

## COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

## MONITORAMENTO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO NO MANEJO DE PLANTAS DANINHAS COM GLIFOSATO EM POMAR COMERCIAL DE CITROS

M.B. Matallo<sup>1</sup>, S.D.B. Almeida<sup>2</sup>, A.L. Cerdeira<sup>3</sup>, D.A.S. Franco<sup>1</sup>, L.C. Luchini<sup>2</sup>, M.A.M. Moura<sup>1</sup>, S.O. Duke<sup>4</sup><sup>1</sup>Instituto Biológico, Centro Experimental Central, Rod. Heitor Penteado, km 3, CEP 13092-543, Campinas, SP, Brasil. E-mail: matallo@biologico.sp.gov.br

## RESUMO

Com o objetivo de verificar o acúmulo de ácido chiquímico em plantas de laranja pêra (*Citrus sinensis*) num pomar comercial manejado com glifosato, um herbicida sistêmico de amplo espectro, foram coletadas amostras na Fazenda Jequitibá, tradicional no cultivo de citros, situada no Município de Santo Antônio de Posse, SP. O produtor aplicou de forma convencional Roundup® Original a 1.440 g.ha<sup>-1</sup> de equivalente ácido (e.a.) do sal de isopropilamino de glifosato em 19/12/2006 na entrelinha de 15 plantas, deixando outras cinco como testemunha. A reaplicação de glifosato a 1.260 g.ha<sup>-1</sup> de e.a. foi realizada em 2/4/2007. Em ambos os casos, imediatamente antes da aplicação e aos 3, 7, 10, 15, 20 e 35 dias após, foram coletadas 20 folhas de cada planta tanto da área tratada como da não tratada, analisando-se o teor de ácido chiquímico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de forma isocrática após extração por micro-ondas. Os resultados mostraram não ocorrer acúmulo do ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra, não havendo diferenças significativas nos teores deste composto entre o material proveniente da área tratada com glifosato e o daquela capinada manualmente.

PALAVRAS-CHAVE: Herbicidas, chiquimato, CLAE.

## ABSTRACT

SHIKIMIC ACID MONITORING IN WEED CONTROL WITH GLYPHOSATE IN A COMMERCIAL CITRUS ORCHARD. In order to check the accumulation of shikimic acid in a traditional commercial grove of citrus "Pêra" cultivar (*Citrus sinensis*) managed for weed control with glyphosate, a systemic herbicide with wide spectrum, samples were collected at Fazenda Jequitibá, in Santo Antonio de Posse County, São Paulo State, Brazil. The producer applied the following treatments of Roundup Original® glyphosate at 1,440 g.ha<sup>-1</sup> a.e. of the isopropylamine salt on 19 December 2006 between rows of 15 plants, leaving five others as control. The re-application of glyphosate at 1,260 g ha<sup>-1</sup> was done on 2 April 2007. In both cases, immediately before application and at 3, 7, 10, 15, 20 and 35 days thereafter, 20 leaves from each treated and untreated plants were collected for analysis of the content of shikimic acid by isocratic high performance liquid chromatography (HPLC) assisted with microwave. The results showed no significant differences in levels of shikimic acid between the material from the area treated with glyphosate and that weeded manually.

KEY WORDS: Herbicides, shikimate, HPLC.

O herbicida glifosato tem sido usado intensivamente na agricultura por mais de 25 anos, sendo o produto mais vendido em todo o mundo para o controle químico de plantas daninhas anuais e perenes de forma não seletiva (COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS, 1999). É o herbicida mais utilizado na citricultura, sendo comum sua aplicação em até três

épocas anuais, direcionadas à linha de plantio, sob as copas das plantas (GRAVENA, 2006).

Apesar de estudos realizados durante vários anos consecutivos não mostrarem nenhum efeito do uso continuado do glifosato sobre a produtividade das plantas de citros (CARVALHO *et al.*, 2002) e dos relatos na literatura de que este herbicida apresenta meia-

<sup>2</sup>Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, São Paulo, SP, Brasil.<sup>3</sup>EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil.<sup>4</sup>United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Oxford, Mississippi, EUA.

vida curta (47 dias no solo) devido a sua forte adsorção aos colóides do solo (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005), este processo pode não neutralizá-lo completamente tornando-o biodisponível para as plantas e, portanto, com potencial para sua intoxicação. Além disso, a deriva e a absorção do glifosato através do contato entre as raízes pela planta não alvo, coexistindo com a planta invasora, podem ter implicações agrônômicas (NEUMANN *et al.*, 2006). Em vários trabalhos observou-se que subdoses de glifosato causaram diminuição nos níveis de fitoalexinas, conseqüentemente, predispondo as plantas a doenças (SHARON *et al.*, 1992; DUKE *et al.*, 2007).

Sob condições normais, em torno de 20% do carbono fixado pelas plantas passa pela rota do ácido chiquímico que, além dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, precedem a formação de um grande número de produtos finais importantes para a vida das plantas como vitaminas, ligninas, alcaloides, fitoalexinas e uma ampla gama de compostos fenólicos que são formados por essa rota (CERDEIRA *et al.*, 1994; KOGAN; PÉREZ, 2003). O bloqueio da rota do chiquimato leva a um acúmulo, dentre outros, de altos níveis de ácido chiquímico com muitas implicações fisiológicas e ecológicas (COLE; CERDEIRA, 1982).

Não só a diminuição nos níveis de fitoalexinas está associada à redução da resistência das plantas às doenças pelo uso do glifosato. O aumento da suscetibilidade a *Phytophthora* spp. foi atribuído por LIU *et al.* (1997) à diminuição da lignificação e a alterações na exsudação de raízes causada pelo glifosato. Por outro lado, NEUMAN *et al.* (2006) propuseram que o glifosato diminuiu a resistência de plantas às doenças pela limitação na disponibilidade de nutrientes.

Bioensaios rápidos e simples baseados na detecção de chiquimato em tecidos foliares foram desenvolvidos para diferenciar plantas de milho, soja, canola e biotipos de *Conyza* sp. tolerantes e resistentes ao glifosato (KOGER *et al.*, 2005; SHANER *et al.*, 2005). Ao estudarem o acúmulo do ácido chiquímico em variedades de algodão resistentes e suscetíveis ao glifosato empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), PLINE *et al.* (2002) verificaram que todos os tecidos das variedades suscetíveis acumularam ácido chiquímico em resposta ao tratamento com glifosato, ao contrário das variedades resistentes, cujos níveis não se alteraram.

Partindo da hipótese de que o uso intensivo de glifosato em pomares de citros, além de outras condições estressantes, estaria relacionado com o favorecimento da ocorrência de doenças como a clorose variegada e a morte súbita dos citros pela redução nos níveis de fitoalexinas decorrente do bloqueio da rota do chiquimato (YAMADA; CASTRO, 2004),

este trabalho teve como objetivo monitorar os níveis de ácido chiquímico de acordo com as doses de glifosato aplicadas pelo agricultor no manejo de plantas daninhas, empregando a técnica da CLAE e sua detecção por arranjo de diodos em cadeia (DAD).

O monitoramento foi realizado na Fazenda Jequitibá, situada no Município de Santo Antônio de Posse, SP, em pomar de laranja variedade pêra (*Citrus sinensis*) com 12 anos de idade. Num talhão com 6.000 plantas, selecionou-se no final de uma das linhas de plantio 20 indivíduos, considerando-se cada um, uma parcela. O produtor aplicou o produto Roundup® Original na entrelinha das 15 primeiras plantas na dose de 4,0 L.ha<sup>-1</sup> (1.440 g e.a. ha<sup>-1</sup>) com equipamento de aplicação tratorizado dotado de barra aplicadora protegida para evitar a deriva e pontas do tipo Magno 110. A primeira aplicação foi realizada no dia 19/12/2006 (temperatura de 24° C, 60% de umidade relativa e consumo de calda de 400,0 L.ha<sup>-1</sup>). A reaplicação de glifosato a 3,5 L.ha<sup>-1</sup> (1.260 g e.a. ha<sup>-1</sup>) foi realizada no dia 2/4/2007 (mesmo consumo de calda a 24,9° C e 65% de umidade relativa). Nas cinco últimas plantas da linha foi realizada somente a capina manual durante todo o período de coleta de folhas. No momento da primeira aplicação as plantas encontravam-se no início da formação de frutos enquanto que, na reaplicação, estas já estavam em pleno amadurecimento.

As coletas de folhas foram realizadas imediatamente antes da aplicação do glifosato (branco) e aos 3, 7, 10, 15, 20 e 35 dias após a aplicação do produto. De cada planta foram coletadas aleatoriamente dos quatro quadrantes, 20 folhas para determinação do teor de ácido chiquímico. As folhas foram colocadas em sacos plásticos identificados e acondicionadas em isopor com gelo para seu transporte até o Laboratório da Ciência das Plantas Daninhas do Instituto Biológico, na Cidade de Campinas, SP, distante 38 km.

Após lavagem com detergente, as folhas foram postas para secar durante 16 horas a 60° C em estufa com circulação forçada de ar e maceradas automaticamente (25.000 rpm); subamostras de 400 mg de cada planta, diluídas em 10 mL de água acidificada com HCl a pH 2,0, foram extraídas em micro-ondas por 10 segundos e potência de 100 W e filtradas em filtro Whatmann 1.

A determinação do teor de ácido chiquímico nas amostras foi feita através de CLAE empregando-se um cromatógrafo marca Shimadzu modelo LC 2010 A e DAD. O método cromatográfico empregou a mistura isocrática de água acidificada a pH 3,0 + metanol (95:5), fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, coluna C<sub>18</sub> marca Phenomenex modelo Gemini (250,0 mm x 4,0 mm; 5 µ), pré coluna, volume de injeção de 20 µL, tempo de corrida de 20 minutos e detecção a 212 nm.

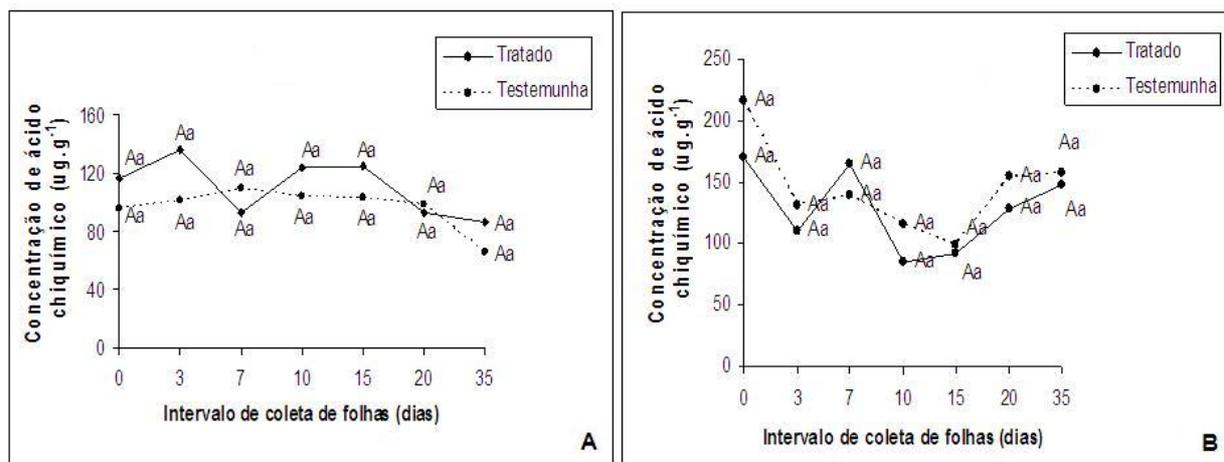


Fig. 1 - Teor de ácido chiquímico nas folhas de laranja pêra provenientes de plantas das áreas tratada e não tratada com glifosato após a primeira aplicação (1A) e reaplicação (1B). Letras maiúsculas permitem a comparação dentro de cada época e letras minúsculas a comparação ao longo das épocas

Foi construída uma curva de calibração com sete concentrações de ácido chiquímico, variando desde 2,04 a 407,20 µg.mL<sup>-1</sup>, para a quantificação de sua concentração pelo método do padrão externo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, tendo como causas da variação os fatores aplicação de glifosato e épocas de coleta de folhas. Para a análise da variância foi feito o teste F com as médias comparadas pelo teste de Tukey, ambos no nível de 1% de significância (BANZATTO; KRONKA, 2006). O teor do ácido chiquímico determinado nas folhas de plantas de citros após a primeira aplicação (Fig. 1A) e a reaplicação (Fig. 1B) pode ser observado acima.

No caso da primeira aplicação de glifosato (Fig. 1A), em todas as épocas de coleta não houve diferença significativa entre o teor de ácido chiquímico das plantas da área tratada e não tratada ( $\alpha = 0,01$ ), apesar de ser ligeiramente superior naquelas tratadas, exceto aos sete dias, apresentando uma tendência de queda a partir do 15º dia.

A concentração de ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra após a reaplicação (Fig. 1B), ao contrário do observado anteriormente, além da tendência generalizada do aumento a partir dos 10 dias, apresentou-se superior nas plantas da área testemunha mesmo antes da aplicação do produto (branco), exceto aos sete dias. Apesar deste comportamento, também não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $\alpha = 0,01$ ).

Apesar de não se observar diferença entre as plantas das áreas tratada e não tratada com glifosato, sabe-se que mais do que a possibilidade da absorção deste herbicida pelas plantas de laranja pêra por deriva ou por transferência via rizosfera (NEUMANN *et al.*, 2006), fatores bióticos e abióticos e heterogeneidade do estágio de desenvolvimento das folhas no momento da

coleta podem contribuir para diferenças nos teores de ácido chiquímico (DUKE *et al.*, 2006). Tais fatores podem justificar um maior nível basal do analito nas plantas analisadas durante o período de reaplicação do glifosato, quando também se observou o pico de ácido chiquímico (sete dias). Este último pode ser atribuído, também, à seletividade do método cromatográfico na detecção desse analito (LANÇAS, 2004).

Com base nos resultados obtidos nas duas épocas de aplicação do glifosato, observou-se não haver alterações significativas nos níveis de ácido chiquímico das plantas, concordando com GRAVENA (2006), que verificou um aumento transitório na concentração de ácido chiquímico em plantas de limão cravo diretamente pulverizadas com glifosato enquanto que em mudas de laranja valência as concentrações não se alteraram.

Pelo exposto, conclui-se que, nas condições de manejo de plantas daninhas praticadas pelo agricultor com o uso do glifosato, não foi detectado acúmulo imediato de ácido chiquímico nas plantas de laranja pêra.

#### AGRADECIMENTOS

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento ao Projeto nº 07-10864-3.

#### REFERÊNCIAS

BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. *Experimentação agrícola*. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.

- CARVALHO, J.E.B.; SOUZA, L.S.; CALDAS, R.C.; ANTAS, P.E.U.T.; ARAÚJO, A.M.A.; LOPES, L.C.; SANTOS, R.C.; SANTOS, N.C.; SOUZA, A.L.V. Leguminosa no controle integrado de plantas daninhas para aumentar a produtividade da laranja-“Pêra”. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.24, n.1, p.82-85, 2002.
- CERDEIRA, A.L.; COLE, A.W.; LUTHE, D.S. Free amino acid and protein modification in southernpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) with glifosate. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.46, n.3, p.172-174, 1994.
- COLE A.W.; CERDEIRA A.L. Southern pea response to glyphosate desiccation. *Horticultural Science*, v.17, p.244-246, 1982.
- COMPÊNDIO DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS: *guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*. 6.ed. São Paulo: Organização Andrei Editora, 1999. 672p.
- DUKE, S.O.; WEDGE, D.E.; CERDEIRA, A.L.; MATALLO, M.B. Herbicide effects on plant disease. *Outlooks on Pest Management*; v.18, n.4, p.36-40, 2006.
- DUKE, S.O.; WEDGE, D.E.; CERDEIRA, A.L.; MATALLO, M.B. Interactions of Synthetic Herbicides with Plant Disease and Microbial Herbicides. In: VURRO, M.; GRESSEL, J. (Ed.). *Novel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management*. New York: Springer, 2007. p. 277-296.
- GRAVENA, R. *Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo glyphosate*. 2006. 144p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.
- KOGAN, M.A.; PÉREZ, J.A. *Herbicidas: Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Santiago: Universidad Católica de Chile, 2003. 333p.
- KOGER, C.H.; SHANER, D.L.; HENRY, W.B.; NADLER-HASSAR, T.; THOMAS, W.E.; WILCUT, J.W. Assessment of two nondestructive assays for detecting glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadensis*). *Weed Science*, v.53, p.438-445, 2005.
- LANÇAS, F.M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMa, 2004. 62p.
- LIU, L.; PUNZA, Z.K.; RAHE, J.E. Altered root exudation and suppression of induced lignification as mechanisms of predisposition by glyphosate of bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) to colonization by *Phytophthora* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.51, p.111-127, 1997.
- NEUMANN, G.; KHOLLS, S.; LANDSBERG, E.; STOCK-OLIVEIRA SOUZA, K.; YAMADA, T. Relevance of glyphosate transfer to non-target plants via the rhizosphere. *Journal of Plant Diseases and Protection*. v.20, p.963-969, 2006.
- PLINE, W.A.; WILCUT, J.W.; DIKE, S.O.; EDMISTEN, K.L.; WELLS, R. Tolerance and Accumulation of Shikimic Acid in Response to Glyphosate Applications in Glyphosate-Resistant and Nonglyphosate-Resistant Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.50, n.3, p.506-512, 2002.
- RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. *Guia de herbicidas*. 5.ed. Londrina: Edição dos autores, 2005. 591p.
- SHANER, D.L.; NADLER-HASSAR, T.; HENRY, W.B.; KOGER, C.H. A rapid *in vivo* shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Science*, v.53, p.769-774, 2005.
- SHARON, A.; AMZELLEM, Z.; GRESSEL, J. Glyphosate suppression of an elicited response. Increased susceptibility of *Cassia obtusifolia* to a mycoherbicide. *Plant Physiology*, v.98, p.654-659, 1992.
- YAMADA, T.; CASTRO, P.R.C. Glifosato, herbicida com singular modo de ação: Efeitos secundários e implicações fisiológicas e agronômicas. In: SIMPÓSIO SOBRE SISTEMA AGRÍCOLA SUSTENTÁVEL COM COLHEITA ECONÔMICA MÁXIMA, 1., 2004, São Pedro, SP. *Anais*. São Pedro, 2004. 1 CD-ROM.

Recebido em 24/7/08

Aceito em 19/5/10