**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

**Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em
variedades de soja transgênica e não transgênica**

Carlos Alberto Moldes

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2006**

Carlos Alberto Moldes
Licenciado em Química com Orientação Agrícola

**Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja
transgênica e não transgênica**

Orientadora:
Profa. Dra. **Siu Mui Tsai**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2006**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Moldes, Carlos Alberto

Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica / Carlos Alberto Moldes. - - Piracicaba, 2006.

92 p.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz . Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2006.
Bibliografia.

1. Enzimas antioxidantes 2. Herbicidas 3. Plantas transgênicas 4. Soja
I. Título

CDD 633.34

DEDICATÓRIA

A mis viejos

*Aprende de los audaces
de los fuertes
de quien no acepta situaciones
de quien sobrevivirá a pesar de todo...*

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. Siu Mui Tsai pelo acolhimento, orientação e apoio permanente.

Ao Professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela enorme colaboração e co-orientação no trabalho.

À Professora Dra. Alicia Grassano porque se não fosse pelo seu apoio, confiança e fé em mim, eu não houvesse encarado esta jornada.

A Soraya por ter me resgatado da minha solidão e ser uma presença imprescindível na minha vida.

Ao Departamento de Química da FacCEN-UNLPam e aos seus docentes, especialmente a Silvia Pattacini, Gladis Scoles e Monica Bellosas pela grande amizade, carinho e estímulo oferecido constantemente.

À Professora Dra. Ana Lia Ronchi pelo apoio pessoal e institucional.

Aos Doutores Ricardo Fornazier e Renato Ferreira pela grande ajuda no início e no fim deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética e Bioquímica de Plantas da ESALQ, Rui Gomes Junior, Priscila Gratão, Geórgia Pompeu, Fabrício Delite, Patrícia Cardoso, Salete Gaziola e José Carmezini.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Othon Abrahão, Edmilson, Luciana Fedatto, Flavia Capaldi, Ludmila Campos, José Elias Gomes, Francisco Montrazi, Wagner Picinini, Juliana Martinati, Camila Patreze, Oscar Fontão, Gladys Baptista e Fabiana Cannavan.

A Diego Soldini do INTA-Marcos Juarez pelo fornecimento do material vegetal utilizado neste trabalho.

A “el aguante argentino” Lorena Sereno, Alfredo Suarez, Eva Mamanis, Esteban Gonzalez, Silvia Imhoff, Jorge Gieco, Maria Basanta, Alejandro Toro e Elisabeth, e meus “segundos pais” Cecilia Videla e Guillermo Almeida.

Aos amigos Alexander Andrade, Luciana Ruggiero, Simão de Sousa, Alessandro Riffel e Rafael de Armas.

Aos meus “terceiros pais” Beatriz Losada e Jesus Ocariz.

A Sergio, Pili e Joaquin por serem uma grande fonte de apoio e alegria.

Aos amigos em Argentina, mas estão sempre presentes, Manuel Neveu e Rosana, Juanci de Dios Herrero, Jorge Schap, Patrícia Garcia, Raul Saez, Silvia Gomes, Helda Gomes, Manuel Pizarro e Carolina Piombi.

A toda família Fumagalli, Federico e Liliana, Lucas e Majo, Maria Paula, Carlos, Mirta, Alicia e “la Tata”.

A CAPES e a Secretaria de Políticas Universitárias-Ministério de Educación de la Nación Argentina pela bolsa concedida através do convenio CAPES-SPU “Becas doctorales para docentes de instituciones argentinas”.

A FAPESP pelo apoio financeiro para desenvolver o trabalho através do Projeto 2004/08444-6.

A Facultad de Ciencias Exactas e Naturales da Universidad Nacional de La Pampa por ser berço da minha formação.

A USP e suas unidades ESALQ e CENA por possibilitar a minha formação doutoral.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 DESENVOLVIMENTO.....	15
2.1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	15
2.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
2.1.2 GERAÇÃO DE EROs A NÍVEL SUB-CELULAR	17
2.1.3 HOMEOSTASE REDOX	18
2.1.4 MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO DE EROS	20
2.1.5 ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS	21
2.1.6 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	23
2.1.6.1 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD)	23
2.1.6.2 CATALASE (CAT).....	24
2.1.6.3 PEROXIDASES (POX)	25
2.1.7 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EM RESPOSTA AO ESTRESSE	27
2.1.8 ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS	30
2.1.9 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DO GLIFOSATO	32
2.1.10 EFEITOS SECUNDÁRIOS DO HERBICIDA GLIFOSATO	33
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	36
2.2.2 EXPERIMENTOS.....	36
2.2.2.1 ENSAIO EM HIDROPONIA.....	36
2.2.2.2 ENSAIO EM SUSTRATO.....	36
2.2.3 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	36
2.2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CLOROFILA.....	37
2.2.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS	37
2.2.5.1 EXTRAÇÃO PROTÉICA.....	37
2.2.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	37
2.2.5.3 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	38

2.2.5.3.1 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM ESPECTROFOTÔMETRO	38
2.2.5.3.2 ATIVIDADE DE GUAIACOL PEROXIDASE (GOPX) EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	38
2.2.5.3.3 ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE (APX) EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	38
2.2.5.3.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ESPECTROFOTÔMETRO	39
2.2.5.3.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) EM ESPECTROFOTÔMETRO.....	39
2.2.6 PERFÍS PROTÉICOS E ISOENZIMÁTICOS	39
2.2.6.1 ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA DESNATURANTE E NÃO DESNATURANTE	39
2.2.6.2. PERFIL DE PROTÉICO.....	40
2.2.6.3 PERFIL DE ISOENZIMAS DE CATALASE (CAT)	40
2.2.6.4 PERFIL DE ISOENZIMAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	41
2.2.6.5 PERFIL DE ISOENZIMAS DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)	41
2.2.7 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS	42
2.2.7.1. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS	42
2.2.7.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC).....	42
2.3 RESULTADOS	44
2.3.1 ENSAIO EM HIDROPONIA.....	44
2.3.2 ENSAIO EM SUSBTATO	52
2.3.3 PERFÍS DE PROTEÍNAS E ISOENZIMÁTICA	63
2.3.4 PERFIS DE AMINOÁCIDOS	68
2.4. DISCUSSÃO.....	71
3. CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82

RESUMO

Resposta de enzimas antioxidantes à aplicação do herbicida glifosato em variedades de soja transgênica e não transgênica

Os herbicidas são aplicados em lavouras com o objetivo de eliminar plantas daninhas presentes, mas os efeitos sobre as culturas muitas vezes não são perceptíveis ou não são amplamente considerados. As plantas sob condições de estresse, podem reagir ao elicitor manifestando reações oxidativas durante as quais espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas. O herbicida glifosato atua como um inibidor competitivo da 5-enolpiruvil xiquimato-3-fosfato sintase da via do xiquimato e o seu efeito herbicida imediato é a inibição da síntese de aminoácidos aromáticos e metabólitos secundários derivados dos fenilpropanoides. A geração de espécies ativas de oxigênio e mecanismos de resposta a estresse oxidativo não são frequentes no estudo do herbicida glifosato, portanto o presente trabalho objetivou estudar e avaliar parâmetros bioquímicos que poderiam ser afetados pelo herbicida glifosato em variedades suscetíveis e resistentes (transgênicos) dando ênfase na resposta de enzimas antioxidantes e no balanço de aminoácidos. Foram desenvolvidos dois experimentos onde em um deles foi avaliado o efeito da concentração de glifosato em plantas crescidas em hidroponia e no outro foi avaliada a resposta de plântulas de soja de quatro variedades de soja duas resistentes e duas suscetíveis. O perfil de aminoácidos mostrou estar alterado entre variedades suscetíveis e resistentes. O aumento de asparagina, glutamato, histidina e isoleucina de folha assim como o conteúdo total de aminoácidos de folha foram menores e/ou não significativo nas variedades resistentes. A tendência de aumento de atividade de algumas enzimas antioxidantes analisadas como a catalase na raiz, peroxidases na folha ou a glutatona redutase de folha indicou que existem mecanismos ativados para defesa frente a espécies ativas de oxigênio. No entanto, os níveis de peroxidação lipídica não variaram em nenhuma das variedades utilizadas neste estudo. Embora hajam sido apresentadas evidências que o glifosato gera estresse oxidativo é de se considerar que o modo de ação deste herbicida não é exercido através de mecanismos geradores de radicais livres, porém estes mecanismos parecem estar mascarados pela grande proliferação de aminoácidos livres que podem atuar como antioxidantes.

Palavras-chave: Soja; Herbicidas; Glifosato; Transgênicos Enzimas Antioxidantes; Metabolismo De Aminoácidos; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Antioxidant enzymes response to glyphosate herbicide application in transgenic and not-transgenic soybean “varieties”

Herbicides are applied in cultures with the objective to eliminate weeds, but the effects over the plants sometimes are not perceptible or are not widely considered. Plants under stress conditions can react to the elicitor with oxidative manifestations where reactive oxygen species (ROS) are generating. Glyphosate acts as a competitive inhibitor of enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase in the shikimate metabolic pathway and its immediately effect is the inhibition of aromatic aminoacids synthesis and secondaries metabolites derived for phenylpropanoids components. ROS generation and response mechanisms to the oxidative stress is not frequently studied in glyphosate applications, although the present work objectives are study and evaluate biochemistry parameters that could be affected by glyphosate herbicide in susceptible and resistant (transgenic) “varieties” giving emphasis in the antioxidant enzymes response and amino acids balance. Two experiments were set up to evaluate the effect of glyphosate in plants of two soybean lines growing under hydroponic conditions and the second experiment evaluated the time effect after application of glyphosate in four soybean lines, susceptible and two resistant (transgenic). Enhancement of asparagine, glutamate, histidine and isoleucine in leaves, and the total contents of soluble amino acids were lower in resistant lines. This tendency to the increase of antioxidant enzymes like catalase in roots, peroxidases and glutathione reductase in leaves indicates defense mechanisms activated against ROS. Nevertheless, lipid peroxidation levels were not changed in all lines. The present work shows evidences for oxidative stress generating by glyphosate but it is necessary to consider that the glyphosate action mode does not occur through the EROs generating mechanisms. These mechanisms could be masked by enhancement of amino acid.

Key-words: soybean; Herbicides; Glyphosate; Transgenics; Antioxidant Enzymes; Amino Acid Metabolism; Oxidative Stress.

LISTA DE ABREVIATURAS

$\cdot\text{O}_2^-$ - ânion (ou radical) superóxido
 $^3\text{Chl}^*$ - clorofila triplete
 AAL – ácido aminolevulínico
 AOXs – alternative oxidases
 APX – ascorbato peroxidase
 BSA – albumina de soro bovino
 CAT – catalase
 CDNB – 1-cloro-2,4-dinitrobenceno
 Chl* - clorofila ativada
 DHA – deidroascorbato
 DPIP – 2,6-dichlorophenolindophenol
 DTNB – 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
 DTT – ditioneitol
 EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
 EPSPS – 5-enolpiruvil xiquimato-3-fosfato sintase
 EROs – espécies reativas de oxigênio
 GOPX – guaiacol peroxidase
 GOPX – guaiacol peroxidase
 GPX – glutationa peroxidase
 GR – glutationa redutase
 GS· - radical glutationilo
 GSH – glutationa reduzida
 GSSG – glutationa oxidada
 GST – glutationa-S-transferase
 H_2O_2 – peróxido de hidrogênio
 HO_2 – radical peridroxila
 $\text{LOO}\cdot$ - radical lipoperóxido
 LOOP – lipoperóxido
 mA – miliampères
 MCP – morte celular programada
 MDA – monodeidroascorbato
 MDAR – monodeidroascorbato redutase
 MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
 NADH – nicotinamida dinucleótido forma reduzida
 NADP^+ - nicotinamida dinucleótido fosfato na forma oxidada
 NADPH – nicotinamida dinucleótido fosfato na forma reduzida
 NBT – nitroblue tetrazolium
 O_2 – oxigênio molecular
 O_2^* - oxigênio “singlet”
 $\text{OH}\cdot$ - radical hidroxila
 PEP – fosfoenolpiruvato
 POX – peroxidases
 PSI – fotosistema I
 PSII – fotosistema II

PVPP – polivinil polipirrolidona

SDS-PAGE – Sodium docedyl sulphate- polyacrilamide gel electrophoresis

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas com ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TEMED – tetramethylethylenediamine

1 INTRODUÇÃO

Os herbicidas são aplicados em lavouras com o objetivo de eliminar plantas daninhas presentes, mas os efeitos sobre as culturas muitas vezes não são perceptíveis ou não são amplamente considerados. Ao aplicar-se o herbicida, uma porção deste atinge a cultura presente na área ou em áreas próximas, podendo causar efeitos co-laterais, incluindo alterações no metabolismo de nitrogênio, nos níveis hormonais e no metabolismo secundário da planta (RIZZARDI et al., 2003).

As plantas sob condições de estresse, podem reagir ao elicitor manifestando reações oxidativas durante as quais espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas, tais como o radical superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$) (SCANDALIOS, 1993; MITTLER, 2002; RIZZARDI et al., 2003). O estresse oxidativo implica em um conjunto de eventos prejudiciais à planta, onde as EROs desencadeiam reações à partir de radicais livres que, de maneira indiscriminada, atingem qualquer tipo de macromolécula alterando a funcionalidade das mesmas (MARTINEZ-CAYUELA, 1998). O aumento na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos pode ser uma resposta adaptativa das células ao aumento das EROs (MITTLER, 2002).

Estudos feitos com alguns herbicidas mostraram comportamentos diferentes na atividade de enzimas antioxidantes (DONAHUE et al. 1997; TEISSEIRE; VERNET, 2000; GEOFFROY et al., 2002; EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005). Geralmente, a resposta antioxidante varia de acordo com o modo de ação do herbicida aplicado e do cultivo. O estudo da resposta antioxidante pode dar importante informação sobre a tolerância de uma planta à aplicação de um herbicida. Tais informações poderiam ser decisivas na hora de avaliar a produtividade do cultivo e o dano ao meio ambiente através das doses que são necessárias para ativar esses mecanismos de resposta (EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005).

Existem poucos relatos sobre mecanismos bioquímicos de resposta ao estresse provocado pela aplicação do herbicida glifosato e mais especificamente na atividade de enzimas antioxidantes. Dado que a funcionalidade deste grupo de enzimas está relacionada com mecanismos da planta que afetam de maneira direta ou indireta o seu desenvolvimento, é de grande interesse o conhecimento das estratégias bioquímicas que a planta usa na sobrevivência frente aos fatores xenobióticos aos quais podem ser expostas nas lavouras. Portanto, o presente trabalho objetivou estudar parâmetros bioquímicos que são afetados pelo herbicida glifosato dando ênfase na resposta de enzimas antioxidantes e no balanço de aminoácidos. O intuito é

avaliar o glifosato como agente de estresse oxidativo em variedades de soja suscetíveis e resistentes (transgênica) através da determinação dos níveis de peroxidação lipídica, a atividade de enzimas antioxidantes freqüentes na resposta ao estresse oxidativo, os perfis de proteínas solúveis e a concentração de aminoácidos em plantas crescidas em condições controladas e submetidas à aplicação de herbicida glifosato.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISSÃO BIBLIOGRAFICA

2.1.1 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse ambiental representa o fator limitante mais importante para a produtividade vegetal e o rendimento de cultivos. Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas são mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas como processos fisiológicos normais. Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto a produção das EROs pode ser considerada como uma característica universal do estresse (CARRILLO; VALLE, 2005). Os fatores ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, podem se classificar em **abióticos**: alta irradiância, seca, hiperoxia, hipoxia, abnóxia, deficiência mineral, baixas e altas temperaturas; **bióticos**: infestação bacteriana, fúngica ou viral; e **xenobióticos**: herbicidas, fungicidas, contaminantes atmosféricos (SO₂, NO, NO₂, ozônio) e metais pesados. Estes últimos são de características antropogênicas (CARRILLO; VALLE, 2005).

Apesar dos organismos aeróbicos disporem de vantagens energéticas significativas utilizando o oxigênio molecular como um oxidante terminal na respiração, a sua presença no ambiente celular constitui uma ameaça oxidativa constante às suas próprias estruturas e processos metabólicos, devido ao seu potencial como redutor parcial para formar as EROs (MALLICK; MOHN, 2000; VAN BREUSEGEM et al., 2001). As EROs podem se tornar altamente destrutivas para células e tecidos se sua produção não for estritamente controlada (RICE-EVANS; DIPLOCK; SYMONS, 1991; ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002). Assim a formação de EROs é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos aeróbicos e provocam estresse oxidativo devido a sua ação tóxica e mutagênica sobre as células (ANGELOVA; PASHOVA; SLOKOSKA, 2000; MALLICK; MOHN, 2000).

Os efeitos do estresse oxidativo são causados pelas particulares propriedades químicas do oxigênio. A molécula de oxigênio pode ser considerada um biradical porque no estado basal de energia contem dois elétrons desemparelhados com spins paralelos. Para poder aceitar um par de elétrons e, portanto cumprir a sua função biológica, o oxigênio deve virar o seu spin para ficar em

conformação antiparalela. Esta característica é chamada de restrição de spin e representa uma barreira termodinâmica que permite ao oxigênio não entrar em combustão espontânea (BLANCO, 2000). A estratégia para diminuir a restrição de spin é proceder à redução do oxigênio incorporando um elétron por vez como acontece na reação catalisada pela citocromo oxidase (HAMILTON, 1991; MARTINEZ-CAYUELA, 1998). Oxidações metabólicas envolvendo oxigênio molecular são, portanto dependentes da ativação do oxigênio produzindo espécies tais como oxigênio “singlet” (O_2^*), $\bullet O_2^-$, H_2O_2 e $OH\bullet$, ou seus respectivos derivados formados pela reação com outras moléculas orgânicas ou complexos com metais de transição (ELSTNER, 1991; VAN BREUSEGEM et al., 2001; GRATÃO et al., 2006).

A ativação do oxigênio pode ocorrer principalmente por dois mecanismos. O primeiro é dado pela transferência de um éxciton de um aceitador de prótons excitado, o que geralmente é um pigmento, a um oxigênio no estado basal produzindo O_2^* . São requeridos -22 kcal/mol para elevar o oxigênio molecular até o seu primeiro estado de oxigênio O_2^* . Em plantas superiores esta energia é obtida a partir de quantuns de luz que podem ser transferidos pela clorofila ao oxigênio molecular (SCANDALIOS, 2005). O O_2^* pode se adicionar a ligações duplas de ácidos graxos insaturados (presentes em membranas, por exemplo) para formar lipoperóxidos (LOOP) (LEDFORD; NIYOGI, 2005).

O outro mecanismo é pela redução de oxigênio por transferência de um, dois, três ou quatro elétrons formando $\bullet O_2^-$, H_2O_2 , $OH\bullet$ e água, respectivamente (ELSTNER, 1991). O processo de formação do ânion superóxido é mediado por enzimas tais como a NADPH oxidase e xantina oxidase ou por compostos não enzimáticos como a semi-ubiquinona componente da cadeia de transporte de elétron da mitocôndria (DRÖGE, 2002). O $\bullet O_2^-$ é a base conjugada do radical ácido fraco peridroxila (OH_2). Sob condições ácidas, o radical OH_2 é predominante, porém em valores de pH altos predomina o $O_2^{\cdot -}$ (SCANDALIOS, 2005).

A subsequente redução do oxigênio leva a formação do H_2O_2 , uma molécula de relativa longa vida que pode difundir facilmente a través de membranas (MARTINEZ-CAYUELA, 1998; VAN BREUSEGEM et al., 2001; MITTLER, 2002). A reatividade do H_2O_2 não é significativa em comparação a outros radicais livres, mas a capacidade de reagir com metais pesados pela reação de Haber-Weiss faz com que se origine o $OH\bullet$ (MCKERSIE, 1996, VAN BREUSEGEM et al., 2001). A desintoxicação enzimática do $\bullet O_2^-$ e do H_2O_2 é preferencial nos organismos, devido ao fato do $OH\bullet$ exercer sua ação deletéria dentro de sua curta meia vida e não poder ser transformado enzimaticamente, portanto seria inviável agir diretamente contra ele. No caso, a

pressão de seleção tem levado a escolher mecanismos que evitem a formação do $\text{OH}^\bullet$ do que eliminá-lo diretamente (MITTLER, 2002).

Radicais de oxigênio incluindo os LOOPs podem desencadear a peroxidação lipídica por subtração de hidrogênio e adição de oxigênio que resultam na formação de radicais carbonilas. Em tal caso, o pacote fechado que formam as moléculas de ácidos graxos nas membranas favorecem o início de reações em cadeia para formação de lipoperóxidos que se propagam até atingir um antioxidante ou acabar o substrato. LOOP são mais polares de que os seus precursores e podem eventualmente comprometer a integridade da membrana. A susceptibilidade da membrana é aumentada na presença de lipídeos polinsaturados, especialmente em cloroplastos onde estão presentes em grande proporção.

2.1.2 GERAÇÃO DE EROs A NÍVEL SUB-CELULAR

Cada organela ou compartimento tem o potencial para ser alvo de danos oxidativos assim como de mecanismos para a eliminação de excesso de EROs (SCANDALIOS, 2005). Organelas com alta atividade metabólica oxidante e alta taxa de fluxo de elétrons tais como cloroplastos, mitocôndrias e microcôrpos, são a maior fonte de EROs em plantas (MITTLER et al., 2004).

Em cloroplastos existem quatro sítios metabólicos onde podem ser geradas as EROs:

1) no fotossistema I (PSI), onde pode ocorrer a redução monovalente do oxigênio pela reação de Mehler quando o NADPH não é consumido no ciclo de Calvin e, portanto diminui a disponibilidade de NADP^+ , criando um ambiente redutor favorável para formação de EROs.

2) as clorofilas fotoativadas, que podem produzir O_2^* quando existe limitação da transferência de elétrons ao NADP^+ . Sob estas condições, a energia luminosa não pode ser dissipada através do sistema de transporte de elétrons e, portanto, é transformada em fluorescência ou transferida a moléculas aceptoras que finalmente serão ativadas.

3) o sítio ativo do PSII, que catalisa a transferência de quatro elétrons até a água em quatro eventos independentes de transferência de um elétron. A co-oxidação de outras substâncias como álcoois, leva à redução incompleta do oxigênio e neste caso, o tipo de ERO formada será determinado pela competição entre o oxigênio e as outras substâncias co-oxidadas.

4) a atividade oxigenase da rubisco, que não gera diretamente EROs em cloroplastos, mas é ponto de início da fotorespiração onde a adição de oxigênio ao carbono 2 da ribulose fosfato forma fosfoglicolato e fosfoglicerato. O subsequente metabolismo do glioxilato no peroxissômo é

gerador de H_2O_2 (ELSTNER, 1991; MCKERSIE, 1996; ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

Na mitocôndria a maior parte do oxigênio é consumida pela citocromo oxidase e envolve uma transferência sequencial de quatro elétrons com formação de água. O sobrecarregamento da cadeia de transporte de elétrons é a principal fonte de superóxido sob condições específicas de estresse (MITTLER et al., 2004). A mitocôndria de plantas tem um sítio adicional de redução como oxidase alternativa distinta da citocromo oxidase pela sua resistência a cianeto. No entanto, nenhum destes sítios produz quantidades significantes de EROs quando comparados com o cloroplasto (MCKERSIE, 1996).

Peroxissômos e glioxissômos são organelas de membrana simples que compartimentalizam enzimas envolvidas na beta oxidação de ácidos graxos e no ciclo do glioxilato, incluindo glicolato oxidase, catalase e varias outras peroxidases. Glicolato oxidase produz H_2O_2 em uma transferência de dois elétrons ao oxigênio. Xantina oxidase, ureato oxidase e NADH oxidase geram superóxido como consequência da oxidação dos seus respectivos substratos (MCKERSIE, 1996).

Atividade oxidoreductase tem sido associada à membrana plasmática. Ao menos oito tipos de atividade foram descritos e muitas das quais envolvem NAD(P)H. Existem dois candidatos à geração de superóxido na membrana plasmática. 1) Um complexo responsável pela redução do íon férrico durante a sua absorção. Esta flavoproteína dependente de NADH é ligada à oxidoredução univalente de íons ferro produzindo EROs pela reação de Fenton. 2) Um homólogo de NADPH oxidase de mamíferos que catalisa a transferência univalente de elétrons ao oxigênio (BOLWELL; WOJTASZEK, 1997).

2.1.3 HOMEOSTASE REDOX

O termo sinalização redox é amplamente usado para descrever um processo regulador no qual um sinal é iniciado através do estatus redox da célula. Este tipo de sinalização é utilizado por uma ampla variedade de organismos, incluindo bactérias, para induzir respostas de proteção contra o dano oxidativo e para restaurar o estatus original de homeostase redox depois de uma exposição temporal a EROs (DRÖGE, 2002, HUNG; YU; LIN, 2005).

Portanto, qualquer condição em que a homeostase redox celular é alterada, pode ser definida como estresse oxidativo. Um desbalanço no qual esse estatus redox é alterado na direção

de pro-oxidantes podem resultar na potencialmente perigosa redução univalente do oxigênio molecular (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997).

Sob condições normais de crescimento a produção de EROs é baixa ($24 \mu\text{M s}^{-1}$ de $\bullet\text{O}_2^-$ e um nível basal de $0,5 \mu\text{M}$ de H_2O_2 em cloroplastos) (POLLE, 2001), porém as condições de estresse que podem perturbar a homeostase das células aumentando a produção de EROs ($240\text{--}720 \mu\text{M s}^{-1}$ de $\bullet\text{O}_2^-$ e um nível basal de $5\text{--}15 \mu\text{M}$ de H_2O_2) (MITTLER, 2002). A concentração destas espécies é determinada pelo balanço da taxa de formação e transformação de compostos e enzimas antioxidantes (DRÖGE, 2002).

Elevadas concentrações de EROs induzem nas células a expressão de genes dos quais os produtos exibem atividade antioxidante. O mecanismo mais comum para manter a homeostase redox é baseado na indução de sinais em cascata sensíveis ao status redox que levam ao aumento de expressão de enzimas antioxidantes ou do sistema de transporte de cisteína, os quais favorecem em alguns tipos de células o aumento da concentração de glutatona intracelular. Também, as proteínas apresentam geralmente menor atividade de desintoxicação de EROs do que a sua equivalente em aminoácidos solúveis, portanto, é razoável assumir que um aumento da proteólise também contribua para manter a homeostase redox (DRÖGE, 2002; MITTLER et al., 2004, 2004).

Células e tecidos mantêm estabilidade quando a taxa de produção e drenagem de EROs estiver constante e balanceada. A sinalização redox requer que este balanço seja perturbado pelo aumento na concentração das EROs e/ou pela diminuição da atividade de um ou vários sistemas antioxidantes. Em organismos superiores tais eventos oxidativos podem ser induzidos pela ativação de sistemas geradores de EROs ou espécies reativas de nitrogênio (ERN - derivados de óxido nítrico [NO]) (BELIGNI; LAMATTINA, 1999; LEDFORD; NIYOGI, 2005). Estas respostas podem ser induzidas por fatores ambientais. Se o aumento inicial de EROs for relativamente pequeno, pode ser facilmente combatido pela resposta antioxidativa e voltar às condições balanceadas originais. Esta manifestação fisiológica da regulação redox envolve um incremento temporário e/ou mudança do status redox tiol/disulfeto até condições mais oxidantes (DRÖGE, 2002; HUNG; YU; LIN, 2005).

No entanto, sob certas condições a produção de EROs pode ser aumentada a níveis tão altos que a resposta antioxidativa não é suficiente para restabelecer a homeostase redox original. Nesses casos, o sistema pode ainda alcançar um equilíbrio, mas resulta em um estado quase-estável onde altas quantidades de EROs são compensadas por diferentes níveis de aminoácidos

livres e/ou diferentes padrões de expressão de genes que comprometem as vias de sinalização redox (DRÖGE, 2002; HUNG; YU; LIN, 2005).

Condições patológicas podem desenvolver os casos mais severos de alta concentração de EROs. Mas estas condições não necessariamente influenciam a homeostase, sendo que os sintomas patológicos podem resultar tanto dos efeitos danosos das EROs como das mudanças na expressão gênica mediadas por essas espécies (DRÖGE, 2002).

A morte celular é um processo essencial no ciclo de vida. Dois tipos têm sido descritos em plantas: a morte celular programada (MCP) e a necrose. Os dois processos produzem um desbalanço na homeostase redox que levam a destruição da célula promovida pela geração de EROs (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

A necrose resulta de um trauma persistente onde o estado de quase estabilidade leva ao enfraquecimento celular através da desorganização dos processos metabólicos, provocada pela perda de funções de moléculas celulares essenciais (macromoléculas, pigmentos, etc.), a qual acaba na desagregação dos componentes celulares. Este processo não é regulado geneticamente (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; DRÖGE, 2002).

A MCP tem sido bem estudada durante a resposta hipersensitiva que é típica em interações incompatíveis entre planta-patógeno. Durante a MCP, uma explosão oxidativa ocorre junto com a morte celular no sítio de ataque do patógeno. Os mecanismos de resposta de enzimas antioxidantes na MCP são inibidos para garantir os efeitos extremos da geração de EROs e provocar a morte celular, o que alguns autores consideram como um “suicídio” da planta regulado geneticamente para impedir que o patógeno atinja o resto da planta (MITTLER; LAM, 1996; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000; MITTLER, 2002), diferente do estresse abiótico ou xenobiótico onde existe a indução de enzimas antioxidantes sob efeitos subletais do agente de estresse (GRATÃO et al., 2006).

2.1.4 MECANISMOS DE DESINTOXICAÇÃO DE EROS

A célula conta com duas estratégias gerais para lidar com a formação de EROs e o estresse oxidativo. Pelo fato de que várias condições de estresse são acompanhadas pela formação de EROs, evitar ou aliviar os efeitos do estresse pode constituir uma primeira linha de defesa frente ao estresse oxidativo. Os mecanismos que podem reduzir o efeito das EROs incluem: 1) adaptações anatômicas, como movimento ou enrolamento das folhas, desenvolvimento de

epidermes refratantes ou estômatos escondidos sob estruturas especializadas; 2) adaptações fisiológicas como as plantas C_4 ou CAM; e 3) mecanismos moleculares que rearranjam o aparelho fotossintético e os seus pigmentos “antena” de acordo com qualidade e intensidade da luz ou diretamente, suprimem a fotossíntese (MITTLER, 2002; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

A produção de EROs também pode ser evitada pela canalização alternativa nas cadeias de transporte de elétrons em cloroplastos e mitocôndrias através de um grupo de enzimas chamadas de oxidases alternativas (AOXs). As AOXs podem desviar elétrons da cadeia de transporte de elétrons e usa-los para reduzir o oxigênio à água. Então, esta estratégia permite por um lado evitar a formação de EROs e por outro, diminuir a concentração de oxigênio celular (MITTLER, 2002; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

A outra estratégia implica agir diretamente sobre as EROs através de compostos antioxidantes. Halliwell e Gutteridge (1989) definiram os compostos antioxidantes como substâncias que, em relativamente baixas concentrações, competem com outros substratos oxidáveis e, portanto, diminuem significativamente ou inibem a oxidação destes substratos. Nesta definição incluem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), guaiacol peroxidase (GPOX) e catalase (CAT); também se pode incluir aqueles não enzimáticos, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), e glutathione (GSH) (DRÖGE, 2002).

O balanço entre as atividades da SOD, peroxidases e CAT, é crucial para se determinar os níveis basais de radicais $\bullet O_2^-$ e H_2O_2 . Este balanço junto com o sequestro de íons metálicos previne a formação do perigoso $OH\bullet$ nas reações de Haber-Weiss e Fenton (MITTLER, 2002, VAN BREUSEGEM et al., 2001). A enzima glutathione redutase (GR) também pode ser incluída como antioxidante, pois mantém o “pool” de glutathione (GSH), a qual atua como doadora de elétrons no ciclo da ascorbato-glutathione para recompor o ascorbato nos cloroplastos, e na regeneração do substrato doador de elétrons GPX. Também é substrato da glutathione-S-transferase (GST), que catalisa a conjugação de alguns agentes xenobióticos, como no caso de herbicidas, com GSH, onde esse conjugado é direcionado para o vacúolo, desintoxicando a célula (CATÁNEO et al., 2003). A GST também tem função peroxidase atuando na redução de hidroperóxidos a monohidróxialcool (MARRS, 1996; CATÁNEO et al., 2003).

2.1.5 ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

Antioxidantes não enzimáticos são encontrados em todos os compartimentos celulares e os mais importantes são o ácido ascórbico (vit C) e a glutathione (GSH). Estes compostos têm propriedades hidrofílicas. Ácido ascórbico, em pH fisiológico, tem uma estrutura de enediol na sua base conjugada. Assim, o ácido ascórbico pode reagir como um doador monovalente. A formação de um radical ascorbil pela doação de um elétron, produz uma deslocação eletrônica altamente estável. Logo, uma dismutação espontânea é produzida para formar ascorbato e deidroascorbato. Este último é convertido a ascorbato em outras vias metabólicas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Com relação à GSH, as propriedades de desintoxicação de radicais livres se devem à presença de um grupo sulfeto na molécula. É conhecido que os mercaptanos, como a glutathione, podem doar um átomo de hidrogênio do grupo sulfeto para formar um radical glutathionil ($GS^\cdot$). Também a base conjugada da glutathione pode ser doador monovalente e formar o $GS^\cdot$.

Um outro composto antioxidante de características hidrofílicas é a ergotioneína. Este composto é sintetizado por fungos e micobactérias e é captado e incorporado às plantas através das raízes. A ergotioneína é um potente dreno de compostos oxidantes não-radicais como ácido hipocloroso ou complexos de ferro hipervalentes (mioglobina, hemoglobina), que também podem reagir com peroxitrinitrito evitando a nitração da tirosina, com uma eficiência similar a GSH e podem desintoxicar $OH^\cdot$ em altas taxas (ASMUS et al., 1996; ARUOMA et al., 1997).

Antioxidantes hidrofóbicos são encontrados em lipoproteínas e membranas onde interrompem a propagação da peroxidação lipídica eliminando radicais peroxil ($LOO^\cdot$) e bloqueiam a formação de hidroperóxidos a partir do O_2^* . Entre estes se destacam a vitamina E, carotenóides e possivelmente, ubiquinol na forma reduzida da coenzima Q (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

A vitamina E (α -tocoferol) é o mais eficiente desintoxicador de radicais peridroxil em bicamadas lipídicas. Similar ao mecanismo de ascorbato, o tocoferol doa um elétron quando reage com lipoperóxidos, formando um radical. Seguidamente é produzida uma deslocação de elétrons e o radical é estabilizado. Por último o radical tocoferol é reduzido por ascorbato ou algum outro sistema redutor (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

Os carotenóides constituem outro grande grupo de antioxidante hidrofóbicos, incluem compostos como licopeno e β -caroteno, que se caracterizam por estarem constituídos de longas cadeias de hidrocarbonetos com duplas ligações conjugadas (KRINSKY, 1989). Esta propriedade

permite a ancoragem nas membranas fosfolipídicas. Também a estrutura dos conjugados permite deslocar elétrons desemparelhados e atuar como doadora de elétrons monovalentes. Essa mesma estrutura conjugada é responsável pela drenagem da energia de ativação do O_2^* (SUNDQUIST; BRIVIBA; SIES, 1994; KIM et al., 2004; LEDFORD; NIYOGI, 2005).

2.1.6 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não enzimáticos não oferecem proteção direta contra os radicais $\bullet O_2^-$ ou H_2O_2 . Estes compostos primários são as maiores fontes de compostos oxidantes como o ferro hipervalente ou complexos cúpricos, peroxinitrito, radicais hidroxila, ou alcóxilos ($RO\bullet$) que são todos iniciadores de reações em cadeia (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999). Enzimas antioxidantes específicas têm capacidade de drenar estas espécies (CHAUDIÈRE, 1994). A vantagem de usar enzimas implica no fato de existir uma ampla variedade de mecanismos de regulação que permitem se adaptar às necessidades celulares (HARRIS, 1992). Varias destas enzimas podem ser induzidas, inibidas ou ativadas por efetores endógenos (GRATÃO et al., 2006).

A degradação de $\bullet O_2^-$ é catalisada pela SOD, entretanto H_2O_2 é degradado pela CAT e peroxidases (POXs). CAT e SOD são dismutases e não requerem cofatores enzimáticos tanto que também não estão associadas a consumo energético. As peroxidases são redutases que necessitam de algum cofator doador de elétrons como ascorbato ou glutathione. Estes cofatores podem ser regenerados posteriormente por NADPH produzido em outras vias metabólicas (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

As principais vias de drenagem enzimática das EROs em plantas incluem SOD que é achada no ciclo água-água dos cloroplastos e em todos os compartimentos celulares; APX e GR no ciclo ascorbato-glutathione dos cloroplastos, citosol, mitocôndria, apoplasto e peroxissômos; GPX e CAT nos peroxissômos (MITTLER, 2002).

2.1.6.1 SUPEROXIDO DISMUTASE (SOD)

O $\bullet O_2^-$ pode ser produzido em qualquer local onde esteja presente uma cadeia de transporte de elétrons. Aliás, as membranas fosfolipídicas são impermeáveis ao radical superóxido e,

portanto é importante que a SOD esteja no local onde é formado (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002).

As SODs são um grupo de metaloproteínas multiméricas que têm sido classificadas em três grupos de acordo com o componente metálico presente em seu sítio ativo: cobre/zinco, manganês ou ferro, sendo que as Cu/Zn-SODs são consideradas as mais abundantes em vegetais (SCANDALIOS, 1993; MALLICK; MOHN, 2000). As Cu/Zn-SODs e algumas Mn-SODs e Fe-SODs de procariotes são diméricas, enquanto que as Mn-SODs das mitocôndrias e de algumas bactérias termófilas são tetraméricas. Também tem sido relatado um novo tipo de SOD que tem Ni no sítio ativo em *Streptomyces* e cianobactérias. Ni-SOD tem uma arquitetura homohexamérica onde cada subunidade está conformada por quatro hélices, onde se localiza o sítio ativo (WUERGES et al., 2004).

De maneira geral, as Cu/Zn-SODs são encontradas no citosol e no estroma dos cloroplastos (HAYAKAWA; KANEMATSU; ASADA, 1994). As Mn-SODs e Fe-SODs têm sido encontradas geralmente na matriz mitocondrial de células eucarióticas e em células procarióticas, embora uma Mn-SOD associada à membrana tenha sido observada nos cloroplastos de algumas plantas (SEHMER; DIZENGREMEL, 1998). A Fe-SOD foi observada em algumas famílias de plantas e está associada principalmente aos cloroplastos (MALLICK; MOHN, 2000).

2.1.6.2 CATALASE (CAT)

A CAT é uma enzima que elimina H_2O_2 através de uma dismutação bivalente onde H_2O_2 é transformado em O_2 e H_2O . Alternativamente, as catalases em condições de baixa concentração de H_2O_2 podem usar outros doadores de elétrons como metanol, etanol, formaldeído, ácido fórmico, ascorbato e fenóis. Aliás, dados cinéticos sugerem que a CAT mitocondrial é mais eficiente como peroxidase, enquanto que a CAT do peroxissômo é mais eficiente como dismutase (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

A CAT é uma enzima tetramérica que contém grupos heme e é encontrada em todos os organismos vivos. Em plantas existem pelo menos três tipos de CATs distintas, que diferem em termos de localização e regulação biossintética (SCANDALIOS; GUAN; POLIDOROS, 1997): (1) aquelas presentes em sistemas fotossintéticos e que têm funções de eliminação de H_2O_2 durante a fotorespiração; (2) produzidas pelo tecido vascular que tem papel na lignificação e (3) abundantes em sementes e plantas novas e sua atividade é relacionada com a remoção do excesso

de H_2O_2 produzido pela degradação de ácidos graxos no ciclo do glioxilato nos glioxisômos (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

As evidências sugerem que a CAT utiliza um mecanismo de dois estágios tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. No primeiro estágio o ferro do grupo heme da CAT interage com o H_2O_2 para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio. Este composto intermediário é denominado componente I. A baixas concentrações de H_2O_2 ($<10^{-6}$ M), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol ou ácido ascórbico). Com elevadas concentrações de H_2O_2 , o componente I reage com uma segunda molécula de H_2O_2 para produzir água e uma molécula de oxigênio (SCANDALIOS, 1994).

2.1.6.3 PEROXIDASES (POX)

As peroxidases estão presentes em todos os compartimentos celulares e catalisam a transferência de elétrons ao H_2O_2 usando diferentes substratos reduzidos como doadores.

As POXs de plantas aumentam em resposta a vários estresses bióticos e abióticos, participam no catabolismo de auxinas e em processos de síntese de parede celular como a oxidação de fenóis, suberização e lignificação em plantas hospedeiras durante a reação de defesa contra patógenos (SYROS et al., 2004). O aumento de peroxidases tem sido correlacionado com mecanismos de resistência em um grande número de interações plantas-microorganismos (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002).

Também a quantificação e caracterização das peroxidases são importantes no sucesso de enxertia de ameixeiras (*Prunus* sp.), tanto que seria necessário que houvesse similaridade entre peroxidases do enxerto e o porta enxerto para que ocorra produção de correlatas ligninas (RODRIGUES et al., 2002).

A atividade POX é aumentada frequentemente em resposta a hormônios relacionados com estresse, tais como ácido abscísico e etileno. Paraquat, um herbicida gerador de estresse oxidativo, induz também este tipo de enzimas (KWAK et al., 1996).

Caminhos metabólicos enunciados anteriormente incluem peroxidases de funções específicas na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e dentre as peroxidases mais importantes estão a APX e GPX.

A APX, uma enzima presente em quase todos os compartimentos celulares, faz parte de duas vias metabólicas que agem na desintoxicação de H_2O_2 , o ciclo água-água e o ciclo da ascorbato-glutationa (MITTLER, 2002).

O ciclo da ascorbato-glutationa é encontrado em quase todos os compartimentos celulares (RIZHSKY; LIANG; MITTLER, 2003). O ascorbato reduz o H_2O_2 à água pela APX e o produto monodeidroascorbato (MDA) formado, volta a se reduzir a ascorbato por três vias: a primeira é por causa da dismutação espontânea que sofre o MDA que produz ascorbato e deidroascorbato (DHA); na segunda via, o MDA é reduzido enzimaticamente pela monodeidroascorbato redutase (MDAR); numa terceira via, o DHA formado da primeira via é reduzido a ascorbato pela deidroascorbato redutase, que utiliza glutathione como agente redutor. A glutathione oxidada é regenerada pela GR. Tanto a GR como a MDAR consomem NADPH como fonte de elétrons para reduzir os seus correspondentes substratos (MITTLER, 2002).

No ciclo água-água também tem participação da APX, porém em uma via diferente que está localizada no cloroplasto e atua parte do metabolismo da fase “luminosa” da fotossíntese. O $\bullet\text{O}_2^-$ formado pela transferência de um elétron do PSI para o O_2 , é dismutado em H_2O_2 e O_2 pela SOD e seguidamente o H_2O_2 é eliminado pela APX. O ciclo água-água utiliza elétrons da ferredoxina para regenerar ascorbato, portanto não tem consumo de NADPH nesta via metabólica (MITTLER, 2002).

Glutathione peroxidases são uma família de múltiplas isoenzimas que catalisam a redução de H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e lipoperóxidos por redução de glutathione. A enzima é uma das poucas que contem na sua estrutura primaria um raro aminoácido, a selenocisteína que é codificado por um triplete TGA (normalmente é um códom de terminação). A substituição do enxofre por selênio contribui para que este aminoácido tenha um grande poder nucleofílico e menor pK do que a cisteína. Assim a enzima GPX na qual o aminoácido selenocisteína é considerado seu sitio catalítico, adquire um grande potencial redox para o seu substrato (CHAUDIÈRE; FERRARI-ILIOU, 1999).

Quatro grupos de GPX que contem selenocisteína têm sido identificados em vertebrados; a GPX citosólica; a GPX de plasma extracelular; GPX gastrointestinal; e a fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase (PHGPX). A identificação da atividade GPX, genes com seqüências homólogas com animais, o isolamento de uma proteína a partir de um gene de citrus e a sua caracterização como fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase não foi conhecida em plantas até relativamente pouco tempo (ESH DAT et al., 1997).

Atividade GPX tem sido detectada em extratos celulares de plantas superiores utilizando H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos como substratos. No entanto, ao menos uma parte desta atividade pode ser devida à presença de GST que também é conhecido por ter alguma atividade GPX (CHURIN; SCHILLING; BÖRNER, 1999).

2.1.7 METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EM RESPOSTA AO ESTRESSE

Proteínas, pigmentos, nucleotídeos, co-fatores enzimáticos, hormônios, componentes estruturais e agentes de defesa são compostos nitrogenados que dependem do funcionamento metabólico apropriado dos mecanismos de incorporação, translocação, e transformação do nitrogênio (NOCTOR et al., 2002).

Os aminoácidos, além de constituir as unidades fundamentais das proteínas, participam como intermediários em grande parte do metabolismo celular, cumprindo funções diversas, como transportadores de nitrogênio, sinalizadores, antioxidantes e precursores de outras moléculas como hormônios, co-fatores e nucleotídeos. O pool de aminoácidos livres em uma célula é fortemente regulado por varias enzimas chaves que participam tanto na síntese como na degradação. Também, mecanismos de sinalização mantêm a relação C/N estabilizada. Em tempos de estresse, particularmente quando tem deficiências de carbono, existe uma forte demanda de esqueletos carbonados a partir de aminoácidos para suplementar o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Para lidar com isso, a planta necessita de enzimas que inter-convertam amidas, aminoácidos e cetoácidos (MIFLIN; HABASH, 2002).

Por outro lado, os aminoácidos são compostos que tem relativamente baixa atividade antioxidante, mas quando presentes em altas concentrações podem contribuir significativamente para desintoxicação das EROs. Os exemplos mais destacados são os aminoácidos livres, peptídeos e proteínas. Praticamente todos os aminoácidos podem servir como alvos para ataque oxidativo, porém alguns aminoácidos como triptofano, tirosina, histidina e cisteína são particularmente sensíveis as EROs. Devido ao fato da concentração acumulada de aminoácidos livres ser da ordem de 10^{-1} M, os aminoácidos livres são quantitativamente importantes como desintoxicadores de EROs (DRÖGE, 2002).

O aumento nos teores de aminoácidos tem sido relatado em vários trabalhos quando expostos a agentes de estresse (COOLEY; FOY, 1992; STARRAT; LAZAROVITS, 1996; DRÖGE, 2002). Possíveis explicações sobre os aumentos observados no pool de aminoácidos

incluem a inibição da síntese de proteínas, aumento da hidrólise de proteínas, decréscimo do uso de aminoácidos como fonte de carbono respiratório e/ou aumento da biossíntese de aminoácidos (COOLEY; FOY, 1992).

Em plantas, todos os aminoácidos obtêm os seus esqueletos carbonados a partir de produtos da fotossíntese, que são convertidos em aminoácidos através de diferentes vias metabólicas. O composto 3-fosfoglicerato dá origem a fosfoenolpiruvato (PEP), e daí derivam vários caminhos de síntese de aminoácidos:

- O PEP convertido em oxaloacetato deriva na síntese de aspartato e continua para a síntese de asparagina, treonina, isoleucina, lisina e metionina.
- O PEP convertido em piruvato deriva na síntese de alanina, leucina e valina.
- O oxalacetato e o piruvato dão origem ao α -cetoglutarato que leva a síntese de glutamato, glutamina, arginina e prolina.
- O PEP pode reagir com outro produto da fotossíntese, a eritrose-4-fosfato, derivando na via do xikimato para síntese de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano.
- Finalmente, a histidina é originada por outro produto fotossintético, a ribose-5-fosfato e o fosfoglicolato inicia a síntese de glicina, serina e cisteína (HELDT, 1997; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A intrincada rede de reações metabólicas faz com que estas vias sejam conectadas em algum ponto, tanto que quando afetada alguma dessas vias biossintéticas, a mudança pode derivar na ativação ou inibição da síntese de outros compostos. A biossíntese de aminoácidos tem uma relação direta com o metabolismo secundário e, portanto, mudanças afetando o conteúdo de aminoácidos podem orientar o metabolismo para uma resposta de defesa (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Os radicais de oxigênio causam também modificações nas proteínas que podem levar a mudanças na função, fragmentação química, ou aumento na susceptibilidade para o ataque proteolítico (DRÖGE, 2002). Davies e Goldberg (1987) relataram que a proteólise aumentou mais de onze vezes depois de expor eritrócitos humanos ao $\bullet\text{O}_2$ - e H_2O_2 .

Glifosato também causou reduções nos níveis de proteínas solúveis e na incorporação de ^{14}C -leucina em proteínas em *Lemna perpusilla* Torr (COOLEY; FOY, 1992). Também, em células de soja, foi observada inibição na síntese de proteínas totais e redução nos níveis de proteínas solúveis devidas á aplicação de glifosato (COOLEY; FOY, 1992). Ausência ou deficiência de aminoácidos aromáticos associados á ação do glifosato influencia a síntese de

proteínas e causa a inibição do crescimento e morte celular (WANG, 2001). No entanto, nem todos os efeitos do glifosato sobre o crescimento são devidos à redução de aminoácidos aromáticos (DUKE; HOAGLAND, 1981).

Killmer; Widholm e Slife (1981) sugeriram que em cultivos de células de cenoura tratadas com glifosato, os esqueletos de carbono se dirigiam para a via do xiquimato causando a diminuição de carbono respiratório e resultando no acúmulo de amônio (WANG, 2001).

Starrat e Lazarovits (1996) submeteram plantas de tomate a herbicidas do tipo das dinitroanilinas (orzalina e dinitroamina) e acetoclor e observaram um aumento significativo de aminoácidos solúveis com as dinitroanilinas. Especificamente houve um aumento significativo específico de glutamina e asparagina nas plantas submetidas à dinitroanilinas associado à predisposição das plantas à resistência contra ataque de fungos fitopatogênicos, pelo fato de que a incidência de doenças diminuiu nas plantas tratadas.

No mesmo trabalho, a diminuição do teor de fenilalanina foi associada com a resistência às dinitroanilinas. Esta diminuição ocorreu devido ao direcionamento deste aminoácido para síntese de compostos de defesa derivados de fenilpropanóides. De fato, plantas submetidas a herbicidas aumentaram os teores de compostos fenólicos em comparação ao controle (STARRAT; LAZAROVITS, 1996). Um efeito contrário foi observado com a aplicação do glifosato. Contrariamente, devido ao comprometimento da síntese de aminoácidos aromáticos, foi ocasionada a supressão das defesas e o aumento na susceptibilidade a doenças em culturas de soja, feijão e tomate sob aplicação de glifosato (RIZZARDI et al., 2003).

Cooley e Foy (1992) observaram aumento no teor de aminoácidos em plantas de *Lemna minor* com aplicação de glifosato. Os resultados deste estudo são consistentes com a hipótese de que a inibição da síntese de proteínas origina os aumentos observados nos níveis de aminoácidos, principalmente alanina e valina. Estes são derivados do piruvato e a inibição da via do xikimato pode desviar metabólitos para síntese de esses outros aminoácidos (HELDT, 1997).

Sob exposição de metais, as plantas sintetizam um conjunto de metabólitos que são acumulados em concentrações milimolares, particularmente aminoácidos específicos, como prolina e histidina, peptídeos como glutatona e fitoquelatinas e aminas como espermina, espermidina, putrescina, nicotinaminas e ácidos muginólicos (SHARMA; DIETZ, 2006).

A prolina tem funções como osmolito, desintoxicador de radicais, dreno de elétrons, estabilizador de macromoléculas e componente da parede celular (MATYSIK et al., 2002). De acordo as suas propriedades químicas, a prolina pode estar envolvida em estresse provocado por

metais, por mecanismos de regulação osmótica e redox, complexação de metais e desintoxicação de EROs (SHARMA; DIETZ, 2006). Este aminoácido é sintetizado à partir de glutamato em três reações exergônicas, consumindo 1 ATP e 2 NADPH. O consumo relativamente elevado de NADPH e o acúmulo de prolina constituem um mecanismo de canalização do excesso de elétrons (HELDT, 1997).

Prolina tem sido estudada como resposta de plantas a estresses abióticos. Muitas plantas acumulam prolina em condições de déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas e alguns outros estresses ambientais, especialmente aqueles provocados por metais de transição Cu, Cd e Zn (COSTA; MOREL, 1994; SCHAT; SHARMA; VOOIJS, 1997; CHEN et al., 2001).

Tem sido comprovado que o hiperacúmulo de Ni em espécies de *Alisum* é especificamente ligado à capacidade de produzir histidina livre (KRÄMER et al., 1996). O papel benéfico dos altos níveis de histidina tem sido demonstrado em *Arabidopsis thaliana* transgênica expressando uma ATP fosforil transferase de *Salmonella typhimurium*. A enzima bacteriana é insensível à retroinibição por histidina. Estas plantas acumularam duas vezes mais histidina e aumentaram 10 vezes mais o seu crescimento na presença de Ni no meio (WYCISK et al., 2004).

Plantas superiores podem sintetizar outros derivados de aminoácidos sob estresse de metal pesado, tais como betaínas, ácidos muginólicos e nicotinaminas (vit PP). Entretanto, as betaínas representam metabólitos de estresse geral, as outras duas tem função específica na homeostase de metal e na defesa contra metais (SHARMA; DIETZ, 2006).

2.1.8 ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS

A ação de um herbicida pode ser descrita como uma interação fisiológica e bioquímica entre um herbicida e a planta. O conhecimento sobre a interação do herbicida com um determinado sítio alvo, não fala de como as plantas morrem. Por exemplo, os eventos fisiológicos e bioquímicos associados à toxidez de oxigênio têm sido relacionados com o mecanismo de ação de herbicidas que inibem a fotossíntese e, portanto, seria incorreto falar que a toxidez destes herbicidas é devida exclusivamente à inibição da fotossíntese (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

Em muitas instâncias, mas não em todas, é possível identificar um "alvo" de ação dentro da planta. Este é o sítio no qual o herbicida se liga ou de alguma maneira produz interferências que resultam em última instância na morte da planta (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

Herbicidas que interferem na cadeia de transporte de elétrons, tanto pela inibição do PSII (Atrazina, Diuron) ou pela captação de elétrons no fotossistema I (Paraquat, Diquat), induz a sua ação fitotóxica através da ativação molecular do oxigênio. Também herbicidas como norflurazon ou pentoxazone que interferem com diferentes tipos de pigmentos no cloroplasto (carotenóides e clorofilas) podem exercer a sua ação fitotoxicidade pela ativação e aumento das EROs de maneira indireta, por causa da falta de drenagem do excesso de luz (WAKABAYASHI; BÖGER, 2004).

Na presença de luz, os pigmentos fotossintéticos como a clorofila (Chl), o P680 e o P700 são excitados pela absorção de fótons e formam intermediários de alta energia (Chl*, P680*, P700*). Quando o sistema de transporte de elétrons tem atividade normal, a clorofila excitada transfere um elétron à plastoquinona dando origem a semiquinona e plastoidroquinona. O elétron é substituído por outro proveniente da água. Quando a redução da plastoquinona é inibida por um herbicida, a energia de excitação não pode ser disponível da maneira usual. A emissão de calor e fluorescência atinge o máximo e a clorofila é acumulada na forma mais estável, clorofila triplete ($^3\text{Chl}^*$) (FUFEZAN; RUTHERFORD; KRIEGER-LISZKAY, 2002). O pigmento acessório β -caroteno pode captar e re-emitir a energia absorvida de uma forma não radiativa. As vias que servem para drenar o excesso de energia nos sistemas de pigmentos fotossintéticos são eficientes sob condições normais no ambiente. No entanto, em folhas com aplicação de herbicida e em condições de luz dia normal, a energia drenada pelo β -caroteno não é suficiente e o sistema fotossintético acaba sendo sobrecarregado. O excesso de clorofila em estado triplete pode reagir com o oxigênio para formar o O_2^* , altamente reativo. O O_2^* poder induzir perda de pigmentos e peroxidação lipídica (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

Herbicidas podem interferir com a fotossíntese normal através da inibição da síntese de carotenóides e resultam na degradação fotooxidativa e a destruição de membranas fotossintéticas (WAKABAYASHI; BÖGER, 2004). As mais importantes enzimas alvos dos herbicidas que afetam a biossíntese de carotenóides são as desaturases. Dois grupos podem ser diferenciados dentro destes herbicidas: aqueles que acumulam fitoeno, indicando a inibição de fitoeno desaturase como norflurazon, diflufenicam, fluorocloridone, fluridone, etc. e outro grupo menos específico, onde são acumulados fitoeno, fitoflueno e ζ -caroteno em proporções variáveis indicando uma inibição preferencial da ζ -caroteno desaturase, como a metoxifenona (BURNS; BUCHANAN; CARTER, 1971; WAKABAYASHI; BÖGER, 2004).

Os sistemas fotossintéticos desprovidos de carotenóides não são estáveis na presença de ar e luz. Mutantes livres de carotenóides são descoloridos exceto na presença de luz muito fraca (LEDFOORD; NIYOGI, 2005). Aliás, a ausência de carotenóides leva à inibição do desenvolvimento do cloroplasto através de um intrincado sistema de controle que correlaciona expressão de genes do cloroplasto e do núcleo (MAYFIELD; TAYLOR, 1987). Mutantes de bactérias e algas fotossintetizantes livres de carotenóides cresceram em atmosfera sem oxigênio e com luz, sendo que a despigmentação e a morte aconteceram quando foram expostas a um ambiente com oxigênio (SIEFERMANN-HARMS, 1987; DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; LEDFOORD; NIYOGI, 2005).

Outro mecanismo de produção de oxigênio tóxico é fornecido pela drenagem de elétrons induzida por herbicidas do tipo bupiridilos (paraquat). Estes herbicidas reagem com o oxigênio molecular para produzir o ânion superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) (chamada de reação de Melher). O $\bullet\text{O}_2^-$ pode também começar uma cadeia de oxidações e peroxidações que estabelecem a ação herbicida (SUNTRES, 2002). Neste caso a ação fitotóxica do herbicida é devido a uma canalização de elétrons dos fotossistemas até o oxigênio. É possível dizer que estes herbicidas têm um mecanismo mais direto de produzir toxidez comparada com aqueles que enfraquecem o aparelho fotossintético saturando os pigmentos e desbalançando o equilíbrio redox da célula.

A enzima protoporfirinogênio oxidase presente nos cloroplastos e mitocôndrias tem sido escolhida como alvo de ação de herbicidas. Esta enzima é na via biossintética da clorofila e dos tetrapirróis, portanto, as ações inibitórias dos herbicidas do tipo nitrodifenileter levam à excessiva formação de protoporfirina IX e outras estruturas tetrapirrólicas (JUNG; BACK, 2005). Depois da inibição da protoporfirinogênio oxidase o substrato porfirinogênio difunde fora do sítio onde se encontra a enzima que o metaboliza e está sujeita a uma aromatização oxidativa que a converte em protoporfirina IX. Mas, este processo acontece em um local onde a via biossintética dos tetrapirróis é ausente, portanto o acúmulo deste metabólito causa a formação de O_2^* na presença de luz com a conseqüente geração de estresse oxidativo (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993; JUNG; KUK, 2003).

2.1.9 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DO GLIFOSATO

O glifosato [N-(fosfonometil) glicina] é um herbicida de amplo espectro, não seletivo, de aplicação em pós-emergência usado para o controle de plantas daninhas que afeta diretamente a

síntese de compostos secundários (RIZZARDI et al., 2003). Este herbicida bloqueia a rota metabólica do xiquimato, portanto reduz a disponibilidade de aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), e ocasiona formação de ácido cinâmico e seus derivados, inibindo desse modo, a produção de ácidos hidroxifenólicos, flavonóides e compostos fenólicos mais complexos como a lignina (RIZZARDI et al., 2003).

EPSP sintase catalisa a síntese de EPSP a partir de fosfoenolpiruvato (PEP) e xiquimato-3-fostato. O glifosato é um inibidor competitivo com respeito do PEP, mas é um inibidor não competitivo respeito do xiquimato (TAN; EVANS; SINGH, 2006). Por outra parte foi proposto que o glifosato não se liga ao sítio ativo da EPSP sintase, porém a um sítio alostérico resultando na mudança estrutural no sítio ativo que impede a ligação ao PEP (SIKORSKI; GRUYS, 1997; READE; COBB, 2002).

O glifosato é usado para o controle da maioria dos capins anuais e perenes, plantas daninhas de folhas largas e algumas coníferas. A aplicação é por borrifamento aéreo, com caminhão ou com mochila (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2003). Em geral é recomendado a aplicação de 1 a 3 L/ha para capins anuais e 4 a 6 L/ha para perenes (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).

A absorção do herbicida é pela folha e rapidamente é transportado através da planta. Devido a sua atuação na síntese de aminoácidos essenciais, reduz a produção de proteínas na planta, portanto inibe o seu crescimento (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2003). Algumas plantas podem metabolizá-lo, sendo o ácido aminometilfosfônico o produto principal da quebra da molécula de glifosato (PLINE-SRNIC, 2006). O glifosato não é geralmente ativo no solo e também não é absorvido do solo pelas plantas. Permanece no solo durante um tempo variável, dependendo da textura e conteúdo de matéria orgânica. A meia vida do glifosato tem uma faixa de 3 – 130 dias e pode ser degradado pelos microrganismos do solo, sendo também o ácido aminometilfosfônico e também sarcosina os produtos de degradação (AMARANTE JUNIOR et al., 2002; PLINE-SRNIC, 2006). O glifosato tem uma meia vida na água de 35 a 63 dias (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2003).

2.1.10 EFEITOS SECUNDÁRIOS DO HERBICIDA GLIFOSATO

Depois que o alvo primário é afetado por um herbicida uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos ocorrem em sequência. Estes eventos são frequentemente interligados e relacionados entre si por vias metabólicas complexas, tanto que ligar os eventos secundários aos efeitos primários às vezes é bastante difícil (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993). Efeitos primários de importância secundária muitas vezes são confundidos com efeitos secundários. Em uma planta que é morta por um herbicida, à ação no sítio primário de importância secundária provavelmente tenha um papel insignificante. Embora, uma dose subletal de herbicidas em plantas que são resistentes no sítio primário de ação, poderia causar profundas mudanças fisiológicas de importância agrícola em outros sítios de ação herbicida. Herbicidas que não tem efeito direto na síntese de pigmentos fotossintéticos eventualmente alteram o cloroplasto. Embora, estes efeitos sejam separados do sítio inicial de ação, eles resultam nos primeiros sintomas visuais de fitotoxicidade (DEVINE; DUKE; FEDTKE, 1993).

O sítio primário de ação do glifosato é a via do xiquimato, no entanto, o primeiro sintoma observado é clorose especialmente nas folhas mais novas. A relação desta clorose com a inibição da síntese de aminoácidos aromáticos não é direta (COLE, 1985).

Clorofila é altamente sensível ao glifosato e a natureza aclorofílica do crescimento subsequente é uma notável característica das plantas que são expostas à dose subletal do herbicida (WONG, 2000; SHIKHA; SINGH, 2004).

O glifosato inibe fortemente a síntese de clorofila por causa da inibição da síntese do seu precursor o ácido δ -aminolevulínico (AAL) (COLE, 1985). O acúmulo deste precursor foi inibido em milho e cevada (KITCHEN; WITT; RIECK, 1981) e em cevada demonstraram inibição específica da incorporação do ^{14}C a partir de glutamato, α -cetoglutarato e glicina ao AAL in vivo. A subsequente transformação de AAL em clorofila não foi afetada. Em plantas, AAL tem um papel chave na síntese de porfirinas que são incorporadas a importantes proteínas como os citocromos, CAT e POXs. A inibição da síntese de AAL pode ser de considerável importância no modo de ação que pode explicar a diminuição do conteúdo de CAT em folhas de *Cyperus rotundus* tratadas com glifosato (ABU-IRMAILEH; JORDAN, 1978).

A diminuição da clorofila em folhas de *Cyperus rotundus* foi precedida pelo declínio de carotenóides e ocorreu somente sob iluminação. Um efeito sinérgico da luz também foi observado em discos de folhas de tabaco e soja, e a similaridade da resposta destas duas espécies teve um marcado contraste em relação ao acúmulo de clorofila em calos (LEE, 1981). O glifosato

também diminuiu o conteúdo de clorofilas em hipocótilos e folhas de soja em campo (HOAGLAND, 1980).

Embora fosse apresentada evidencia sobre a interferência do glifosato na inibição da síntese de pigmentos, o declínio do conteúdo de clorofila dependente de luz sugere o envolvimento de fotodestruição nestes casos. A interferência da síntese de clorofila é uma propriedade de vários herbicidas e na maioria dos casos, a clorofila sofre fotodestruição devido á inibição da síntese de carotenóides (CORBETT, 1984; FEDTKE, 1982). Estes pigmentos secundários provêm de um mecanismo de drenagem de clorofilas fotoexcitadas. Na ausência de carotenóides são geradas EROs a partir da ativação do oxigênio, pelo ataque clorofílico a componentes do cloroplasto. A descoloração de tecido de milho emergente foi acompanhada pela perda de ribossomos no cloroplasto e a fração I de proteínas (CROFT et al., 1974) o que suporta fortemente o envolvimento de fotodestruição.

Em *Fagopirum esculentum* (fagópiro) a inibição da formação de clorofila foi restaurada pela adição simultânea de fenilalanina e tirosina, no entanto a adição de fenilalanina só foi efetiva para restaurar a síntese de antocianinas (HOLLANDER; AMRHEIN, 1980). Estes ensaios não foram efetivos em plantas de tabaco (LEE, 1981).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas oito variedades de soja em dois ensaios. O primeiro ensaio foi montado em sistema hidropônico, com as variedades CD206 e Msoy7024 ambas duas não transgênicas. No segundo experimento, foram utilizadas quatro variedades de soja: DM 48, DM4800RG, Msoy7501, Msoy7575RR, em um sistema em substrato de areia e vermiculita 2:1.

2.2.2 EXPERIMENTOS

2.2.2.1 ENSAIO EM HIDROPONIA

As plantas foram crescidas em solução nutritiva de Hoagland e o experimento contou com cinco tratamentos com o herbicida glifosato, detalhadas em seguida para as variedades de soja CD206 e Msoy7024: Controle; 0,18 μM ; 0,90 μM ; 4,5 μM e 22,5 μM . Aos 60 dias depois de implantado o experimento foram coletadas folhas e raízes. O ensaio foi disposto de forma inteiramente casualizada com quatro repetições por tratamento.

2.2.2.2 ENSAIO EM SUSTRATO

Sementes das variedades DM48, DM4800 RG, Msoy7501, Msoy7575RR, foram colocadas em vasos com solo estéril e irrigadas com solução nutritiva de Murashige & Tuckey semanalmente. Cinco semanas após emergência foi aplicada uma única dose de Glifosato equivalente à aplicada em campo (4 L/ha). A aplicação foi feita na folha em câmara de aplicação. Foram coletadas folhas e raízes às 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida. Os tratamentos foram dispostos de forma inteiramente casualizada com quatro repetições. O ensaio foi cercado por vasos com plantas de soja de similares características ao ensaio para minimizar o efeito de “bordadura”, devido ao fato de que a luz atinge de forma diferente as plantas colocadas nas laterais e as colocadas no interior.

2.2.3 DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS

A peroxidação de lipídeos foi avaliada através da produção de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malondialdeído segundo Gomes Junior et al. (2006). Amostras (0,25 g) foram maceradas com 1,3 mL de TCA (0,1%) na presença de 20% (p/v) de PVPP. O homogenato resultante foi transferido para tubo eppendorf e centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos. Foi retirada uma alíquota de 0,25 mL do sobrenadante, colocada em tubo eppendorf com adição de 1 mL de TCA (20%) contendo 0,5 % de TBA. A mistura foi deixada em banho seco a 95°C por 30 minutos e resfriada em gelo logo em seguida. Após a mudança de coloração, a mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, com o intuito de separar algum resíduo formado durante o aquecimento e também para clarificar um pouco a coloração. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos em mmol TBARS mg de tecido fresco⁻¹.

2.2.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE CLOROFILA

O conteúdo de clorofila foi determinado utilizando o aparelho SPAD-502 (MINOLTA) na segunda folha após folha bandeira em unidades SPAD, segundo instruções do fabricante.

2.2.5 ANÁLISE DE PROTEÍNAS TOTAIS SOLÚVEIS

2.2.5.1 EXTRAÇÃO PROTÉICA

Folhas e raízes de soja foram maceradas em um mortar com nitrogênio líquido até formar uma farinha. Posteriormente foi adicionado o tampão de extração (fosfato de potássio 100 mM [pH 7,5] contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 4% de PVPP), na proporção de 1 g de tecido para 3 mL de tampão de extração. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante coletado foi dividido em alíquotas e estocado em freezer -80°C até o momento das análises.

2.2.5.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

O método de Bradford (1976) foi utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais em extratos de raízes. O método de Lowry (1951) foi usado para a determinação de proteínas em extratos de folha. Ambos os métodos foram calibrados utilizando uma curva feita com albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.2.5.3 DETERMINAÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES

2.2.5.3.1 ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) EM ESPECTROFOTÔMETRO

A atividade CAT foi determinada como descrito por Ferreira et al. (2002) em uma mistura de reação a 25°C contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 0,0075% de H₂O₂. A reação foi iniciada com a adição de 25 µL de extrato e a atividade foi determinada em espectrofotômetro seguindo-se a decomposição de H₂O₂ por 1 min através das alterações na absorbância a 240 nm. Os resultados foram expressos em $\eta\text{mol min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$ ($\epsilon = 39,4 \text{ mM}^{-1}$).

2.2.5.3.2 ATIVIDADE DE GUAIACOL PEROXIDASE (GOPX) EM ESPECTROFOTÔMETRO

A avaliação da atividade GOPX foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Gomes Junior et al. (2006) com pequenas modificações. O ensaio foi conduzido em uma mistura de reação contendo de tampão fosfato 0,2M – citrato 0,1M (solução de fosfato de sódio dibásico 0.2 M e ácido cítrico 0.1 M) a pH 5,0; 0,01% de guaiacol e 0,06% de H₂O₂ e 5-10 µL de extrato protéico. Esta mistura foi incubada a 30°C por 15 min. Após incubação, a mistura foi colocada em banho de gelo adicionando-se 20 µL da solução de meta bissulfito de sódio a 2% (volume final 1 mL). Após agitação em vortex, a mistura foi deixada em repouso por 10 minutos e a leitura de absorbância foi feita em 450 nm. A atividade enzimática foi expressa em unidades de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg de proteína}^{-1}$.

2.2.5.3.3 ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE (APX) EM ESPECTROFOTÔMETRO

Atividade da APX foi determinada segundo o método de Nakano e Asada (1981), onde 40 μL do extrato enzimático foi acrescentado a uma mistura de reação 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,0), 0,1mM de EDTA, 0,1 mM de H_2O_2 e 0,5 mM de ácido ascórbico. A atividade enzimática foi determinada pelo decrescimento da absorbância a 290 nm devido à diminuição da concentração do ascorbato e expressa em $\text{nmol-}\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

2.2.5.3.4 ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) EM ESPECTROFOTÔMETRO

A atividade GR foi determinada como descrito por Azevedo et al. (1998), com algumas modificações. Em uma mistura de reação consistindo de 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1mM DTNB, 1 mM GSSG e 0,1 mM NADPH, foi adicionado 40 μL de extrato protéico. A atividade da GR foi medida pela redução de GSSG acompanhada pelo monitoramento da absorbância a 412 nm. Os valores de atividade foram expressos em $\eta\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

2.2.5.3.5 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) EM ESPECTROFOTÔMETRO

A atividade GST foi determinada como descrito por Anderson; Prasad e Stewart (1995) com algumas modificações. O ensaio foi conduzido a 30°C em uma mistura de reação de conteúdo 850 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,5) e 1 mM de CDNB (40 mM) e 5 mM de GSH. O ensaio foi iniciado pela adição de 75 μL de amostra. O monitoramento da absorbância foi feito por 2 min a 340 nm. A atividade foi expressa em $\eta\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

2.2.6 PERFÍS PROTÉICOS E ISOENZIMÁTICOS

2.2.6.1 ELETROFORESE EM GÉIS DE POLIACRILAMIDA EM SISTEMA DESNATURANTE E NÃO DESNATURANTE

As análises de eletroforese foram feitas em sistemas de tampão descontínuo baseados no método de Laemmli (1970) utilizando-se o sistema mini-gel vertical (8,3 x 10,2 cm). O sistema para gel desnaturante (SDS-PAGE) foi constituído por um gel de corrida de 10 %T (Tris 0,75 M pH 8,9 e SDS 0,1%) e outro de empacotamento de 5 %T (Tris 0,125 M pH 6,7 e SDS 0,1%) preparados a partir de acrilamida:bis 30 % (30:0,8). Como catalisador da reação de polimerização foi usado 25 µL de TEMED (Invitrogen) e 50 µM de persulfato de amônio (10%). O tampão de corrida foi constituído por Tris 25 mM, glicina 192 mM e 1% de SDS. Os géis não-desnaturantes foram feitos da mesma maneira dos géis desnaturantes com os correspondentes ajustes de acrilamida para atingir o %T para cada tipo de isoenzima analisada, mas sem adição de SDS. Do mesmo jeito, tampão de corrida também foi preparado sem SDS.

2.2.6.2 PERFIL DE PROTÉICO

Amostras obtidas a partir da mistura de extratos pertencentes às repetições de cada tratamento (amostra composta) foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Extratos dos diferentes tratamentos foram desnaturados pelo aquecimento na presença do SDS e β-mercaptoetanol, com a finalidade de quebrar as ligações dissulfeto. Para isso foi adicionado às frações protéicas na proporção 1:1 tampão de amostra 0,06 M Tris-HCl (pH 6,7), 8% glicerol, 2% de SDS, 5% de β-mercapetanol e 0,0025% de azul de bromofenol. A quantidade de proteína do extrato submetida à eletroforese foi de 15 µg. A misturas de amostra:tampão foram fervidas por 5 minutos, resfriadas e colocadas no gel junto com padrão de peso molecular Protein Ladder da Invitrogen.

A eletroforese foi conduzida à corrente constante de 15 mA por placa, durante aproximadamente três horas (até a saída do frente de solvente) em PAGE desnaturante 10% T.

Após a corrida o gel foi lavado com água deionizada, mergulhado em solução corante e agitado *overnight*. A solução corante foi 0,05% de coomassie blue R-250 em solvente metanol:ácido acético: água 40:7:53. A descoloração do gel foi feito com a mesma solução corante sem coomassie blue com sucessivas lavadas até o aparecimento das bandas.

2.2.6.3 PERFIL DE ISOENZIMAS DE CATALASE (CAT)

Amostras obtidas a partir da mistura de estratos pertencentes às repetições de cada tratamento foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante para determinar o perfil isoenzimático da CAT. O volume de extrato foi calculado considerando uma quantidade de 60 µg de proteína que seria submetida à eletroforese. Foi adicionado tampão de amostra (0,3M Tris, 28% glicerol 0,036% azul de bromofenol) ao extrato na proporção 4:1.

A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 20 mA por placa num gel 8 %T. Para cada gel foi aplicado um padrão de CAT de fígado bovino (2 unidades).

A revelação para atividade de CAT foi realizada após lavagem do gel em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em H₂O₂ 0,003%, a temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl₃ 1% (P/V) e K₂Fe(CN)₆ 1% (P/V) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água deionizada. A fixação foi realizada com solução de ácido acético (7%).

2.2.6.4 PERFIL DE ISOENZIMAS DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

Foi realizada a eletroforese em PAGE (9 %T). Como padrão foram utilizadas 2 unidades de SOD de fígado bovino e a concentração de proteínas das amostras foi de 60 µg. A corrida eletroforética foi feita a corrente constante de 30 mA por placa.

O revelado da SOD foi feito como descrito por Ferreira et al. (2002). Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,8), 1 mM EDTA, 0,05 mM de riboflavina, 0,1 mM de NBT e 0,3% TEMED. Ao final de 30 minutos, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas negativas sob fundo roxo. A fixação foi realizada com solução de ácido acético (7%).

2.2.6.5 PERFIL DE ISOENZIMAS DA GLUTATIONA REDUTASE (GR)

A revelação para atividade de GR foi determinada como descrito por Gomes Junior et al. (2006). Foi feita a eletroforese em PAGE não desnaturante (9%). Foi utilizado como padrão 0,25 unidades de GR Bovino. A eletroforese foi desenvolvida a corrente constante de 20 mA por

placa, os géis foram lavados com água destilada e incubados a temperatura ambiente, em uma solução de 0,25 M de TRIS em pH 7,5; 0,5 mM de MTT; 0,7 mM de DPIP; 3,4 mM GSSG e 0,5 mM NADPH. Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida mergulhando-se o gel em uma solução de ácido acético (7%).

2.2.7 DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

2.2.7.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS TOTAIS

O procedimento para extração e quantificação de aminoácidos é baseado na técnica descrita por Bielecki e Turner (1966), com algumas modificações.

Foram utilizados 100 mg de material vegetal macerado em 2 mL da solução de extração MCW (metanol:clorofórmio:água 12:5:3). A mistura foi centrifugada a 2500 rpm por 20 min a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi misturado a 0,5 mL de clorofórmio e 0,75 mL de água Milli-Q. A fase hidrossolúvel foi coletada e aliquoteada em tubos eppendorff para posterior quantificação de aminoácidos.

Para quantificação foi acrescentado nesta solução de aminoácidos 500 µL de tampão de citrato 0,2 M, 200 µL de ninidrina 5% e 1 mL de solução de KCN 0,2 mM em metil glicol. A mistura foi aquecida a 100°C por 20 minutos e em seguida resfriada em água corrente por 10 min. Posteriormente foi adicionado 1 mL de etanol 60 % na solução. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 570 nm (leitura entre valores de absorbância entre 0.400 e 0.800). A concentração de aminoácidos foi determinada segundo a curva padrão de Leucina em unidades de nmol g massa fresca⁻¹.

2.2.7.2 QUANTIFICAÇÃO DE AMINOÁCIDOS SOLÚVEIS EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO (HPLC)

Os aminoácidos solúveis foram separados e analisados por HPLC de fase reversa. Foi utilizada uma coluna Spherisorb ODS-2 C18 e a corrida foi em um gradiente linear formado pelas soluções de metanol 65% e tampão fosfato pH 7,5 (50 mM de acetato de sódio, 50 mM de fosfato disódico, 1,5 mL de ácido acético, 20 mL de tetraidrofurano, 20 mL de metanol) em um fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente incrementou a proporção de metanol de 20% a 28% entre 0 e 5 min, de

28% a 58% entre 5 e 35 min, de 58% a 75% entre 35 e 45 min, 75% a 95% entre 40 a 56 min, 95% a 96% entre 56 a 60 min e 96% a 100% entre 60 e 61 min. O fluído da coluna foi monitorado por um detector de fluorescência Shimadzu (modelo RF350) operando com um comprimento de onda de excitação de 250 nm e um comprimento de onda de emissão de 388 nm. 10 µL da solução de aminoácidos forma derivatizados com 30 µL do reagente OPA. Após 2 minutos foram injetados 10 µL no aparelho de HPLC. Os dados foram expressos em nmol gr peso fresco⁻¹ e % mol do total de aminoácidos.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 ENSAIO EM HIDROPONIA

Serão apresentados seguidamente os resultados das análises feitas em folha e raiz de soja do experimento I descrito no item 6.2.1 de material e métodos. As concentrações de glifosato e o desenho do experimento foram realizados seguindo as recomendações de Cole (1985). Foram feitas três análises estatísticas para analisar os parâmetros medidos: 1- análise de variância; 2- teste de Scheffé (comparação de médias); 3- análise de regressão. Foi utilizado o software estatístico SAS para fazer as análises dos dados. Em amostras de raiz foram feitas análises de peroxidação lipídica (TBARS), atividade APX, GR, CAT e GST. Em folha foram feitas análises de atividade GOPX, GR e eletroforese de SOD. Também foram quantificados os pesos secos e frescos de raiz e folha.

Segundo o análise de variância houve maior quantidade de parâmetros com diferença significativa na variedade CD206 do que na Msoy7024. De forma geral, isto significa que a variedade MSoy7024 tende a manter o seu metabolismo mais estabilizado na presença de glifosato.

Os resultados indicam que o glifosato afetou o crescimento da planta refletido nos pesos secos da parte aérea e raiz. Na figura 1 é possível observar que nas concentrações mais baixas não existem variações neste parâmetro e praticamente o glifosato não estaria afetando o desenvolvimento da parte aérea. Na concentração de 4,5 mM o peso seco da parte aérea aumenta para ambas as variedades embora que não seja de maneira significativa. No entanto, dada a tendência, é possível que exista um umbral na faixa entre 4,5 mM e 22,5 mM onde o parâmetro atinja um máximo indicando que existe um efeito indutor de crescimento para determinadas concentrações de glifosato em solução nutritiva. Pode ser determinado o limite de 22,5 mM para o umbral devido a grande toxidez que produziu nesta concentração.

O peso seco de raiz da variedade CD206 teve um comportamento similar ao de folhas, mas o aumento aconteceu em concentrações de glifosato mais baixas (0,18 mM – Figura 2). Depois, o efeito do glifosato leva a diminuição do peso segundo aumenta a dose de glifosato. Entanto na variedade Msoy7024 o declínio do peso seco começou desde o início não se observando aumento nenhum.

Figura 1 - Produção de massa seca da parte aérea (em gramas) das variedades de soja CD206 (-□-) e Msoy7024 (-■-) tratadas com diferentes concentrações de glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 2 - Produção de massa seca de Raiz (em gramas) das variedades de soja CD206 (-□-) e Msoy7024 (-■-) tratadas com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Embora não sejam diferenças significativas, os pesos secos de raiz e folha estão indicando que o comportamento foi diferente a baixas concentrações e que nas concentrações mais altas houve um declínio produzindo fitotoxidez por excesso de herbicida. Isto é confirmado por quase todos os parâmetros que foram medidos, incluindo alguns dos parâmetros bioquímicos que serão descritos a continuação.

A peroxidação lipídica medida a través da determinação de espécies reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS) em raiz mostrou diferenças significativas segundo a análise de variância. É possível observar na figura 3 que a variedade Msoy7024 parece sofrer menos lipoperoxidação o qual é confirmado através da comparação da media total de ambas as variedades com o teste de Scheffé, embora que o análise da meia de cada ponto ensaiado não foi estatisticamente diferente.

Figura 3 - Peroxidação lipídica (nmol TBARS g massa seca⁻¹) da raiz tratadas com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva das variedades de soja CD206 (□) e Msoy7024 (■). As Letras indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Além disso, é possível ver na figura 4 que a atividade GOPX de Msoy7024 é significativamente maior do que a variedade CD206 em quase todas as concentrações. Mais ainda, é possível ver que existe uma diminuição inicial na atividade GOPX na variedade CD206 mais forte do que na Msoy7024. Possivelmente esta predisposição explicaria porque a Msoy7024 tem menor geração de TBARS fazendo-a menos susceptível em presença de glifosato.

Figura 4 - Atividade enzimática de GOPX expressa em variação de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ de folha das variedades de soja CD206 (-□-) e Ms0y7024 (-■-) tratadas com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

A atividade CAT não apresentou maiores variações tendo uma tendência quase constante a diminuir perante as concentrações crescentes de glifosato. Somente é observado um efeito indutor significativo na concentração de 0,18 mM de glifosato em Ms0y7024 na qual a atividade aumenta significativamente (Figura 5). Isto não demonstra que a variedade MSoy7024 adquire maior resistência frente ao herbicida, mas consegue acumular um dado a mais sobre a sua melhor predisposição frente ao agente de estresse.

Outra evidência sobre este fato é representado pela atividade da APX (Figura 6) que não tem variação significativa com as concentrações de glifosato, mas é importante o fato que a testemunha da variedade Ms0y7024 apresenta alta atividade APX em comparação com CD206. Isto da conta de que APX está presente de maneira constitutiva em Ms0y7024 enquanto que CD206 a enzima é induzida e implicaria em gasto energético adicional na presença do herbicida.

A atividade GR na raiz praticamente acompanha a evolução da APX em ambas as variedades (Figura 7). A coordenação destas enzimas responde ao funcionamento da via do ascorbato-glutationa, exceto no tratamento controle da variedade CD206 que induz a atividade APX. No entanto é possível observar que existe mais uma evidência acerca do comportamento

diferenciado que se dá nas baixas concentrações de glifosato. A atividade GR tem um declínio importante na concentração 0,18 mM que é significativo estatisticamente na variedade CD206.

Figura 5 - Atividade enzimática da CAT expressa em $\text{nmol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ da raiz com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva das variedades de soja CD206 (-□-) e Msoy7024 (-■-). As Letras indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 6 - Atividade enzimática da APX expressa em $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ da raiz das variedades de soja CD206 (-□-) e MSoy7024 (-■-) com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

A atividade GR na raiz praticamente acompanha a evolução da APX em ambas as variedades (Figura 7). A coordenação destas enzimas responde ao funcionamento da via do ascorbato-glutationa, exceto no tratamento controle da variedade CD206 que induz a atividade APX. No entanto é possível observar que existe mais uma evidência acerca do comportamento diferenciado que se dá nas baixas concentrações de glifosato. A atividade GR tem um declínio importante na concentração 0,18 mM que é significativo estatisticamente na variedade CD206.

Nenhuma das variedades parece responder ao herbicida através do mecanismo detoxificante que confere a GST, já que não foram observadas alterações importantes na atividade desta enzima (figura 8). O glifosato não está sujeito à conjugação, pelo menos no tempo que foi feita a colheita das amostras. Portanto também não seria importante em mecanismos de defesa antioxidante.

Estes resultados permitem visar que variedades de uma mesma espécie têm comportamentos significativamente diferentes frente à aplicação do herbicida. Mas doses baixas refletem comportamentos diferenciados entre variedades que dariam um efeito do tipo-hormonal induzindo ou inibindo de maneira específica elementos participantes na resposta de defesa.

Figura 7 - Atividade enzimática da GR expressa em $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ da raiz das variedades de soja CD206 (-□-) e Msoy7024 (-■-) com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Também, a soma de evidências bioquímicas permite ver uma melhor disposição da variedade Msoy7024, só que não é refletido em vantagens na produção de matéria seca, tanto de folha como de raiz. Na figura 9 é possível observar esta afirmação que tem confirmação estatística quando comparada a media total de ambas as variedades (gráfica 7).

Figura 8 - Atividade enzimática da GST expressa em nmol CDNB conjugado min⁻¹ mg proteína⁻¹ da raiz das variedades de soja CD206 (-□-) e Msoy7024 (-■-) com diferentes concentrações de glifosato em solução nutritiva. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 9 - Produção total de Massa seca da Parte Aérea (PSP) e da Raiz (PSR) das variedades de soja CD206 e Msoy7024 no ensaio. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

2.3.2 ENSAIO EM SUBSTRATO

Foram realizadas análise de teor de clorofila de folha e peroxidação lipídica, atividade CAT, APX, GOPX para folha e raiz de cada um das variedades utilizadas. GST e GR foram analisadas somente para folha. Para cada determinação foi feito o análise de variância, teste de meias de Scheffé, e regressão linear com o software estatístico SAS. Também foram feitas análise de aminoácidos livres para raiz e folha onde foi utilizado o mesmo esquema de análise estatístico.

O teor de clorofila diminuiu significativamente na variedade DM48 às 72 horas após aplicação de glifosato em comparação ao seu par DM4800RG. Na figura 10 pode se observar que o conteúdo de clorofila do par MSoy7501-MSoy7575RR é menor do que o par DM48-DM4800Rg tendo a MSoy7501 um conteúdo menor estatisticamente significativo respeito das outras variedades. Nas variedades transgênicas DM4800RG e MSoy7575RR o teor de clorofila não foi modificado com a aplicação do glifosato, mas esta característica não necessariamente está associada à transgenicidade já que na variedade convencional MSoy7501 não houve alterações no teor de clorofilas. No entanto deveria se considerar que baixos teores constitutivos de clorofilas não seriam afetados pela aplicação de glifosato.

Os perfis protéicos de SOD, CAT, GR, e proteína total foram feito para raiz e folha e analisados visualmente.

Figura 10 - Conteúdo de clorofila expressa em unidades SPAD de folhas de soja dos pares de variedades DM48 DM4800RG e MSoy7501 MSoy7575RR em 0 (controle) e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato

Figura 11 - Peroxidação lipídica expressa em nmol de TBARS g massa fresca⁻¹ de folhas de soja dos pares de variedades DM48 (-○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR(-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. . As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFE

A determinação dos níveis de peroxidação lipídica mostrou que na folha houve um aumento às 24 horas causado pela aplicação do herbicida, e que volta a os níveis normais em 72 horas (Figura 11). Embora este fato não fosse confirmado estatisticamente, existe uma tendência para se dar esse aumento inicial e, aliás, parece afetar mais às variedades resistentes do que nas convencionais.

Nas raízes o efeito foi quase oposto (Figura 12), se não for que as variedades transgênicas praticamente não sofreram variações ao longo do tempo, mas as variedades convencionais aumentam os níveis de TBARS em 24 h voltando aos níveis normais em 72 h. Este fato não confirma que o glifosato produz algum efeito de estresse oxidativo que possa ser significativo e que seja parte do mecanismo de toxidez do glifosato. Mas análise enzimático e de aminoácidos livres que serão descritos a continuação podem dar conta do porque não é possível gerar um efeito considerável de estresse oxidativo.

Na folha é possível observar alguns comportamentos interessantes da atividade GOPX (Figura 13). O primeiro par utilizado (DM84-DM4800RG) mostra que a variedade convencional induz o aumento da GOPX entanto que a quantidade constitutiva de GOPX na variedade transgênica é alta e não necessita de ser induzida. Por outro lado, o par Msoy7501-Msoy7575RR a atividade GOPX é induzida em ambas as variedades.

Figura 12 - Peroxidação lipídica expressa em nmol de TBARS g massa fresca⁻¹ de folhas de soja dos pares de variedades DM48 (○-), DM4800RG (●-) e Ms7501 (△-), Ms7575RR (▲-) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. . As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 13 - Atividade enzimática de GPX expressa em variação de absorbância min⁻¹ mg proteína⁻¹ de folha de soja dos pares de variedades DM48 (○-), DM4800RG (●-) e Ms7501 (△-), Ms7575RR (▲-) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. . As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Por outro lado, a análise de regressão linear indicou em ambas as variedades transgênicas (DM48RG e Ms7575RR) que não existiu uma taxa de variação significativa de atividade nos tempos ensaiados entanto que as variedades DM48 e Ms7501 apresentaram um aumento linear

significativo (Tabela 1). Diante esta análise estatística, a atividade GOPX poderia ser utilizado como marcador bioquímico para distinguir entre variedades convencionais e transgênicas.

A atividade GOPX na raiz não mostrou variação significativa em nenhuma das variedades (Figura 14).

A atividade CAT nas primeiras 24 horas após aplicação do glifosato não tem um comportamento definido que possa caracterizar a alguma variedade, tanto na folha como na raiz. Por outra parte, na folha se observa uma tendência no par DM48-DM4800RG a diminuir a atividade CAT entre 24 e 72 h (Figura 15). Esta tendência é confirmada estatisticamente comparando as medias de 24 e 72 h no par Msoy7501-Msoy7575RR (Tabela 1).

Contrariamente, a atividade CAT entre 24 e 72 h na raiz tem um comportamento mais definido, no qual as variedades convencionais DM48 e Msoy7501 produzem um aumento de 3 vezes na atividade enquanto que as variedades transgênicas se mantêm no mesmo patamar. A variedade Msoy7575RR nas primeiras 24 h induz atividade, mas volta a níveis iniciais as 72 h (Figura 16).

Figura 14 - Atividade enzimática de GOPX expressa em variação de absorbância $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ de Raiz de soja dos pares de variedades DM48 (-○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR(-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. . As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 15 - Atividade enzimática de CAT expressa em nmol de H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹ de folha de soja das variedades DM48 (○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR(-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 16 - Atividade enzimática de CAT expressa em nmol de H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹ de raiz de soja das variedades DM48 (○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR(-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferencia estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 17 - Atividade enzimática de APX expressa em $\text{nmol de ascorbato min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ de folha de soja das variedades DM48 (○), DM4800RG (●) e MS7501 (△), MS7575RR (▲) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Tabela 1. Análise de regressão linear descrevendo o comportamento linear de todos os parâmetros medidos para as variedades DM48, DM4800RG, Msoy7501 e Msoy7575RR. O valor $P < 0,05$ indica variação significativa do parâmetro através do tempo; a equação descreve o comportamento linear do parâmetro através do tempo; e o R^2 indica o erro associado ao parâmetro através do tempo

	DM48			DM4800RG			Msoy7501			Msoy7575RR		
	P	Equação: $y = b + a \cdot x$	R ²	P	Equação: $y = b + a \cdot x$	R ²	P	Equação: $y = b + a \cdot x$	R ²	P	Equação: $y = b + a \cdot x$	R ²
Peroxidação Lipídica Folha (PLF)	0.4411	$PLF = 22,832 - 0,0284 \cdot \text{TEMPO}$	0.1018	0.1321	$PLF = 21,764 + 0,0958 \cdot \text{TEMPO}$	0.4712	0.9802	$PLF = 28,644 - 0,0016 \cdot \text{TEMP}$	0.0001	0.1487	$PLF = 25,049 + 0,0784 \cdot \text{TEMP}$	0.4435
Peroxidação Lipídica Raiz (LPR)	0.3532	$PLR = 5,3631 + 0,0012 \cdot \text{TEMPO}$	0.1443	0.7937	$PLR = 5,1195 - 0,0023 \cdot \text{TEMPO}$	0.0192	0.3382	$PLR = 7,1296 - 0,0287 \cdot \text{TEMP}$	0.1831	0.8009	$PLR = 5,6673 - 0,0029 \cdot \text{TEMP}$	0.0178
Catalase Folha (CATF)	0.1090	$CATF = 62,937 - 0,383 \cdot \text{TEMPO}$	0.3710	0.2366	$CATF = 0,8679 - 0,3042 \cdot \text{TEMPO}$	0.3260	0.0457	$CATF = 74,1175 - 0,4033 \cdot \text{TEMP}$	0.5833	0.6699	$CATF = 63,366 - 0,0613 \cdot \text{TEMP}$	0.0501
Catalase Raiz (CATR)	0.0002	$CATR = 79,212 + 2,3681 \cdot \text{TEMPO}$	0.9109	0.2862	$CATR = 84,586 + 0,3707 \cdot \text{TEMPO}$	0.2743	0.0108	$CATR = 137,4 + 2,2094 \cdot \text{TEMP}$	0.7579	0.6596	$CATR = 163,95 + 0,3769 \cdot \text{TEMP}$	0.0534
Ascorbato Peroxidase Folha (APXF)	0.5296	$APXF = 201,15 + 0,338 \cdot \text{TEMPO}$	0.0690	0.9109	$APXF = 263,35 - 0,0885 \cdot \text{TEMPO}$	0.0035	0.9728	$APXF = 291,42 - 0,0252 \cdot \text{TEMP}$	0.0003	0.8783	$APXF = 2967,7 - 0,1318 \cdot \text{TEMP}$	0.0066
Ascorbato Peroxidase Raiz (APXR)	0.5336	$APXR = 2,4924 + 0,0081 \cdot \text{TEMPO}$	0.0677	0.9462	$APXR = 2,9351 - 0,0007 \cdot \text{TEMPO}$	0.0013	0.6197	$APXR = 1,6412 + 0,006 \cdot \text{TEMP}$	0.0529	0.0004	$APXR = 1,4629 + 0,0291 \cdot \text{TEMP}$	0.9682
Guaiacol Peroxidase Folha (GOPXF)	0.0451	$GOPXF = 0,5686 + 0,0058 \cdot \text{TEMPO}$	0.5147	0.7294	$GOPXF = 1,4621 - 0,0022 \cdot \text{TEMPO}$	0.0333	0.0008	$GOPXF = 0,5399 + 0,0108 \cdot \text{TEMP}$	0.9114	0.4623	$GOPXF = 0,6636 + 0,0019 \cdot \text{TEMP}$	0.1415
Guaiacol Peroxidase Raiz (GOPXr)	0.9119	$GOPXR = 0,0273 - 1,15E-7 \cdot \text{TEMPO}$	0.0022	0.5509	$GOPXR = 0,0265 + 0,0001 \cdot \text{TEMPO}$	0.0956	0.9403	$GOPXR = 0,0215 + 6,94E-6 \cdot \text{TEMP}$	0.0012	0.7337	$GOPXR = 0,0198 + 3,35E-5 \cdot \text{TEMP}$	0.0322
Aminoácidos Totais Folha (AAF)	<.0001	$AAF = 3,3545 + 0,155 \cdot \text{TEMPO}$	0.9618	0.7715	$AAF = 6,6457 + 0,0061 \cdot \text{TEMPO}$	0.0236	0.0052	$AAF = 5,7732 + 0,0901 \cdot \text{TEMP}$	0.8173	0.0078	$AAF = 5,9234 + 0,051 \cdot \text{TEMP}$	0.8593
Aminoácidos Totais Raiz (AAR)	0.0041	$AAR = 0,6811 + 0,0136 \cdot \text{TEMPO}$	0.7707	0.1731	$AAR = 0,7866 + 0,0072 \cdot \text{TEMPO}$	0.4067	0.0007	$AAR = 0,3775 + 0,0126 \cdot \text{TEMP}$	0.9166	0.0662	$AAR = 0,666 + 0,0091 \cdot \text{TEMP}$	0.6114
Glutathione-S-Transferase Folha (GSTF)	0.4015	$GSTF = 8,0973 + 0,0513 \cdot \text{TEMPO}$	0.1196	0.6352	$GSTF = 9,1093 + 0,0314 \cdot \text{TEMPO}$	0.0617	0.0016	$GSTF = 3,4851 + 0,1387 \cdot \text{TEMP}$	0.8847	0.5233	$GSTF = 6,6442 + 0,0253 \cdot \text{TEMP}$	0.1087
Glutathione Redutase Folha (GRF)	0.3558	$GRF = 15,335 + 0,1616 \cdot \text{TEMPO}$	0.1429	0.0179	$GRF = 7,8916 + 0,0988 \cdot \text{TEMPO}$	0.7895	0.0275	$GRF = 12,447 + 0,2878 \cdot \text{TEMP}$	0.6546	0.0579	$GRF = 13,648 + 0,1533 \cdot \text{TEMP}$	0.6345

A atividade APX de folha não parece aportar à defesa antioxidante na folha. Não foram encontradas diferenças na atividade enzimática em nenhuma das variedades nos tempos que foram ensaiados e, portanto não poderia se considerar que APX cumpra funções importantes frente este caso de estresse (Figura 17).

Por outra parte APX de raiz tem um comportamento diferente. Este comportamento não parece responder a um padrão de comportamento relacionado com a transgenicidade das variedades (Figura 18). É possível observar que a variedade Msoy7575RR responde à aplicação de glifosato com um aumento na atividade APX de quase três vezes entre 0 e 72 h (gráfico 11-b). Entretanto que o seu par convencional praticamente não tem variações durante esse tempo. DM4800RG tem uma atividade constitutiva de APX maior do que DM48 e tem uma tendência a diminuir embora esta não seja significativa. Por outra parte a DM48 induz atividade até as 24 h continuando no mesmo patamar em 72 h seguindo o mesmo comportamento do par Msoy7501-Msoy7575RR. Portanto, estes resultados indicam que não existe uma relação direta entre este parâmetro bioquímico e a resistência a glifosato de soja.

Figura 18 - Atividade enzimática de APX expressa em μmol de ascorbato min^{-1} mg proteína⁻¹ de Raiz de soja das variedades DM48 (○-), DM4800RG (●-) e Msoy7501 (△-), Msoy7575RR (▲-) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Resultados semelhantes ao de APX foram encontrados para GR (Figura 19) e GST (figura 20) em folha. Não foi determinado nenhum padrão de comportamento que mostre diferenças importantes entre variedades convencionais e transgênicas. GR parece responder ao estresse aplicado, mantendo um aumento na atividade significativo durante o tempo de ensaio (Figura 19)

em todas as variedades. Só a variedade DM48 tem uma forte indução inicial da GR que diminuiu em 72 h. Aparentemente, após aplicação do glifosato, começam a ser induzidos os mecanismos de recomposição da glutathiona. O aumento da atividade GST indica que às 24 h todas as variedades tem uma disposição potencial para conjugar o herbicida (Figura 20). Portanto é possível considerar que o aumento de GR pode estar indo a cobrir o consumo de glutathiona que é originado a partir da aplicação do estresse.

Figura 19 - Atividade enzimática de GR expressa em nmol de H₂O₂ min⁻¹ mg proteína⁻¹ de folha de soja das variedades DM48 (-○-), DM4800RG (-●-) e Ms7501 (-△-), Ms7575RR (-▲-) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Figura 20 - Atividade enzimática da GR expressa em $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ de folha de soja das variedades DM48 (○-), DM4800RG (●-) e Msoy7501 (△-), Msoy7575RR (▲-) em 0, 24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Das determinações que foram feitas para este trabalho, quem mais consegue chegar a diferenciar entre as variedades transgênicas das convencionais é a determinação de aminoácidos livres em raiz e folha. A variação dos teores de aminoácidos livres em folha pode ser descrita a traves de análises de regressão linear (Tabela 1), onde os teores de aminoácidos aumentam de maneira significativa ao longo do tempo em variedades convencionais, entanto que variedades transgênicas a taxa de variação deste parâmetro é muito menor. No par DM48-DM4800RG é possível observar que esta diferença é tal que não existe uma variação estatisticamente significativa em folhas da variedade transgênica entanto que a convencional o aumento chega a quintuplicar os teores iniciais depois de 72 h (Figura 21). A taxa de variação (o valor “a” da equação de regressão linear na tabela 3) indica que o par Msoy7501-Msoy7575RR segue o mesmo padrão de comportamento (figura 21). A diferença entre ambas as variedades é dada pela taxa de variação onde a variedade transgênica o teor de aminoácidos livres aumenta menos em comparação á convencional.

Figura 21 - Aminoácidos solúveis expressos em nmol de leucina g massa fresca⁻¹ de folha de soja das variedades DM48 (-○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR(-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

Na raiz também os aminoácidos livres aumentam a uma taxa maior nas variedades convencionais do que nas transgênicas, mas a taxa é consideravelmente menor do que na folha (tabela 1). A observação da figura 22 parece indicar que as variedades transgênicas em algum momento começam a ter a mesma taxa de variação de aminoácidos totais do que as convencionais.

Figura 22 - Aminoácidos solúveis expressos em nmol de leucina g massa fresca⁻¹ de raiz de soja das variedades DM48 (-○-), DM4800RG (-●-) e Msoy7501 (-△-), Msoy7575RR (-▲-) em 0,24 e 72 horas após aplicação do herbicida glifosato. As letras diferentes indicam diferença estatística significativa segundo o teste de SCHEFFÉ

2.3.3 PERFÍS DE PROTEÍNAS E ISOENZIMÁTICA

Os perfis protéicos indicam em geral que existe pouca variação da expressão de proteínas nos primeiros dias após aplicação de glifosato. SOD, CAT e GR não apresentaram mudanças no perfil de expressão de isoenzimas nos tempos ensaiados.

No par DM48-DM4800RG somente detectou-se uma banda na variedade DM4800RG que é sobreexpressa quando comparada com a DM48 (Figura 23). Esta banda (marcada com uma seta) está situada entre os marcadores de 40 e 50 kDa e embora se trate somente de uma banda, é possível inferir que a proteína (ou proteínas presente(s)) nessa banda tem características constitutivas que estariam relacionadas á transgenicidade de DM4800RG.

Na raiz não foram observadas diferenças no perfil tanto a través dos tempos deste ensaio como entre variedades.

Os perfis isoenzimáticos de folha (Figura 24) e raiz (figura 25) não indicam a síntese de novas isoenzimas de SOD produzidas pela aplicação de glifosato.

Figura 23 - Perfil de proteína solúvel total de folha. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um numero que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra "A" e a DM4800 RG com a letra "B". A seta indica uma banda diferencialmente expressa entre variedades

Figura 24 - Perfil de isoenzimas SOD de folha. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um numero que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra "A" e a DM4800 RG com a letra "B"

Figura 25 - Perfil de isoenzimas SOD de Raiz. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um numero que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra “A” e a DM4800 RG com a letra “B”

Em raiz foram detectadas 10 isoenzimas e foi possível determinar através dos rf que 7 isoenzimas SOD de raiz são as mesmas que estão presentes na folha (Figura 26).

Também não foram encontradas diferenças nos perfis isoenzimáticos de CAT tanto em folha como em raiz. Em ambos tecidos foi identificada uma única banda (Figuras 27 e 28). No entanto, as intensidades das bandas vêm a confirmar os resultados obtidos em espectrofotômetro. Em folha é observada uma diminuição da intensidade da banda em 72 horas nas duas variedades utilizadas (Figura 25).

Figura 26 - Comparação do perfil de isoenzimas SOD entre raiz e folha da variedade DM48

Figura 27 - Perfil de isoenzimas CAT de folha. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um numero que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra "A" e a DM4800 RG com a letra "B"

Na raiz, se observa que a intensidade da banda aumenta conforme ao passo do tempo após exposição ao glifosato na variedade convencional. Essa diferença através do tempo é menos evidente na variedade transgênica (Figura 28).

Figura 28. Perfil de isoenzimas CAT de raiz. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um número que indica as horas após aplicação do glifosato. A variedade DM48 está indicada com a letra “A” e a DM4800 RG com a letra “B”

Os perfis de isoenzimas GR para folha e raiz também não tiveram diferenças na quantidade de bandas, nem pelas características da variedade, nem pelo tempo analisado (figura 29 e 30).

Figura 29 - Perfil de isoenzimas GR de folha. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um número que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra “A” e a DM4800 RG com a letra “B”

Embora não tenham se encontrado diferenças nos tempos e nas variedades, o perfil isoenzimático de raiz e folha é bastante diferente. Na folha foram identificadas 8 isoenzimas de GR enquanto que em raiz foram detectadas duas.

Figura 30 - Perfil de isoenzimas GR de Raiz. Cada perfil está descrito com uma letra indicando a variedade e um numero que indica as horas após aplicação do glifosato, A variedade DM48 está indicada com a letra “A” e a DM4800 RG com a letra “B”

2.3.4 PERFIS DE AMINOÁCIDOS

Na visão geral se observa que a aplicação de glifosato produz um grande desbalanço no conteúdo de aminoácidos em folha das variedades convencionais três dias após aplicação de glifosato. Dos 17 aminoácidos que puderam ser identificados em HPLC (Tabelas 2 e 3), se observou que a grande maioria deles aumentou nas variedades não-transgênicas (DM48 e Msoy7501) enquanto que as variedades transgênicas (DM4800RG e Msoy7575RR) foram poucos os aminoácidos que foram alterados. Este comportamento da maioria dos aminoácidos de folha e raiz parece ter correlação com o teor de aminoácidos totais (Figuras 21 e 22) e sua variação ao longo do tempo nas variedades convencionais e transgênicas.

Nas folhas, 6 aminoácidos dos dois pares tiveram comportamentos que merecem especial atenção: Aspartato, Glutamato, Glutamina, Asparagina, Histidina e Isoleucina. A aplicação de glifosato nas duas variedades não-transgênicas produz o aumento do conteúdo de glutamato e histidina, enquanto que o conteúdo destes aminoácidos não variou significativamente nas variedades transgênicas. Asparagina e Isoleucina aumentaram em todas as variedades, mas a taxa de variação foi menor nas variedades transgênicas. Aliás, o conteúdo de asparagina nos controles das variedades transgênicas é maior do que nas variedades não transgênicas.

Embora não tenha sido significativo, houve uma tendência em quase todas as variedades à diminuição da glutamina na folha. A diminuição da percentagem deste aminoácido na folha confirma esta tendência e, aliás, indicam que a diminuição de glutamina é menor nas variedades transgênicas. Aparentemente o glifosato estimula a desaminação da glutamina o que explicaria parcialmente o aumento dos teores de glutamato em variedades não transgênicas. Glutamato é um metabólito ligado à síntese de prolina característico da resposta ao estresse, e arginina que atua no ciclo da uréia (MOROT-GAUDRY; JOB; LEA, 2001).

Da mesma maneira do que asparagina, a isoleucina aumenta significativamente em todas as variedades havendo um aumento mais acentuado nas variedades transgênicas. A quantificação de asparagina e isoleucina por grama de material fresco aumentou na folha de maneira significativa em todas as variedades utilizadas, mas sempre o maior aumento foi dado nas variedades susceptíveis. Foi observado um aumento entre 2 e 3 vezes do conteúdo de isoleucina de folha tratadas com glifosato nas variedades DM48 e Msoy7501, enquanto que DM4800RG e Msoy7575RR tiveram aumentos 15 e 23 vezes respectivamente com aplicação do herbicida.

Na raiz houve um comportamento similar ao de folha se observando o aumento de maior quantidade de aminoácidos nas variedades convencionais do que nas transgênicas (Tabela 3). Aspartato, glutamato, tirosina e metionina tiveram comportamento similar na raiz de ambos pares. A tendência do glutamato para aumentar o seu conteúdo foi observada em todas as variedades; enquanto que com aspartato, tirosina e metionina só aumentaram nas variedades não transgênicas. No entanto, o aminoácido fenilalanina (aminoácido aromático detectado pelo método) cuja via de síntese é afetada pelo glifosato não tem um comportamento que possa se associar às características de resistência das variedades utilizadas nem na folha nem raiz.

De forma geral, é possível observar que a resistência está associada à capacidade de manter a estabilidade do “pool” de aminoácidos solúveis.

Tabela 2. Teor de aminoácidos livres de FOLHA (nmol gr⁻¹) em testemunha sem glifosato (TEST) e após 72 h da aplicação (72HS). O valor P < 0,05 indica diferença significativa (negrito) pelo teste de SCHEFFÉ

	DM48			DM4800RG			MSOY7501			MSOY7575RR		
	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P
Asp	0.299	0.569	0.0020	0.346	0.462	0.0384	0.332	0.474	0.0443	0.389	0.461	0.3376
Glu	0.234	1.819	0.0001	0.442	0.569	0.1769	0.533	1.111	0.0174	0.500	0.590	0.6713
Asn	1.511	6.322	0.0005	2.641	3.869	0.0229	1.848	5.684	0.0001	2.104	3.857	0.0040
Gln	0.212	0.210	0.9607	0.327	0.253	0.1255	0.297	0.178	0.0253	0.408	0.356	0.4139
Ser	0.309	0.522	0.0082	0.350	0.439	0.1664	0.329	0.393	0.3623	0.440	0.424	0.8333
Thr	n/d	n/d		0.120	0.154	0.2884	n/d	n/d		n/d	n/d	
His	0.044	0.424	0.0001	0.083	0.133	0.1164	0.066	0.317	0.0008	0.070	0.100	0.1297
Arg	n/d	1.906		0.300	0.489	0.0737	0.169	1.540	0.0001	0.157	0.798	0.0005
Lys	0.046	0.694	0.0001	0.211	0.134	0.0512	0.044	0.203	0.0008	0.052	0.331	0.0046
Gly	0.232	1.063	0.0001	0.252	0.308	0.3294	0.220	0.471	0.0017	0.217	0.347	0.0050
Ala	0.192	n/d		0.208	0.303	0.0279	0.154	0.316	0.0023	0.170	0.203	0.2825
Val	0.068	0.082	0.3663	0.096	0.105	0.4993	0.091	0.569	0.0001	0.105	0.122	0.3873
Ile	0.022	0.516	0.0003	0.034	0.089	0.0023	0.034	0.516	0.0001	0.045	0.088	0.0112
Leu	0.012	0.028	0.0160	0.027	0.038	0.1710	0.022	0.322	0.0004	0.026	0.031	0.2107
Tyr	0.333	0.444	0.1801	0.212	0.453	0.0166	0.117	0.243	0.0295	0.290	0.314	0.6729
Phe	0.025	0.487	0.0001	0.124	0.458	0.0247	0.114	0.050	0.0099	0.189	0.379	0.0209
Met	0.110	0.523	0.0003	0.074	0.104	0.0362	0.054	0.087	0.0575	0.060	0.117	0.0189

Tabela 3. Teor de aminoácidos livres de RAIZ (nmol gr⁻¹) em testemunha sem glifosato (TEST) e após 72 h da aplicação (72HS). O valor P < 0,05 indica diferença significativa (negrito) pelo teste de SCHEFFÉ

	DM48			DM4800RG			MSOY7501			MSOY7575RR		
	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P	TEST	72HS	P
Asp	0.004	0.036	0.0050	0.009	0.011	0.3896	0.011	0.024	0.0039	0.005	0.007	0.0505
Glu	0.005	0.020	0.0252	0.006	0.010	0.0421	0.007	0.016	0.0119	0.004	0.008	0.0049
Asn	0.126	0.634	0.0098	0.299	0.533	0.0065	0.172	0.378	0.0142	0.221	0.161	0.0696
Gln	0.009	0.044	0.0013	0.007	0.010	0.1086	0.015	0.030	0.1388	0.013	0.008	0.0372
Ser	0.005	0.017	0.0009	0.005	0.010	0.0204	0.009	0.018	0.0048	0.004	0.007	0.0544
Thr	0.065	0.112	0.009	0.094	0.112	0.3467	0.040	0.115	0.003	0.068	0.143	0.001
His	0.015	0.019	0.3816	0.026	0.029	0.4781	0.010	0.021	0.0148	0.009	0.012	0.2549
Arg	0.002	0.013	0.0263	0.004	n/d		n/d	0.009		n/d	0.003	
Lys	0.010	0.031	0.0191	0.007	0.017	0.0034	n/d	n/d		n/d	n/d	
Gly	0.289	0.249	0.4728	0.326	0.444	0.1468	0.176	0.412	0.0099	0.314	0.533	0.1274
Ala	0.006	0.020	0.0206	0.007	0.011	0.0932	n/d	0.010		0.007	0.006	0.1280
Val	n/d	n/d		n/d	n/d		0.007	n/d		0.002	n/d	
Ile	n/d	n/d		n/d	n/d		n/d	n/d		n/d	n/d	
Leu	0.009	0.058	0.0027	0.007	0.064	0.0003	0.085	0.088	0.9138	0.041	0.139	0.0020
Tyr	0.085	0.201	0.0170	0.090	0.082	0.2940	0.046	0.154	0.0033	0.082	0.151	0.1509
Phe	n/d	n/d		n/d	n/d		n/d	0.007		0.002	0.003	0.7869
Met	n/d	0.018		0.003	0.003	0.6704	0.005	0.015	0.0380	0.005	0.002	0.1265

2.4 DISCUSSÃO

O estudo da resposta antioxidante tem tido o objetivo implícito de procurar na resposta ao estresse uma ferramenta para entender como o ambiente afeta um organismo. A resposta oxidativa é universal em plantas submetidas a estresse (CARRILLO; VALLE, 2005), entretanto, a variedade de respostas é muito maior do que as circunstâncias que produzem essa resposta fazendo quase impossível determinar um padrão de comportamento geral.

No entanto, tem-se sugerido que a modificação direta da expressão de enzimas envolvidas na resposta antioxidante poderia ter um efeito importante na tolerância ao estresse oxidativo (ALLEN; WEBB; SCHAKE, 1997). Eckmekci et al. (2004) tem sugerido que técnicas de “screening” podem ser usadas para quantificar a resposta de diferentes espécies ou diferentes genótipos da mesma espécie ao estresse ambiental e fazer um “ranking” de acordo a sua tolerância relativa ao estresse.

Segundo Allen; Webb e Schake (1997), a hipótese de que enzimas antioxidantes são críticas na prevenção do estresse oxidativo em plantas é baseado em varias linhas de evidencias: (a) a atividade de um ou mais de estas enzimas é geralmente incrementada em plantas expostas a condições de estresse, e a sua elevada atividade está relacionada com o incremento da tolerância ao estresse. (b) o pré-tratamento de plantas sob um tipo de estresse pode incrementar a tolerância a vários outros tipos de estresse - este fenômeno é conhecido como tolerância cruzada. (c) linhas selecionadas para resistência a EROs podem incrementar os níveis de uma ou varias destas enzimas exibindo tolerância cruzada.

É interessante o fato de não haverem relatos que relacionem o glifosato com a geração de estresse oxidativo e também não acerca das respostas antioxidantes enzimática e não enzimática.

No presente trabalho não foi achado pela determinação da peroxidação lipídica que se produza estresse oxidativo de maneira significativa em plantas de soja tratadas com glifosato, porém, houve um grande desbalanço da homeostase celular gerado pelo aumento de aminoácidos solúveis observado em grande proporção nas variedades de soja susceptíveis a glifosato. Esta é uma resposta típica da aplicação de glifosato (COOLEY; FOY, 1992) que tem sido observado em muitas espécies. Já que os aminoácidos também podem atuar como antioxidantes (DRÖGE, 2002), existe a possibilidade de um solapamento do estresse oxidativo. Foram observados aumentos de atividade de enzimas antioxidantes nestas mesmas variedades, tanto na raiz como na folha, evidenciando que o agente xenobiótico aplicado inicia uma resposta dada de maneira universal frente ao estresse oxidativo.

Chaudière e Ferrari-Iliou (1999) indicaram que unicamente enzimas antioxidantes podem agir frente à geração de peróxidos primários como $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 , não havendo outras vias que possam ser utilizadas de maneira direta. Portanto, aminoácidos e outros compostos antioxidantes como ascorbato, glutatona, tocoferóis, etc., podem aumentar os seus teores para agir frente a um dano já produzido, mas não poderiam prevenir o dano oxidativo. Portanto a indução de enzimas antioxidantes indica que existe uma reação frente ao ataque oxidativo que, no caso do estresse provocado pelo glifosato, não poderia ser medida devido á grande proliferação de aminoácidos solúveis provocada pelos mesmos efeitos tóxicos do herbicida.

Geralmente nos estudos que relacionam enzimas antioxidantes com a aplicação de herbicidas em plantas, o herbicida escolhido tem um modo de ação que afeta de maneira direta ou indireta mecanismos de transporte de elétrons que podem produzir estresse oxidativo e, portanto, uma resposta antioxidativa. O herbicida paraquat foi muito estudado por ser um herbicida cujo modo de ação desvia o fluxo de elétrons do caminho fotossintético para o oxigênio (KWAK et al., 1996). Em alguns casos o incremento de enzimas antioxidantes é correlacionado com resistência a este herbicida. Donahue et al. (1997) encontraram correlações entre resistência de *Pisum sativum* com a idade da folha e taxas fotossintéticas. O aumento na a atividade de enzimas GR e APX citosólicas foi observado em folhas resistentes. Ekmekci e Terzioglu (2005) indicaram que tratamentos com paraquat excederam a capacidade foto protetora dos pigmentos de espécies de trigo selvagens e cultiváveis resultando em um dano por fótons. Os parâmetros de estresse oxidativo medidos indicaram um aumento na peroxidação lipídica e na precipitação electrolítica (“electrolitic leakage”) em todas as espécies testadas. Embora a atividade constitutiva das enzimas SOD, APX GR e POX, não indicou melhor predisposição para o estresse, aumentos na quantidade do herbicida aplicado levaram a um maior grau de indução destas enzimas nas variedades cultiváveis do que nas selvagens.

Oxyfluorfenó é um potente inibidor da síntese de clorofilas que inibe a transformação de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX. A oxidação não enzimática do protoporfirinogênio IX pode induzir o acúmulo de protoporfirina IX em outros locais celulares (fora do cloroplasto) sendo responsável pela geração de EROs. Geoffroy et al. (2003) observaram o aumento da atividade de enzimas CAT, APX, GR, e GST quando *Scenedesmus obliquus* foi exposto ao efeito de oxyfluorfen. Estas observações estão de acordo com o obtido para cultivos celulares de soja, tabaco e feijão (GULLNER; KÖMIVES; KIRÁLY, 1991; KNÖRZER; DURNER; BÖGER, 1996) e o aumento de enzimas antioxidantes também poderia ser associado à resistência. Por

outra parte, plantas transgênicas de arroz superexpressando um gene de *Mixococcus xanthus* que codifica uma protoporfirinogênio oxidase insensível a oxyfluorfen não tiveram ativação de enzimas antioxidantes SOD, POD e CAT, entanto que o correspondente não transgênico, induziu a atividade destas enzimas (JUNG; BACK, 2005). A partir desta evidencia é possível diferenciar a resposta entre um mecanismo de resistência por evitação e um mecanismo de resistência por tolerância. Este caso também encontra analogia no presente trabalho onde a resistência a glifosato é dada pela introdução de um gene codificando uma enzima insensível ao herbicida. Aquelas variedades resistentes se caracterizam por manterem sem mudanças boa parte dos parâmetros bioquímicos medidos, entanto que variedades susceptíveis apresentam evidências de uma resposta mais intensa que produz um grande desequilíbrio metabólico.

Quando os níveis de carotenóides diminuem por causa da aplicação de herbicidas que afetam a biossíntese de carotenos (fluridone, norflurazon, diflufenican, flurtamone, por exemplo) as suas funções protetoras não podem ser mantidas. A planta morre por causa de uma grande proliferação de EROs que acaba danificando todo o aparelho fotossintético (KIM et al., 2004). Jung et al. (2000) reportaram que a atividade GOPX, SOD, APX e GR aumentou em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) tratadas com norflurazon e submetidas à alta irradiância, mas em baixa irradiância os níveis destas enzimas tiveram níveis basais altos e aumentaram pouco com o tratamento de norflurazon.

O fator comum destes herbicidas é que afeta de maneira direta ou indireta o funcionamento do aparelho fotossintético produzindo o aumento das espécies reativas de oxigênio a níveis tóxicos. A função coordenada dos pigmentos é vital para o funcionamento correto da fotossíntese e a falta de direcionamento adequado dos elétrons leva à redução monovalente do oxigênio.

Também foram reportados trabalhos onde foi gerado estresse oxidativo em plantas submetidas a tratamentos com herbicidas que não tem modo de ação (ao menos como alvo primário) no aparelho fotossintético.

Luo; Sunohara e Matsumoto (2004) relataram que fluazifop-butilo, um herbicida que afeta a biossíntese de ácidos graxos, induziu a peroxidação lipídica em plântulas de *Acanthospermum hispidum* D.C. Os resultados deste trabalho sugerem que EROs são induzidos por fluazifop-butilo e tem um papel na fitotoxicidade, mas o tipo de EROs e a via de produção não é ainda claro. Não entanto, se poderia propor que uma diminuição no conteúdo de ácidos graxos, junto a uma elevação hipotética (embora leve ou nula) do nível basal das EROs por causa da aplicação do herbicida levaria a um aumento na relação EROs:ácidos graxos que ocasionaria o aumento da

peroxidação lipídica. A adição de antioxidantes (vitamina E e etoxiquina) diminuiu os efeitos do fluazifop-butilo devido ao aporte de uma via para os lipoperóxidos descarregar o excesso de elétrons de membranas danificadas (LUO; SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004).

No caso do presente trabalho, é possível propor uma analogia entre o caso do glifosato com soja e o fluazifop-butilo com *Acanthospermum hispidum* D.C já que o aumento de aminoácidos solúveis que é dado pela ação herbicida atua de maneira análoga à adição de um antioxidante como Vitamina E ou etoxiquina, mascarando o efeito sobre as membranas. No trabalho de Luo; Sunohara e Matsumoto (2004) não foram realizadas medições de atividade enzimática, mas poderia ter se dado algum tipo de indução frente à fluazifop-butilo assim como o glifosato induz a CAT e APX em raiz e a GOPX, GST e GR em folha.

Sunohara e Matsumoto (2004) utilizaram quinclorac, um herbicida tipo auxínico cujos efeitos tóxicos incluíam a geração de H_2O_2 (GROSSMANN; KWIATKOWSKI; TRESCH, 2001; SUNOHARA; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2003), para comparar os efeitos entre arroz (uma espécie tolerante) e *Echinochloa oryzicola* Vasing. (uma planta daninha susceptível). Os seus resultados indicam que a luz aumenta a seletividade de quinclorac entre arroz e *Echinochloa oryzicola* Vasing e a susceptibilidade de *Echinochloa oryzicola* Vasing sob peroxidação lipídica está relacionada com a redução no conteúdo de clorofila. Mas, o efeito da alta concentração do herbicida causou efeitos deletérios incluso em baixa irradiância, portanto a peroxidação lipídica sob luz não explicaria completamente o modo de ação do quinclorac. Por outra parte, a resposta de enzimas antioxidantes não é significativa frente ao estresse, mas a atividade constitutiva destas enzimas é marcadamente maior em arroz e possivelmente este seja um dos motivos pelo qual *Echinochloa oryzicola* Vasing apresenta maior susceptibilidade a quinclorac (SUNOHARA; MATSUMOTO, 2004).

No par DM48-DM4800RG utilizado no presente trabalho, houve diferenças constitutivas na atividade de GOPX e CAT em folha (Figura 13 e 15) observando-se maior atividade na variedade resistente. Portanto, a maior predisposição da variedade DM4800RG á peroxidação lipídica observada poderia ser minguada pelas enzimas antioxidantes de maior atividade basal. No entanto, este fato não é confirmado pelo par Msoy7501-Msoy7575RR devido a que não foram observadas diferenças na atividade constitutiva de nenhuma das enzimas antioxidantes analisadas.

Os herbicidas inibidores da acetolactato sintase (ALS) interferem na síntese de aminoácidos alifáticos (leucina, valina e isoleucina). Estes tipos de herbicidas produzem geralmente aumento no conteúdo de aminoácidos livres similar ao que acontece com glifosato (SHANER, 1991).

Zabalza et al. (2006) não observaram efeitos do estresse oxidativo em plantas de *Pisum sativum* tratadas com imazethapir, um inibidor de ALS, através da determinação da precipitação eletrolítica e carbonilas, embora que um leve aumento na peroxidação lipídica de folhas foi observado. No entanto, houve resposta típica ao estresse oxidativo em alguns parâmetros medidos como aumento nos níveis de ascorbato e atividade de GOPX em folha e o aumento no conteúdo de glutathione e atividade GR na raiz. Eles concluem que imazethapir não exerce efeito herbicida através do estresse oxidativo, mas é possível determinar pela soma de evidências que existe indução do mecanismo antioxidante causado por estresse oxidativo não letal.

O teor de clorofila encontrada no par DM48-DM4800RG foi maior do que o par Msoy7501-Msoy7575RR e esta característica estaria relacionada com o fato de serem estes pares adaptados a diferentes tipos de irradiância. O par DM48-DM4800RG é mais adaptado a climas com níveis de irradiância relativamente baixos, característicos de latitudes altas, enquanto que o par Msoy7501-Msoy7575RR está adaptado para níveis de irradiância mais alta. Isto poderia explicar o fato da variedade DM4800RG conter atividade constitutiva de enzimas antioxidantes mais altas e complementar o mecanismo de resistência desta variedade à aplicação de glifosato. Em uma planta com alto nível basal de clorofila, os níveis basais de EROs deveriam manter uma proporção constante com conteúdo de clorofila, e para manter o equilíbrio redox seria necessário um nível constitutivo de enzimas antioxidantes adequado, mais ainda quando se deve considerar que os pigmentos fotossintéticos são os principais geradores de peróxidos primários como $\bullet\text{O}_2^-$ e H_2O_2 .

A clorofila é altamente sensível ao glifosato e a diminuição do seu conteúdo foi reportada para espécies como milho, cevada, e tabaco (COLE, 1985). Existem trabalhos que apresentam evidências de que o glifosato inibe a formação de um precursor de clorofila, o ácido aminolevulínico, um composto sintetizado a partir de glutamato, α -cetoglutarato e glicina, portanto dependente da via de síntese de aminoácidos.

A redução de clorofila que ocorre a doses subletais de glifosato pode ser atribuída também à fotodestruição causada pela perda de carotenóides induzida por glifosato (MUÑOZ-RUEDA et al., 1986). Trabalhos feitos em beterraba mostraram um substancial declínio nos pigmentos aparentemente por fotodestruição causada pela perda de carotenóides (SERVAITES; TUCCI;

GEIGER, 1987), mas em *Abutilon theophrasti* Medikus não foi claro se a diminuição de clorofila foi pela interferência da síntese, fotodestruição ou ambas (FUCHS et al., 2002).

Os resultados obtidos indicam que a não variação dos teores de clorofila na variedade DM4800RG frente à aplicação de glifosato é um mecanismo a mais, adicionado à resistência a glifosato e possivelmente as vias do xiquimato e a síntese de ALA poderiam ser afetadas conjuntamente.

Mas, esta afirmação não é confirmada pelo outro par, porém a causa possivelmente seja o menor requerimento de clorofila. Nesse caso, se a síntese de clorofila estivesse regulada para sintetizar uma quantidade menor de clorofila no par Msoy7501-Msoy7575RR, e a maquinaria de síntese fosse similar entre todas as variedades, então seria mais fácil compensar a percas de clorofila do que no par DM48-DM4800RG. Aliás, o requerimento de carotenos para a drenagem de elétrons seria maior (não necessariamente em proporção direta) quanto maior é o potencial de geração das EROS da clorofila.

Sendo o ácido aminolevulínico um metabólito das etapas iniciais da via de síntese de porfirinas, todo componente da célula que contenha um grupo heme pode ser afetado frente a um efeito inibitório da sua síntese. Assim, seguindo o caminho metabólico que percorre o ácido aminolevulinico (KEGG Database) é possível ver a que inibição desta via comprometeria a síntese de enzimas como peroxidases e catalases. Esta inibição foi informada para *Cyperus rotundus* e em folhas de soja (ABU-IRMAILEH; JORDAN, 1978). No presente trabalho é possível observar que existe uma tendência a diminuir a atividade CAT em folha (Figura 15 e 27) após aplicação do glifosato. Mas as vias de síntese de CAT são afetadas de maneira diferencial em raiz e folha. A atividade de CAT não é afetada pela falta do grupo prostético heme na raiz, tanto que é observado aumento de atividade em resposta à aplicação do glifosato nas variedades susceptíveis. Esta foi uma das mais claras diferenças encontrada no presente trabalho entre variedades susceptíveis e resistentes a glifosato e afirma o fato de que um mecanismo de resistência por evitação, como é a introdução de uma EPSPS insensível a glifosato, promove uma resposta quase nula e não tem desequilíbrio metabólico significativo na planta quando aplicado o agente de estresse.

Se os efeitos primários do glifosato fossem independentes da inibição da síntese de ácido aminolevulínico então seria considerado como um efeito primário de importância secundária segundo a definição de Devine; Duke e Fedtke, (1993) e que teoricamente aconteceria mesmo sem a planta ser atingida no alvo principal pelo herbicida por causa da resistência. Se a inibição

da síntese do ácido aminolevulínico ser um caso de efeito secundário, então teria dependência com o alvo principal do herbicida já que o efeito principal “induziria” o efeito secundário. No presente trabalho, a marcada diminuição na atividade CAT na fola de todas as variedades da conta de que esse efeito é independente do efeito primário do glifosato. Mas, a indução de GOPX nas variedades susceptíveis e a manutenção dos teores de clorofila na variedade DM4800RG em comparação á diminuição na DM48 dão conta de que esses efeitos teriam algum tipo de dependência com o alvo primário.

Se a diminuição da clorofila fosse pela fotodestruição causada pela diminuição dos carotenóides, então o aumento de GOPX se induziria em resposta ao aumento das EROs geradas nos cloroplastos. A diminuição da CAT se daria pela canalização dos grupos prostéticos heme para formação de nova clorofila, e para GOPX que agiria de maneira mais direta sobre a formação de EROs no cloroplasto do que a CAT cuja maior atividade é no peroxissômo. Então, se fosse necessário “canalizar” grupos heme significa que a via de síntese estaria trabalhando a uma taxa insuficiente para sustentar as vias que requerem grupos heme, portanto estaria inibida, e confirma o fato da independência do efeito sobre a via de síntese do ácido aminolevulínico com respeito ao alvo principal EPSPS.

Por outra parte, Reddy; Rimando e Duke (2004) não observaram mudança nos teores de clorofila em soja resistente a glifosato e determinaram que o ácido aminometilfosfônico, um produto da degradação de glifosato, seria responsável da clorose observada em soja RG. Mas, em condições de campo a formação do ácido aminometilfosfônico pode depender da taxa de absorção do glifosato, genótipos, e condições ambientais. A incerteza da formação do ácido aminometilfosfônico explica porque os agricultores às vezes têm que lidar com este problema e outras vezes não.

Se considerarmos o caráter multidimensional dos processos bioquímicos na célula pode-se deduzir que muitos processos metabólicos são afetados ao mesmo tempo quando é atingido por um agente de estresse. A síntese de metabólitos de baixo peso molecular como os aminoácidos seguem rotas metabólicas que mesmo muitas vezes independentes podem ter algum tipo de interação. No caso do glifosato, a inibição da via do xiquimato interfere na síntese de aminoácidos aromáticos de maneira direta. Mas foi possível observar que um grande aumento no teor absoluto de quase todos os aminoácidos e uma grande variação nos teores percentuais das variedades susceptíveis.

Tem havido relatos conflitantes acerca dos efeitos do glifosato no pool de aminoácidos. Alguns trabalhos relatam uma diminuição de aminoácidos aromáticos e um incremento geral nos aminoácidos totais (HOAGLAND; DUKE; ELMORE, 1978; NILSSON, 1977). Outros observaram uma diminuição geral de aminoácidos livres incluindo aminoácidos aromáticos em resposta ao glifosato (HOAGLAND; DUKE; ELMORE, 1978; NAFZIGER et al., 1984).

Wang (2001) informou que o conteúdo de aminoácidos totais foi significativamente maior, 5 dias após tratamento com glifosato em *Cyperus rotundus*. Ekanayake; Wickremasinghe e Liyanage (1979) observaram que a aplicação de glifosato em *Panicum repens* resultou em um incremento inicial da concentração total de aminoácidos na planta que chegou a um Máximo em 8 dias. Entretanto que Tymonko e Foy (1978) observaram um incremento de 38% no primeiro dia após aplicação de glifosato em cultura de células in vitro de soja. Em plantas de *Triticum aestivum* borrifadas com glifosato os aminoácidos solúveis aumentaram consideravelmente, em especial aspartato, asparagina, glutamato e glutamina (NILSSON, 1977), todos os aminoácidos que transportam nitrogênio na planta (MOROT-GAUDRY; JOB; LEA, 2001).

Segundo Starrat e Lazarovits (1996), o incremento dos aminoácidos em plantas de tomate tratadas com dinitroanilinas não parece ser o resultado do aumento da hidrólise de proteínas por enzimas como a leucina aminopeptidase, um componente indutível da resposta de defesa de tomate.

Glifosato resultou em inibição de 57% da síntese de proteínas em células de soja (TYMONKO; FOY, 1978), mas não inibiu a incorporação de aminoácidos em proteínas em plântulas de soja (DUKE; HOAGLAND, 1981).

O grande acúmulo de aminoácidos em tubérculos de *Cyperus rotundus* poderia ser o resultado da inibição do uso de aminoácidos na síntese de proteínas ou a acelerada quebra de proteínas (WANG, 2001).

O acúmulo de aminoácidos durante estresse de baixa temperatura pode ser provocada pela diminuição da atividade respiratória. Quando isto ocorre, vários componentes do ciclo de ácidos tricarboxílicos como 2-oxoglutarato ou piruvato tende a aumentar promovendo a síntese de aminoácidos (NAIDU et al., 1991). Alternativamente a entrada de aminoácidos na cadeia ou a síntese de proteínas pode ser inibida a baixa temperatura provocando o acúmulo de aminoácidos (NAIDU et al., 1991).

No presente trabalho, o teor de aminoácidos solúveis totais aumentou em todas as variedades embora a taxa de variação fosse consideravelmente maior nas variedades susceptíveis

do que nas resistentes. Na variedade DM48 o aumento drástico observado aos três dias após aplicação do herbicida (aproximadamente 5 vezes o valor inicial), poderia indicar que tal excesso fosse gerado por hidrólise protéica.

O conteúdo de glutamina em folha é o único aminoácido que tende a diminuir com a aplicação de glifosato no presente trabalho. A diminuição da glutamina junto com o aumento de glutamato foi demonstrada em animais de laboratório submetidos a doses letais e subletais de glufosinato, um herbicida que inibe a enzima glutamina sintetase encarregada da transaminação de glutamato para formar glutamina (HACK et al., 1994). Sob o mesmo modo de ação, fosfinotricina diminuiu os teores de glutamina em raízes noduladas de *Medicago truncatula* (BARSCH et al., 2006).

A glutamina participa do ciclo da GS/GOGAT e é precursor para síntese de aminas e ureidos (LEA; MIFLIN, 2003). A derivação da glutamina para a síntese destes compostos poderia estar ocorrendo com a aplicação de glifosato na folha de soja. Lea e Miflin (2003) associam estresse ao aumento da biosíntese de glutamina devido à derivação de esqueletos carbonados para manter o balanço C/N celular. A síntese de 2-oxoglutarato a partir de glutamato libera o amônio que vira tóxico passando certos patamares e, portanto deve ser derivado a compostos nitrogenados como glutamina (através da glutamina sintetase), ureidos ou aminas (MOROT-GAUDRY; JOB; LEA, 2001).

Entanto que a diminuição de glutamina poderia estar ligada a um redirecionamento de nitrogênio para outra vias, entanto que o aumento observado de asparagina em folhas estaria ligada a um direcionamento de nitrogênio para se mesma através da transaminação do aspartato. O comportamento irregular do aspartato frente à aplicação do glifosato poderia se dever a vários fatores que agem ao mesmo tempo, a) a derivação de aspartato para outras vias metabólicas (fator de diminuição), a estimulação da via de síntese (fator de aumento) e á degradação proteolítica (fator de aumento).

A síntese de asparagina também utiliza glutamina como substrato conjuntamente com aspartato através da reação catalisada pela asparagina sintetase com gasto de ATP (MOROT-GAUDRY; JOB; LEA, 2001; AZEVEDO et al., 1997; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006).

A aplicação de glifosato também provocou o aumento do conteúdo de asparagina na folha de todas as variedades utilizadas no presente trabalho e poderia ser indicado como um dos causantes da diminuição da glutamina.

Neste caso, o aspartato também deveria ser consumido no processo. No presente trabalho foi observado que o teor absoluto de aspartato aumenta na folha de todas as variedades. Por outra parte os valores percentuais do aspartato em todas as variedades diminuem confirmando o fato de que aspartato também estaria sendo gasto para sustentar outras vias metabólicas..

O fato do valor absoluto de aspartato estar aumentando seria evidência que a origem do aumento de aspartato estaria na degradação proteolítica assim como o aumento da maioria dos aminoácidos observado nas variedades convencionais no presente trabalho.

Aspartato dá origem à síntese dos aminoácidos isoleucina, metionina, treonina e lisina (MOROT-GAUDRY; JOB; LEA, 2001; AZEVEDO; LANCIEN; LEA, 2006). A isoleucina teve um comportamento bem definido dentre as variedades estudadas. Este padrão se deu também na determinação percentual de isoleucina. Os teores de isoleucina aumentam em todas as variedades, mas o maior aumento é dado nas variedades transgênicas. No entanto, o desvio de aspartato para síntese de isoleucina não reduz o aumento de aspartato. O comportamento da metionina e lisina é irregular entre as variedades, mas tendem a aumentar do mesmo jeito do que a isoleucina confirmando um aumento nos carbonos que entram na via do ácido aspártico.

O incremento de isoleucina tem sido reportado para outros tipos de estresse. Marur; Sodek e Magalhes (1994) observaram em folhas de algodão sob estresse hídrico que isoleucina e valina apresentaram o mesmo perfil de resposta com um progressivo incremento na sua concentração a baixos potenciais hídricos.

Também, Naidu et al. (1994) determinou que os níveis de isoleucina, valina, alanina e glicina aumentaram significativamente sob condições de baixa temperatura.

Por outro lado, seriam necessários testes que indiquem o comportamento de enzimas envolvidas na rota de síntese e nas vias de degradação para comprovar a origem do aumento no teor de aminoácidos tanto nas variedades transgênicas como as não-transgênicas. Desta maneira seria possível avaliar se existe algum padrão de atividade enzimática mais específico relacionado com o metabolismo de aminoácidos que caracterize a susceptibilidade ou resistência dos pares avaliados.

O pequeno aumento relativo de isoleucina e histidina observado nas variedades utilizadas no presente trabalho indica que variedades transgênicas e não transgênicas seguem diferentes padrões de comportamento frente à aplicação de glifosato.

3 CONCLUSÕES

Através de parâmetros bioquímicos foi possível identificar diferenças que permitiram caracterizar variedades de soja enquanto a sua resistência a glifosato.

Embora não fossem encontradas diferenças nos perfis tanto de proteínas totais como isoenzimas, foi possível encontrar respostas bioquímicas diferenciais entre aquelas variedades resistentes e susceptíveis quando submetidas ao glifosato. Entre elas a resposta de CAT em raiz (Figura 16) e GOPX de folha (Figura 13 e Tabela 1).

O perfil de aminoácidos indicou vários deles com acúmulo diferencial entre variedades susceptíveis e resistentes. Asparagina, glutamato, histidina e isoleucina de folha tiveram comportamento muito claro. O aumento destes aminoácidos foi menor e/ou não significativo nas variedades resistentes.

A mais clara das determinações bioquímicas que permitiu diferenciar resistência e susceptibilidade das variedades estudadas foi a quantificação de aminoácidos solúveis em folha. O aumento maior dos aminoácidos livres frente à aplicação de glifosato foi característico das variedades susceptíveis analisadas no presente trabalho.

Em geral foi observado que as variedades resistentes caracterizaram-se por não alterar em grandes proporções os parâmetros que foram medidos em comparação com as variedades susceptíveis.

A tendência a aumentar de algumas enzimas antioxidantes analisadas como a CAT na raiz, peroxidases na folha ou a GR de folha indicou que existem mecanismos ativados para defesa frente a espécies ativas de oxigênio.

Por outro lado, o dano oxidativo não foi perceptível através do análise de peroxidação lipídica. Pouco é considerado na literatura o papel que aminoácidos livres tem na drenagem de EROs e o efeito que o aumento dos teores de aminoácidos livres tem sobre o estatus redox da célula. No presente trabalho, o aumento dos aminoácidos livres pode explicar o fato de não ter havido peroxidação lipídica.

Por último, embora hajam sido apresentadas evidencias de que o herbicida glifosato gera estresse oxidativo é de se considerar que o modo de ação do glifosato não é exercido através de mecanismos geradores de radicais livres porque estes mecanismos parecem estar mascarados pela grande proliferação de aminoácidos livres que podem atuar como antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ABU-IRMAILEH, B.E.; JORDAN, L.S. Some aspects of glyphosate action in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Science**, Champaign, v. 26, n. 6, p. 700-703, 1978.
- ALLEN, R.D.; WEBB, R.P.; SCHAKE, S.A. Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 473-479, 1997.
- ALSCHER, R.G.; DONAHUE, J.L.; CRAMER, C.L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 224-233, June 1997.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, May. 2002.
- AMARANTE JUNIOR, O.P.; DOS SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, Jul. 2002.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozymes profiles of catalase, peroxidase and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1247-1257, Dec. 1995.
- ANGELOVA, M.B.; PASHOVA, S.B.; SLOKOSKA, L.S. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus nidulans* cells. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, n. 7, p. 544-549, Apr. 2000.
- ARORA, A.; SAIRAM, R.K.; SRIVASTAVA, G.C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- ARUOMA, O.I.; WHITEMAN, M.; ENGLAND, T.G.; HALLIWELL, B. Antioxidant action of ergothioneine: assessment of its ability to scavenge peroxynitrite. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 231, n. 2, p. 389-391, Feb. 1997.
- ASMUS, K.D.; BENSASSON, R.V.; BERNIER, J.L.; HOUSSIN, R.; LAND, E.J. One-electron oxidation of ergothioneine and analogues investigated by pulse radiolysis: redox reaction involving ergothioneine e vitamin C. **Biochemical Journal**, London, v. 315, p. 625-629, Apr. 1996.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-tipe and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n. 2, p. 280-292. Oct. 1998.

AZEVEDO, R.A.; ARRUDA, P.; TURNER, W.L.; LEA, P.J. The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 46, n. 3, p.395-419, Oct. 1997.

AZEVEDO, R.A.; LANCIEN, M.; LEA, P.J. The aspartic acid metabolic pathway, a exiting and essential pathway in plants. **Amino Acids**, New York, v. 30, n. 2, p. 143-162, Mar. 2006.

BARSCH, A.; CARVALHO, H.G.; CULLIMORE, J.V.; NIEHAUS, K. GC-MS based metabolite profiling implies three interdependent ways of ammonium assimilation in *Medicago truncatula* root nodules. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.127, n. 1, p. 79-83, Dec. 2006.

BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective?. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 8, p. 299, Aug. 1999.

BIELESKI, R.L.; TURNER, N.A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extract by thin-layer electrophoreses and chromatography. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.17, n. 2, p. 278-293, 1966.

BLANCO, A. **Química Biológica**. 7.ed. Buenos Aires: El Ateneo. 2001. 605 p.

BOLWELL, G.P.; WOJTASZEK, P. Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense – a broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.51, n. 6, p. 347-366, Dec. 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. 1.ed. Rockville, 2000. 1367 p.

BURNS, E.R.; BUCHANAN G.A; CARTER,M.C. Inhibition of carotenoid synthesis as a mechanism of action of amitrole, dichlormate, and pyriclor. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, n.1, p. 144-148, 1971.

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. Cordoba. v. 2, n. 2. Mar. 2005. Disponível em: <<http://www.safv.com.ar/Carrillo%200305.pdf>>. Acesso em: 5 Dez. 2005.

CATÁNEO, A.C.; DESTRO, G.F.G., FERREIRA, L.C.; CHAMMA, K.L.; SOUSA, D.C.F. Atividade de glutatona-S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 21, n. 2, p. 307-312, Maio 2003.

CHAUDIÈRE, J. Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells. In: RICE EVANS, C.; BURDON, R.H. (Ed.). **Free radical damage and its control**. Amsterdam: Elsevier Science, 1994. chap. 2, p. 23-64.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 949-962, Sept. 1999.

CHEN, C.T.; CHEN, L.M.; LIN, C.C.; KAO, C.H. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. **Plant Science**, Clare, v. 160, n. 2, p. 283-290, Jan. 2001.

CHURIN, Y.; SCHILLING, S.; BÖRNER, T. A gene family encoding glutathione peroxidase homologues in *Hordeum vulgare* (barley). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 459, n. 1, p. 33-38, Oct. 1999.

COLE, D.J. Mode of action of glyphosate-a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. chap. 5, p. 48-74.

COOLEY, W.E.; FOY, C.L. Effects of SC-0224 and glyphosate on free amino acids, soluble protein, and protein synthesis in inflated duckweed (*Lemna gibba*). **Weed Science**, Champaign, v. 40, n. 3, p. 345-350, July 1992.

CORBETT, J.R. **The biochemical mode of action of pesticides**. 2nd ed. London: Academic Press, 1984. 382 p.

COSTA, G.; MOREL, J.L. Water relations, gas exchange and amino acid content in Cd-treated lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 32, n. 4, p. 561-570, July 1994.

CROFT, S.M.; ARNTZEN, C.J.; VANDERHOF, L.W.; ZETTINGER, C.S. Inhibition of chloroplast ribosome formation by N,N-bis(phosphonomethyl)glycine. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 335, n. 2, p. 211-217, 1974.

DAVIES, K.J.A.; GOLDBERG, A.L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid-peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, n. 17, p. 8220-8226, June 1987.

DEVINE, M.; DUKE, S.O.; FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: PTR Prentice Hall, 1993. 441p.

DONAHUE, J.L., OKPODU, C.M., CRAMER, C.L., GRABAU, E.A., ALSCHER, R.G. Response of antioxidants to paraquat in pea leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 1, p. 249-257, Jan. 1997.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan. 2002.

DUKE, S.O.; HOAGLAND, R.E. Effect of glyphosate on the metabolism of phenolic compounds: VII. Root-fed amino acids and glyphosate toxicity in soybean (*Glycine max*) seedlings. **Weed Science**, Champaign, v. 29, n. 3, p. 297-302, 1981.

EKANAYAKE, A.; WICKREMASINGHE, R.L.; LIYANAGE, H.D.S. Studies on the mechanism of herbicidal action of N-(phosphonomethyl) glycine. **Weed Research**, Oxford, v.19, n.1, p. 39-43, 1979.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Effects of oxidative stress unduced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 83, n. 2. p. 69-81, Oct. 2005.

ELSTNER, E.F. Mechanism of oxigen activation in different compartments of plant cells. In: PELL, E.; STEFFEN, K. **Active oxigen/oxidative stress and plant metabolism**. New York: American Society of plants Physiologists, 1991. chap.2, p. 13-25.

ESHDAT, Y.; HOLLAND, D.; FALTIN, Z.; BEM-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 100, n. 2, p. 234-240, June 1997.

FEDTKE, C. **Biochemistry and physiology of herbicide action**. Berlin: Springer-Verlag. 1982. 202 p.

FERREIRA, R.R; FORNAZIER, R.F; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 2, p.327-342, 2002.

FUCHS, M.A.; GEIGER, D.R.; REYNOLDS, T.L.; BOURQUE, J.E. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 74, n. 1, p. 27-39, Sept. 2002.

FUFEZAN, C.; RUTHERFORD, A.W.; KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 532, n. 3, p. 407-410, Dec. 2002.

GEOFFROY, L., TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M., VERNET, G. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 72, n. 3, p. 178-185, Mar. 2002.

GOMES JUNIOR, R.A; MOLDES, C.A.; DELITE F.S.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.;LEA, P.J.; AZEVEDO,R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabiga* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, n. 5, p. 420-429, May 2006.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 32, n. 32, p. 481-494, 2005.

GROSSMANN, K.; KWIATKOWSKI, S.; TRESCH, S. Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 362, p. 1811-1816, Sept. 2001.

GULLNER, G.; KÖMIVES, T.; KIRÁLY, L. Enhanced inducibility of antioxidant systems in a *Nicotinia tabacum* L biotype results in acifluorfen resistance. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences**, Tubingen, v. 46, n. 9, p. 875-881, Sept. 1991.

HACK, R.; EBERT, E.; EHLING, G.; LEIST, K.H. Glufosinate ammonium - Some aspects of its mode of action in mammals. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 5, p. 461-470, May 1994.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1989. 496 p.

HAMILTON, G.A. Chemical and biochemical reactivity of oxygen. In PELL, E.; STEFFEN, K. **Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism**. New York: American Society of plants Physiologists, 1991. chap. 1, p. 5-12.

HARRIS, E.D.; Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 6, n. 9, p. 2675-2683, June 1992.

HAYAKAWA, T., KANEMATSU, S., ASADA, K. Occurrence of Cu,Zn-Superoxide dismutase in the intrathylakoid space of spinach-chloroplasts. **Planta and Cell Physiology**, Kyoto, v. 25, n.6, p. 883-889, 1994.

HELDT, H. **Plant biochemistry and molecular Biology**. New York: Oxford University Press, 1997. 522 p.

HOAGLAND, R.E. Effects of glyphosate on metabolism of phenolics compounds: VI. Effects of glyphosine and glyphosate metabolites on phenylalanine ammonia-lyase activity, growth and protein, chlorophyll, and anthocyanin levels in soya bean (*Glycine max*) seedlings. **Weed Science**, Champaign, v. 28, n. 4, p. 393-400, 1980.

HOAGLAND, R.E.; DUKE S.O.; ELMORE, C.D. Effects of glyphosate on metabolism of phenolic compounds. II. Influence on soluble hydroxyphenolic compounds, free aminoacids and soluble proteins levels in dark-grown maize roots. **Plant Science Letters**, Clare, v.13, n. 4, p.291-299, 1978.

HOLLANDER, H; AMRHEIN, N. The site of the inhibition of the shiquimate pathway by glyphosate I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 66, n. 5, p. 823-829, 1980.

HUNG, S.H.; YU, C.W.; LIN C.H. Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 46, n. 1, p. 1-10, Jan. 2005.

UNITED STATES DEPARTAMENT OF AGRICULTURE (USDA). **Glyphosate, Pesticide Fact Sheet**. Washington: Information Ventures Inc., 2003. 9 p. Disponível em: <<http://infoventures.com/e-hlth/pesticide/glyphos.html>>. Acesso em 8 Mar. 2004.

JUNG, S.; KUK, Y.I. The expression level of a specific catalase isozyme of maize mutants alters catalase and superoxide dismutase during norflurazon-induced oxidative stress in *Scutella*. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 28, n. 3, p. 287-292, 2003.

JUNG, S.; BACK, K. Herbicidal and antioxidant responses of transgenic rice overexpressing *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 43, n. 5, p. 423-430, May 2005.

JUNG, S.; KIM, J.S.; CHO, K.Y.; TAE, G.S.; KANG, B.G. Antioxidant responses of cucumber (*Cucumis sativus*) to photoinhibition and oxidative stress induced by norflurazon under high and low PPFDs. **Plant Science**, Clare, v. 153, n. 2, p. 145-154, Apr. 2000.

KILLMER, J.; WIDHOLM, J.; SLIFE, F. Reversal of glyphosate inhibition of carrot cell culture growth by glycolytic intermediates and organic and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 68, n. 6, p. 1299-1302, 1981.

KIM, J.; YUN, B.; CHOI, J.S.; KIM, T.; KWAK, S.; CHO, K. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, n. 3, p. 127-139, Mar. 2004.

KITCHEN, L.M.; WITT, W.W.; RIECK, C.E. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 29, n. 4, p. 513-516, 1981.

KNÖRZER, O.; DURNER, J.; BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 388-396, June 1996.

KRÄMER, U.; COTTER-HOWELLS, J.D.; CHARNOCK, J.M.; BAKER, A.J.M. SMITH, J.A.C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate Nickel. **Nature**, London, v. 379, p. 635-638, Feb. 1996.

KRINSKY, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 617-635, 1989.

KWAK, S.S.; KIM, S.K.; PARK, I.H.; LIU, J.R. Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. **Phytochemistry**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 565-568, Oct. 1996.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 41, n. 6, p. 555-564, June 2003.

LEDFORD, H.K.; NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1037-1045, Aug. 2005.

LEE, T.T. Effect of glyphosate on synthesis and degradation of chlorophyll in soybean and tobacco cells. **Weed Research**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 161-164, 1981.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J. FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin Phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 193, n. 1. p. 265-275, 1951.

LUO, X.; SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Fluazifop-butyl causes membrane peroxidation in the herbicide-susceptible broad leaf weed bristly starbur (*Acanthospermum hispidum*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 78, n. 2, p. 93-102, Feb. 2004.

MALLICK, N., MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 157, n. 2, p. 183-193, Aug. 2000.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione-S-transferase in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 127-158, 1996.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v. 39, n. 1, p. 5-18, 1998.

MARUR, C.J.; SODEK, L.; MAGALHES, A.C. Free aminoacids in leaves of cotton plants under water deficit. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 103-108, 1994.

MATYSIK, J.; ALIA; BHALU, B.; MOHANTY P. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by praline under stress in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n.5, p. 525-532, Mar. 2002.

MAYFIELD, S.P.; TAYLOR, W.C. Chloroplasts photooxidation inhibits the expression of a set of nuclear genes. **Molecular & General Genetics**, New York, v. 208, n. 1, p. 309-314, June 1987.

MCKERSIE, B.D. Oxidative stress. **Plant Stress**, 1996. Disponível em: www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm. Acesso em: 8 Jun. 2004.

MIFLIN, B.J.; HABASH, D.Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 979-987, Apr. 2002.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R.; LAM, E. Sacrifice in the face of foes: pathogen-induced programmed cell death in plants. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 10-15, Jan. 1996.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEN, F. Reactive oxygen gene network of plants. **TRENDS in Plant Science**, London, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, Clare, v. 162, n. 4, p. 491-498, Apr. 2002.

MOROT-GAUDRY, J.F.; JOB, D.; LEA, P.J. Amino Acid Metabolism. In: LEA, P.J., MOROT-GAUDRY, J.F. (Ed.). **Plant Nitrogen**. Berlin. Springer-Verlag, 2001. chap. 4, p. 167-212.

MUÑOZ-RUEDA, A.; GONZALEZ-MURUA, C.; BECERRIL, J.M.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M.F. Effects of glyphosate [N-(phosphonomethyl)glycine] on photosynthetic pigments, stomatal response and photosynthetic electron transport in *Medicago sativa* and *Trifolium pratense*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 66, n. 1, p. 63-68, Jan. 1986.

NAFZIGER, E.D.; WIDHOLM, J.M.; STEINRUCKEN, H.C.; KILLMER, J.L. Selection and characterization of a carrot cell line tolerant to glyphosate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, n.3, p. 571-574, 1984.

NAIDU, B.P.; PALEG, L.G.; ASPINALL, D.; JENNINGS, A.C.; JONES G.P. Amino acid and glycine-betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. **Phytochemistry**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 407-409, 1991.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NILSSON, G. Effects of glyphosate on the amino acid content in spring wheat plants. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Oslo, v. 7, n. 3, p. 153-157, 1977.

NOCTOR, G.; NOVITSKAYA, L.; LEA, P.J.; FOYER, C.H. Co-ordination of leaf minor amino acid contents in crop species: significance and interpretation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 939-945, Apr. 2002.

PLINE-SRNIC, W. Physiological mechanisms of glyphosate resistance. **Weed Technology**, Lawrence, v. 20, n. 2, p. 290-300, Apr. 2006.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computing simulations as step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 445-462, May 2001.

READE, J.P.H.; COBB, A.H. Herbicides: modes of actions and metabolism. In: NAILOR, R.E.L. (Ed.) **Weed Management handbook**. Oxford: Blackwell Science, 2002. p. 134-170.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A.M.; DUKE, S.O. Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 52, n. 56, p. 5139-5143, Aug. 2004.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURDON, R.H., VAN KNIPPENBERG, P.H. (Ed.). **Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology**. London: Elsevier, 1991 v. 22, p. 1-278.

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n.40, p. 38921-38925, Oct. 2003.

RIZZARDI, M.A.; FLECK, N.G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JR, A.A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 5, p. 957-965, Out. 2003.

RODRIGUES, A.C.; DINIZ, A.C.; FACHINELLO, J. C.; da SILVA, J. B.; FARIA, J. L. C. Peroxidases e fenóis totais em tecidos de porta-enxertos de *Prunus sp.* nos períodos de crescimento vegetativo e de dormência. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.4, p.559-564, Ago. 2002.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**. 4.ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

SCANDALIOS, J.G. Regulation and properties of plants catalase. In: FOYER, C.H.; MULIUNEUX, P.M. (Ed.) **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p. 275-315.

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, Jul. 2005.

SCANDALIOS, J.G.; GUAN, L.; POLIDOROS, A.N. Catalases in Plants: gene structure, properties, regulation and expression. In: SCANDALIOS, J.G. (Ed.) **Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. p. 343-406.

SCHAT, H.; SHARMA, S.S.; VOOLIS, R. Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 101, n. 3, p. 477-482, Nov. 1997.

SEHMER, L.; DIZENGREMEL, P. Contribution to subcellular localization of superoxide dismutase isoforms of spruce needles and oak leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 53, n. 5, p. 545-551, Nov. 1998.

SERVAITES, J.C.; TUCCI, M.A.; GEIGER, D.R. Glyphosate effects on carbon assimilation ribulose biphosphate carboxylase activity and metabolite levels in sugar beet leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 370-374, Oct. 1987.

SHANER, D.L. Physiological effects of imidazolinone herbicides. In: SHANER, D.L.; O'CONNOR, S.L. (Ed.), **The Imidazolinone Herbicides**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 129-137.

SHARMA, S.S.; DIETZ, K.J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptations to heavy metal stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 711-726, Mar. 2006.

SHIKHA; SINGH D.P. Influence of glyphosate on photosynthetic properties of wild type and mutant strains of cyanobacterium *anabaena doliolum*. **Current Science**, Bangalore, v. 86, n. 4, p.571-576, Feb. 2004.

SIEFERMANN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 69, n. 3, p. 561-568, Mar. 1987.

SIKORSKI, J.A.; GRUYS, K.J. Understanding glyphosate's molecular mode of action with EPSP synthase: evidence favoring an allosteric inhibitor model. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 30, n. 1, p. 2-8, Jan. 1997.

STARRAT, A.N.; LAZAROVITS, G. Increases in free amino acids levels in tomato plants accompanying herbicide-induced disease resistance. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 54, n. 3, p. 230-240, Mar. 1996.

SUNDQUIST, E.A.; BRIVIBA, K.; SIES, H. Singlet oxygen quenching by carotenoids. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 234, p. 354-366, 1994.

SUNOHARA, Y.; MATSUMOTO, H. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing. and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. **Plant Science**, Clare, v. 167, n. 3, p. 597-606, Sept. 2004.

SUNOHARA, Y.; KOBAYASHI, H.; MATSUMOTO, H. Light induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in quinclorac-treated maize seedlings. **Journal of Pesticide Science**, Tokio, v. 28, n. 1, p. 18-23, 2003.

SUNTRES, Z.E. Role of antioxidants in paraquat toxicity. **Toxicology**, Clare, v. 180, n. 1, p. 65-77, Oct. 2002.

SYROS, T.; YUPSANIS, T.; ZAFIRIADIS, H.; ECONOMOU, A. Activity and isoforms of peroxidases, lignin and anatomy, during adventitious rooting in cuttings of *Ebenus cretica* L. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, n. 1, p. 69-77, Jan. 2004.

TAN, S.; EVANS, R.; SINGH, B. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. **Amino Acids**, New York, v. 30, n. 2, p. 195-204, Mar. 2006.

TEISSEIRE, H.; VERNET, G. Is the “Diuron effect” due to a herbicide strengthening of antioxidative defenses of *Lemna minor*?. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 66, n. 3, p. 153-160, Mar. 2000.

TYMONKO, J.M.; FOY, C.L. Inhibition of protein-synthesis by glyphosphate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, n. 4, p. 41-41, 1978.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, n. 3, p. 405-414, Aug. 2001.

WAKABAYASHI, K.; BÖGER, P. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 1): the photosynthetic electron transport system. **Weed Biology and Management**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 8-18, Mar. 2004.

WANG, C. Effect of glyphosate on aromatic amino acid metabolism in purple nutsedge (*Cyperus rotundus*). **Weed Technology**, Lawrence, v. 15, n. 4, p. 628-635, Oct. 2001.

WONG, P.K. Effects of 2,4-D, glyphosate and paraquat on growth, photosynthesis and chlorophyll-a synthesis of *Scenedesmus quadricauda* Berb 614. **Chemosphere**, Oxford, v. 41, n.1, p. 177-182, July 2000.

WUERGES, J.; LEE, J.W.; YIM, H.S.; KANG, S.O.; CARUGO, K.D. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States Of America**, Washington, v. 101, n. 23, p.8569-8574, June 2004.

WYCISK, K.; KIM, E.J.; SCHROEDER, J.I.; KRÄMER, U. Enhancing the first enzymatic step in the histidine biosynthesis pathway increases the free histidine pool and nickel tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 578, n. 1, p.128-134, Dec. 2004.

ZABALZA, A.; GASTON, S.; SANDALIO, L.M.; DEL RIO, L.A.; ROYUELA, M. Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides que inhibit acetolactate synthase. **Enviromental and Experimental Botany**. Oxford. Jan. 2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=495322444&sort=d&view=c&acct=C000049650&version=1&urlVersion=0&userid=972067&md5=756848619f3161a6c82f930fe375ea95>. Acesso em: 6 Maio 2006.