu421. Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. A atividade média obtida no controle (CTR), 3,43 nmol/min/mg, foi tida como 100%. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Figura 39, a EPSPs da soja RR, variedade BRS FAVORITA, não é influenciada de forma significativa pelos compostos estudados, assim como a soja RR variedade TMG133RR, apresentada anteriormente.

Estes resultados já eram esperados, uma vez que estas duas variedades são de plantas resistentes ao glifosato, o que quer dizer que possuem EPSPs insensíveis a este herbicida, como descrito por Zonetti et al. (2012). Nos estudos de Marchiosi (2008) também não foi encontrado acúmulo de chiquimato ao usar glifosato em soja RR, ou seja, não houve inibição da EPSPs.

Foi importante observar também que a inserção dos metais cobalto (experimento I) e cobre (experimentos I e III) na estrutura do glifosato não interferiu na resistência da soja transgênica.

#### 4.7.12 Determinação da atividade de PAL em *B. decumbens*

Nos três experimentos *in vivo* foi avaliado o efeito dos diferentes tratamentos sobre a atividade da PAL. A Figura 40 apresenta os resultados do primeiro experimento *in vivo*, ou seja, na ausência de óleo mineral. Neste experimento, a atividade média obtida no controle foi de aproximadamente 2,5 nmol/min/mg de proteína.

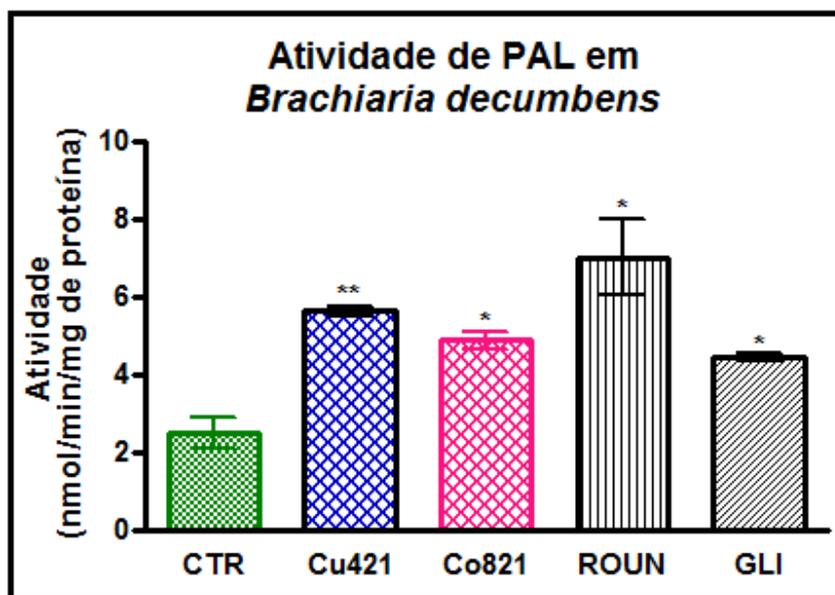


Figura 40: Experimento I: Atividade de PAL em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexos glifosato-íons metálicos (Cu421 e Co821) em comparação com o controle (CTR). O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de PAL em comparação ao controle. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Figura 40, os quatro tratamentos foram capazes de aumentar de forma significativa a atividade enzimática. O fato de ter ocorrido aumento da atividade de PAL com uso dos compostos testados fortalece a hipótese de que tenha ocorrido inibição de EPSPs no primeiro experimento *in vivo*, embora tal inibição não tenha sido detectada.

No experimento onde houve uso de óleo mineral também foi avaliada a atividade da PAL, como mostra a Figura 41. Neste segundo experimento, a atividade média obtida no grupo controle foi de 2,3 nmol/min/mg de proteína.

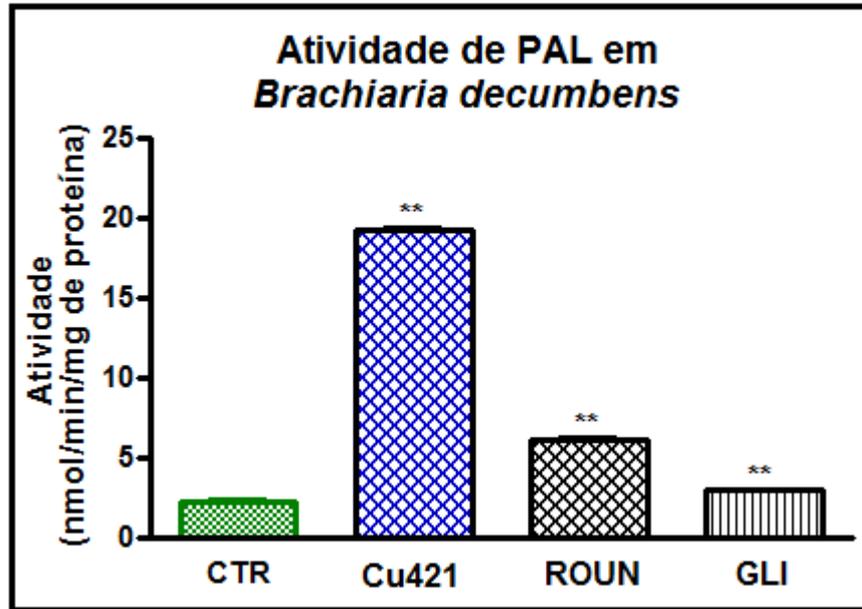


Figura 41: Experimento II: Atividade de PAL em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421) em comparação com o controle (CTR). Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de PAL em comparação ao controle.

\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Figura 41, novamente todos os tratamentos usados causaram indução significativa da atividade de PAL, sendo que no caso do complexo Cu421, a atividade obtida foi aproximadamente 8,5 vezes maior do que a do controle. Isto mostra o quanto este complexo é capaz de influenciar o metabolismo desta espécie vegetal. Roundup e glifosato promoveram uma atividade enzimática aproximadamente 2,5 e 1,5 vezes maior que a do controle, respectivamente.

No experimento III, novamente foi possível confirmar o efeito indutivo dos tratamentos à base de glifosato sobre esta atividade enzimática. Todos os tratamentos induziram esta atividade de forma significativa, como mostra a Figura 42.

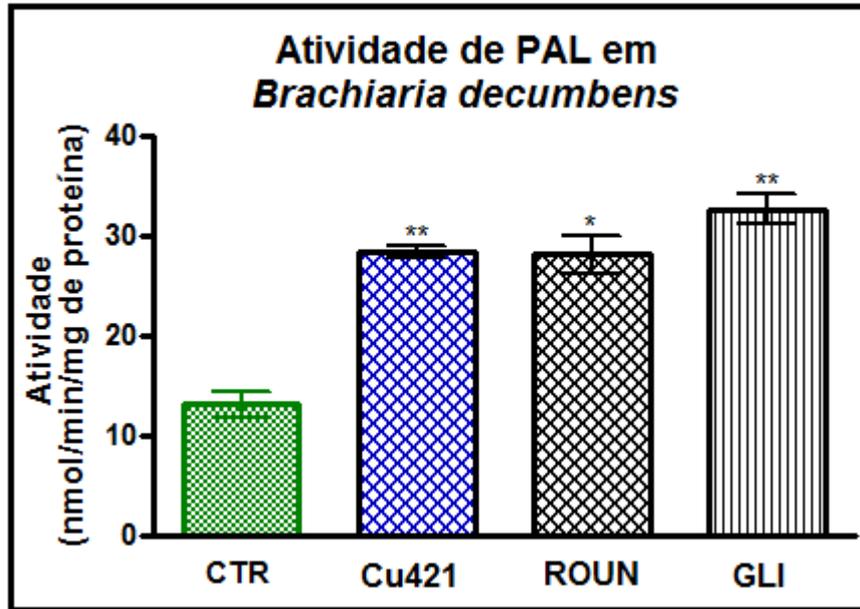


Figura 42: Experimento III: Atividade de PAL em *B. decumbens* submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN) e complexo glifosato-cobre (Cu421) em comparação com o controle (CTR). Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. Asteriscos sinalizam os tratamentos que provocaram diferença significativa na atividade de PAL em comparação ao controle.

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Neste experimento, a atividade média obtida no grupo controle foi de 13,1 nmol/min/mg de proteína e todos os tratamentos foram capazes de aumentar esta atividade em, aproximadamente, 2,3 vezes.

O aumento da atividade frente o uso de glifosato e compostos que o contém (Roundup e o complexo Cu421) era esperado, uma vez que resultados semelhantes foram encontrados por diferentes autores, como Marchiosi (2008) e Hoagland (1990), estudando o efeito deste herbicida na atividade de PAL em outras plantas.

O aumento desta atividade pode ser devido a uma diminuição do metabolismo secundário da planta ocasionado por inibição da EPSPs, ou mesmo como forma de defesa da planta, mecanismos explicados anteriormente. O fato do metabolismo da planta reagir desta forma ao complexo Cu421 mostra que ele também se apresenta como um “perigo” para a mesma.

Os efeitos deletérios dos complexos, em especial o Cu421, sobre a planta daninha estudada, favorece a continuação de estudos com este complexo, que tem se mostrado com alto potencial herbicida.

#### 4.7.13 Determinação da atividade de PAL em soja transgênica

A resistência da soja transgênica aos compostos também foi observada através da análise da enzima PAL, como mostra a Figura 43. A atividade obtida no grupo controle foi de 4,5 nmol/min/mg de proteína.

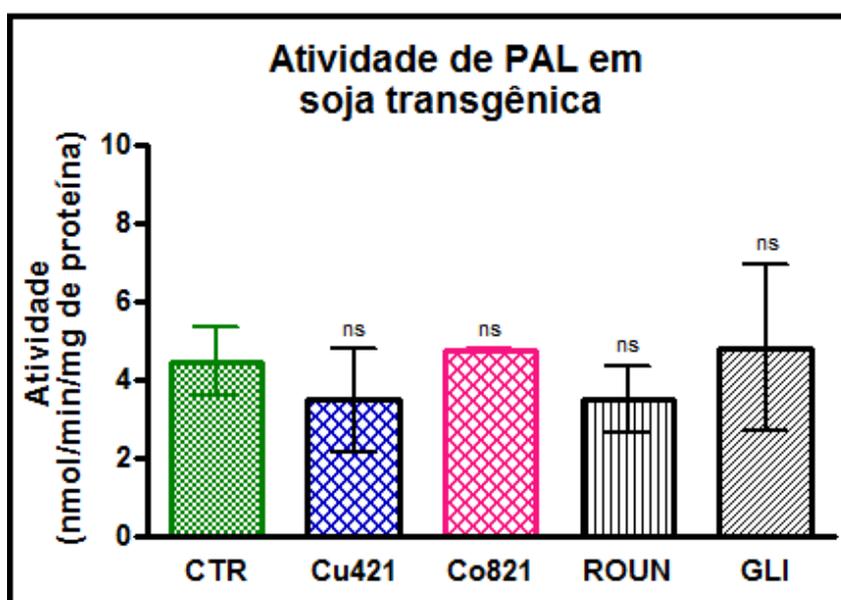


Figura 43: Experimento I: Atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) em soja transgênica (TMG133RR) submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN), complexos glifosato-íon metálico (Cu421 e Co821) em comparação com o controle (CTR). O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Figura 43, nenhum dos tratamentos altera de forma significativa a atividade da enzima fenilalanina amônia liase. No experimento III, onde fez-se uso de óleo mineral, a atividade obtida no grupo controle foi, em média, de 3,4 nmol/min/mg de proteína. Os resultados deste último experimento *in vivo* em soja BRS FAVORITA são apresentados na Figura 44.

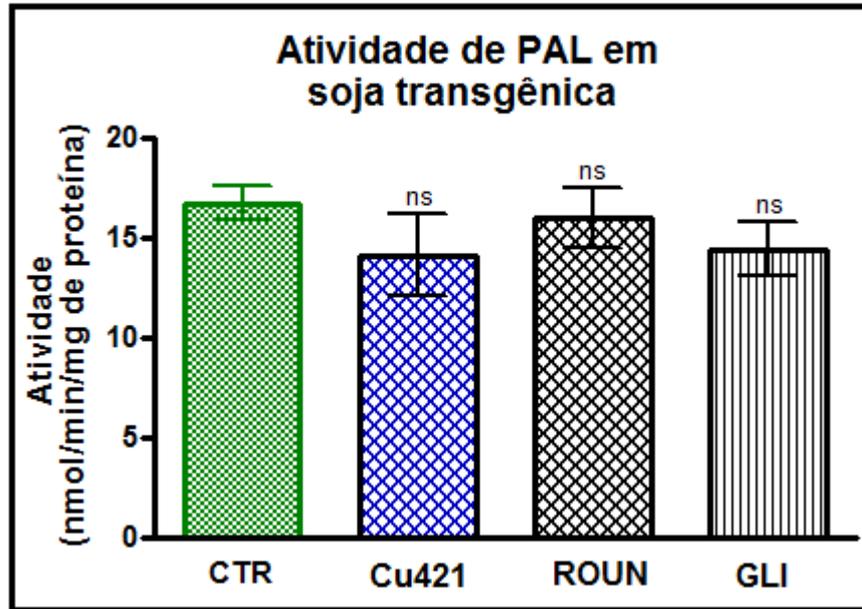


Figura 44: Experimento III: Atividade de fenilalanina amônia liase (PAL) em soja transgênica (BRS FAVORITA) submetida a tratamento com glifosato purificado (GLI), Roundup WG® (ROUN), complexo glifosato-cobre (Cu421) e complexo glifosato-cobalto (Co421) em comparação com o controle (CTR). Uso de óleo mineral em todos os tratamentos. O ensaio enzimático foi realizado em duplicata. ns: não significativo. Teste T de student ( $p < 0,05$ ).

Como pode ser observado na Figura 44, nenhum dos tratamentos foi capaz de alterar de forma significativa a atividade da PAL na segunda variedade de soja transgênica. Os resultados apresentados nas Figuras 44 e 45, portanto, mostram uma tolerância das plantas transgênicas em relação aos compostos à base de glifosato, incluindo aos complexos metálicos. Marchiosi (2008), ao testar o efeito de glifosato sobre a atividade de fenilalanina amônia liase de soja transgênica, também não encontrou efeito significativo deste composto sobre a enzima.

Vale destacar também que em todas as análises do presente estudo, exceto no experimento *in vivo* I em *B. decumbens*, a alteração de PAL se mostrou dependente da alteração da EPSPs. Isto corrobora a hipótese de que o aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia liase seja consequência da inibição da EPSPs.

A pouca sensibilidade da soja transgênica aos complexos estudados, especialmente o de Cu421, é de extrema importância. Para que um novo produto à base de glifosato seja desenvolvido e disponibilizado no mercado, é vantajoso que as plantas transgênicas já existentes mantenham sua resistência a tal composto. Além disso, o produto desenvolvido a partir deste complexo teria uma vantagem adicional de não sequestrar Cu presente no solo, uma vez que o “novo” glifosato já teria seus sítios ocupados com este cátion.

Foi importante, portanto, comprovar que Cu421 é uma forma de complexação entre glifosato e cobre que possui boa eficácia herbicida contra plantas daninhas, tendo mostrado, sob determinados parâmetros, eficácia superior às outras formas de glifosato estudadas.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o complexo de cobre, Cu421, pode vir a ser utilizado de forma eficaz como herbicida, uma vez que inibiu de forma significativa sua enzima-alvo, influenciou a fotossíntese, provocou redução no acúmulo de massa fresca e induziu o mecanismo de defesa da planta daninha estudada. Além disso, as sojas transgênicas de duas variedades distintas mostraram-se pouco sensíveis a este composto, como já era esperado, o que aumenta ainda mais a perspectiva do uso do mesmo como herbicida.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Para que o uso de glifosato previamente complexado com metais seja estimulado, são importantes novas pesquisas que comprovem outros benefícios destes compostos a culturas de grande importância para o país, como a soja. Dentre estes benefícios pode-se citar o enriquecimento mineral do solo, que se for comprovado, aumentará ainda mais a perspectiva do uso destes complexos na agricultura.

São necessários estudos de toxicidade para analisar os efeitos deste novo complexo sobre espécies não alvo. Uma vez que este complexo foi sintetizado com glifosato purificado, acredita-se que os resultados destes estudos venham a ser positivos, já que o uso de surfactantes foi descrito na literatura como possível intensificador da toxicidade. Desta forma, este complexo pode representar um composto de eficácia semelhante e de maior segurança que herbicidas comercializados atualmente.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, L. P. et al. Desempenho da soja roundup ready sob aplicação de glyphosate em diferentes estádios. *Planta Daninha*, v. 29, n. 3, p. 585-590, 2011.

ALLOWAY, B. J. *Heavy metals in soils*. New York: John Wiley, 1990. 339p.

AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. *Química Nova*, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANDRIGHETTI, M. *Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida*. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

AHMED, S.; EVANS, H. J. Cobalt: a micronutrient element for the growth of soybean plants under symbiotic conditions. *Soil Science*, Baltimore, v. 90, p. 205-210, 1960.

BAILEY, W. A. et al. Glyphosate interactions with manganese. *Weed Technology*, v.16, p.792-799, 2002.

BARRETO, L.; NETO, E. *Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas*. Pernambuco: EDU – Editora Universitária da UFRPE, 2011. 261p.

BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; AFONSO, M. S. Íons III - phosphonate complexes. *Polyhedron*, v. 20, n. 15-16, p. 1821-1830, 2001.

BASSO, C. J. et al. Aplicação foliar de manganês em soja transgênica tolerante ao glyphosate. *Ciencia Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 10, p. 1726-1731, 2011.

BELLALOUI, N. et al. Simulated glyphosate drift influences nitrate assimilation and nitrogen fixation in non-glyphosate-resistant soybean. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 54, n. 9, p. 3357-3364, 2006.

BELLALOUI, N. et al. Nitrogen metabolism and seed composition as influenced by glyphosate application in glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 56, p. 2765–2772, 2008.

BERVALD, C. M. et al. Desempenho fisiológico de sementes de soja de cultivares convencional e transgênica submetidas ao glifosato. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2, p. 009-018, 2010.

BRADBERRY, S.; PROUDFOOT, A.; VALE, J. Glyphosate poisoning. *Toxicological reviews*, v. 23, n. 3, p. 159-167, 2004.

BRIGHENTI, A. M. et al. Suscetibilidade diferencial de espécies de braquiária ao herbicida glifosato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 46, n. 10, p. 1241-1246, 2011.

CANAL RURAL. Disponível em: <  
<http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/entenda-acao-mpf-contra-glifosato-56004>>  
de 17/04/15. Acesso: 28 mai. 2015.

- CANAL RURAL. Disponível em: <<http://www.canalrural.com.br/noticias/agricultura/qual-importancia-glifosato-para-agricultura-brasileira-56325>> de 07/05/15. Acesso: 28 mai. 2015.
- CARDINALI, V. C. B. et al. Acúmulo de shiquimato em biótipos susceptíveis e resistentes de Buva para determinação da resposta ao herbicida glyphosate. In: *CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS*, XXVII, 2010, Ribeirão Preto. Ribeirão Preto: 2010, p. 3149-3153.
- CARVALHO, S. J. P. et al. Glifosato aplicado com diferentes concentrações de uréia ou sulfato de amônio para dessecação de plantas daninhas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1501-1508, 2008.
- CAVALIERI, S. D. et al. Acúmulo de nutrientes e matéria seca na parte aérea de dois cultivares de soja RR sob efeito de formulações de glyphosate. *Planta Daninha*, v.30, n.2, p.349-358, 2012.
- CAVALLI, V. L. L. O. et al. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 65, p. 335-346, 2013.
- CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 6, p. 71-80, 1975.
- CLARKE, T. E. et al. Structural investigation of the Cu(II) chelate of N-phosphonomethylglycine. X-ray crystal structure of Cu(II) [O<sub>2</sub>CCH<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>] $\cdot$ Na(H<sub>2</sub>O)<sub>3.5</sub>. *Inorganica Chimica Acta*, v. 164, p. 59-63, 1989.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira – Grãos, v. 2, n. 4, p. 6, 2015. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15\\_01\\_09\\_09\\_00\\_21\\_boletim\\_graos\\_janeiro\\_2015.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf)>. Acesso em: 4 Fev. 2015.
- COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H. Complexos Metálicos com o Herbicida Glifosato: Revisão. *Química Nova*, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1038-1045, 2005.
- CRISPIM, S. M. A.; BRANCO, O. D. Aspectos Gerais das Braquiárias e suas Características na SubRegião da Nhecolândia, Pantanal, MS. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33, p. 10-11, 2002.
- CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.
- DANIELE, P. G.; DE STEFANO, C.; PRENESTI, E.; SAMMARTANO, S. Copper(II) complexes of N-(phosphonomethyl)glycine in aqueous solution: a thermodynamic and spectrophotometric study. *Talanta*, v. 45, n. 2, p. 425-31, 1997.
- DUKE, S. O.; HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). *The herbicide glyphosate*. London: Butterworth, 1985. p. 92-123.

- DUTRA, B.; FERNANDES, F.; FAILACE, D.; OLIVEIRA, G. Effect of roundup® (glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyalella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*, v. 20, n.1, 255-263, 2011.
- EDAGI, F. K. et al. Compostos salicilados e tolerância de nêsporas ao frio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 46, n. 5, p. 563-566, 2011.
- EKER, S. et al. Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 26, p. 10019-10025, 2006.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. *Turrialba*, San Jose, v. 34, p. 9-18, 1984.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFPA)*, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FORLANI, G.; PARISI, B.; NIELSEN, E. 5-enol-Pyruvyl-Shikimate-3-Phosphate Synthase from *Zea mays* Cultured Cells. *Plant Physiology*, v. 105, p. 1107-1114, 1994
- FRANZ, J. E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). *The herbicide glyphosate*. London: Butterworths, 1985. p. 3-17.
- FRANZEN, D. W.; BARR, J. H.; ZOLLINGER, R. K. Interaction of a foliar application of iron HEDTA and three postemergence broadleaf herbicides with soybeans stressed from chlorosis. *Journal Plant Nutrition*, v. 26, n. 12, p. 2365-2374, 2003.
- GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M. C. *Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura*. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005. 60 p.
- GONÇALVES, A. H.; SILVA, J. B.; SOUZA, I. F.; PURCINO, A. A. C. Subdoses de sulfosate sobre a inibição da atividade da EPSPs em plantas de milho. *Planta Daninha*, Viçosa, v. 20, n. 3, p. 465-470, 2002.
- GORDON, B. Adubação com manganês em soja convencional e soja resistente ao glifosato. *Informações Agronômicas*, n. 117, p.6-7, 2007.
- GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.
- HAN, F. G. et al. Two Novel Cobalt(II) Coordination Polymers Based on the Herbicide Glyphosate as a Building Block and their Magnetic Properties. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, v. 634, p. 1991, 2008.
- HEINEKE, D.; FRANKLLIN, S. J.; RAYMOND, K. N. Coordination Chemistry of Glyphosate: Structural and Spectroscopic Characterization of Bis(glyphosate)metal(III) Complexes. *Inorganic Chemistry*, v. 33, n 11, p. 2413 – 2421, 1994.
- HOAGLAND, R. E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds: VI. Effects of glyphosine and glyphosate metabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity, growth, and protein, chlorophyll, and anthocyanin levels in soybean (*Glycine max*) seedlings. *Weed Science*, v. 28, n.4, p. 393-400, 1980.
- HOAGLAND, R. E. Interaction of indoleacetic acid and glyphosate on phenolic metabolism in soybean. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 36, p. 68-75, 1990.

- HUBER, D. M. Strategies to ameliorate glyphosate immobilization of manganese and its impact on the rhizosphere and disease. In: LORENZ, N.; DICK, R. (Eds). *Proceedings of the glyphosate potassium symposium*, 2006. Iowa, Ohio State University: AG Spectrum, 2006.
- ITAYA, K.; UI, M. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clinica Chimica Acta*, v. 14, n. 3, p. 361-366, 1966.
- JOLLEY, V. D.; HANSEN, N. C.; SHIFFLER, A. K. Nutritional and management related interactions with iron-deficiency stress response mechanisms. *Soil Science Plant Nutrition*, v. 50, n. 7, p. 973-981, 2004.
- KARIA, C.T; DUARTE, J.B; ARAÚJO, A.C.G. *Desenvolvimento de cultivares do gênero Brachiaria (trin) Griseb no Brasil*. Ed. 163. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. 57p.
- LAJMANOVICH, R. et al. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 60, n. 4, p. 681-689, 2011.
- LANZETTA, P. A. et al. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry*, v. 100, n. 1, p. 95-97, 1979.
- LEE, J. D. *Química Inorgânica Não Tão Concisa*, Ed. 5, São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 1999.
- LI, Q. et al. Glyphosate and AMPA inhibit cancer cell growth through inhibiting intracellular glycine synthesis. *Drug design, development and therapy*, v. 7, p. 635-643, 2013.
- MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 2, p. 285-291, 2006.
- MARCHIOSI, R. *Efeitos metabólicos nas raízes de soja, susceptível e resistente ao glifosato, após exposição das sementes ao herbicida*. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Maringá, Paraná, 2008.
- MAUAD, M. et al. Influência da densidade de semeadura sobre características agronômicas na cultura da soja. *Agrarian*, v. 3, n. 9, p. 175-181, 2011.
- MENELAOU, M. et al. pH-Specific synthetic chemistry, and spectroscopic, structural, electrochemical and magnetic susceptibility studies in binary Ni(II)-(carboxy)phosphonate systems. *Polyhedron* v. 28, p. 3331, 2009.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, v.5, n.1, p.62-71, 2001.
- MONQUERO, P. A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. *Bragantia*, v. 64, n. 4, p. 517-531, 2005.
- NAKAZAWA, A. et al. Expression pattern and gene structure of phenylalanine ammonia-lyase in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Research*, v. 114, p. 323-328, 2001.
- NAVARRO, C.; MARTINEZ, C. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 165, p. 83-90, 2014.

- NEPOMUCENO, A. L.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – Características da Soja, [s.d.] Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01\\_24\\_271020069131.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_24_271020069131.html)>. Acesso em: 4 fev. 2015.
- NUNES, U. R. et al. Produção de palhada de plantas de cobertura e rendimento do feijão em plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 41, n. 6, p. 943-948, 2006.
- OLIVEIRA JR, R. et al. Interação entre sistemas de manejo e de controle de plantas daninhas em pós-emergência afetando o desenvolvimento e a produtividade da soja. *Planta Daninha*, v. 24, n. 4, p. 721-732, 2006.
- PADGETTE, S. R. et al. New weed control opportunities: Development of glyphosate-tolerant soybeans. In: DUKE, S.O. (Ed). *Herbicide resistant crops*. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 54-80.
- PAZMINO, D. et al. Differential response of young and adult leaves to herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in pea plants: role of reactive oxygen species. *Plant, cell & environment*, v. 34, n. 11, p. 1874-1889, 2011.
- PETERSON, G. L. A Simplification of the Protein Assay Method of Lowry et al. Which is More Generally Applicable. *Analytical Biochemistry*, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977.
- PIRES, F. R. et al. Manejo de plantas de cobertura antecessoras à cultura da soja em plantio direto. *Ceres*, v. 55, n. 2, p.94-101, 2008.
- QUINN, J. P. Interactions of the herbicides glyphosate and glufosinate (phosphinothricin) with the soil microflora. In: ALTMAN, J. (Ed). *Pesticides interactions in crop production - beneficial and deleterious effects*. Boca Raton: CTC Press, 1993. p. 245-265.
- RICHARD, S. et al. Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 6, p. 716, 2005.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. de. *Guia de herbicidas*. Ed. 5. Londrina, 2005. 592p.
- ROSSI, S. *Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos Pesticidas ROUNDUP® e HEXARON® em astyanax sp. (pisces, teleostei)*. 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2008.
- ROUSTAN, A. et al. Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere*, v. 108, p. 93–100, 2014.
- RUBIN, J. L.; GAINES, C. G.; JENSEN, R. A. Glyphosate Inhibition of 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase from Suspension-Cultured Cells of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiology*, v. 75, n. 3, p. 839-845, 1984.
- SAMORA, R. USDA ainda coloca Brasil como 1º exportador de soja. 10/10/14. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/economia/noticias/usda-ainda-coloca-brasil-como-1o-exportador-de-soja-abiove-ve-previsao-com-cautela-2>>. Acesso em: 4 fev. 2015.
- SANTOS, J. B. et al. Avaliação de formulações de glyphosate sobre soja Roundup Ready. *Planta Daninha*, v. 25, n. 1, p. 165-171, 2007.

- SERRA, A. P. et al. Influência do glifosato na eficiência nutricional do nitrogênio, manganês, ferro, cobre e zinco em soja resistente ao glifosato. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 1, p. 77-84, 2011.
- SHEALS, J.; PEARSSON, P.; HEDMAN. B. IR and EXAFS spectroscopic studies of glyphosate protonation and copper(II) complexes of glyphosate in aqueous solution. *Inorganic Chemistry*, v. 40, n. 17, p. 4302-4309, 2001
- SILVA, A. et al. Sistema de Plantio Direto na Palhada e seu impacto na agricultura brasileira. *Ceres*, v. 56, n. 4, p. 496-506, 2009a.
- SILVA, M. A. et al. Efeito hormótico de glifosato no desenvolvimento inicial de cana-de-açúcar. *Bragantia*, v. 68, n. 4, p. 973-978, 2009b.
- SILVA, F. et al. Chlorophyll fluorescence as an indicator of cellular damage by glyphosate herbicide in *Raphanus sativus* L. plants. *American Journal of Plant Sciences*, v. 5, n. 16, p. 2509-2519, 2014a.
- SILVA, A. L. et al. Tratamentos para quebra de dormência em *Brachiaria brizantha*. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, v. 37, n. 1, p. 37-41, 2014b.
- SILVA, A. F. et al. Emergency *Brachiaria decumbens* a function of depth of seeds in soil profile. *Nucleus Animalium*, v. 6, n. 1, p. 6, 2014c.
- SOUZA, L. S. et al. Efeito alelopático de capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) sobre o crescimento inicial de sete espécies de plantas cultivadas. *Planta daninha*, Viçosa v. 24, n. 4, p. 657-668, 2006.
- SUBRAMANIAM, V.; HOGGARD, P.E. Metal complexes of glyphosate. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 36, n. 6, p. 1326-1329, 1988.
- SUNDARAM, A., SUNDARAM, K. M. S. Solubility products of six metal-glyphosate complex in water and forestry soils, and their influence on glyphosate toxicity to plants. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 32, n.4, p. 583-598, 1997.
- VARGAS, Gisele. A economia da soja: vantagens e desvantagens da transgenia no Brasil. 2014. 67 f. Monografia, Graduação em Ciências Econômicas, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2014.
- WILLS, G. D.; MCWHORTER, C. G. Effect of inorganic salts on the toxicity and translocation of glyphosate and MSMA in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Science*, v. 33, n. 6, p. 755-761, 1985.
- YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *Informações Agronômicas*, n. 119, p. 1-32, 2007.
- YOON, J. et al. Tolerance to paraquat-mediated oxidative and environmental stresses in squash (*Cucurbita* spp.) leaves of various ages. *Pesticide biochemistry and physiology*, v. 99, n. 1, p. 65-76, 2011.
- ZOBIOLE, L. H. S. et al. Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosateresistant soybeans. *Applied Soil Ecology*, v. 44, p. 176-180, 2010.
- ZONETTI, P. C. et al. High temperatures on root growth and lignification of transgenic glyphosate-resistant soybean. *Agrociência*, v. 46, n. 6, 2012.

ZUCKER, M. Induction of phenylalanina deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiology*, v. 40, p. 779-784, 1965.