

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

**JOELSON FERNANDES**

**ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS  
ALTERAÇÕES NO PROCESSO FOTOSSINTÉTICO EM  
PLANTAS DE SOJA TRANSGÊNICAS (RR) INDUZIDAS PELO  
HERBICIDA GLIFOSATO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**DOURADOS/MS**

**FEVEREIRO/2012**

**JOELSON FERNANDES**

**ESTUDO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DAS  
ALTERAÇÕES NO PROCESSO FOTOSSINTÉTICO EM  
PLANTAS DE SOJA TRANSGÊNICAS (RR) INDUZIDAS PELO  
HERBICIDA GLIFOSATO**

**ORIENTADOR: SAMUEL LEITE DE OLIVEIRA**

**COORIENTADOR: ANDERSON RODRIGUES LIMA CAIRES**

**Dissertação de mestrado submetida ao  
programa de pós-graduação em Ciência e  
Tecnologia Ambiental, como um dos  
requisitos necessários para a obtenção do  
título de mestre em Ciência e Tecnologia na  
área de concentração em Ciência Ambiental.**

**DOURADOS/MS**

**FEVEREIRO/2012**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL

---

## TERMO DE APROVAÇÃO

Após apresentação, argüição e apreciação pela banca examinadora foi emitido o parecer APROVADO para a dissertação intitulada: "Estudo por espectroscopia de fluorescência das alterações no processo fotossintético em plantas de soja transgênicas (RR) induzidas pelo herbicida glifosato", de autoria de JOELSON FERNANDES, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



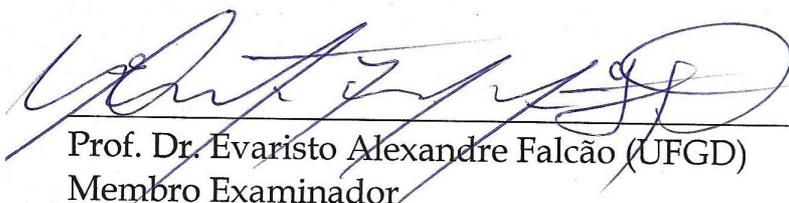
---

Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Orientador- UFGD)  
Presidente da Banca Examinadora



---

Prof. Dr. Luís Humberto da Cunha Andrade (UEMS)  
Membro Examinador



---

Prof. Dr. Evaristo Alexandre Falcão (UFGD)  
Membro Examinador

*Aos que sempre foram em todas as coisas que realizei meus maiores incentivadores e admiradores e pelos quais sempre darei o melhor de mim para fazer jus de toda credibilidade e fé que depositaram em mim. Meu amado Filho Rafael Henrique e minha eterna - e para sempre amada - Sônia.*

## AGRADECIMENTOS

*Meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que me ajudaram a elaborar e desenvolver esta pesquisa.*

*Em especial minha mais profunda gratidão aos meus orientadores, Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires e Prof. Dr. Samuel de Oliveira Leite. Sei que o empenho de orientar desde o meu aceite por suas partes se faz cumprir por legitimidade do papel que lhes cabe como pesquisadores, contudo o papel de amigos e companheiros jamais foi preceito da orientação. Por isto aqui cabe mais uma vez o meu muito obrigado a vocês, pelos conselhos e por toda simplicidade ao passar os conhecimentos adquiridos e que me ajudaram a desenvolver meu mestrado e principalmente a desenvolver a mim como pessoa e como pesquisador.*

*Gostaria de agradecer pela significativa colaboração dos Técnicos Bruno Pontim e João Augusto Machado, dos Laboratórios de Fitopatologia e Solos do curso de Agronomia da Universidade Federal da Grande Dourados, pela significativa colaboração no decorrer desta pesquisa.*

*Aos meus colegas de mestrado, em especial, aos meus amigos e companheiros de grupo de pesquisa pelos momentos de trocas de conhecimento e de descontração que sempre se fizeram presentes quando nos reuníamos. Mestrandos e Alunos de IC: Abdimar Moreno, Francieli Crivelaro, Gustavo R. Salmazzo, Gustavo Kern, Jonatam Moreira Rodrigues, Keurissom Magalhães e William Falco e Professores: Anderson Caires, Eriton R. Botero e Evaristo A. Falcão e José Ezequiel de Souza.*

*Agradeço aos ensinamentos dos rubro-negros, como eu, Prof. Dr. Andrelson Wellington Rinaldi e Nelson Domingues, que me aturaram em meu estágio docência.*

*Aos meus pais, Joel e Lourdes, minha eterna gratidão pelos valores a mim repassados.*

*Meus agradecimentos mais especiais vão para meu filho Rafael e minha esposa Sônia pelo amor, carinho, paciência e presença incondicional ao meu lado nos momentos do decorrer da busca de meus objetivos. A vocês minha mais profunda gratidão.*

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	Ácido aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Tri-fosfato
Ca	Cálcio
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>a + b</i>	Clorofila extrato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
CTR	Controle
EAA	Espectroscopia de absorção atômica
EPS Ps	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
FS I	Fotossistema I
FS II	Fotossistema II
Fv	Fluorescência Variável
Fm	Fluorescência Máxima
GTO I	Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup>
GTO II	Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup>
GTO III	Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup>
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O	Água
KCl	Cloreto de Potássio
KW	Kilowatts
Lb	Libras
LMR	Limite Máximo de Resíduo
Mn	Manganês
Mo	Molibidênio
Mg	Magnésio
N	Nitrogênio
NADPH	Adenosina Difosfato Reduzida
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
ND	Não Detectado
P	Fósforo
Pol	Polegadas
RR	Roundup Ready - RR®
TrF	Trifólio
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta no visível
σ	Desvio padrão

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Recomendação para aplicação ROUNDUP® WG em soja geneticamente modificada tolerante ao Glifosato.....	8
Tabela 2 -	Tolerância e intervalo de confiança para glifosato em alimentos.....	8
Tabela 3 -	Concentrações de Chl <i>a</i> e Chl <i>a + b</i> nos extratos obtidos das variedades 245 RR, 246 RR e 295 RR sem e com tratamento pós-emergente (GTO I).....	33
Tabela 4 -	Concentrações de Chl <i>a</i> e Chl <i>a + b</i> nos extratos obtidos das variedades 245 RR, 246 RR e 295 RR sem e com tratamento pós-emergente(GTO II).....	33
Tabela 5 -	Concentrações de Chl <i>a</i> e Chl <i>a + b</i> nos extratos obtidos das variedades 245 RR, 246 RR e 295 RR sem e com tratamento pós-emergente(GTO III).....	34
Tabela 6 -	Concentração de macronutrientes (g.Kg <sup>-1</sup> ) para a variedade BRS 245RR.....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema mostrando as principais etapas do processo de fotossíntese e suas interrelações. (CCL= centro de captação de luz, FSII=fotossistema II, ATP=adenosina trifosfato, NADPH=nicotinamida adenosina difosfato reduzida. Note que na captação de gás carbônico há duas vias, a C <sub>3</sub> e a via C <sub>4</sub> . Todas as vias levam ao mesmo lugar, que é produzir carboidratos que serão utilizados para o crescimento da planta.....	4
Figura 2 -	Mecanismo de síntese de aminoácidos soja convencional e modo de ação do glifosato.....	6
Figura 3 -	Mecanismo de síntese de aminoácidos soja transgênica e modo de ação do glifosato.....	6
Figura 4 -	Figura modificada de Espectros de Absorção Molecular (linha pontilhada) e de Fluorescência (linha cheia) dos principais pigmentos contidos na folha.....	10
Figura 5 -	Aplicador Manual usado para aspersão de herbicidas nas amostras.....	15
Figura 6 -	Espectrofluorímetro Portátil – USB 2000-FL – MM’ OCEAN ÓPTICS.....	15
Figura 7 -	Imagem da Análise <i>in vivo</i> do Folíolo Central do primeiro trifólio por fluorescência.....	16
Figura 8 -	(a) Grupo Controle (sem tratamento pós-emergente) e (b) Grupo GTO (com tratamento pós-emergente).....	18
Figura 9 -	Imagem do primeiro trifólio da variedade Soja 245 RR. (a) sem tratamento pré-emergente; (b) com tratamento emergente (Glifosato, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ); (c) com tratamento pré-emergente (Glifosato, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ) e (d) com tratamento pré-emergente (Glifosato, 11,25 g.L <sup>-1</sup> ).....	19
Figura 10	Variedades Soja BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR sobre diferentes taxas de GTO. Coluna (A) Teor GTO I - 3,75 g.L <sup>-1</sup> . Coluna (B) Teor GTO II - 7,50 g.L <sup>-1</sup> e Coluna (C) Teor de GTO III 11,25 g.L <sup>-1</sup> .....	20
Figura 11	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 245 RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida:	

	0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	22
Figura 12	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 246 RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	23
Figura 13	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 295 RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	24
Figura 14	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 245 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	25
Figura 15	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 246 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	26
Figura 16	Bandas de Emissão Chl <i>a in vivo</i> do 1° TrF Soja 295 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (II) Glifosato 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (III) Glifosato 11,25 g.L <sup>-1</sup> . As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.....	27

Figura 17	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 405nm.....	28
Figura 18	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B1) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C1) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 532 nm.....	29
Figura 19	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 246RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 405 nm.....	29
Figura 20	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 246RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B1) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C1) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 532 nm.....	30
Figura 21	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 295RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 405 nm.....	30
Figura 22	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 295RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B1) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C1) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 532 nm.....	30
Figura 23	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para o 4º TrF da variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 405nm.....	31
Figura 24	Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para o 4º TrF da variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L <sup>-1</sup> ; (B1) GTO I, 7,50 g.L <sup>-1</sup> ; (C1) GTO III (11,25 g.L <sup>-1</sup> ) em energia de excitação de 532nm.....	32

Figura 25	Intensidade de Absorbância do extrato de clorofila (CH <sub>3</sub> OH 85%) da Variedade BRS 245 RR com e sem tratamento pós-emergente.....	32
Figura 26	Bandas de Emissão do extrato de clorofila (CH <sub>3</sub> OH 85%) – Excitação em 405 nm: (a) BRS 245 RR; (b) BRS 246 RR e (c) BRS 295 RR com e sem tratamento pós-emergente.....	34
Figura 27	Bandas de Emissão do extrato de clorofila (CH <sub>3</sub> OH 85%) – Excitação em 532 nm: (a) BRS 245 RR; (b) BRS 246 RR e (c) BRS 295 RR com e sem tratamento pós-emergente.....	35
Figura 28	Espectro eletrônico da clorofila <i>a</i> (—) e feofitina <i>a</i> (- - -), 7,5 x 10 <sup>-6</sup> mol.L <sup>-1</sup> , a 30,0 ° C, em acetona.....	36
Figura 29	Intensidade de Fluorescência em Sementes de Soja 245 RR em Energia de Excitação de 405 nm. (a) Sementes CTR e Sementes GTO I e (b) Sementes CTR e GTO (III). (colheita – 117 dias após plantio).....	38
Figura 30	Intensidade de Fluorescência em Sementes de Soja 245 RR em Energia de Excitação de 532 nm. (a) Sementes CTR e Sementes GTO I e (b) Sementes CTR e GTO (III). (colheita – 117 dias após plantio).....	38

## RESUMO

Com safras cada vez maiores e uma tecnologia e infraestrutura em franca expansão, o país se torna a cada safra uma potência mundial em matéria de produção de grãos. No entanto, diversos estudos têm sido desenvolvidos quanto aos impactos ambientais gerados devido a esta expansão no setor, como desmatamento, uso indiscriminado de pesticidas, herbicidas entre outros insumos agrícolas. Neste contexto, vem ganhando destaque o aumento significativo do uso do herbicida glifosato com o advento da soja geneticamente modificada tolerante a este herbicida. No presente estudo, as alterações das atividades fotossintéticas induzidas pelo uso do glifosato em plantas tolerante ao herbicida foram avaliadas a partir da espectroscopia de fluorescência. A emissão da clorofila *a*, quando excitada em 405 nm e 532 nm, foi estudada para três variedades de soja tolerante ao glifosato (BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR) quando submetidas a diferentes doses do herbicida. Os resultados mostraram que o glifosato induziu uma supressão da intensidade de fluorescência da clorofila e esta supressão foi dependente da dose aplicada. Nossos resultados também mostraram que o teor de clorofila das plantas foi reduzido devido a ação do glifosato, e que esse efeito foi observado mesmo para folhas que não sofreram o contato direto com o herbicida. Ademais, o presente estudo mostra a potencialidade da espectroscopia de fluorescência para ser utilizada com ferramenta no processo de avaliação *in vivo* do teor de herbicida nas plantas, capaz de fazer uma detecção precoce do stress na planta, causado pelo uso de herbicidas.

*Palavras-Chave: Fluorescência, Clorofila a, Glifosato, Soja Transgênica*

## ABSTRACT

Nowadays, there is a fast growing of soybean production due to the food and livestock feed industries. However, several studies have been conducted regarding the environmental impacts as a result of this expansion, such as deforestation, indiscriminate use of pesticides, herbicides and other agricultural inputs. In this context, the herbicide glyphosate began to be used in large scale due to the advent of genetically modified soybeans tolerant to this herbicide. In the present study, changes in photosynthetic activity induced by the use of glyphosate in plants herbicide-tolerant were evaluated using the fluorescence spectroscopy. The chlorophyll *a* emission, when excited at 405 nm and 532 nm, was studied for three soybean varieties glyphosate-tolerant (BRS 245RR, 246RR, and BRS 295RR) when exposed to different doses of the herbicide. The results showed that glyphosate intensity induced a suppression of chlorophyll fluorescence and this effect was dependent on the applied dose. Our results also showed that the chlorophyll content was reduced by the action of glyphosate, and this effect was observed even for leaves that were not submitted to a direct contact with the herbicide. Furthermore, the present study shows the potential of fluorescence spectroscopy to be used as a tool to evaluate the herbicide content, *in vivo*, by an early detection of stress on the plant, caused by the use of herbicide.

*Keywords: Fluorescence, Chlorophyll a, Glyphosate, Transgenic, soybean, herbicide.*

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO I</b> .....	1
1 Introdução.....	1
<b>CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2 Plantas, fisiologia e produtividade – aspectos físico-químicos.....	3
2.1 Fotossíntese.....	3
2.2 Plantas daninhas.....	4
2.3 Herbicidas.....	5
2.4 Glifosato.....	6
2.4.1 Toxicidade.....	7
2.4.2 Recomendações Técnicas de Aplicação.....	8
2.5 Fluorescência da Clorofila.....	9
<b>CAPITULO III – OBJETIVOS DA PESQUISA</b> .....	13
3 Objetivo Geral.....	13
3.1 Objetivos específicos.....	13
<b>CAPITULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
4 Plantio e Cultivo.....	14
4.1 Aplicação do Herbicida.....	14
4.2 Análise Foliar In Vivo.....	15
4.3 Extração da Clorofila .....	16
4.3.1 Análise do extrato da clorofila.....	16
4.3.2 Análise do teor de clorofila no extrato.....	17
4.4 Análise do Teor de Macronutrientes (Ca, Mg, K e P) .....	17
4.5 Análise das Sementes 2ª Geração.....	17
<b>CAPITULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	18
5 ANÁLISE FOLIAR .....	18
5.1 Análise Foliar 1º Trifólio (TrF) .....	19
5.2 Evolução Temporal da Emissão.....	21
5.3 Razões de Fluorescência.....	28
5.4 Análise do 4º TrF.....	31
5.5 Análises do Extrato de Clorofila.....	32
5.6 Análise Foliar de Ca, Mg, K e P.....	36
5.7 Análise das Sementes por Fluorescência.....	38
<b>CAPITULO VI</b> .....	40
6 CONCLUSÃO.....	40
<b>CAPITULO VII</b> .....	41
7 REFERÊNCIAS.....	41

# CAPITULO I

## 1 INTRODUÇÃO

Oficialmente a liberação para o plantio de soja (*Glycine max*) geneticamente modificada (GM) no Brasil ocorreu em 2005 com a Lei n. 11.105, dada pela nova lei de biossegurança. Contudo, desde os anos 90 no estado do Rio Grande do Sul, o plantio de soja GM já era uma realidade <sup>[1]</sup>.

Com a inserção dos transgênicos nos anos 90 iniciou-se grande especulação sobre os potenciais perigos à saúde humana devido ao seu caráter geneticamente modificado. Esse caráter, ainda hoje é amplamente estudado bem como possíveis impactos ambientais e efeitos nocivos que estes produtos possam causar aos seres vivos <sup>[1-4]</sup>. No entanto, os transgênicos surgiram com uma grande expectativa no setor produtivo visto que a produção de alimentos poderia saltar em grande escala com produtos resistentes a pragas e condições adversas do clima. Este era o principal suporte para a introdução dos transgênicos no mercado <sup>[5-7]</sup>.

Aliado aos produtos GM, tecnologias de campo como plantio direto favoreceram reduções significativas nas margens operacionais. Contudo, a redução mais significativa ocorreu com a queda do preço do glifosato, um dos principais insumos usado no campo para plantio direto, dada pela sua patente expirada em 1991 na Argentina <sup>[4]</sup>. O Glifosato [(N-fosfometil) glicina] é um herbicida altamente eficaz e de amplo espectro essencialmente ativo em praticamente todas as plantas anuais e perenes agindo pela inibição específica da enzima 5-enolpiruvil chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), que catalisa um passo essencial na via biosintética dos aminoácidos aromáticos <sup>[5-8]</sup>.

No entanto, o glifosato teve seu uso em grande escala favorecido não só pelo seu alto desempenho no controle de ervas daninhas e seu baixo custo, mas através do desenvolvimento de variedades de plantas tolerantes a este herbicida como a soja GM *Roundup Ready* criada pela Monsanto, ou simplesmente Soja RR, que possibilitou o tratamento pós-emergente dessa cultura.

O aumento do uso do herbicida glifosato, devido a esta nova variedade de soja transgênica, tem gerado alguns questionamentos sobre o uso excessivo deste insumo. Dentre os impactos ambientais gerados pelo uso de glifosato, estudos citam que o herbicida apresentou efeitos nocivos em mamíferos, peixes, anfíbios, caracóis, minhocas, insetos, etc.<sup>[10-11]</sup>. Assim, a biótica da soja tolerante a este herbicida, bem como as alterações que este causa em sua fisiologia precisam ser mais bem compreendidas e estudadas, para fundamentar uma cultura já tão amplamente comercializada.

A técnica de fluorescência, neste contexto, tem ganhado destaque por ser uma técnica não destrutiva e que permite tanto análise qualitativa como quantitativa, sendo frequentemente utilizada para avaliar a eficiência fotoquímica e o estado fisiológico geral das plantas<sup>[12-17]</sup>.

Análises por fluorescência *in vivo* podem fornecer dados concretos das reais alterações induzidas por diferentes condições de stress induzidas em plantas<sup>[18]</sup>. Isto por que a excitação por ultravioleta e/ou visível (UV - Vis) em folhas verdes induz dois tipos distintos, fundamentalmente diferentes, mas ainda assim complementares de fluorescência: uma fluorescência azul-verde na faixa de 400-630 nm e a fluorescência da clorofila *a* na região vermelha para vermelho-distante (630-800 nm) do espectro<sup>[18]</sup>.

As intensidades relativas desses dois tipos de fluorescência são altamente sensíveis às propriedades intrínsecas da folha revelando muito sobre o estado fisiológico da planta como fotossíntese, reações fotoquímicas primárias e conteúdo de clorofila<sup>[18-19]</sup>.

## CAPITULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

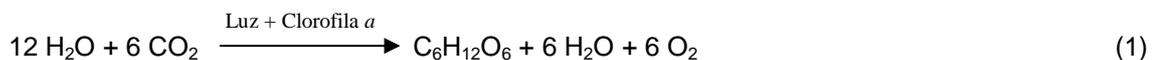
### 2 PLANTAS, FISILOGIA E PRODUTIVIDADE – ASPECTOS FÍSICO-QUÍMICOS.

As condições climáticas (disponibilidade hídrica, energia luminosa e temperatura) e é claro, a fertilidade do solo cultivado são determinantes na produtividade vegetal. Contudo, toda produção agrícola e seu rendimento é controlado pelo processo de fotossíntese da planta, que envolve a conversão de energia luminosa (radiação solar) em energia química, usando como ingredientes CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O que sofre variação conforme o tipo de metabolismo da espécie [20].

#### 2.1 Fotossíntese

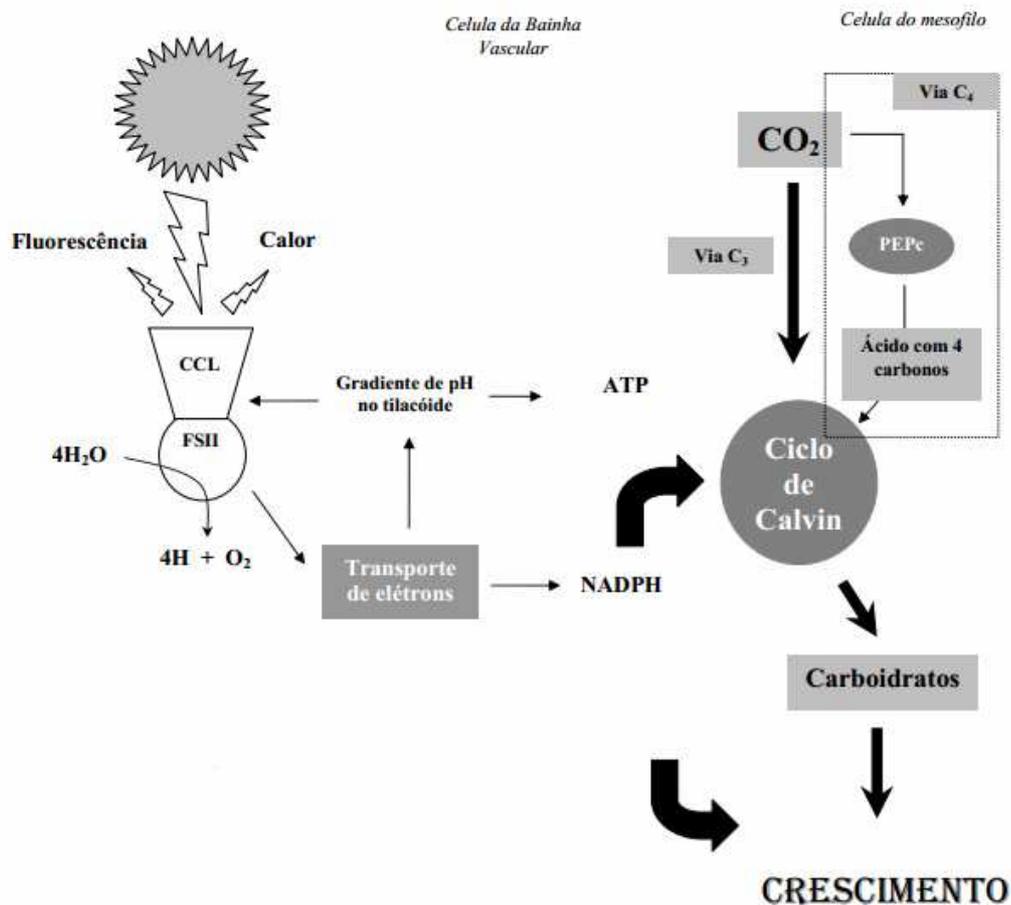
O sistema fotossintético da planta se localiza nos cloroplastos. Formado por uma dupla membrana, disposta em regiões de alta densidade e denominada o grana, e de baixa densidade, denominado a lamela; e alocado por uma matriz externa, o estroma, e uma interna, o lúmen. A fotossíntese acontece nos tilacóides, devido à presença de pigmentos fotossintéticos, as clorofilas, que absorvem luz na faixa de 400-700 nm. É esta faixa do espectro, que é utilizada pelos vegetais como fonte de energia para as suas atividades metabólicas, é comumente identificada como Radiação fotossinteticamente Ativa (RFA), cuja unidade de medida é  $\mu\text{mol de fótons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$  [20].

O processo fotossintético pode ser descrito de forma simplificada, como mostra a Equação 1.



A fotossíntese, no entanto, refere-se a uma série de reações, as quais envolvem: Absorção da luz, conversão de energia, transferência de elétrons e múltiplos processos dos quais participam enzimas para conversão de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O em carboidratos. O processo envolve reações com luz para produção de O<sub>2</sub>, Adenosina tri-fosfato (ATP) e Nicotinamida hidrogenase (NADPH) e Carbono (C) que são sintetizados a partir da energia radiante e também

reações de redução do Carbono na ausência de luz (escuro), que consome ATP e NADPH e produz carboidratos, que na soja ocorre via metabolismo  $C_3$  (que reduzem  $CO_2$  via ciclo de Calvim). Essas reações ocorrem em regiões distintas: a primeira nas membranas do tilacóide e a segunda no estroma, mediada por enzimas <sup>[20]</sup>. A Figura 1 apresenta as principais etapas no processo de Fotossíntese.



**Figura 1** - Esquema mostrando as principais etapas do processo de fotossíntese e suas interrelações. (CCL= centro de captura de luz, FSII=fotossistema II, ATP=adenosina trifosfato, NADPH=nicotinamida adenosina difosfato reduzida. Note que na captação de gás carbônico há duas vias, a  $C_3$  e a via  $C_4$ . Todas as vias levam ao mesmo lugar, que é produzir carboidratos que serão utilizados para o crescimento da planta. Fonte: BUCKERIDGE, S. M., Disponível em: <http://felix.ib.usp.br>. Acesso em: 12-01-2012.

## 2.2 Plantas Daninhas

A interferência das plantas daninhas (plantas infestantes) pode promover perdas na produtividade da lavoura em níveis variados, de 10 a 80% <sup>[20]</sup>. Essa

interferência se dá pela competição dos macro e micronutrientes presentes no solo entre a planta infestante e a cultura cultivada (soja, milho, etc).

Características químicas e físicas do solo e às condições climáticas, irão definir o grau de interferência das plantas daninhas na cultura, a necessidade de controle delas, bem como das variedades das espécies cultivadas.

As principais plantas infestantes pertencem as famílias das Gramineae como a *Digitaria horizontalis* (Capim-colchão, Capim-carrapicho, Capim-braquiária etc.); *Cyperaceae* (tiririca) <sup>[20]</sup>.

As plantas infestantes são controladas por métodos preventivos, culturais, mecânicos, biológicos e químicos. Os métodos preventivos envolvem medidas que visam evitar a entrada e/ou a disseminação, na área, de propágulos de plantas daninhas. Já o controle cultural visa tornar a cultura mais competitiva em relação às plantas infestantes. Contudo, o controle químico através do uso de herbicidas é o método mais utilizado devido as sua alta eficiência, alto rendimento e baixo custo <sup>[20]</sup>. Dentre os principais herbicidas registrados para controle de plantas daninhas 36% podem ser usados em modalidades de aplicações tanto em tratamento pré como pós-emergente.

Seus mecanismos de ação envolvem regulação no crescimento, inibição do fotossistema I e II, inibição da divisão celular, inibição da enzima enol piruvil chiquimato fosfatase e inibição da síntese de carotenóides <sup>[20-21]</sup>.

### **2.3 Herbicidas**

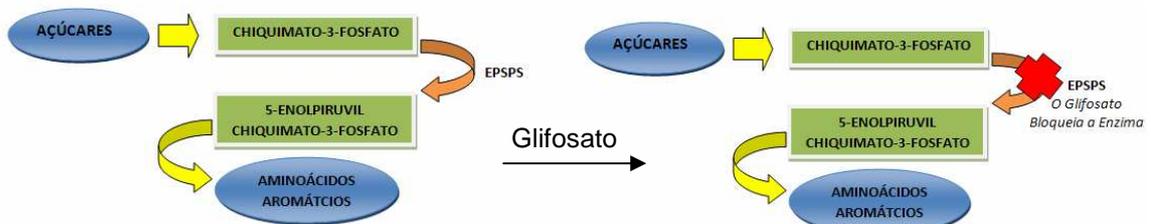
Os herbicidas se dividem em cinco categorias classificadas de acordo com o tipo de inibição específica de cada grupo e se subdividem de acordo com as enzimas alvos de atuação <sup>[21]</sup>. A discussão sobre o stress induzido pelo herbicida deve levar em conta seus efeitos gerais de acordo com a sua categoria, a enzima alvo de ação e o tipo de inibição induzida na planta. Neste contexto, cinco categorias de herbicidas são apresentadas:

- (1) Inibidores Fotossintéticos
- (2) Inibidores Biossintéticos
- (3) Desreguladores Hormonais
- (4) Indutores de Metabolismos de Herbicidas e
- (5) Efeitos no Genoma.

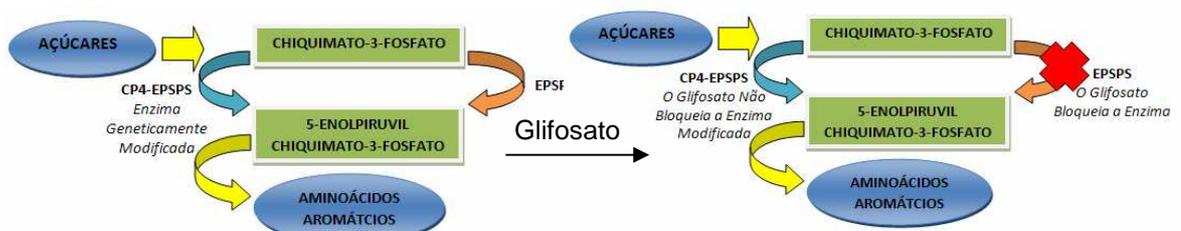
Esta pesquisa avaliou alterações fotossintéticas induzidas pela ação do herbicida glifosato um inibidor biossintético. Herbicidas inibidores biossintéticos são formados por apenas um grupo, do qual atuam via: ácidos graxos inibindo a enzima Acetil-CoA carboxilase; ácido fólico inibindo a enzima Di hidropteroate sintase; metabolismo da amônia inibindo a enzima Glutamine synthetase; quinonas inibindo a enzima 4-Hydroxiphenilpyruvate; carotenóides inibindo a enzima Lycopene cyclase e via clorofila inibindo a enzima Protoporphyrinogen oxidase [21-22].

## 2.4 Glifosato

O herbicida glifosato é o inibidor biossintético mais conhecido. Este herbicida inibe a enzima EPSPs, responsável pela biossíntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano, tirosina e componentes importantes de proteínas como fenilpropanóides, fitoalexinas, ligninas [21]. As Figura 2 e 3 ilustram de forma simplificada o mecanismo de ação do herbicida glifosato em plantas de soja convencional e transgênica respectivamente.



**Figura 2** – Mecanismo de síntese de aminoácidos soja convencional e modo de ação do glifosato.



**Figura 3** – Mecanismo de síntese de aminoácidos soja transgênica e modo de ação do glifosato.

Como mostrado pela Figura 2, na soja convencional, o glifosato bloqueia a enzima 5-enolpiruvil chiquimato 3-fosfato, impedindo a síntese dos aminoácidos essenciais, causando sua morte. Na soja transgênica o bloqueio ainda se processa, contudo através de uma nova rota, possível através da enzima modificada, a planta pode sintetizar os aminoácidos essenciais tornando a mesma tolerante ao herbicida <sup>[25]</sup>, como apresentado pela Figura 3.

Assim, em plantas tolerantes como a soja RR, esse processo não ocorre. A base da resistência ao glifosato na soja é a inserção do gene CP4-EPSPs, da *Agrobacterium sp*, linhagem CP<sub>4</sub>, em seu genoma <sup>[23-25]</sup>. O que faz com que a soja geneticamente modificada tenha uma nova rota de síntese dos aminoácidos <sup>[25]</sup>. Na atualidade o uso de sementes transgênicas ainda é restrito a poucas culturas como a soja, milho e algodão por representarem mercados mais significativos.

A absorção do glifosato pelas plantas se dá através das células pela difusão passiva ou por meio de transporte via fosfato ATPase (transportador fosfato energizado – plamalena). O glifosato é continuamente reciclado pelo floema, move-se em toda planta em um intervalo de 72 horas e se acumula nas folhas jovens, raízes e meristemas <sup>[26]</sup>.

#### **2.4.1 Toxicidade**

A meia vida do glifosato no solo pode variar de várias semanas a anos, sendo seus resíduos, cerca de 90%, encontrados a uma camada de 15 cm do solo, podendo afetar não só a atividade microbiana, mas também afetar a nutrição de micronutrientes de plantas <sup>[27]</sup>.

Os principais produtos de degradação do glifosato são o ácido aminometilfosfônico (AMPA), que consiste na clivagem oxidativa da ligação carbono-nitrogênio e a Sarcosina, que consiste da clivagem da ligação fósforo-carbono por ação da bactéria *Agrobacterium radio bacter* ou *Enterobacter* (enzima C-P liase) <sup>[28]</sup>.

Nas plantas, após absorção do herbicida, a formação de compostos insolúveis, complexos glifosato-metal, no tecido da planta, pode limitar o transporte de micronutrientes catiônicos. No entanto, na planta, o glifosato

sofre pouca degradação e é sistematicamente transportado para locais metabolicamente ativos<sup>[8]</sup>.

Cultivares de soja, resistente ao glifosato, apresentam leve clorose nos trifólios jovens quando submetidos à doses recomendadas de glifosato<sup>[27]</sup>, sendo também o estado nutricional da planta bastante afetado<sup>[21]</sup>.

#### 2.4.2 Recomendações Técnicas de Aplicação

A concentração recomendada pelo fabricante se aplica na faixa de 0,50-0,75 Kg de p. c. ha<sup>-1</sup> para Campim-carrapicho (*Cenchrus echinatu*) e Capim-Colchão (*Digitaria horizontalis*), o que equivale a 375 g.100L<sup>-1</sup>, de acordo com a Tabela 1.

**Tabela 1** – Recomendação para aplicação ROUNDUP<sup>®</sup> WG em soja geneticamente modificada tolerante ao Glifosato.

FOLHA ESTREITA		Época (DAE) e estágio de crescimento da planta infestante
		Dose Kg de p.c./ha
Nome Comum	Nome Científico	Aos 25 DAE, até 2 perfilhos ou 10 cm
		Estádio da soja: V <sub>3</sub>
Capim-carrapicho	<i>Cenchrus echinatus</i>	0,50 – 0,75
Capim-colchão	<i>Digitaria horizontalis</i>	0,50 – 0,75

Fonte: Bula Roundup WG.

O limite residual de pesticida aceito em alimentos para consumo humano é chamado de Limite Máximo de Resíduo (LMR). Na legislação brasileira os limites residuais de herbicida são estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os valores de alguns alimentos e o intervalo de confiança (intervalo de aplicação e colheita) são apresentados na Tabela 2<sup>[47]</sup>.

**Tabela 2** – Tolerância e intervalo de confiança para glifosato em alimentos

Alimentos	Tolerância	Intervalo de segurança
<b>Sementes oleaginosas</b>		
Soja	2 ppm	45 dias
<b>Outros produtos</b>		
Café	1,0 ppm	15 dias
Cacau	0,1 ppm	30 dias
Cana-de-Açúcar	1,0 ppm	30 dias
Pastagens	0,2 ppm	ND*

Fonte: AMARANTE *et al*, 2002

## 2.5 Fluorescência da Clorofila

A clorofila (Chl) é o principal pigmento estudado por espectroscopia de fluorescência devido a representar a melhor informação bioquímica da planta e por ser o principal pigmento responsável pela fotossíntese <sup>[19]</sup>. Contudo, diversos estudos envolvem pigmentos como Acido ferúlico, Adenosina Trifosfato (ATP), Nicotinamida Adenosina Difosfato Reduzida (NADPH) e o Rubisco, que também estão presentes na folha e exercem funções bioquímicas assim como captam luz do ambiente <sup>[19]</sup>.

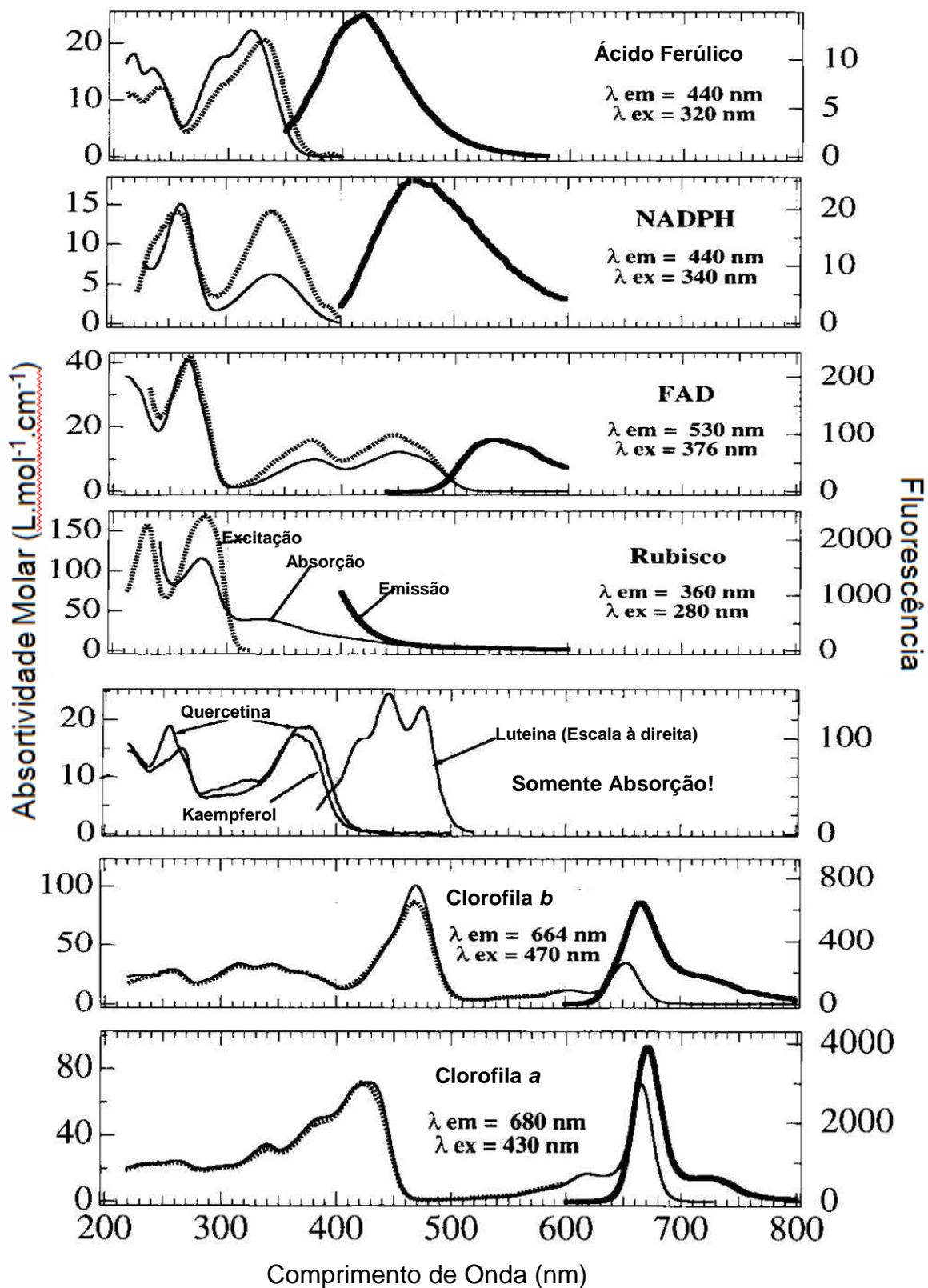
As clorofilas *a* e *b* são partes do conjunto de pigmentos responsáveis por coletar luz do ambiente. Esse conjunto de pigmentos é formado por dois grupos divididos por suas funcionalidades, os pigmentos acessórios e pigmento principal.

Na planta, os pigmentos acessórios têm a função de absorver a luz do ambiente e transferir essa energia captada para o pigmento principal. Os pigmentos acessórios são formados por todos os pigmentos presentes na folha exceto a clorofila *a* (Chl *a*), sendo os mais abundantes a clorofila *b* e os carotenoides <sup>[19]</sup>.

A Chl *a* também absorve luz, contudo sua função principal é capturar a energia dos pigmentos acessórios e transferir essa energia para os centros de reação para ocorrência da fotossíntese. Esses centros de reação são formados por dois fotossistemas: o Fotossistema I (FSI) e Fotossistema II (FSII).

Assim, ao absorver fótons do ambiente, os pigmentos auxiliares sofrem emissão na região de absorção das clorofilas. No entanto ao absorver fótons a clorofila *b* transfere sua energia para a Chl *a* que passa a ser o único fluoróforo a transferir energia para o fotossistema <sup>[18-19]</sup>.

A Figura 4 apresenta um conjunto de espectros de absorção molecular (linha pontilhada) e de fluorescência (linha cheia) em comprimentos de onda de excitação de 355 nm dos principais pigmentos presentes na folha. A energia UV é a principal radiação para excitar o ácido Ferúlico, NADPH, FAD e Rubisco. A fluorescência destes pigmentos ocorre na região do espectro compreendida entre 450 e 550 nm e que as clorofilas absorvem fortemente entre 400 e 500 nm (região do azul) e 600 e 700nm (região do vermelho).



**Figura 4** – Figura modificada de Espectros de Absorção Molecular (linha) e de Fluorescência (linha negro) dos principais pigmentos contidos na folha. **Fonte:** GEROVIC *et al*, 1999.

A fluorescência do FSI compreende a região do vermelho próximo (680-700 nm) e a do FSII do vermelho distante (730-740 nm). A banda de fluorescência em 680 nm é dependente da transferência de energia da clorofila para o FS II. Já a banda de fluorescência em 740 nm é dependente da transferência de energia da clorofila para os dois fotossistemas (FS I e FS II). Sob certas condições de stress, plantas com metabolismo C3, como a soja, sofrem danos fotoquímicos que são gerados particularmente no FS I <sup>[42-43]</sup>.

Já com relação ao FS II as alterações fotossintéticas estão ligadas à degradação da proteína D1, formada pelos aminoácidos valina, glicina, isoleucina, triptofano, treonina, alanina e arginina. As bandas de absorção características do centro de reação do FSI apresentam máxima intensidade em 700 nm, enquanto que o centro de reação do FSII apresenta máxima absorção em 680 nm. Essas absorções são devidas ao agrupamento de moléculas de Chl *a*, que absorvem e transferem a energia para o centro de reação.

A análise foliar *in vivo* por fluorescência da Chl *a* torna possível avaliar as diferentes condições de stress em que a planta é submetida, isto por que a fluorescência da Chl *a*, *in vivo*, apresenta indiretamente o aparato fotossintético da planta, sendo nesta condição de análise o principal pigmento responsável pela fotossíntese e único responsável pela emissão na região entre 600 e 800 nm em análise *in vivo*, podendo atuar como biosensor das diferentes alterações fisiológicas na planta.

Excitação UV em folhas verdes induz dois tipos distintos, fundamentalmente diferentes, mas ainda assim complementares de fluorescência: uma fluorescência azul-verde na faixa de 400-630 nm e a fluorescência da clorofila *a* na região vermelha para vermelho-distante (630-800 nm) do espectro <sup>[19]</sup>. As intensidades relativas desses dois tipos de fluorescência são altamente sensíveis às propriedades intrínsecas da folha revelando muito sobre o estado fisiológico da planta como fotossíntese, reações fotoquímicas primárias e conteúdo de clorofila <sup>[19]</sup>.

A fluorescência da Chl *a* tem sido extensivamente estudada ao longo dos últimos anos. Esses estudos demonstram que, as emissões da Chl *a*, estão intimamente relacionadas com o estado do fotossistema II <sup>[30]</sup>, que desempenha um papel fundamental no processo de fotossíntese. Em

condições de ambientes estressantes ocorre o decréscimo característico na eficiência quântica potencial do fotossistema II, podendo ser detectada pela queda na relação  $F_v/F_m$ <sup>[31]</sup>, onde  $F_v$  representa a fluorescência variável e  $F_m$  a fluorescência máxima. Esta relação fornece o rendimento quântico do fotossistema<sup>[49]</sup>. Um estudo baseado em índices de vegetação apontou que lavouras que sofreram derivação de aplicações de glifosato, apresentaram redução do conteúdo de Chl a para soja, algodão e milho já na primeira aplicação, em total de quatro realizadas<sup>[32]</sup>.

Neste contexto, a Chl a se torna uma sonda de análise para investigar possíveis alterações nos fotossistemas da planta, como resultado de stress físico ou químico, podendo inclusive revelar a presença de substâncias tóxicas amplamente difundidas no meio ambiente, como herbicidas, pesticidas e metais pesados<sup>[30]</sup>.

## CAPITULO III – OBJETIVOS DA PESQUISA

### 3 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa teve como objetivo principal avaliar por fluorescência as alterações no processo fotossintético induzidas pela ação do glifosato em plantas de soja geneticamente modificada (transgênicas) com tratamento pós-emergente em diferentes teores deste herbicida.

#### 3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a aplicação da espectroscopia de fluorescência no estudo de stress induzido por herbicidas em plantas de soja transgênicas através de análises *in vivo* da Chl a.
- Estudar a evolução temporal da emissão foliar da Chl a em plantas de soja transgênica - por técnica de fluorescência - frente a diferentes teores de herbicida.
- Avaliar o comportamento de três variedades de plantas de soja transgênica após tratamento pós-emergente com herbicida glifosato através de análises *in vivo* a partir da fluorescência emitida pela clorofila a.

## CAPITULO IV – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4 PLANTIO E CULTIVO

Durante a presente investigação foram analisadas três variedades de soja (*Glycine max*) geneticamente modificadas tolerantes ao herbicida glifosato: BRS 245RR; BRS 246RR e BRS 295RR, com percentual de germinação de 92%.

Antes do plantio as sementes foram previamente tratadas com fungicida e inoculante, sendo que para cada 100 g de sementes adicionou-se 0,25g de inoculante (Biomax  $7,2 \times 10^9$  ufc/g) e 0,3 mL de fungicida Derosal Plus<sup>[34]</sup>. Feito isto, as sementes foram semeadas em vasos contendo 3,2 dm<sup>3</sup> de solo Latossolo Vermelho. O solo em cada vaso foi previamente corrigido com calcário e adubado com  $0,1778 \pm 0,0001$  g de KCl e  $0,2375 \pm 0,0001$  g de Superfosfato Triplo, conforme protocolo já estabelecido pelo Laboratório de Fitopatologia da UFGD, sendo dez sementes de soja semeadas por vaso<sup>[34]</sup>.

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, modelo estufa, equipada com sistema de resfriamento por ventilação umidificadora evaporativa de água e sistema de irrigação por pulverização, contudo, os vasos foram regados por pesagem para minimizar qualquer derivação.

As plantas ficaram expostas sobre um fotoperíodo de 12h de pleno sol sobre faixa de temperatura de 24-36 ° C no período diurno e 19-23 ° C no período noturno, sendo os vasos derivados especialmente na casa de vegetação, para controlar quaisquer variáveis como diferença de luminosidade e temperatura na estufa.

#### 4.1 Aplicação do Herbicida

As soluções foram preparadas em balão volumétrico usando como produto comercial o Roundup WG forma granulada diluído em água Milli-Q.

As aplicações obedeceram a critérios técnicos do fabricante, que para soja transgênica recomenda uma calda de aplicação de 120 litros por hectare (ha), sendo aplicação única para soja geneticamente modificada em estágio de desenvolvimento V<sub>3</sub> (3º trifólio totalmente expandido).

Para aspersão foi usado equipamento manual terrestre <sup>[22]</sup>, como mostra a Figura 3. Para garantir a máxima absorção do herbicida pelas folhas, as amostras foram previamente irrigadas. O volume foi aspergido a uma pressão aproximada de 29 Lb/pol<sup>2</sup> e um volume aproximado de 12 mL/m<sup>2</sup>, o que equivale a 120L/há, como recomendado para aplicações em soja transgênica.



**Figura 5** – Aplicador Manual usado para aspersão de herbicida nas amostras.

Para cada variedade, separaram-se quatro grupos de amostragem, sendo cada grupo composto de 20 plantas (duas por vaso). O primeiro grupo usado como controle e/ou testemunho – [CTR] (0,00 g.L<sup>-1</sup>- Aspersão de Água), o segundo usado para aplicação recomendada – [GTO I] (Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>), o terceiro para aplicação dobrada – [GTO II] (Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>) e o quarto para aplicação triplicada – [GTO III] (Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>) de herbicida.

## 4.2 Análise Foliar

A fluorescência emitida pela Chl *a in vivo* (foliar), foi medida em fluorímetro portátil constituído de dois lasers, operantes em 405nm e em 532nm, um espectrômetro (USB 2000 FL - Ocean Optics), uma fibra óptica do tipo Y e um laptop, como mostra Figura 6.



**Figura 6** – Espectrofluorímetro Portátil (MM'OPTICS).

As leituras foram realizadas sobre excitação do folíolo central do trifólio, como mostra a Figura 7, antes da aspersão do herbicida e após aspersão, sendo que na leitura após aspergir o herbicida, respeitou-se o intervalo de 3 horas, tempo necessário para garantir máxima absorção do herbicida pela planta, as medidas subseqüentes (total de 20 medidas) foram realizadas em intervalos de 24 horas. Todas as curvas de emissão foram normalizadas frente à de maior intensidade que, no presente estudo, se deu sempre para a variedade controle.



**Figura 7** – Imagem da Análise *in vivo* do Folíolo Central do primeiro trifólio por fluorescência.

### 4.3 Extração da Clorofila

A clorofila foi obtida a partir do extrato do folíolo central do segundo trifólio, sem maceração em acetona 80% <sup>[36]</sup>, isto por que as ligações entre as moléculas de clorofilas são muito frágeis (não-covalentes), rompendo-se com facilidade ao macerar o tecido em solventes orgânicos <sup>[37]</sup>. Após repouso de três dias a mistura foi centrifugada a 2000 RPM por 5 minutos. Para cada grupo realizaram-se cinco extrações. Sendo que cada extrato representava o substrato extraído de quatro plantas (4 folhas somando um total de 20).

#### 4.3.1 Análise do extrato da clorofila

A análise da clorofila via extrato, por absorção molecular compreendeu a região de 400 nm a 800 nm do visível. Nesta análise utilizou-se equipamento de bancada da Variam, modelo Cary-50, com fonte de excitação composta de uma lâmpada pulsada de Xenônio e um detector de diodo de Si, usando cubeta de duas faces polidas de 10 mm de caminho óptico.

Para o estudo de fluorescência foi utilizado fluorímetro de bancada da Varian, modelo Cary-Eclipse, com comprimentos de onda de excitação em 405 nm e 532 nm respectivamente, com fonte de excitação composta de uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), e com detecção da fluorescência por tubo fotomultiplicador (R928).

#### **4.3.2 Análise do teor de clorofila no extrato**

As concentrações de Chl *a* e Chl *a+b* foram calculadas a partir das equações simultâneas de Arnon [36]. Para o cálculo, levando-se em consideração o solvente usado na extração (acetona 80%) as equações 2 e 3 são apresentadas.

$$[\text{Chl } a + b] = 19,54 \cdot A^{646,6} + 8,29 \cdot A^{663,6} \quad (2)$$

$$[\text{Chl } a] = 13,71 \cdot A^{663,6} - 2,85 \cdot A^{646,6} \quad (3)$$

#### **4.4 Análise do Teor de Macronutrientes (Ca, Mg, K e P)**

Para esta análise a solução amostra é obtida da abertura foliar via úmida utilizando a mistura ácida HNO<sub>3</sub> + HClO<sub>4</sub> (3:1). Realizada a abertura foliar, pipetou-se 1,0 mL da solução e adicionou-se 4,0 mL de solução de Lantânio (La) 1%. Feito isto, procedeu-se a leitura de cálcio e magnésio em um espectrômetro modelo AA 240 FS – da VARIAN. O Potássio foi determinado em Fotômetro de Chama da Micronal, modelo B-462 calibrado com soluções padrão de 0 a 50 ppm para determinações em plantas. O Fósforo (P) foi determinado em espectrofotômetro da Fento, modelo 600 S em comprimento de onda de 600 nm.

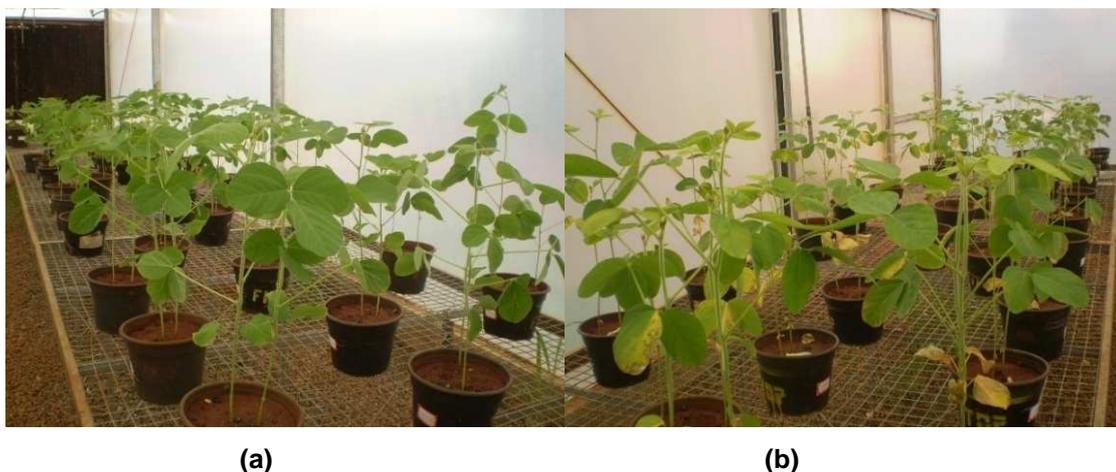
#### **4.5 Análise das Sementes 2ª Geração**

Para esta análise foram colhidas as sementes geradas pelos grupos CTR, GTO I, GTO II e GTO III da variedade BRS 245RR, sendo que, para cada grupo analisou-se 30 sementes. A fluorescência emitida pelas sementes foi medida com fluorímetro portátil em 405nm e em 532nm da MM'OPTICS.

## CAPITULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5 ANÁLISE FOLIAR

Em todas as variedades analisadas que sofreram tratamento pós-emergente com glifosato, independentemente da concentração, observou-se clorose (redução no teor de clorofila) nas folhas. Para as variedades controle este efeito não é observado, como mostra a Figura 8.

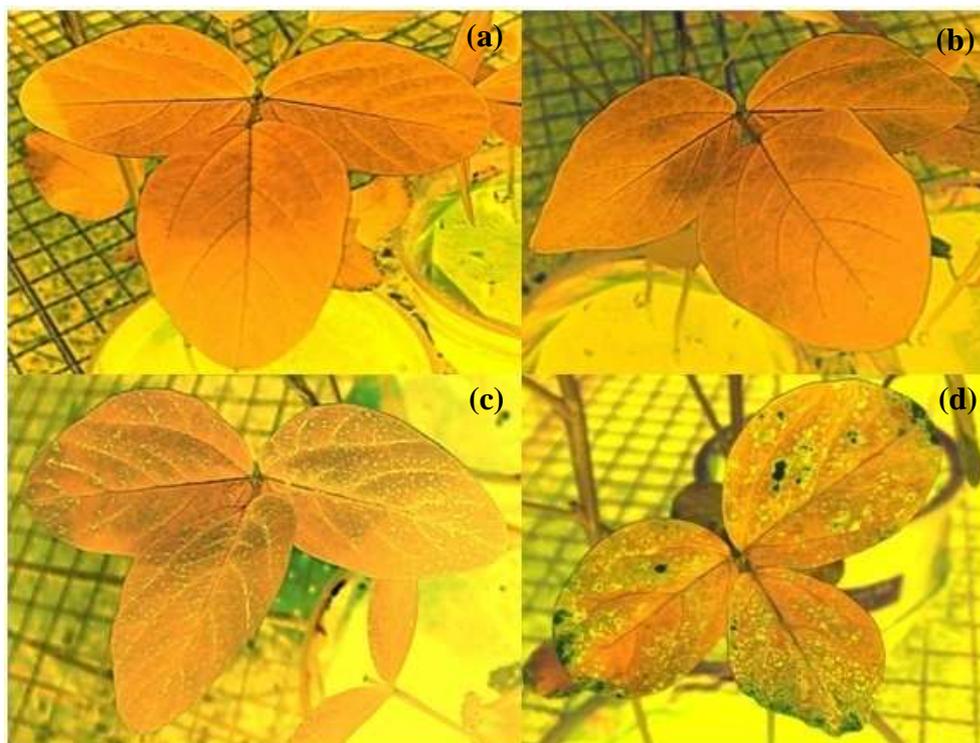


**Figura 8** – (a) Grupo Controle (sem tratamento pós-emergente) e (b) Grupo GTO (com tratamento pós-emergente)

A clorose das folhas está relacionada com a deficiência de magnésio induzida pela ação do herbicida. Isto porque o glifosato sendo um ácido fosfônico acaba atuando como agente quelante, formando complexo estável com cátions de metais divalente e trivalente<sup>[38]</sup>. Esse efeito quelante imobiliza micronutrientes essenciais como ferro e manganês, componentes necessários que atuam como co-fatores e reguladores de funções fisiológicas na planta<sup>[5]</sup>. Assim, o estado nutricional da soja transgênica (RR) também é fortemente afetado pelo uso do herbicida<sup>[21]</sup>.

A Figura 9 (para uma melhor visualização, um tratamento de imagem dado pela inversão de cores foi realizado), representa os trifólios de uma das três variedades estudadas – a BRS 245RR -, após nove dias da aplicação com diferentes teores de glifosato. De acordo com a Figura, é possível constatar, melhor os danos causados pela aplicação do herbicida em suas diferentes taxas de aplicação usadas neste estudo. As plantas sem tratamento pós-emergente se apresentam sem nenhuma clorose. Já as plantas submetidas às

aplicações recomendadas e dobradas apresentam clorose que se representam por pontos fluorescentes na imagem. Em aplicações triplicadas, as plantas apresentaram clorose e necrose dada pelos pontos negros. Como abordado anteriormente, o grau de clorose bem como da necrose, ocorre frente ao tratamento emergente com glifosato. Mesmo em concentrações recomendadas o herbicida causa stress, mas não intenso como em concentrações acima do recomendado.



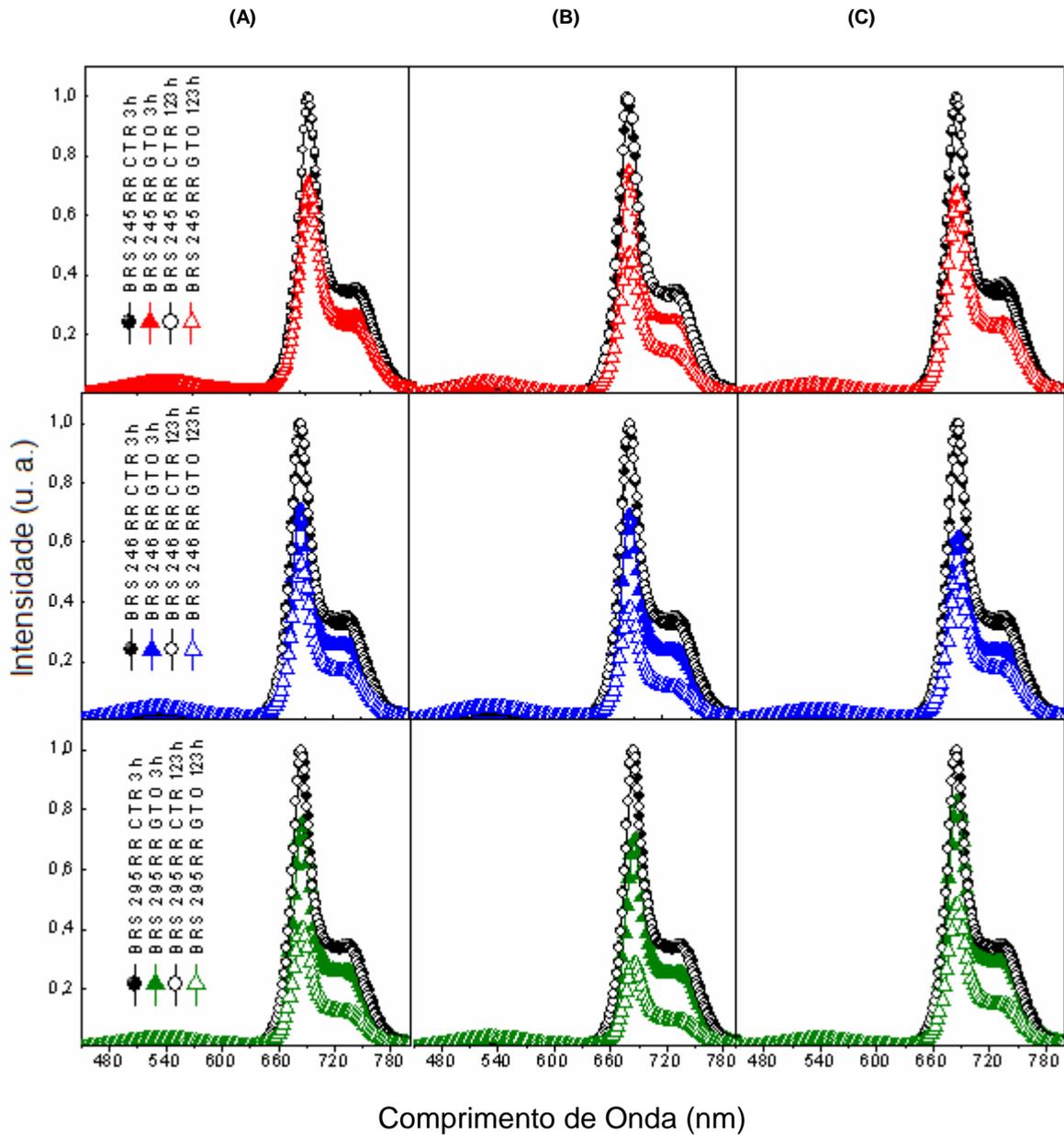
**Figura 9** – Imagem do primeiro trifólio da variedade Soja 245 RR aos 9 dias após tratamento pós-emergente . (a) sem tratamento pré-emergente; (b) com tratamento emergente (Glifosato, 3,75 g.L<sup>-1</sup>); (c) com tratamento pré-emergente (Glifosato, 7,50 g.L<sup>-1</sup>) e (d) com tratamento pré-emergente (Glifosato, 11,25 g.L<sup>-1</sup>).

A análise foliar, *in vivo*, foi realizada sobre cada folíolo central com excitações em 405 e 532 nm. A seguir são apresentados os dados obtidos dessas análises por fluorescência da Chl a induzida por luz laser em 405 nm na região entre 450 e 800 nm do primeiro trifólio (1º TrF) das três variedades avaliadas nesta pesquisa.

### 5.1 Análise Foliar 1º Trifólio (TrF)

As bandas de fluorescência foram normalizadas frente ao maior intensidade média que, neste intervalo de tempo, ocorreu para as amostras

controle. A Figura 10, apresenta o comportamento das bandas de emissão para as variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR no intervalo de tempo de 3 e 123 horas, respectivamente após tratamento com herbicida.



**Figura 10** – Variedades Soja BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR sobre diferentes taxas de GTO. Coluna (A) Teor GTO I - 3,75 g.L<sup>-1</sup>. Coluna (B) Teor GTO II - 7,50 g.L<sup>-1</sup> e Coluna (C) Teor de GTO III 11,25 g.L<sup>-1</sup>.

Os dados apontam supressão de intensidade de fluorescência da Chl a nas plantas com tratamento pós-emergente recomendado (GTO I) no tempo de 3 h da aspersão, assim como no tempo de 123 horas após aspersão.

As maiores supressões, contudo, são observadas para as amostras que sofreram tratamento pós-emergente com teores acima do recomendado. O comportamento das bandas de emissão para as variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR no intervalo de tempo de 3 e 123 horas respectivamente após tratamento com herbicida indicam uma possível foto inibição induzida pelo glifosato. A supressão observada em 685 e 735 nm é seguida de um pequeno aumento de intensidade da banda em 528 nm que é característica de produtos degradativos da clorofila que são responsáveis pela resposta da planta em condições de stress <sup>[25]</sup>.

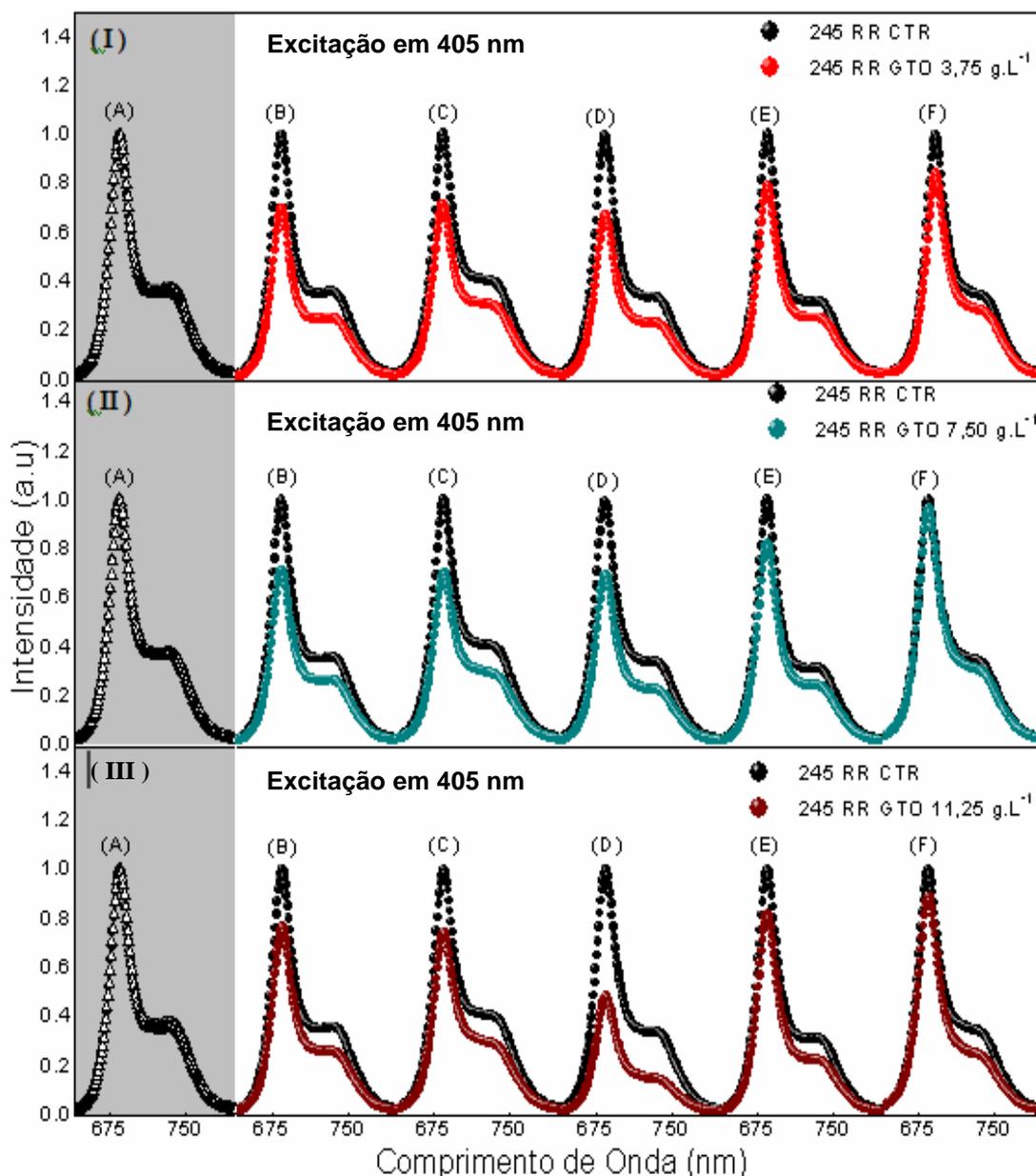
## 5.2 Evolução Temporal da Emissão

Tendo em vista que, as variações mais significativas na alteração de emissão foliar foram observadas na região entre 600 e 800 nm que compreende intrinsecamente, quando em análise *in vivo*, emissões da Chl *a*, nossas análises serão centradas na avaliação da emissão da Chl *a* em função do tempo nesta região.

De acordo com as recomendações técnicas de aplicação do herbicida glifosato, um intervalo de 20 dias após aplicação deve ser respeitado caso haja a necessidade de novas aplicações sobre a cultura no trato de ervas daninhas. Neste experimento foram realizadas medidas *in vivo* envolvendo o 1º TrF durante este intervalo, com o critério avaliativo da técnica de monitoramento por fluorescência *in vivo* da Chl *a* com fonte de luz laser.

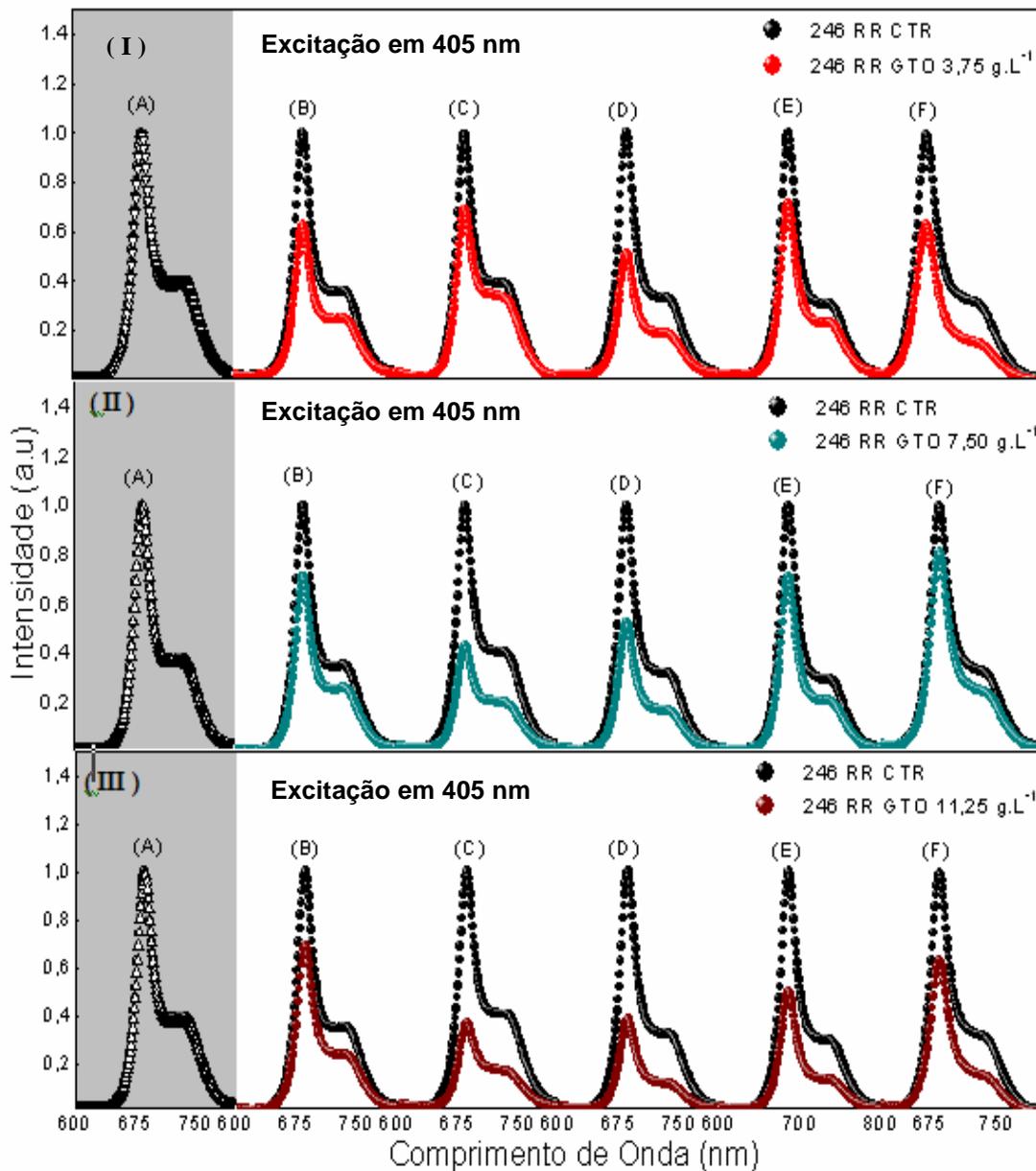
A Figura 11 apresenta as bandas de emissão no intervalo de 12 dias da aplicação do herbicida, a contar da medida zero (sem tratamento) para a variedade BRS 245RR. Inicialmente, após o tratamento com o herbicida (3 horas) ocorre supressão da fluorescência da banda da característica da Chl *a*.

Após 123 horas da aplicação uma recuperação de intensidade da banda em 685 nm é observada. Um estudo realizado apontou resposta da planta ao stress induzido pelo herbicida após 28 dias do tratamento pós-emergente, recomendando aplicações de herbicida na planta em sua fase inicial, como no estágio V<sub>3</sub>, o que propiciaria à planta, tempo ótimo para recuperação, minimizando perdas na produtividade <sup>[42]</sup>.



**Figura 11** – Bandas de Emissão Chl *a* *in vivo* do 1º TrF Soja BRS 245RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

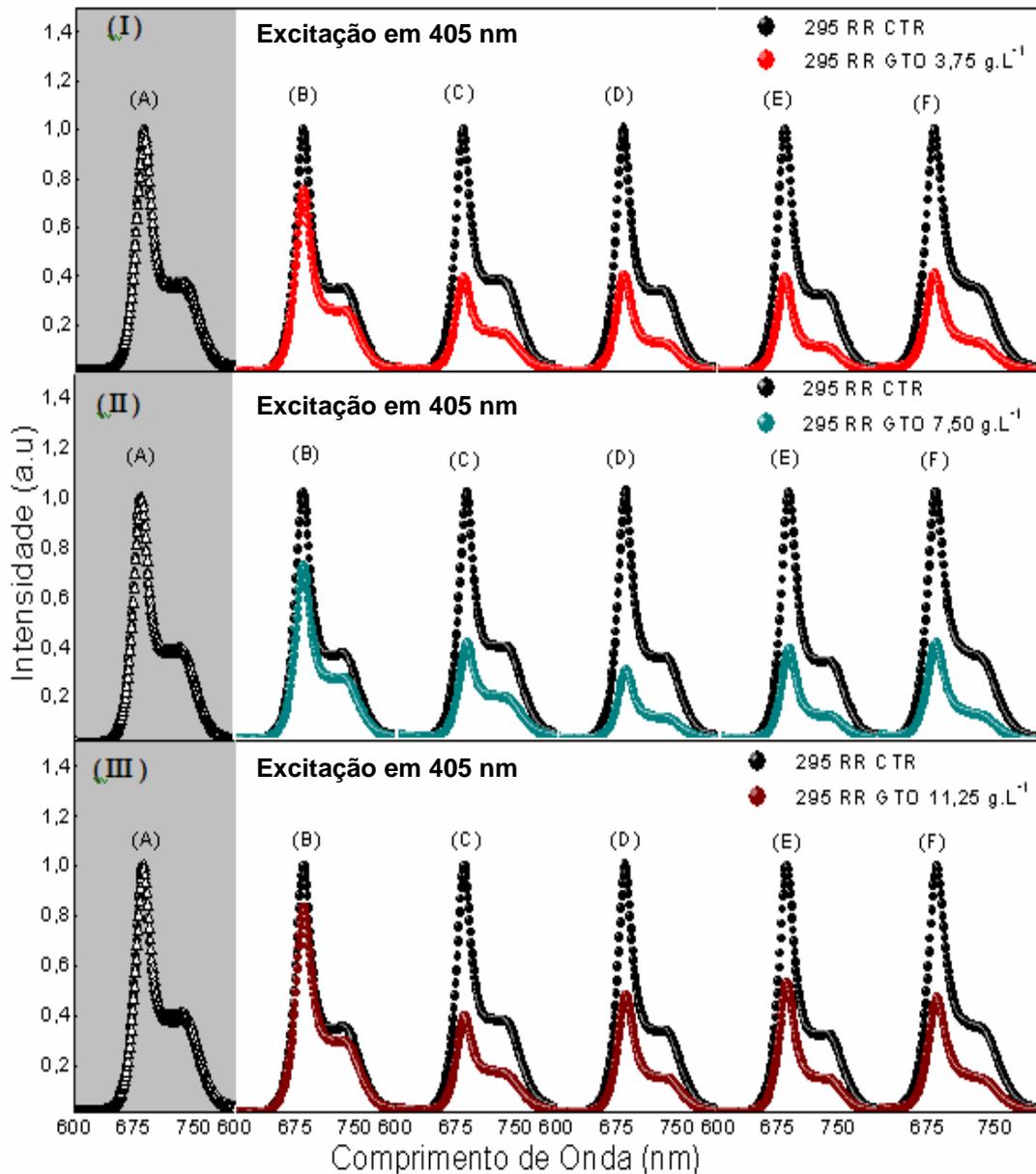
Como observado para variedade BRS 245RR, a variedade BRS 246RR sofre supressão após tratamento pós-emergente, independente do teor de herbicida aplicado, como mostra a Figura 12. Contudo, para esta variedade a recuperação de intensidade é observada em menor grau, quando submetida ao teor de aplicação triplicada (GTO III).



**Figura 12** – Bandas de Emissão Chl *a* *in vivo* do 1º TrF Soja 246 RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

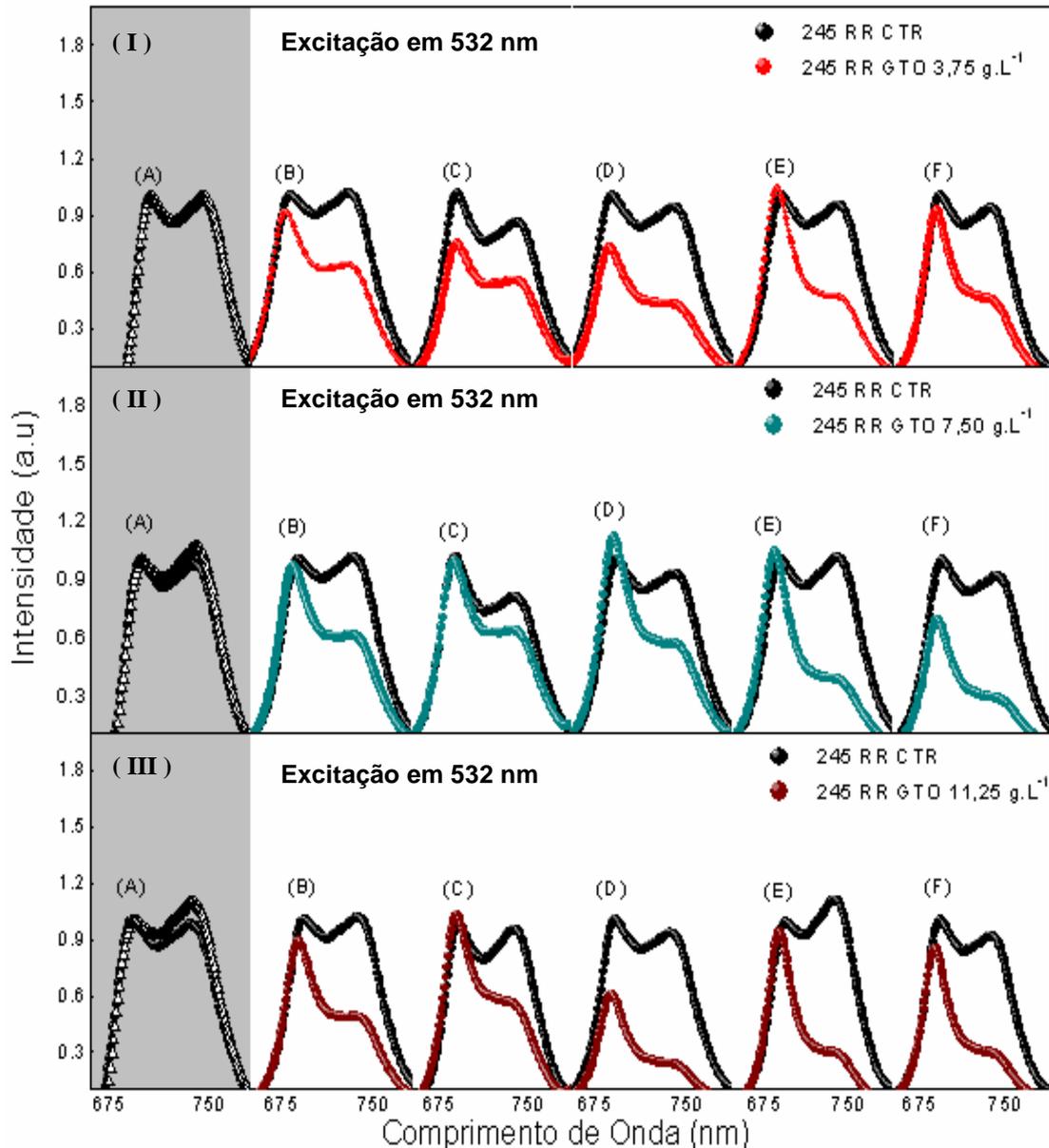
A Figura 13 apresenta o comportamento observado para a variedade BRS 295RR. Para esta variedade, o comportamento de resposta da planta ao stress com o tempo, dado pela recuperação de intensidade de emissão da Chl *a*, nas plantas com tratamento pós-emergente, não ocorre de forma significativa, nem mesmo a teores de aplicação recomendado, demonstrando

que, cada variedade transgênica pode responder de forma distinta ao stress causado por tratamentos pós-emergentes com herbicidas.



**Figura 13** – Bandas de Emissão Chl *a* *in vivo* do 1º TrF Soja 295 RR com o Tempo (h) quando excitado em 405 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

Nas medidas realizadas com excitação foliar de 532 nm a supressão da banda em 735 nm, ocorre de forma mais intensa, como mostra a Figura 14.

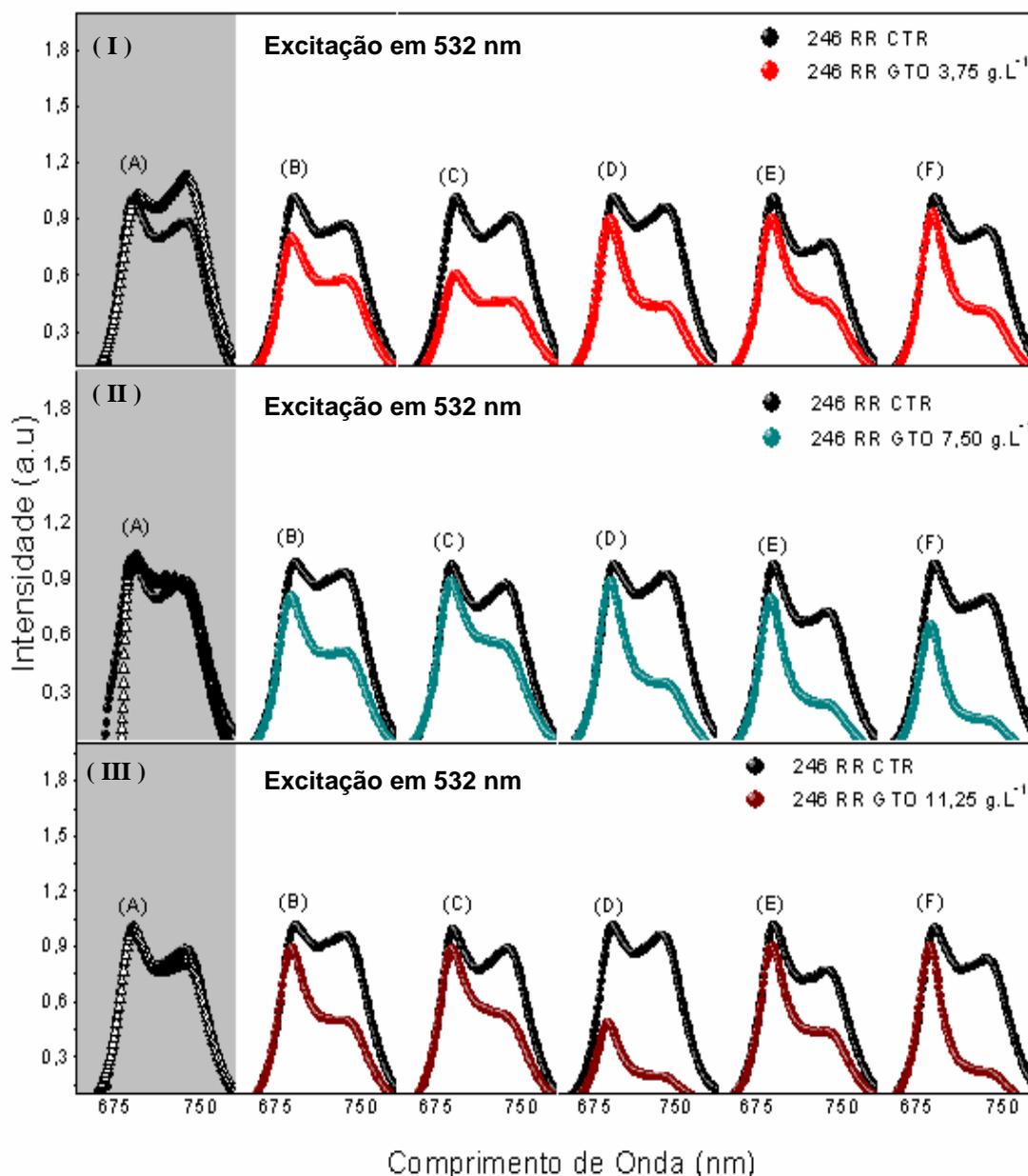


**Figura 14** – Bandas de Emissão Chl *a* *in vivo* do 1º TrF Soja 245 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

De acordo com os dados obtidos para a variedade BRS 245RR, a supressão de fluorescência da Chl *a*, está relacionada com a inibição – induzida pelo herbicida glifosato - da transferência de energia da Chl *a* para os dois fotossistemas (FSI e FSII). Essa caracterização fica mais evidente quando se observa intensa supressão em 740 nm em energia de excitação de 532 nm.

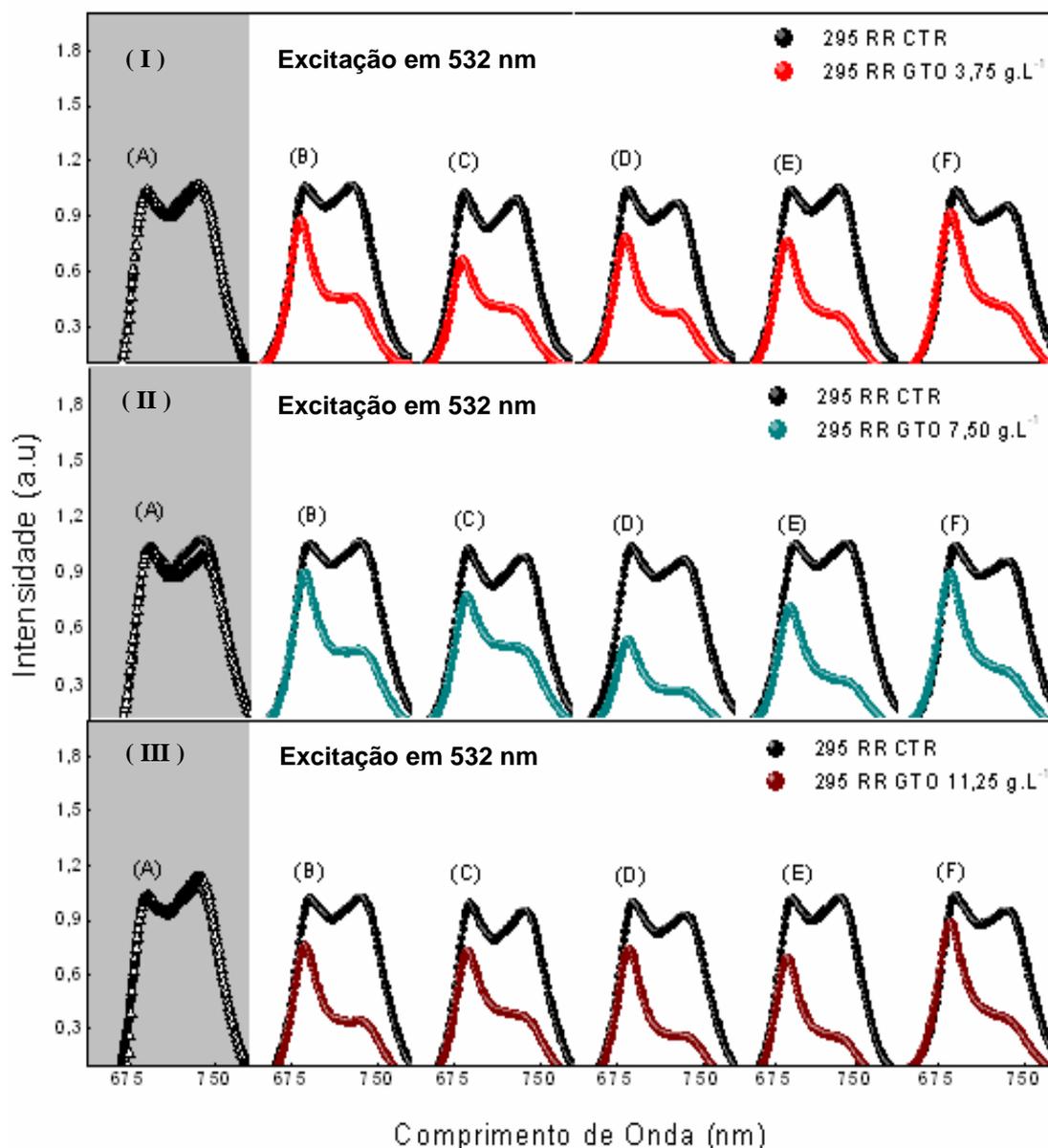
A Figura 15 apresenta os dados obtidos para a variedade BRS 246RR. O comportamento é semelhante ao observado para a variedade BRS 245RR.

Contudo, a variedade BRS 246RR apresenta maior grau de supressão da banda em 680 nm em taxas de herbicida acima do recomendado.



**Figura 15** – Bandas de Emissão Chl *a in vivo* do 1º TrF Soja 246 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

A Figura 16 apresenta os dados obtidos para a variedade BRS 295RR seguindo o mesmo comportamento. Contudo, para esta variedade, a supressão de fluorescência em 680 nm é mais intensa.



**Figura 16** – Bandas de Emissão Chl *a* *in vivo* do 1º TrF Soja 295 RR com o Tempo (h) quando excitado em 532 nm. (I) Glifosato 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (II) Glifosato 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (III) Glifosato 11,25 g.L<sup>-1</sup>. As letras A, B, C, D e E representam os tempos de medida: 0, 3, 51, 123, 171 e 291 horas respectivamente. O tempo 0 h (Medida A) representa a Emissão do grupo controle (CTR) sem tratamento e do grupo testemunho (GTO) antes do tratamento pós-emergente.

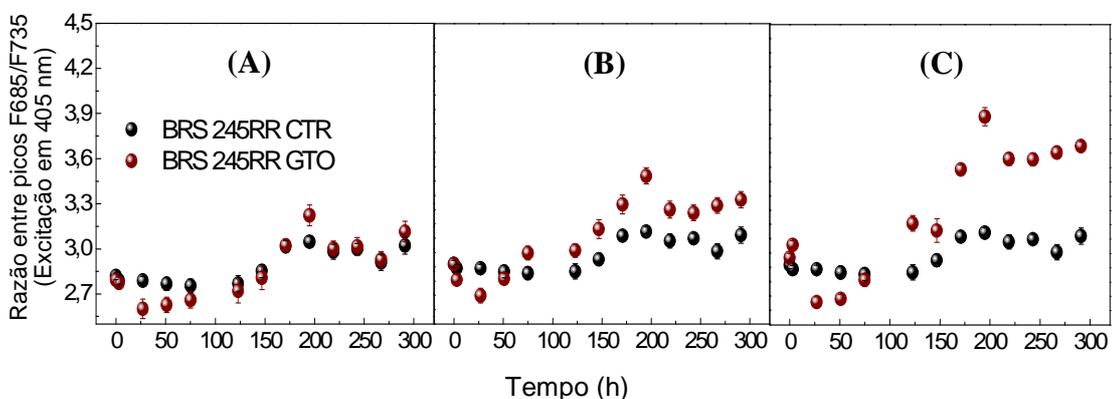
Em condições de stress os danos fotoquímicos são gerados particularmente no FS I e são mais intensos, em plantas com metabolismo C3, como a soja [43-44]. No FS II as alterações fotossintéticas estão ligadas à degradação da proteína D1. A resposta da planta se dá mais lenta para o FS I que para o FS II [45]. Como resultado a recuperação de intensidade das amostras com tratamento é observado com maior intensidade na banda de 680 nm.

### 5.3 Razões de Fluorescência

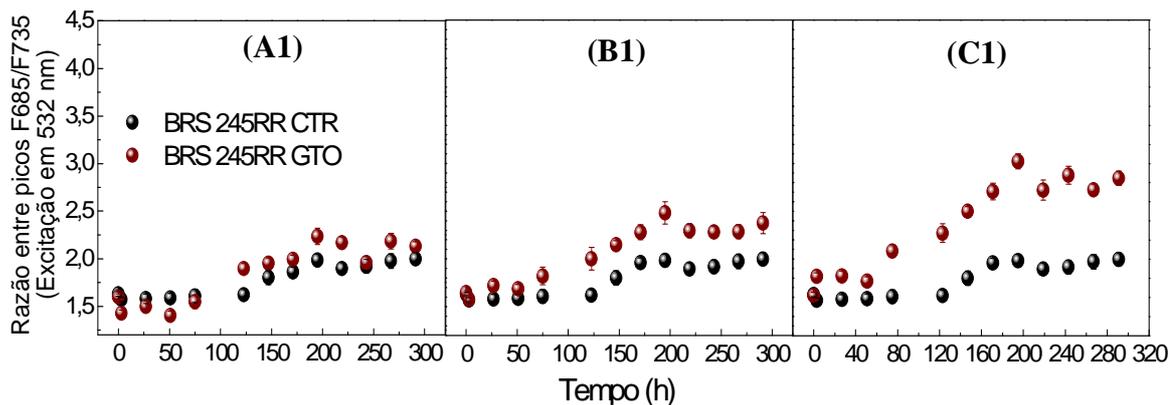
Como a banda característica de fluorescência da Chl *a* pode mudar de forma independente como resposta a diferentes fatores fisiológicos e ambientais <sup>[19]</sup>. Consideraram-se as variações dos índices de fluorescência em vez de apenas considerar como absoluta, mudanças de intensidade de fluorescência que, neste contexto, são fortemente afetados por fatores externos como, dispersão atmosférica, geometria da folha e movimentos <sup>[18]</sup>.

Os índices de fluorescência são obtidos através da razão entre picos. As razões usadas atualmente envolvem intensidades de pico em regiões de: vermelho-vermelho distante (685/735) e Azul-Vermelho e vermelho distante (450/685 e 450/735). Contudo, enquanto a fluorescência em 600-800 é característica da Chl *a*, vários compostos podem contribuir para emissão de fluorescência na região azul (450nm) e verde (530nm) do espectro nm sendo o Ácido Ferúlico um dos principais responsáveis pela fluorescência nesta região <sup>[19]</sup>. Emissões em 530 nm são de origem mesofílica e pode fornecer dados sobre o estado redox do Cloroplasto <sup>[18-19]</sup>, organela onde se realiza a fotossíntese.

Neste contexto, e de acordo com a região de interesse, este estudo baseou-se na análise da razão F685/F735, que pode fornecer um diagnóstico sobre o estado nutricional da planta. As Figuras, 17 e 18 apresentam os dados obtidos da razão F685/F735, para a variedade 245 RR quando submetida a concentrações recomendadas, dobradas e triplicadas de glifosato quando excitadas em 405 e 532 nm, respectivamente.



**Figura 17** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 405nm.

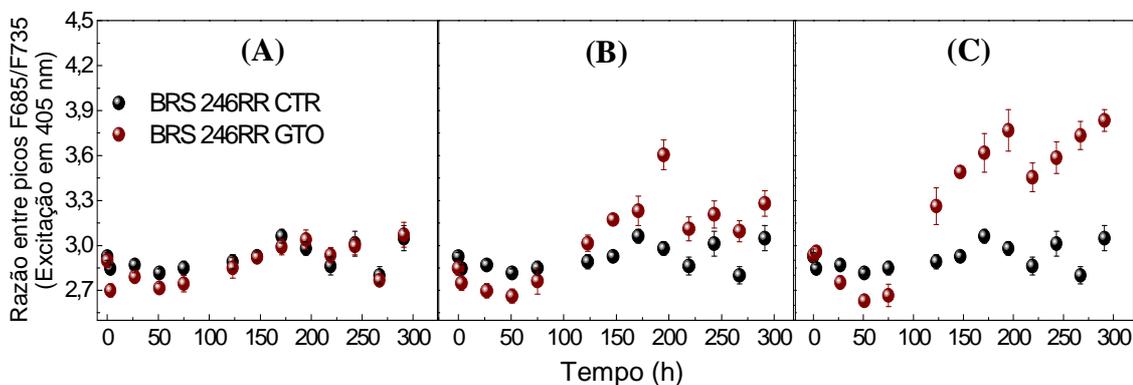


**Figura 18** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B1) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C1) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 532 nm.

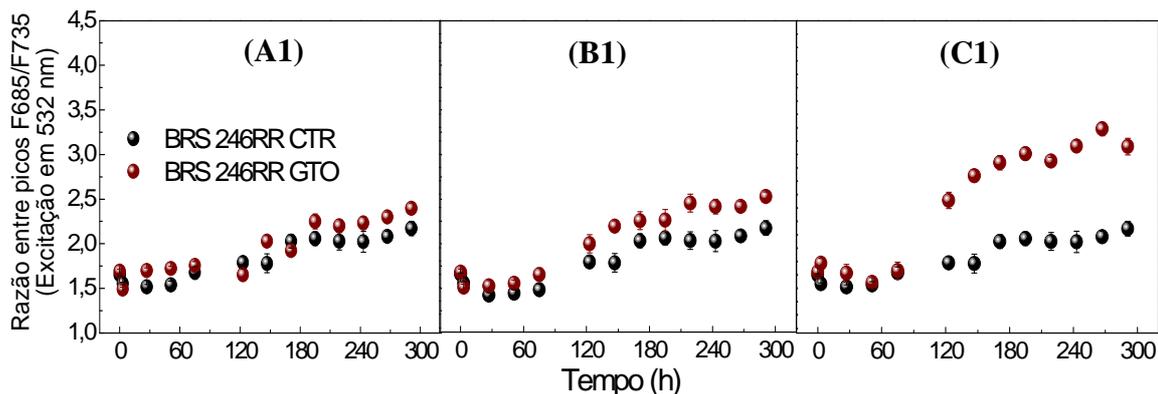
Tanto em 405 nm como em 532 nm é possível caracterizar por fluorescência amostras de variedades tolerantes que sofreram aplicação não recomendada e recomendada, respectivamente, dado pelo aumento da razão entre picos na região de emissão da Chl *a* *in vivo*. Portanto, o aumento dos índices de fluorescência dado pela razão entre picos dado por F685/F735 se relaciona com a concentração aspergida de herbicida, inferindo a seguinte condição:

- *Em concentração acima do recomendado de herbicida em plantas tolerantes, tem-se aumento de índice de fluorescência dado pela razão entre os máximos da Fluorescência do Vermelho Próximo com a Fluorescência do Vermelho Distante - FVP/FVD (685/735).*

A análise do índice de fluorescência dada pela razão (F685/F735) para a variedade BRS 246RR apresentou o mesmo comportamento observado para variedade BRS 245RR, como pode ser observado pelas Figuras 19 e 20, quando excitadas em 405 e 532 nm, respectivamente.

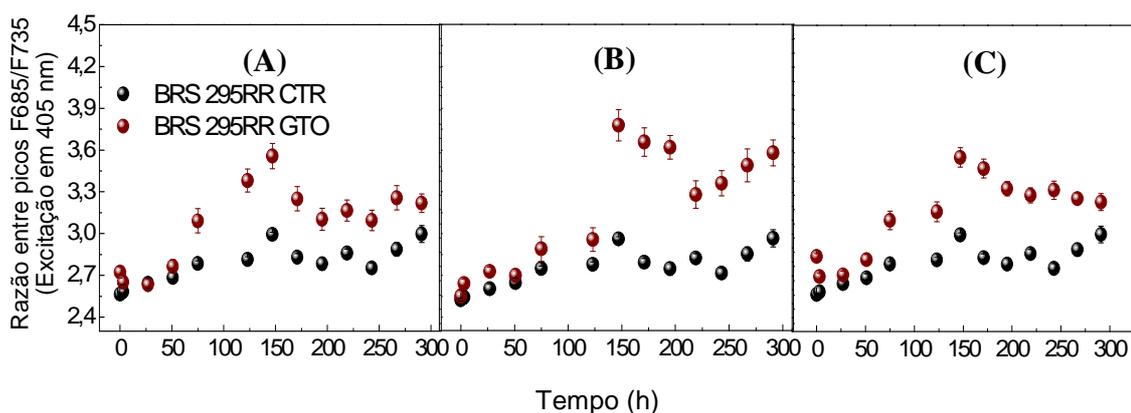


**Figura 19** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 246RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 405 nm.

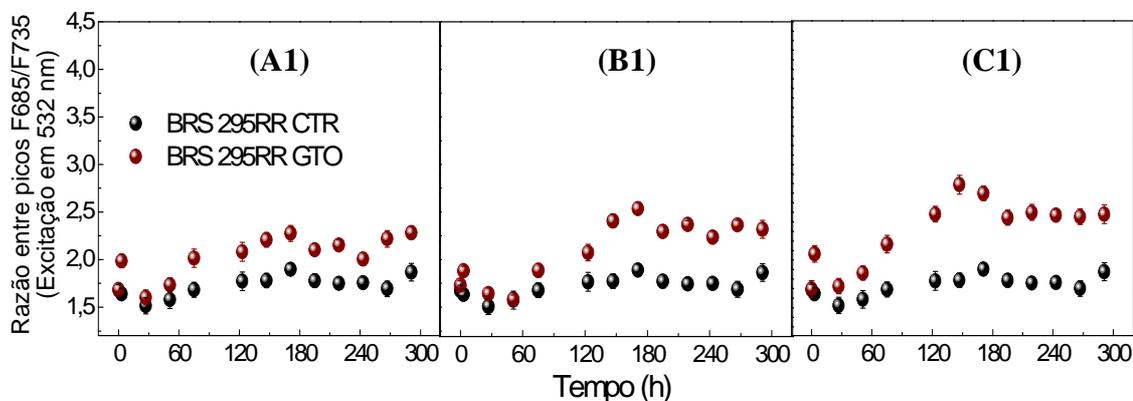


**Figura 20** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 246RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B1) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C1) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 532 nm.

As Figuras, 21 e 22, apresentam os índices obtidos pela razão F685/F735 para variedade BRS 295RR quando excitada em 405 e 532 nm, respectivamente.



**Figura 21** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 295RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 405 nm.



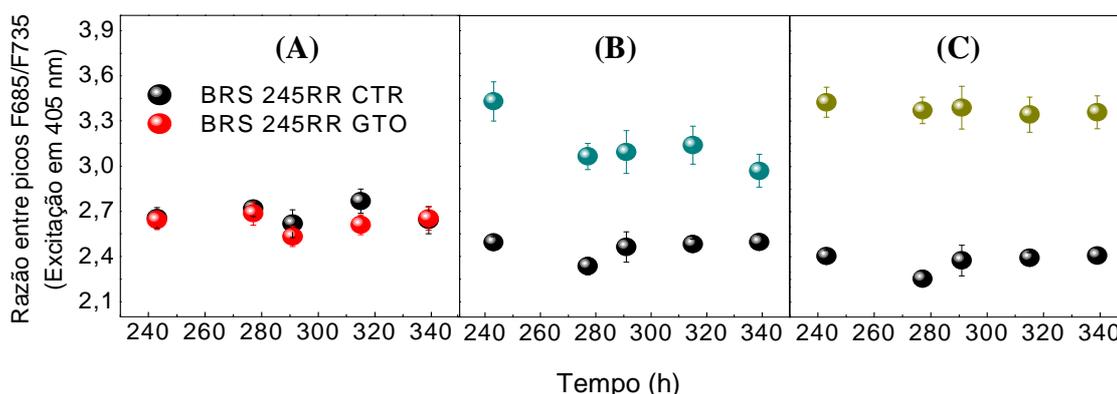
**Figura 22** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para a Variedade BRS 295RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B1) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C1) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 532 nm.

Os índices de fluorescência obtidos para variedade 295 RR sugerem que a Chl *a* sofre redução de seu conteúdo em concentrações recomendadas de herbicida. Para as variedades 245 RR e 246, a redução de conteúdo da Chl *a* ocorre apenas em concentrações de herbicida acima do recomendado.

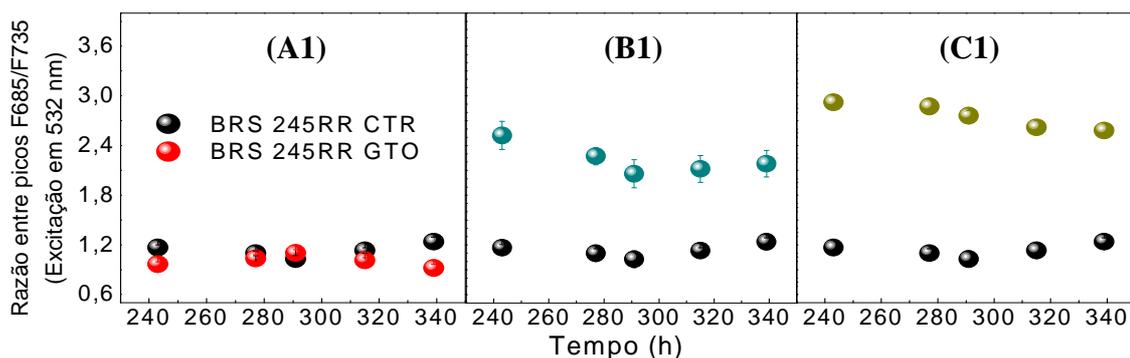
#### 5.4 Análise do 4° TrF

Os resultados discutidos até o momento compreendem análises realizadas apenas sobre o primeiro trifólio. Sobre um segundo ensaio, foi realizada análise por fluorescência *in vivo*, das emissões da Chl *a* sobre o quarto trifólio (4° TrF). Isto por que, nas plantas o glifosato sofre pouca degradação e é sistematicamente transportado para locais metabolicamente ativos [8]. Neste contexto, a análise do quarto trifólio é de extrema significância, devido ao mesmo não sofrer aspersão direta do herbicida em tratamento pós-emergente realizado no estágio V<sub>3</sub>, ou seja, onde apenas o terceiro trifólio encontra-se totalmente expandido.

Assim, nesta análise do 4° TrF objetivou-se determinar o possível deslocamento do herbicida pela planta sob os demais trifólios. As Figuras, 23 e 24 apresentam os dados obtidos da razão F685/F735 para a variedade 245 RR em comprimento de onda de excitação em 405 e 532 nm, respectivamente.



**Figura 23** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para o 4° TrF da variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 405nm.

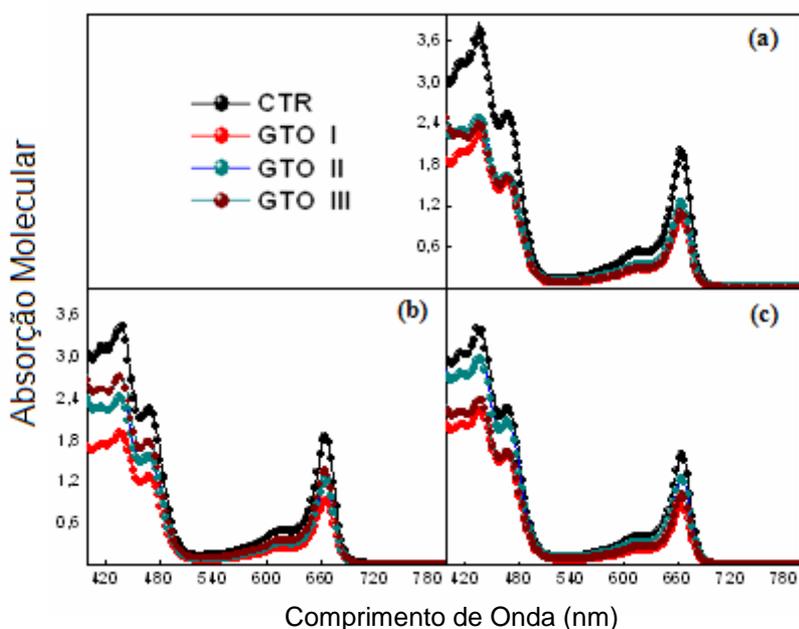


**Figura 24** - Índices de Fluorescência obtidos pela razão F685/F735 para o 4º TrF da variedade BRS 245RR sem e com teores de Glifosato (GTO): (A1) GTO I, 3,75 g.L<sup>-1</sup>; (B1) GTO I, 7,50 g.L<sup>-1</sup>; (C1) GTO III (11,25 g.L<sup>-1</sup>) em energia de excitação de 532nm.

Os dados apontam que, em teores acima do recomendado de herbicida, o glifosato é percolado para o 4º TrF. Isto é evidenciado, pelo aumento dos índices de fluorescência dado pela razão entre picos F685/F735, como observado em dados colhidos para o 1º TrF.

### 5.5 Análises do Extrato de Clorofila

Medidas por absorção molecular mostraram que, os extratos de clorofila obtidos das variedades que sofreram aplicação de herbicida, tiveram intensidade de absorção menor que o extrato obtido das amostras controle, como mostra a Figura 25 para a variedade BRS 245 RR.



**Figura 25** – Intensidade de Absorbância do extrato de clorofila. a) BRS 245RR; b) BRS 246RR e c) BRS 295 RR.

Os resultados de menor intensidade de absorção molecular obtidos da análise da clorofila, a partir do extrato são coerentes com o observado *in vivo*. Isto porque, as amostras que sofreram aplicação de herbicida tiveram a intensidade de fluorescência emitida pela Chl *a* suprimida, o que infere redução de seu conteúdo, conseqüentemente, menor concentração e menor absorção por parte das moléculas de clorofila na folha.

A redução do conteúdo de Chl na planta induzida pela ação do herbicida é constatada nas determinações realizadas na quantificação do teor de Chl (*a+b*) e Chl *a* usando-se as equações simultâneas de Arnon. Para esta análise são usadas as absorções em determinados comprimentos de onda que para o presente estudo foi baseado no tipo de solvente usado na extração, que no presente estudo foi via acetona 80% sem maceração.

De acordo com os dados, as plantas que sofreram tratamento com herbicida tiveram conteúdo de Chl *a* e Chl *a + b* reduzidos. As Tabelas; 3, 4 e 5 apresentam as concentrações determinadas nos extratos obtidos.

**Tabela 3** – Concentrações de Chl *a* e Chl *a + b* nos extratos obtidos das variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR sem e com tratamento pós-emergente recomendado (GTO I).

Variedade	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra CTR	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra GTO I	Teor Chl <i>a + b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra CTR	Teor Chl <i>a+b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra GTO I
<b>BRS 245RR</b>	25,10	13,25	32,53	17,09
<b>BRS 246RR</b>	23,33	11,85	30,11	15,26
<b>BRS 295RR</b>	20,04	10,56	25,77	13,11

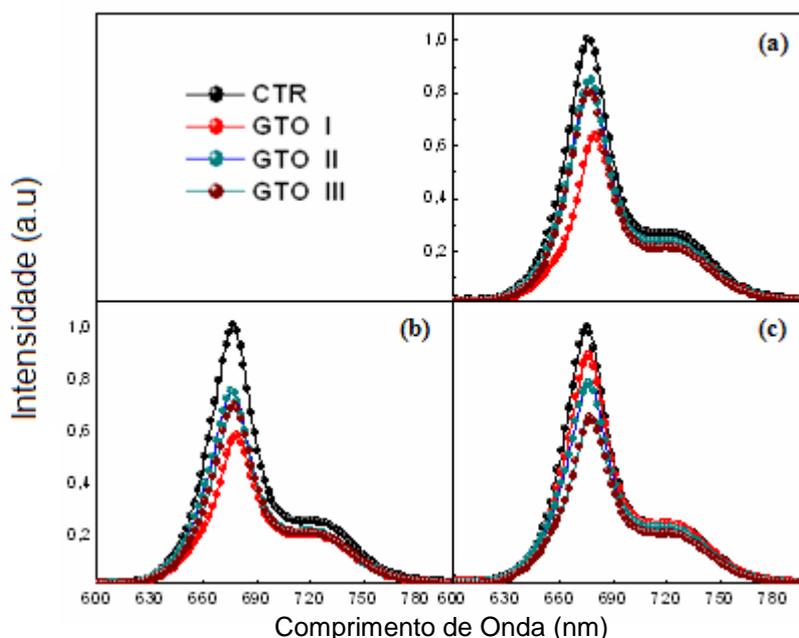
**Tabela 4** – Concentrações de Chl *a* e Chl *a + b* nos extratos obtidos das variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS295RR sem e com tratamento pós-emergente dobrado (GTO II).

Variedade	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra CTR	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra GTO II	Teor Chl <i>a + b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra CTR	Teor Chl <i>a+b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> ) Amostra GTO II
<b>BRS 245RR</b>	25,10	15,62	32,53	20,21
<b>BRS 246RR</b>	23,33	15,20	30,11	19,57
<b>BRS 295RR</b>	20,04	15,80	25,77	19,74

**Tabela 5** – Concentrações de Chl *a* e Chl *a* + *b* nos extratos obtidos das variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR sem e com tratamento pós-emergente triplicado (GTO III).

Variedade	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> )	Teor Chl <i>a</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> )	Teor Chl <i>a</i> + <i>b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> )	Teor Chl <i>a</i> + <i>b</i> (nmol.mL <sup>-1</sup> )
	Amostra CTR	Amostra GTO III	Amostra CTR	Amostra GTO III
<b>BRS 245RR</b>	25,10	13,71	32,53	17,69
<b>BRS 246RR</b>	23,33	18,67	30,11	22,53
<b>BRS 295RR</b>	20,04	12,63	25,77	15,60

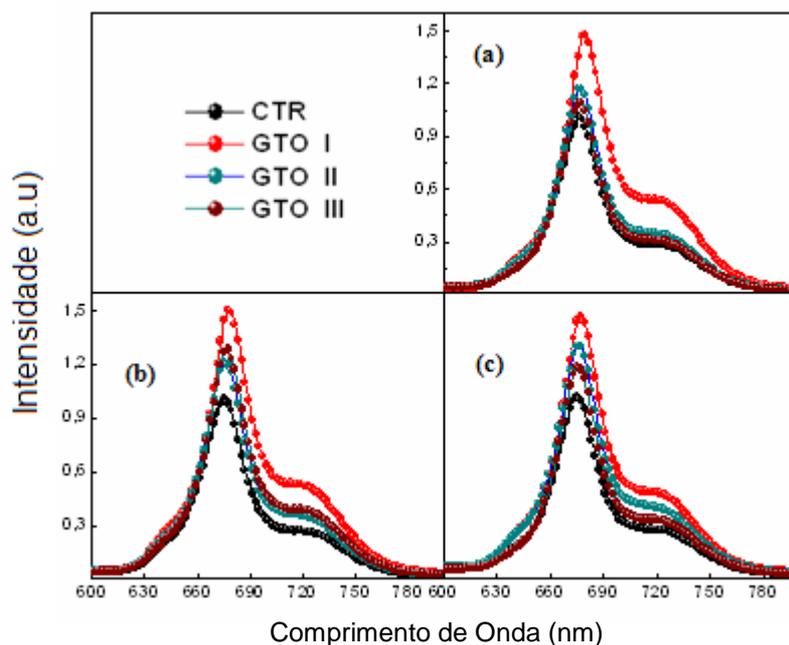
Quando extrato é excitado em 405 nm o comportamento de intensidade de fluorescência segue o observado das análises *in vivo*, ou seja, a intensidade de fluorescência é maior para as amostras controle que para as amostras que sofreram tratamento com herbicida, conforme pode ser observado pela Figura 26.



**Figura 26** – Bandas de Emissão do extrato de clorofila (CH<sub>3</sub>OH 85%) – Excitação em 405 nm: (a) BRS 245 RR; (b) BRS 246 RR e (c) BRS 295 RR com e sem tratamento pós-emergente.

Contudo, as análises obtidas por fluorescência a partir do extrato, sugerem um comportamento inverso das análises obtidas *in vivo*, quando o extrato é excitado em 532 nm, ou seja, as amostras que sofreram aplicação de herbicida têm maior intensidade de fluorescência que as amostras controle,

conforme mostra a Figura 27, para as variedades BRS 245RR, BRS 246RR e BRS 295RR.



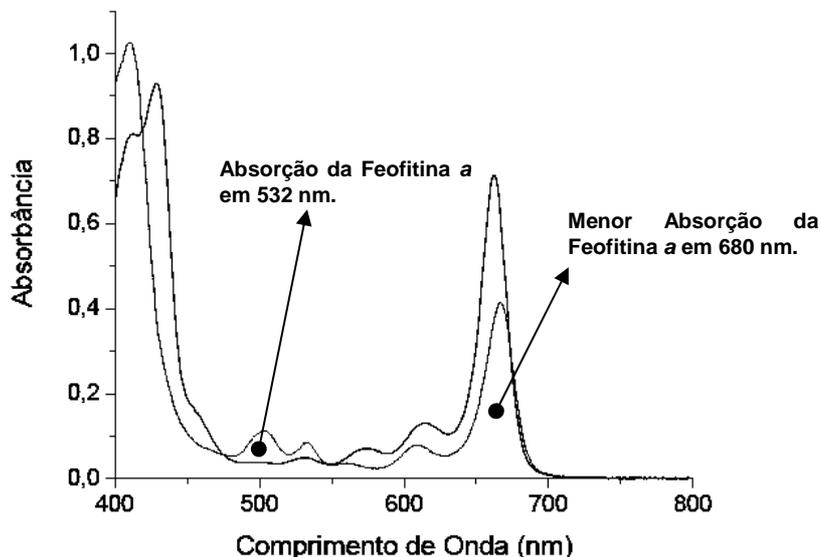
**Figura 27** – Bandas de Emissão do extrato de clorofila ( $\text{CH}_3\text{OH}$  85%) – Excitação em 532 nm: (a) BRS 245RR; (b) BRS 246RR e (c) BRS 295 RR com e sem tratamento pós-emergente.

Um dos produtos de degradação da Chl *a* é a Feofitina *a* que absorve luz e sofre emissão nesta mesma região do espectro [37]. O processo de obtenção da Feofitina *a*, a partir da Chl *a* se dá por hidrólise ácida.

O herbicida glifosato, por ser um ácido fosfônico [27], pode atuar na degradação direta da Chl *a*, por desmetalção, formando complexo com o íon magnésio, e indireta, por imobilização de Mg e Mn, necessários para formação da clorofila e fotossíntese, respectivamente [26]. Também pode atuar no aumento da acidez na planta favorecendo a hidrólise ácida em sua fisiologia, implicando na degradação indireta da clorofila por feofitinação.

Assim, a redução do conteúdo da Chl *a* pode estar relacionado também com a formação da Feofitina *a*, induzido pelo glifosato, sendo o espectro de absorção de menor intensidade observado no extrato obtido das variedades pesquisadas relacionado à presença da Feofitina *a*, bem como a supressão de emissão observada, *in vivo*, para as amostras tratadas com herbicida. Isto por que, a Feofitina *a* possui menor intensidade de absorção molecular que a

clorofila *a* [39] e, diferentemente da molécula de clorofila, a Feofitina *a* possui duas bandas de absorção na faixa de 490 nm a 540 nm, como pode ser observado pela Figura 28, o que pode favorecer uma maior emissão quando excitada em 532 nm.



**Figura 28** - Espectro eletrônico da clorofila *a* (—) e feofitina *a* (- - -),  $7,5 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>, a 30,0 ° C, em acetona. Fonte: SOARES, 2006.

Contudo, as supressões de intensidades observadas *in vivo* não se relacionam com a presença da Feofitina *a* diretamente, visto que, na folha, *in vivo*, apenas a Chl *a* sofre emissão na região entre 600-800 nm do espectro.

A formação da Feofitina *a*, está relacionada com a desmetalacão direta da clorofila e/ou indireta por deficiência do macronutriente magnésio na planta. Neste contexto, determinações de alguns macronutrientes foram realizadas.

## 5.6 Análise Foliar de Ca, Mg, K e P

A análise por absorção atômica das amostras visou entender o comportamento observado em análises do extrato de clorofila das amostras - que mostraram um comportamento inverso do observado nas análises *in vivo*-, ou seja, o aumento de fluorescência quando o extrato sofre excitação com energia de 532 nm para as variedades que sofreram aplicação do herbicida frente ao extrato controle, sendo que o mesmo extrato absorve menos, como mostrado em análises por absorção molecular. Este comportamento está

relacionado com a presença da Feofitina *a*, que possui bandas de absorção em 540 nm, como demonstrado previamente.

O glifosato, se complexa com o íon magnésio e deixa o aparato fotossintético da planta deficiente do metal, inibindo a complexação e formação da Chl *a*, favorecendo o aumento da concentração da Feofitina *a* por indireta. A formação da Feofitina *a* também se dá por via direta, através da desmetalização da Chl *a* pelo principal derivado do glifosato, o AMPA [48].

Contudo, a deficiência é no aparato fotossintético e não na planta, isto por que o glifosato e seu principal derivado se complexam com o magnésio evitando que este, se encontre no aparato na forma livre, desfavorecendo a captação pela fisiologia da planta, mas gerando o aumento deste metal na forma de complexo.

A fisiologia da planta por captação via solo e por desmetalização da Chl *a* formando a *Feofitina a*, fornece o íon magnésio necessário para formação dos complexos com o herbicida e seus derivados, justificando assim, a presença da Feofitina *a* e a maior concentração de magnésio encontrada na planta. A tabela 6 apresenta os dados obtidos para a variedade BRS 245RR. De acordo com os resultados, o teor de magnésio, potássio e fósforo aumentaram com o aumento da concentração de aplicação de herbicida, evidenciando que o glifosato atua na captação de macronutrientes por complexação, deixando a planta deficiente desses nutrientes na forma livre.

**Tabela 6** – Concentração de macronutrientes (g.Kg<sup>-1</sup>) para a variedade BRS 245RR.

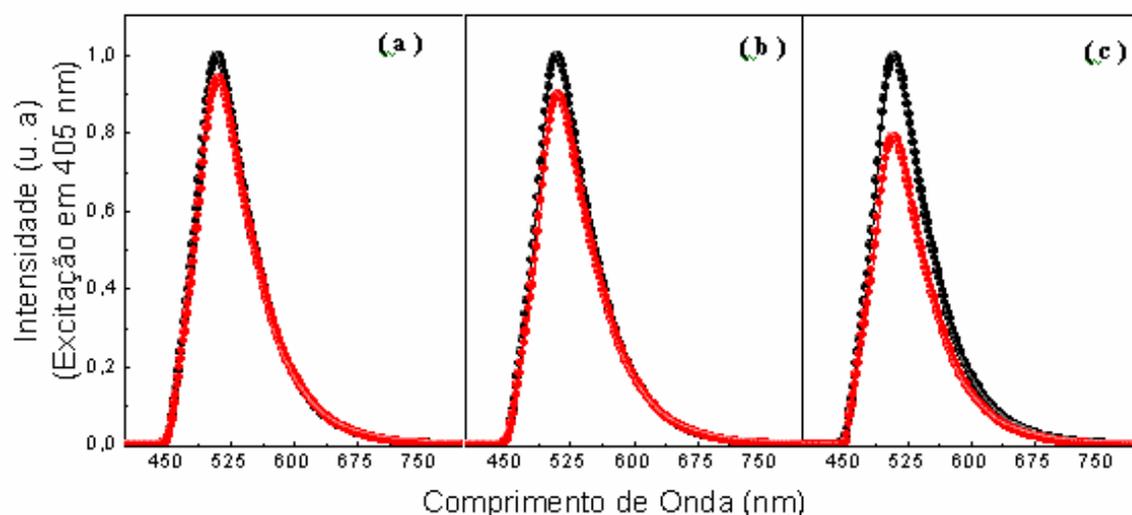
VARIETADE	Teor de GTO	Teor de Ca (g.Kg <sup>-1</sup> )	σ	Teor de Mg (g.Kg <sup>-1</sup> )	σ	Teor de K (g.Kg <sup>-1</sup> )	σ	Teor de P (g.Kg <sup>-1</sup> )	σ
	0,0 g.L <sup>-1</sup>	10,9977	0,0505	4,3026	0,0302	1,31	0,02	1,89	0,02
BRS 245RR	3,75 g.L <sup>-1</sup>	10,6131	0,1004	4,4613	0,0141	1,61	0,07	2,61	0,06
	7,50 g.L <sup>-1</sup>	11,2343	0,0390	4,8559	0,0433	1,82	0,03	4,17	0,02
	11,25 g.L <sup>-1</sup>	11,6787	0,1156	5,0593	0,0742	1,93	0,04	4,96	0,03

A Chl *a* é também suscetível à degradação oxidativa na presença de ácidos graxos saturados [37], se degradando também, na presença de ácidos

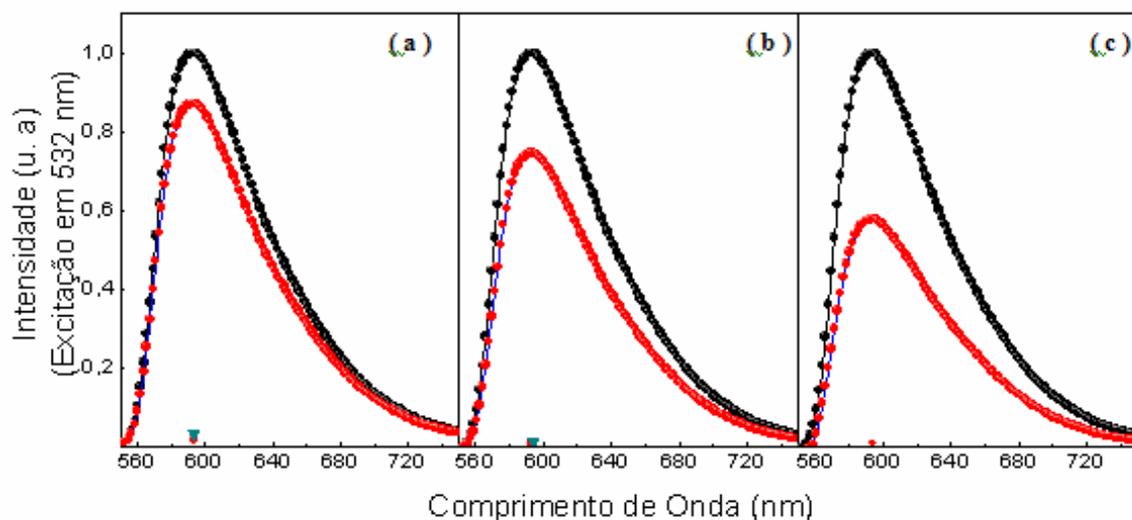
graxos insaturados. Alguns autores abordaram que, em soja tratada com glifosato, houve aumento de forma significativa de ácidos graxos monoinsaturados em sementes de soja [38]. Neste contexto, foram analisadas por fluorescência, as sementes geradas das variedades que sofreram tratamento pós-emergente.

### 5.7 Análise das Sementes por Fluorescência

Os espectros obtidos por análise direta das sementes por fluorescência apontam bandas em regiões distintas de acordo com a energia de excitação, 405 e 532 nm respectivamente, como mostram as Figuras, 29 e 30.



**Figura 29** – Intensidade de Fluorescência em Sementes de Soja 245 RR em Energia de Excitação de 405 nm. (a) Sementes CTR e Sementes GTO I e (b) Sementes CTR e GTO (III). (colheita – 117 dias após plantio).



**Figura 30** – Intensidade de Fluorescência em Sementes de Soja 245 RR em Energia de Excitação de 532 nm. (a) Sementes CTR e Sementes GTO I e (b) Sementes CTR e GTO (III). (colheita – 117 dias após plantio).

Em sementes de soja, estão presentes várias substâncias que poderiam ser responsáveis pelas emissões observadas. A identificação da substância principal, responsável pelas emissões, ainda é motivo de investigação que foge ao escopo desta pesquisa. No entanto, estudos relataram que a aplicação de glifosato reduziu micronutriente tanto em folhas como em sementes<sup>[38]</sup>.

Reduções significativas em ácidos, linoléico poliinsaturado e linolênico acompanhado de aumento significativo em ácidos graxos monoinsaturados nas sementes foram observadas<sup>[38]</sup>.

As observações de diminuição do parâmetro fotossintético foliar, somada a uma baixa disponibilidade de nutrientes induzida por complexação com glifosato e seu principal derivado, o AMPA, se relacionam com o efeito de supressão de intensidade de fluorescência observado nas sementes. Os mesmos efeitos foram observados para as sementes das variedades 246 RR e 295 RR. Evidenciando que, a alteração fotossintética induzida em planta tratada com herbicida se propaga nas sementes.

## CAPITULO VI

### 6 CONCLUSÃO

A técnica de análise por fluorescência *in vivo*, se mostrou robusta no processo de avaliação dos efeitos, induzido pelo glifosato, em plantas transgênicas, tipo RR, de soja. Em quatro ensaios realizados, a supressão de fluorescência da clorofila foi observada em todas as plantas que sofreram tratamento com herbicida. Os resultados mostraram que o glifosato atuou como agente ativo nas alterações das atividades fotossintéticas das plantas, induzindo uma redução do teor de clorofila *a*. Mesmo em quantidade recomendada, os efeitos inibitórios do herbicida são observados por técnica de fluorescência *in vivo*, onde se observou uma significativa supressão da emissão da clorofila.

Os processos precursores das alterações fotossintéticas em plantas com tratamento pós-emergente são específicos, mas não únicos. Envolve processos de imobilização de micronutrientes catiônicos, inibição de fotossíntese, redução do conteúdo da clorofila e seqüestro de magnésio por complexação com glifosato induzindo desmetalção da clorofila, gerando a feofitinação, a partir de hidrólise ácida catalisada pela presença do herbicida na fisiologia da planta.

Ademais, os resultados também mostraram que o herbicida induziu alterações da resposta de fluorescência dos grupos de sementes oriundas de plantas que sofreram a aspensão do mesmo. Esse resultado sugere que além das alterações na dinâmica de produção de energia pela planta, o glifosato alterou a composição química das sementes.

A análise de fluorescência através das razões de emissão da clorofila mostrou-se capaz de detectar as alterações induzidas pelo uso em excesso do herbicida mesmo antes da detecção visual dos estresses. Portanto, esse tipo de análise demonstra um grande potencial para ser utilizado no processo de detecção prévia do uso excessivo do herbicida.

## CAPITULO VII

### 7 REFERÊNCIAS

1. FUCK, M. P., BONACELLI, B. M. Sementes geneticamente modificadas: (in) segurança e racionalidade na adoção de transgênicos no Brasil e na Argentina. **Revista Iberoamericana de Ciência Tecnología y Sociedad**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 4, n. 12, abr. 2009.
2. PANCETTI, A. Pesquisa da Embrapa/LAC-Biosafety avalia transgênicos no Brasil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 62, n. 2, 2010.
3. MARINHO, C.L.C., MINAYO-GOMEZ, C. Decisões conflitivas na liberação dos transgênicos no Brasil. **São Paulo Perspectivas**, São Paulo, v. 18, n. 3, 2004.
4. FURLANETO, B. P. F., et al. Soja transgênica versus convencional: estimativa dos custos operacionais de produção na região do Médio Paranapanema, Estado de São Paulo. **Ciência e Agrotecnologia**., Lavras, v. 32, n. 6, 2008 .
5. ZOBIOLE, L.H.S., et al. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of “second generation” glyphosate-resistant soybean (*Glycine max L.*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 53-60, 2011.
6. CORDEIRO, R. A. Plantas transgênicas: o futuro da agricultura sustentável. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 2, 2000.
7. SILVEIRA, J. F., RESENDE, L.M. Estratégias de mercado no agronegócio paranaense: soja convencional vs. transgênica. **Produção [online]**, São Paulo, v. 20, n. 1, 2010.

8. BOTT, S., et al. Phytotoxicity of Glyphosate Soil Residues Re-Mobilised by Phosphate Fertilization. **Plant Soil**, v. 342, p. 249-263, 2011.
9. MATSUO, E. et al. Resistência de genótipos de soja ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. spe, 2009.
10. BERNAMÚUM, A. M., et al. Effects of the herbicide glyphosate in biological attributes *Alpaidaveniliae* (Araneae, Araneidae) in the laboratory. 2009.
11. REDDY, N. K., BELLALOU, N., ZABLOTOWICZ, M. R. Glyphosate Effect on Shikimate, Nitrate Reductase Activity, Yield, and Seed Composition in Corn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 3646-3650, 2010.
12. CAIRES, L. R. A., et al. Water Stress Response of Conventional and Transgenic Soybean Plants Monitored by Chlorophyll a Fluorescence. **Journal of Fluorescence**, v. 20, p. 645-649, 2010.
13. BAKER, N.R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, oxford, v.55, p.1607-1621, 2004.
14. FAVORETTO, C. M., et al. Determinação da humificação da matéria orgânica de um latossolo e de suas frações organo-minerais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, 2008.
15. CICERO, M. S., SCHOOR, D. V. R., JALINK, H. Use of chlorophyll fluorescence sorting to improve soybean seed quality. **Revista brasileira de sementes**, Londrina, v. 31, n. 4, 2009.
16. GONCALVES, C. F. J, SANTO JUNIOR, M.U. Utilization of the chlorophyll a fluorescence technique as a tool for selecting tolerant species to

environments of high irradiance. **Brazilian Journal of Plant Physiology.**, Londrina, v. 17, n. 3, 2005.

17. RALPH, P. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. **Aquatic Botany**, v. 66, p. 141-152, 2000.

18. GEROVIC, G. Z., et al. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. Review. **Agronomie**, v. 19, n. 7, p. 543-547, 1999.

19. LINS, C. C. E. Espectroscopia de Fluorescência na Citricultura. Outubro, 2009. 116 fls. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos. **Biblioteca e Informação** – SP. Brasil.

20. SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. **CANA-DE-AÇÚCAR - Bioenergia, Açúcar e Etanol – Tecnologias e Perspectivas**. 2<sup>a</sup> ed. Viçosa, MG. Ed. Folha de Viçosa Ltda, 2012.

21. JENKS, A. M. and HASEGAWA, M. P. **Plant Abiotic Stress**. 1<sup>a</sup> ed. Indiana USA. Ed. Blackwell Publishing, 2005.

22. BULA ROUNDUP WG, Monsanto Imagine TM, Disponível em: <<http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/fichas-de-emergencia-e-bulas/pdf/roundup-wg-bula.pdf>>. Acesso em: Nov. 2010.

23. AGOSTINETTO, D., et al. Desempenho de cultivares de soja transgênica e controle de plantas daninhas em função da época de aplicação e formulações de glifosato. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, de 2009.

24. MARCHIOSI, R. Efeitos metabólicos nas raízes de soja, susceptível e resistente ao glifosato, após exposição das sementes ao herbicida. Abril 2008. 64 fls. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. 03 abril 2008 **Biblioteca Central - UEM, Maringá** – PR., Brasil.

25. CAIRES. L. R. A., et al. Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**. v 62, p. 1044-1047, 2008.
26. BERNARD, L. M., et al. Glyphosate interaction with manganese in tank mixtures and its effect on glyphosate absorption and translocation. **Weed Science**, v. 53, p. 787-794, 2005.
27. EKER, S. et al. Foliar-Applied Glyphosate Substantially Reduced Uptake and Transport of Iron and Manganese in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10019-10025, 2006.
28. JUNIOR, M. A. H., R. **Estudo de determinação de resíduos de glifosato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) em amostras de soja e água usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em TANDEM com ionização por electrospray (LC-ESI/MS/MS)**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). São Paulo, Brasil., 2005. Liv. nº23.252, 121 fls.
29. ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo da concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal.**, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
30. BUENASERA, K., et al. Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1139-1151, 2011.
31. CRUZ, M. C. M., da et al . Fluorescência da clorofila a em folhas de tangerineira 'Ponkan' e limeira ácida 'Tahiti' submetidas ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura.**, Jaboticabal, v. 31, n. 3, 2009.

32. ORTIZ, B. V., et al. Determination of differences in crop injury from aerial application of glyphosate using vegetation indices. **Computer and Eletronics in Agriculture**, v. 77, p. 204-213, 2011.
33. SANTO, V. I. D., GIL, S. E. Fluorimetria na Análise Farmacêutica: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 7(1), p. 12-26, 2010.
34. LOPES, A. S., GUILHERME, L. A. G. Solo sob Cerrado: Manejo da fertilidade para a produção agropecuária. **ANDA Associação Nacional para Difusão de Adubos e Corretivos Agrícolas, Boletim Técnico nº 5**. São Paulo, SP, 1994. 56 p.
35. SILVA, C. F. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2ª ed. Revista e Ampliada. Brasília, DF. 2009 p. (59-85; 191-233).
36. PORRA, J. R. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls *a* and *b*. **Photosynthesis Research**. v. 73, p. 149-156, 2002.
37. STREIT, M. N., et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, 2005.
38. ZOBIOLE, L.H.S., et al. Glyphosate Affects Seed Composition in Glyphosate-Resistant Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 4517-4522, 2010.
39. SOARES, S. R. R., **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. Março, 2006. 92 fls. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil.

40. ZOBIOLE, L.H.S., OLIVEIRA, R.S. Jr., HUBER, D.M., CONSTANTIN, C. de CASTRO, OLIVEIRA, F.A., OLIVEIRA A. Jr, Glyphosate reduces shoot concentration of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans, **Plant Soil**, 2009.
41. ZVEZDANOVIC', et al. Chlorophyll bleaching by UV-irradiation in vitro and in situ: Absorption and fluorescence studies. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 78, p. 25-32, 2009.
42. WEING, D. et al. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. **Chemosphere**, v. 83, p. 593-598, 2011.
43. JENSEM, E. P., et al. Structure, function and regulation of plant photosystem I. review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1767, p. 335–352, 2007.
44. SCHELLER, H.V. Haldrup, Photoinhibition of photosystem I. **Planta**, v. 221, p. 5–8, 2005.
45. SONOIKE, K. Photoinhibition of photosystem I. **Physiologia Plantarum**, v. 142, p. 56-64, 2011.
46. VIEIRA, R. C., CABRAL, V. L., PAULA, O. C. A. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, 1999.
47. AMARANTE JUNIOR, et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, 2002.
48. NANDULA, V. K., et al. Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (*Glycine max*) and canola (*Brassica napus*) dose response and metabolism

relationships with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 3540-3545, 2007.

49. GONCALVES, E. R., et al . Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 4, 2010.