

MONITORAMENTO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO EM PLANTAS DE CITRUS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO DE PLANTAS DANINHAS

Marcus B. Matallo (Instituto Biológico, E-mail: matallo@biologico.sp.gov.br); Daniel A. S. Franco (Instituto Biológico); Sydnei D. B. Almeida (Instituto Biológico); Antonio Luiz Cerdeira (CNPMA-EMBRAPA); André L. S. Lacerda (Instituto Biológico)

RESUMO: Com o objetivo de verificar, a curto prazo, o acúmulo de ácido chiquímico em plantas de laranja pêra num pomar manejado com glifosate, foi instalado um experimento na Fazenda Jequitibá, tradicional no cultivo de citros situada no município de Santo Antônio de Posse, SP. Aplicou-se de forma convencional Roundup Original a 4,0 L.ha⁻¹ em 19/12/2006 na entrelinha de 5 plantas, deixando-se outras 5 como testemunha. A reaplicação de glifosato a 3,5 L/ha foi realizada em 02/04/07. Em ambos casos, imediatamente antes da aplicação (0 DAT) e aos 3, 7, 10, 15, 20 e 35 DAT foram coletadas 20 folhas de cada planta tanto da área tratada como da área não tratada, analisando-se o teor de ácido chiquímico por cromatografia líquida de forma isocrática após extração por microondas. O método analítico mostrou-se adequado com recuperações variando desde 89,74 % a 100,76%. Os resultados mostraram que, a curto prazo, durante os períodos de coleta das folhas, não foram detectadas diferenças significativas nos teores de ácido chiquímico entre as folhas das plantas de laranja pêra provenientes da área tratada com glifosato e da área capinada manualmente. Há necessidade de comprovar esses resultados em pomares submetidos ao uso de glifosato por um longo prazo.

Palavras-chave: Glifosato; herbicidas, iatrogenia, hormesis

INTRODUÇÃO

O efeito dos herbicidas sobre as doenças das plantas é um importante aspecto, muitas vezes negligenciado, do manejo integrado de pragas. Essas interações podem ter papel crucial para o sucesso do controle biológico de plantas daninhas com o emprego de microorganismos. Indiretamente, devido ao seu efeito sobre as plantas, os herbicidas podem influenciar vários processos ou interações com as plantas, incluindo sua suscetibilidade à doenças (Ouke et al., 2006). É fato relatado que o uso inadequado de pesticidas, especialmente os herbicidas e fitoreguladores, pode originar ou incrementar a severidade de fitopatologias (Griffiths, 1981).

Sob condições normais, em torno de 20% do carbono fixado pelas plantas passa pela rota do ácido chiquímico. Um dos aspectos importantes dessa rota é a inibição pelo herbicida glifosate da enzima 5-enol-piruvil-shikimato-fosfato sintetase (EPSPS) responsável por uma das etapas de síntese de aminoácidos aromáticos. O bloqueio da rota do chiquimato devido a ação do glifosate leva o acúmulo de altos níveis de ácido chiquímico e, conseqüentemente, à uma redução nos níveis desses aminoácidos, a partir dos quais são formados metabólitos secundários, como as fitoalexinas, envolvidos na resposta das plantas aos fitopatógenos, aumentando a suscetibilidade às doenças (Ouke et al. 2005). O aumento da incidência de doenças como a clorose variegada dos citros (CVC) e a morte súbita dos citros (MSC) estaria relacionada ao uso intensivo do glifosate, podendo ser explicada, dentre outros fatores, pela redução na síntese de fitoalexinas (Yamada & Castro, 2004)

De acordo com Anderson et al. (2001), um bioindicador ideal para plantas expostas ao glifosate deve ser específico para esse herbicida, desenvolver-se rapidamente no interior da célula, aí permanecendo durante algum tempo, ser relativamente fácil de extrair e analisar a baixo custo. Nesse mister, o ácido chiquímico tem demonstrado ser um marcador seletivo para plantas expostas à sub-doses de glifosate (Harring et al., 1998; Singh & Shaner, 1998; Wang, 2001; Mueller et al., 2003). Níveis elevados de ácido chiquímico, detectados a partir de aplicações de glifosate, foram reportados em *Conyza canadensis* (Koger et al, 2005; Mueller et al. *op.cit.*), algodão (Pline et al., 2002), girassol, trigo e milho (Henry et al., 2007), soja (Singh & Shaner *op.cit.*) e trigo (Brenahan, 2003; Anderson, *op. cit.*). Por sua vez, Neumann et al. (2006) relatam a transferência, via raiz, de glifosate aplicado em folhas de cultivares de soja convencional, soja RR e *Brachiária brizantha* para plantas de girassol e café cultivadas simultaneamente em solução nutriente e outros sistemas, devido ao acúmulo intracelular do ácido chiquímico determinado nessas plantas não-alvo.

Oiante da possibilidade de que o uso intensivo de glifosate possa interferir na síntese do chiquimato, seja por deriva ou por transferência via rizosfera, o objetivo desse trabalho foi, através da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), verificar, a curto prazo, o acúmulo de ácido chiquímico, em plantas de laranja pêra em pomar manejado com glifosate.

MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de campo foi instalado na Fazenda Jequitibá, em pomar de laranja pêra com 12 anos de idade, tradicionalmente manejada com o uso de glifosate para controle das plantas daninhas. Num talhão com 6000 plantas, selecionaram-se no final de uma das linhas de plantio 20 plantas, considerando-se cada planta 1 parcela. Aplicou-se o produto Roundup Original® na entrelinha das 5 primeiras plantas na dose de 4,0 L.ha⁻¹, com equipamento de aplicação tratorizado dotado de barra aplicadora protegida para evitar a deriva e pontas do tipo Magno 110. A aplicação foi realizada no dia 19/12/2006 com temperatura de 24 °C, 60% de umidade relativa e consumo de calda de 400 L.ha⁻¹). A reaplicação de glifosato a 3,5 L.ha⁻¹ foi realizada no dia 02/04/07. Nas 5 últimas plantas da linha foi realizada somente a capina manual durante todo o período de coleta de folhas. No momento da aplicação as plantas encontravam-se em pleno amadurecimento dos frutos. Em ambos casos as coletas foram realizadas imediatamente antes da aplicação do glifosate (0 DAT) e aos 3, 7, 10, 15, 20 e 35 DAT. Oe cada planta, nos quatro pontos cardeais, foram coletadas aleatoriamente 20 folhas em diferentes estádios de desenvolvimento que, após embaladas e identificadas, foram acondicionadas em isopor com gelo e transportadas para o laboratório da Ciência das Plantas Daninhas do Instituto Biológico, no Município de Campinas, SP, distante 30 km.

No laboratório, as folhas foram postas para secar em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C durante 16 horas, após o quê foram

trituras a 25.000 rpm (IKA A11 Basic) e armazenadas em frigorífico a -18 °C. Cerca de 400mg da amostra moída foram pesadas e adicionadas em 10 mL de água a pH 2,5. em bequer de vidro de 50 mL de capacidade sendo colocados individualmente no centro do disco de um forno microondas (Panasonic Model NN-S62 B) durante 10 segundos na potência de 100 W a uma temperatura média de 49.8 °C (± 2.8 °C). Após o esfriamento, a amostra foi filtrada em filtro de papel Watmann no 1 e filtro de membrana Millex - GV (Millipore) para análise por CLAE.

A concentração de ácido chiquímico nas amostras foi determinada usando-se um cromatógrafo líquido marca Shimadzu LC 2010 equipado com software Class VP 6.0, auto-injetor e detector de arranjo de diodos em cadeia empregando-se o comprimento de onda de 212 nm. A coluna empregada foi da marca Phenomenex, Gemini C₁₈ 110 A^e (250 mm X 4.0 mm; 5 μ m tamanho de partícula) com pré coluna C₁₈ da mesma marca. O volume de injeção usado foi de 20 μ L. O sistema isocrático empregado utilizou como fase móvel a mistura de água MilliQ a pH 3,0: metanol na proporção 95:5 e fluxo de 1,0 mL.minuto⁻¹. O tempo total de corrida foi de 10 minutos e o tempo de retenção do ácido chiquímico foi de 4,9 minutos ($\pm 0,1$). Uma curva de calibração com 7 pontos, variando desde 2,04 to 407,2 μ g.mL⁻¹ foi empregada para a quantificação do ácido chiquímico com padrão externo.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, tendo como causas da variação os fatores aplicação de glifosato (2) e épocas de coleta de folhas (7). Para a análise da variância foi feito o teste F com as médias comparadas pelo teste de Tukey, ambos ao nível de 1% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método analítico mostrou-se adequado conforme demonstrado para os resultados obtidos na determinação do endógeno do ácido chiquímico e nas amostras fortificadas. O teor médio endógeno de ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra foi de 105,68 \pm 13,97 μ g.g⁻¹ em peso seco. As recuperações médias a partir de amostras de laranja pera recém preparadas e fortificadas com ácido chiquímico foram de 89,74 \pm 5,18% a 103,13 μ g.g⁻¹, 97,79 \pm 1,38% a 206,25 μ g.g⁻¹ e 100,76 \pm 0,38% a 412,50 μ g.g⁻¹ de ácido chiquímico adicionado em amostras de 400 mg de folhas de laranja pêra seca e moída. Todos os resultados tiveram como base o peso seco das amostras afim de evitar a variabilidade no teor de umidade das folhas (Anderson, *op. cit.*). Esses dados concordam com estudos prévios empregando um ácido ou água como agente extrator seguido por análise do ácido chiquímico por CLAE. Singh & Shaner (*op. cit.*) e Mueller et al. (*op. cit.*) reportam recuperações acima de 80% em extratos de milho, soja e *Conyza* sp. fortificados com ácido chiquímico.

O método analítico proporcionou um pico cromatográfico claramente distinto (Figura 1). O espectro de absorção do ácido chiquímico a 212 nm é mostrado na inserção da Figura 1.

Usando este método foi determinado o teor do ácido chiquímico nas folhas provenientes de plantas de laranja pêra da área tratada com glifosato e de folhas provenientes de plantas da área testemunha, cujos resultados são mostrados nas Figuras 2A e 2B.

No caso da primeira aplicação de glifosato (Figura 2A), em todas as épocas de coleta, inclusive na imediatamente anterior à aplicação (0 DAT), o teor de ácido chiquímico nas plantas da área tratada foi superior ao das plantas de laranja pêra da área não tratada,

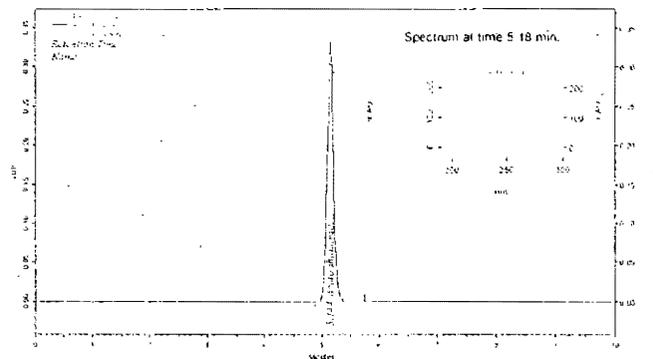


Figura 1. Cromatograma obtido a partir de extrato seco de citros fortificado com ácido chiquímico e respectivo espectro a 212 nm.

exceto aos 7 e 20 DAT. Em ambos casos o teor de ácido chiquímico das plantas apresentou tendência a decrescer com o tempo após 10 DAT. Os dados mostram também que as plantas de laranja pêra da área tratada já partiram de um nível de ácido chiquímico endógeno superior ao das plantas da área não tratada, conforme observado para a determinação inicial feita antes da aplicação do glifosato (0 DAT).

A concentração de ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra após a reaplicação do glifosato é mostrado na Figura 2B. Ao contrário do observado anteriormente, além da tendência generalizada do aumento no teor do ácido chiquímico a partir dos 10 DAT as plantas da área testemunha apresentaram um nível de ácido chiquímico inicial (0 DAT) superior ao das plantas da área tratada, também estatisticamente semelhantes entre si. Exceto aos 7 DAT, quando se observa uma inversão nessa ordem, durante todos os demais períodos o teor de ácido chiquímico das plantas de laranja pêra da área reaplicada com glifosato sempre foi inferior ao das plantas da área testemunha.

Em ambos casos, não houve diferença significativa ($\alpha = 0,01$) nos níveis de ácido chiquímico entre as plantas de laranja da área com glifosato e a testemunha dentro de cada época de coleta nem ao longo do período de coleta.

Mais do que a possibilidade da absorção de glifosato pelas plantas de laranja pêra, seja por deriva ou por transferência via rizosfera (Neumann et al., *op. cit.*), a diferença observada nos teores de ácido chiquímico quando pode ser atribuída principalmente a fatores bióticos. Sabe-se que o glifosato acumula-se na região meristemática (Duke *op. cit.*), portanto uma vez que a coleta das folhas de laranja pêra não foi direcionada exclusivamente para folhas em desenvolvimento, a heterogeneidade no seu estágio no momento da coleta poderia ter contribuído para as diferenças observadas nos teores de ácido chiquímico Henry et al., (*op. cit.*) observaram uma redução nos níveis de ácido chiquímico em plantas de milho possivelmente devido ao fato das plantas estarem entrando em seu período reprodutivo. Por outro lado, fatores abióticos podem influir na produção de ácido chiquímico pelas plantas, conforme demonstrado por Amrhein & Hollander (1981) ao afirmarem que a taxa de síntese de metabólitos secundários está associada ao incremento da atividade da via do ácido chiquímico induzida pela luz.

O pico de ácido chiquímico observado aos 7 DAT quando da reaplicação de glifosato pode ser atribuído à seletividade do método cromatográfico na detecção desse analito (Lanças, 2004). A análise da pureza do pico

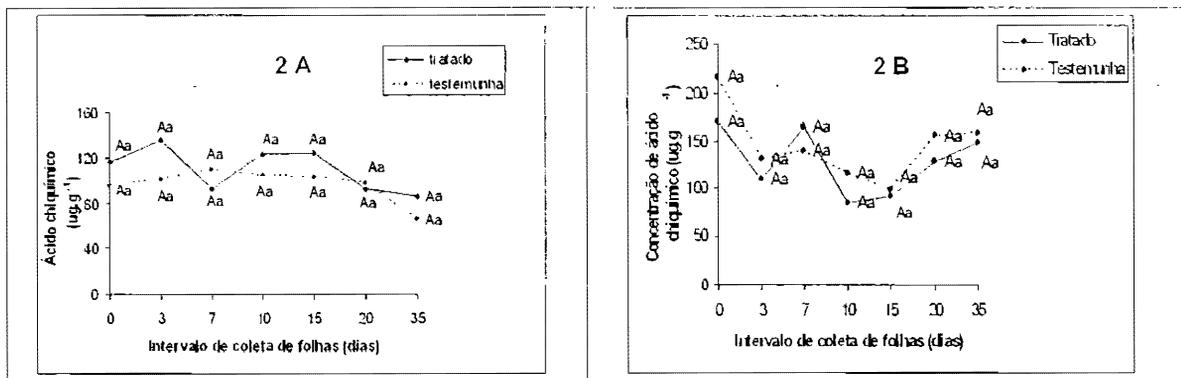


Figura 2. Teor de ácido chiquímico nas folhas de laranja pêra provenientes de plantas da área tratada e plantas da área não tratada com glifosato após a primeira aplicação (2A) e reaplicação (2B). Letras maiúsculas permitem a comparação dentro de cada época e letras minúsculas a comparação ao longo das épocas

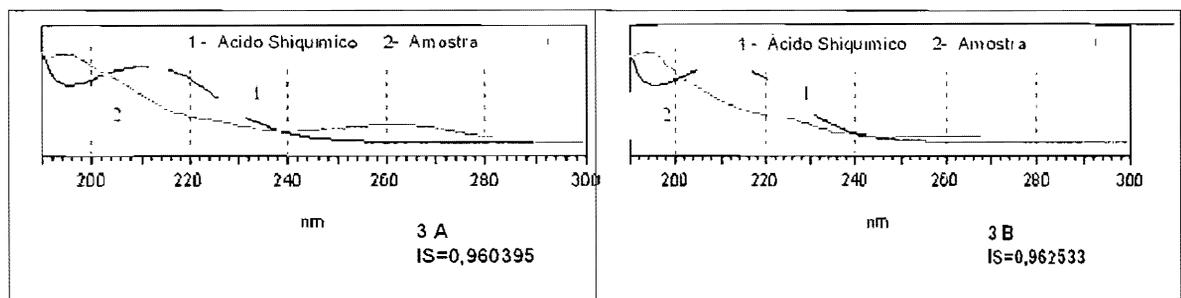


Figura 3: Índices de similaridade (IS) para a comparação dos espectros entre o pico referente ao padrão do ácido chiquímico e da amostra coletada aos 7 DAT na área testemunha (3 A) e tratada com glifosato (3 B).

cromatográfico apresentada na Figura 3 mostra claramente a diferença entre os espectros do pico do padrão de referência do ácido chiquímico e das amostras coletadas aos 7 DAT tanto da área tratada como da área não tratada, corroborado pelos baixos índices de similaridade calculados.

CONCLUSÕES

A curto prazo, não foi detectado acúmulo imediato de ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra submetidas ao manejo com a aplicação de glifosato para o controle de plantas daninhas.

CONTRIBUIÇÃO PRÁTICA E CIENTÍFICA DO TRABALHO

O trabalho mostrou que não houve interferência do glifosato, quando aplicado dentro das chamadas "Boas Práticas Agrícolas", na concentração do ácido chiquímico; conseqüentemente, a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, triptofano e metabólitos secundários fenólicos derivados do ácido chiquímico como os fenilpropanóides, as cumarinas e as fitoalexinas nas plantas laranja pêra não foi afetada, elucidando, a princípio, a suspeita de que esse herbicida poderia predispor as plantas de laranja pera à incidência de doenças pelo estresse devido, principalmente, à redução dos níveis de fitoalexina. Entretanto ainda há um questionamento importante a ser estudado, qual seja se essa interferência

ocorreria numa situação de uso intensivo de glifosato durante um longo período de tempo. Além disso, o método desenvolvido está em perfeita sintonia com a chamada "química verde", reduzindo ao mínimo o uso de solventes ambientalmente perigosos na extração do ácido chiquímico sendo simples, rápido e relativamente barato empregando pela primeira vez, com eficiência, o uso de microondas na extração do ácido chiquímico a partir de matrizes vegetais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMRHEIM, N. & HOLANDDER, H. Light Promotes the Production of Shikimic Acid in Buckwheat. *Naturwissenschaften*, 68, 43, 1981.
 ANDERSON, K. A.; COBB, W.T.; LOPER, B. R. Analytical Method for Determination of Shikimic Acid: Shikimic Acid Proportional to Glyphosate Application Rates. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* , 32 (17 & 18), 2831 - 2840, 2001.
 BRESNAHAN, G. A., MANTHEY, F.A., HOWATT, K.A., CHAKRABORTY, M.C. Glyphosate Applied Preharvest Induces Shikimic Acid Accumulation in Hard Red Spring Wheat (*Triticum aestivum*).
 DUKE, S.O.; WEGE, D.E., CERDEIRA, A.L.; MATALLO, M.B. Herbicide Effects on Plant Disease. *Outlooks*

- on pest management 18/4, 36-40 2007.
- DUKE, S.O., WEDGE, D.E., CERDEIRA, A.L., MATALLO, M.B. Interactions of Synthetic Herbicides with Plant Disease and Microbial Herbicides. M. Vurro & J. Gressel (eds.). **Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management**. 277-296. 2007, Springer.
- GRIFFITS, E. Iatrogenic Plant Diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 19: 69-82, 1981
- HARRING, T.; STEIBEIG, J.C.; HUSTED, S. Accumulation of shikimic acid: A technique for screening glyphosate efficacy. *J. Agric. Food Chem.* 46: 4406 - 4412, 1998.
- HENRY, B.W.; SHANER, D.L.; WEST, M.S. Shikimate accumulation in sunflower, wheat and proso millet after glyphosate application. *Weed Sci.* 55: 1- 5, 2007.
- KOGER, C.H., SHANER, D.L., HENRY, W.B., NADLER-HASSAR, T., THOMAS, W.E., WILCUT, J.W. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Sci.* 53:438-445, 2005.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62p.
- MUELLER, T.C.; MASSEY, J.H.; HAYES, R. M.; MAIN, C.L.; STEWART Jr., N. Shikimate Accumulates in Both Glyphosate-Sensitive and Glyphosate Resistant Horseweed (*Conyza canadensis* L. Cronq.). *J. Agric. Food Chem.*, 51:680-84, 2003.
- NEUMANN, G.; KHOLLS, S.; LANDSBERG, E.; STOCK-OLIVEIRA, SOUZA, K.; YAMADA, T. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Diseases and Protection Special Issue/Sonderheft XX*, 963-969, 2006.
- PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DIKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, F. Tolerance and Accumulation of Shikimic Acid in Response to Glyphosate Applications in Glyphosate-Resistant and Nonglyphosate-Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *J. Agric. Food Chem.* 50:3, 506-512. 2002.
- SINGH, B.K. & SHANER, D.L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technol.* 12:52 - 530, 1998.
- WANG, C. Effect of Glyphosate on Aromatic Acid Metabolism in Purple Nutsedge (*Cyperus rotundus*). *Weed Technol.* 15 (4): 628-635, 2001.
- YAMADA, T & CASTRO, P.R.C. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: Efeitos secundários e implicações fisiológicas e agronômicas. "In SIMPÓSIO SOBRE SISTEMA AGRÍCOLA SUSTENTÁVEL COM COLHEITA ECONÔMICA MÁXIMA. 1., São Pedro, 2004. *Anais. CI ROM.*

* Projeto FAPESP 2004/10864-3