

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



ADILSON PEREIRA DOMINGUES JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO HERBICIDA
GLIFOSATO SOBRE O CAFEIEIRO: RESPOSTAS
BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ADILSON PEREIRA DOMINGUES JÚNIOR
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Campinas, 2011.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

D713a

Domingues Júnior, Adilson Pereira

Avaliação dos efeitos do herbicida glifosato sobre o
cafeeiro: respostas bioquímicas e fisiológicas / Adilson
Pereira Domingues Júnior. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Paulo Mazzafera.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Coffea. 2. Deriva. 3. Glifosato. 4. Herbicida. 5.
Hormese. I. Mazzafera, Paulo, 1961-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Evaluation of the effects of glyphosate on the coffee: biochemical and physiological responses.

Palavras-chave em inglês: Coffea; Drift; Glyphosate; Herbicide; Hormesis.

Área de concentração: Biologia Vegetal.

Titulação: Mestre em Biologia Vegetal.

Banca examinadora: Paulo Mazzafera, Pedro Luis da Costa Aguiar Alves, Alexandra Christine Helena Frankland Sawaya.

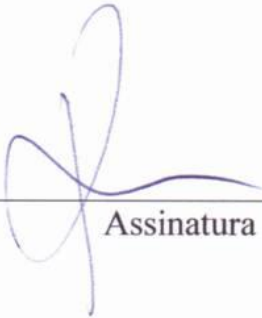
Data da defesa: 17/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal.

Campinas, 17 de fevereiro de 2011.

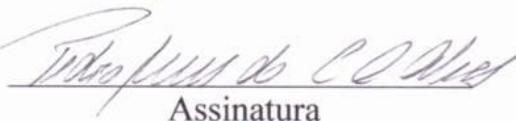
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Mazzafera (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves



Assinatura

Prof. Dr. Alexandra Christine H. F. Sawaya



Assinatura

Prof. Dr. Marlene Aparecida Schiavinato

Assinatura

Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

Assinatura

Dedico

**aos meus pais, Adilson e Maria de Lourdes e
aos meus irmãos, Guilherme e Maisa,
com todo o meu respeito e honra,
por serem meu referencial e meu incentivo em
todos os momentos de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A meus pais e meus irmãos pelos constantes estímulos e por acreditarem em mim.

Ao professor Paulo Mazzafera, por me orientar, desafiar e incentivar ao longo de minha formação científica.

Ao Dr. Milton Massao Shimizu, pela constante ajuda, desde os meus primeiros dias de iniciação científica.

Aos membros da banca e da pré-banca, pelos significativos conselhos fornecidos.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

A meus amigos e colegas de graduação e de Departamento, pelos momentos de descontração e alegria.

A todos os membros do Departamento de Biologia Vegetal, pela grande ajuda ao longo desses anos.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMO	10
SUMMARY	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Glyphosate	12
1.1.1. O problema da deriva	13
1.1.2. Relação entre o herbicida e o solo	14
1.1.3. Ação do herbicida nas plantas	14
1.1.4. Mecanismo de ação	16
1.2. Compostos fenólicos	18
1.3. O café.....	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Material vegetal e solos de cultivo	23
4.2. Tratamentos	24
4.3. Avaliações	26
4.3.1. Medidas de trocas gasosas.....	26
4.3.2. Quantificação de pigmentos fotossintéticos	26
4.3.3. Quantificação de chiquimato	27
4.3.4. Quantificação do total de compostos fenólicos solúveis	27
4.3.5. Análises de ácidos clorogênicos em amostras de folhas dos Ensaios 1 e 2	28
4.3.6. Análises de ácidos clorogênicos e cafeína em amostras de frutos do Ensaio 3.....	29
4.3.7. Extração de açúcares e aminoácidos solúveis	29
4.3.8. Quantificação de açúcares solúveis	30
4.3.9. Quantificação de aminoácidos totais solúveis	30
4.3.10. Extração e quantificação de proteínas totais.....	30
4.4. Análises dos dados	31
5. RESULTADOS	32

5.1. Ensaio 1 – aplicação do herbicida via foliar.....	32
5.2. Ensaio 2 – aplicação do herbicida via três diferentes tipos de solo.....	36
5.3. Ensaio 3 – aplicação do herbicida via foliar e seu impacto em frutos em desenvolvimento	
41	
6. DISCUSSÃO	46
6.1. Ação do herbicida glyphosate em folhas de café	46
6.2. Ação do herbicida glyphosate no fruto de café	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

ABREVIATURAS

5-CQA	Ácido 5-cafeoilquínico
A	Taxa fotossintética
AMPA	Ácido aminometilfosfônico
CGA	Ácidos clorogênicos
CoA	Coenzima A
CTC	Capacidade de troca catiônica
cv.	Cultivar
DAA	Dias após a aplicação do herbicida
DIECA	Dietilditiocarbamato de sódio
E	Taxa de transpiração
E1	Ensaio 1
E2	Ensaio 2
E3	Ensaio 3
E4P	Eritrose-4-fosfato
EPSP	5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato
EPSPs	Enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
ESI-MS/MS	Espectrômetro de massa com ionização por <i>electrospray</i>
gs	Condutância estomática
GSH	Glutathione
GSTs	Glutathione S-transferase
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IAC	Instituto Agronômico de Campinas

IRGA	Analisador de gases por radiação infravermelha
M.O.	Matéria orgânica
m/z	Relação massa por carga
NO	Óxido nítrico
PAL	Fenilalanina amônia liase
PCA	Análises multivariadas por componentes principais
<i>p</i> -cumárico	Ácido para-cumárico
PEP	Fosfoenolpiruvato
pEPSPs	Pré-enzima enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase
Pi	Fósforo inorgânico
PSII	Fotossistema II
RBP	Ribulose bisfosfato
S3P	Chiquimato-3-fosfato
SIR	<i>Selected ion monitoring</i>
UPLC	Cromatografia líquida de ultra-eficiência
UPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência associada à espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
UPLC-MS	Cromatografia líquida de ultra-eficiência associada à espectrometria de massas
UV-VIS	Intervalo entre a radiação ultravioleta e a visível

RESUMO

O glyphosate é considerado o herbicida mais utilizado em todo mundo. Seu mecanismo de ação baseia-se no bloqueio da rota do chiquimato, interrompendo a síntese dos aminoácidos aromáticos. Observa-se que a sua aplicação de maneira incorreta permite que uma parcela do ingrediente ativo chegue à cultura não-alvo, caracterizando a deriva. O café aparece como a segunda mais importante *commodity* no mercado internacional, com o Brasil como principal produtor. Neste trabalho, avaliou-se o impacto que o herbicida glyphosate teria na cultura de café, em uma condição de deriva simulada via pulverização foliar e via contaminação de três diferentes tipos de solos: argiloso, arenoso e rico em matéria orgânica. Análises revelaram que, em baixas concentrações, o glyphosate pode reduzir a taxa fotossintética do cafeeiro, mas estimular a síntese de pigmentos foliares. Também foi observado um aumento do conteúdo de compostos fenólicos, configurando-se como um possível caso de hormese. Quando aplicado nas folhas, o herbicida foi transportado para frutos em desenvolvimento. Nos frutos, o herbicida alterou o metabolismo de diversos compostos importantes para a bebida do café, tais como a cafeína e açúcares. Assim, este trabalho apresenta-se como um dos primeiros a investigar as alterações induzidas pelo herbicida glyphosate em plantas de café e a relatar a hormese provocada pelo herbicida sobre seus metabólitos secundários.

Palavras-chave: *Coffea*, café, deriva, glyphosate, herbicida, hormese, frutos, solos.

SUMMARY

Glyphosate is the most widely used herbicide worldwide. Its mechanism of action is based on the blockage of the shikimate pathway, hindering the biosynthesis of the aromatic amino acids. Its incorrect application allows a portion of the active ingredient to reach the non-target crop, characterizing the drift. Coffee is the second commodity in the international market, and Brazil is the main producer. Here, we studied the impact that the herbicide glyphosate would have on coffee plants, in a condition where drifting was simulated by foliar sprays and contamination of three different soils: clay, sandy and rich in organic matter. Our data revealed that, at low concentrations, glyphosate may reduce photosynthesis, but it can stimulate the biosynthesis of leaf pigments. An increase of phenolic compounds was also observed, suggesting a possible hormesis effect. When applied to the leaves, the herbicide was transported to developing fruits and in the fruits the metabolism of important compounds for the coffee beverage, such as caffeine and sugar, was altered. Thus, this work presents itself as one of the first to investigate the impact of glyphosate herbicide on the coffee tree and report the hormesis caused by the herbicide on secondary metabolites of coffee.

Keywords: *Coffea*, coffee, drift, glyphosate, herbicide, hormesis, fruits, substrates.

1. INTRODUÇÃO

O uso excessivo dos recursos naturais e a síntese em larga escala de compostos xenobióticos gera inúmeros problemas ambientais, tais como a poluição do ar, de ecossistemas terrestres e aquáticos, além de alterações em ciclos biogeoquímicos. Atualmente, observa-se uma maior utilização de compostos organofosforados, correspondendo a 38% dos pesticidas utilizados em todo mundo. A principal característica destes compostos é a presença de uma ligação covalente entre átomos de carbono e fósforo (C-P), resistente à hidrólise química, aos danos térmicos e à fotólise (Singh & Shaner, 2006; Ermakova *et al.*, 2008).

Muitos organofosforados são capazes de interferir no metabolismo vegetal, inibindo determinadas enzimas, relacionadas com a biossíntese de aminoácidos. Como os animais não são capazes de sintetizar todos os aminoácidos necessários, obtendo-os através da alimentação, estes organofosforados tendem a lhes causar menores danos quando comparado com as plantas. Logo, muitos herbicidas são baseados nesta característica (Tan *et al.*, 2006)

Ao eliminarem plantas daninhas, os herbicidas podem promover uma economia de nutrientes e água do solo, bem como da terra arável, mas sua utilização precisa seguir um manejo cuidadoso a fim de evitar que estes compostos prejudiquem plantas co-existent em áreas adjacentes às zonas-alvo de sua aplicação (Tan *et al.*, 2006; Ermakova *et al.*, 2008).

Um importante exemplo de organofosforado capaz de interferir no metabolismo vegetal é o glyphosate, composto ativo de muitos herbicidas (Ermakova *et al.*, 2008; Moldes *et al.*, 2008).

1.1. Glyphosate

O glyphosate [N-(fosfonometil)glicina] é considerado um dos herbicidas mais utilizados para o controle de plantas daninhas no Brasil e no mundo. Este composto corresponde em torno

de 10% das vendas globais de herbicidas e está presente em 150 marcas comerciais. O glyphosate é uma das moléculas mais eficientes já introduzidas no mercado para controle de plantas daninhas e, no Brasil, tem ação comprovada sobre cerca de 150 espécies de plantas daninhas, sendo utilizado em áreas agrícolas, industriais, florestais e residenciais (Bervald, 2006; Ahsan *et al.*, 2008). Sua popularidade se deve a propriedades únicas: possui amplo espectro de ação, é capaz de controlar uma grande variedade de espécies vegetais perenes e anuais, tem alta solubilidade e capacidade de transporte em tecidos vegetais e apresenta rápida ligação às partículas do solo, além de uma baixa toxicidade a mamíferos, aves e peixes (Pline-Srnic, 2006; Preston & Wakelin, 2008). Assim, o herbicida glyphosate pode ser definido como não seletivo às culturas, de ação sistêmica nas plantas daninhas e sem efeito residual no solo (Gravena, 2006). Entretanto, um dos problemas mais sérios observados na utilização do herbicida é a ocorrência da deriva.

1.1.1. O problema da deriva

A deriva é caracterizada pelo contato da molécula herbicida com organismos não alvo de sua aplicação. Sua ocorrência é comum na prática agrícola; entretanto, devido ao uso inadequado dos equipamentos de aplicação, à falta de uma regulação adequada do mesmo e/ou a uma aplicação em condições ambientais desfavoráveis, tais como no período do dia de menor umidade relativa do ar e maior temperatura, esta ocorrência tende a se acentuar (Velini *et al.*, 2008; Cakmak *et al.*, 2009).

Dessa forma, mesmo em aplicações dirigidas de produtos não seletivos, a própria cultura pode ser afetada pela deriva. Sabe-se que o efeito da deriva de herbicidas está diretamente relacionado à quantidade do composto ativo que chega às culturas, também estando associada às doses utilizadas no controle das plantas daninhas. Assim, pode-se observar que a utilização de

doses elevadas de glyphosate em áreas infestadas por plantas daninhas tem potencializado os riscos de danos provocados pela deriva (Santos, 2006).

1.1.2. Relação entre o herbicida e o solo

Além da aplicação direta, o glyphosate pode acabar sendo destinado ao solo via contaminação indireta por deriva, pela chuva e por outros mecanismos. No solo, este herbicida é caracterizado por apresentar alta capacidade de sorção às partículas coloidais, sendo pouco dessorvido (Tesfamariam *et al.*, 2009). Segundo Piccolo *et al.* (1996), a ligação do glyphosate às partículas do solo se deve à interação entre o grupo ácido fosfônico do herbicida com cátions polivalentes adsorvidos à argila. Esta interação tende a manter o herbicida indisponível para a absorção pelas plantas. Entretanto, Gravena (2006) aponta que, em situações específicas, o glyphosate pode permanecer ativo neste ambiente por um curto período de tempo, afetando a emergência de culturas anuais e de plantas daninhas. Segundo o autor, a disponibilidade do glyphosate no solo deve-se principalmente da combinação dos seguintes fatores: solo com textura arenosa, alta dose do herbicida, disponibilidade de água e alto valor de pH do solo.

Também se deve observar que o transporte de pesticidas no solo é governado pelos processos de sorção, transformação e absorção radicular das moléculas, aliados às condições ambientais. Assim, as propriedades físico-químicas das moléculas e os atributos físicos, químicos e biológicos do solo interferem diretamente na movimentação das moléculas no perfil do solo (Gravena, 2006; Tesfamariam *et al.*, 2009).

1.1.3. Ação do herbicida nas plantas

A ação dos herbicidas ocorre através de duas fases: (i) movimento para o local de ação e, (ii) conseqüências metabólicas resultantes de sua interação com o local de ação. A primeira fase inicia-se com a aplicação do herbicida, seja de forma direta sobre a folhagem ou via solo para atingir as raízes. Em seguida, o herbicida é absorvido pela planta para, então, atingir o local de

ação. Essas etapas incluem a entrada nas células, difusão por curtas distâncias, transporte por longas distâncias, conversão metabólica do herbicida (levando a sua ativação ou desativação) e entrada nas organelas celulares. A interação do herbicida com o local de ação pode ser considerada como a primeira etapa da segunda fase, que resulta na morte da planta (Gravena, 2006).

Quando aplicado sobre a folhagem, a absorção do glyphosate é um processo que envolve uma rápida penetração inicial através da cutícula, seguida por uma absorção lenta. A difusão é considerada o principal processo de transporte do herbicida pela cutícula e, portanto, o gradiente de concentração entre a região de deposição e o interior da planta influencia sua absorção (Gravena, 2006). Quando absorvido, é rapidamente e extensivamente transportado para fora deste órgão. Seu transporte segue o padrão de fonte para dreno, semelhante ao observado para as substâncias fotoassimiladas, o que sugere que a translocação pelo floema tenha papel importante. Entretanto, também se observou o transporte do herbicida através do xilema, embora em menor intensidade, considerando-se que há maior concentração do herbicida em órgãos drenos quando comparado com as folhas (Preston & Wakelin, 2008).

Diversos trabalhos na literatura mostram que o glyphosate é pouco metabolizado nas plantas. Porém, estudos com o herbicida radiomarcado possibilitam sugerir que o glyphosate é, primeiramente, transformado em ácido aminometilfosfônico (AMPA). Então, este composto é degradado via transaminação e os produtos desta degradação podem ser incorporados a metabólitos naturais ou serem convertidos a dióxido de carbono, para, então serem incorporados através da fotossíntese (Coupland, 1985). As plantas também possuem enzimas capazes de metabolizar diversos xenobióticos, dentre eles, herbicidas, proporcionando sua desintoxicação. A glutathione S-transferase (GSTs, EC 2.5.1.18) é um importante exemplo deste grupo de enzimas, capaz de catalisar a conjugação de glutathione (GSH) a uma variedade de substratos, geralmente

citotóxicos, produzindo conjugados menos tóxicos. Muitos autores constataram um aumento da atividade desta enzima em plantas submetidas à aplicação de glyphosate, indicando sua participação no processo de detoxificação do herbicida (Cataneo *et al.*, 2003).

1.1.4. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação do glyphosate é atribuído à inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs, E.C. 2.5.1.19), que catalisa a reação entre chiquimato-3-fosfato (S3P) e fosfoenolpiruvato (PEP), formando 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) e fósforo inorgânico (Pi) (Moldes *et al.*, 2008; Cedergreen & Olesen, 2010). Essa reação ocorre em duas etapas, iniciando-se pela ligação da enzima EPSPs ao S3P, formando o complexo EPSPs-S3P; em seguida, o PEP liga-se a este complexo, permitindo o prosseguimento da reação, finalizando com a produção de EPSP (Tan *et al.*, 2006). Quando a planta é exposta ao glyphosate, o herbicida não irá se ligar à enzima EPSPs livre, mas sim ao complexo EPSPs-S3P, impedindo a sua interação com PEP, ao formar o complexo inativo EPSPs-S3P-glyphosate. Verificou-se que o glyphosate não se liga ao sítio ativo da EPSPs, mas a um possível sítio alostérico, resultando em uma mudança conformacional do sítio ativo, o que dificultaria a ligação de PEP (Reade & Cobb; 2002).

A EPSPs é a sexta enzima da rota do ácido chiquímico, essencial para a biossíntese de aminoácidos aromáticos em bactérias, algas, fungos e plantas superiores. Nas plantas, esta enzima é codificada completamente no núcleo e desempenha sua ação catalítica nos plastídios. Ainda, esta enzima possui um peptídeo sinal que permite seu direcionamento ao cloroplasto, caracterizando uma forma conhecida como pré-enzima (pEPSPs). Na membrana do cloroplasto, a pré-enzima interage com um receptor, com posterior liberação da forma ativa da enzima no lado interno desta membrana. A inibição da enzima pelo glyphosate também ocorre no citoplasma, formando o complexo glyphosate-pEPSPs-S3P, cuja estabilidade estrutural impede a

flexibilidade necessária para o transporte através da membrana do cloroplasto (Franz *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2006 ; Perez-Jones *et al.*, 2007).

A inibição da enzima EPSPs prejudica a produção dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano. Inúmeros trabalhos mostram que plantas tratadas com glyphosate tornam-se deficientes destes três aminoácidos e a sua adição exógena reverte a intoxicação (Fuchs *et al.*, 2002; Ahsan *et al.*, 2008; Moldes *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008). Entretanto, um efeito mais rápido e dramático que a redução da quantidade disponível de aminoácidos aromáticos é o aumento da quantidade de ácido chiquímico e, posteriormente, de ácidos benzóicos derivados deste ácido, potencialmente tóxicos às células vegetais (Perez-Jones *et al.*, 2007; Cedergreen & Olesen, 2010). Segundo Velini *et al.* (2008), este aumento dos níveis de ácido chiquímico pode servir para se avaliar a susceptibilidade ou a exposição de espécies vegetais ao glyphosate.

Na literatura podem ser encontrados muitos efeitos secundários causados por este herbicida, dependentes de inúmeros fatores, tais como a espécie, a dose aplicada do herbicida e o estágio da planta (Eker *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2008). O mecanismo de ação do glyphosate também afeta muitos outros compostos celulares, tais como auxinas, ligninas, flavonóides, antocianinas e quinonas, derivados de intermediários da via do chiquimato. Ainda, a aplicação de glyphosate também pode levar a uma queda da taxa fotossintética e inibir a formação de clorofila, reduzindo o conteúdo total do pigmento, além de interferir na organização do aparelho fotossintético. Também se observou que folhas expostas ao glyphosate apresentaram um aumento do nível de peroxidação lipídica, conteúdo de glutathione (GSH), prolina livre e fluxo iônico, sugerindo que, além da inibição de alvos específicos, a ação do glyphosate também leva ao estresse oxidativo nas plantas (Bernald, 2006; Eker *et al.*, 2006; Moldes *et al.*, 2008). Fuchs *et al.* (2002) destacam que tais alterações determinadas pelo glyphosate tendem a se concentrar em

tecidos metabolicamente ativos como drenos, tais como folhas imaturas, brotamentos, botões florais e raízes.

1.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são constituintes importantes das plantas superiores, sendo encontrados em praticamente todos os alimentos de origem vegetal, inclusive frutas e bebidas como o vinho, o chá e o café. Entre os compostos fenólicos está o grupo dos fenilpropanóides, compostos aromáticos originados em passos posteriores à via do ácido chiquímico (Robars & Antolovich, 1997; Abbasi *et al.*, 2007). Estes compostos representam o maior conjunto de metabólitos secundários, compreendendo aproximadamente 20% do total de carbono disponível na biosfera terrestre. Muitos desses compostos têm recebido considerável atenção dos pesquisadores como fatores potencialmente protetores contra doenças crônicas humanas, câncer e doenças cardiovasculares (Scalbert *et al.*, 2005; Peters, 2007; Yu & Jez, 2008).

O aminoácido fenilalanina é a molécula que inicia a via de síntese dos fenilpropanóides nas plantas. A fenilalanina amônia liase (PAL), primeira enzima desta via, catalisa a desaminação da fenilalanina para ácido *trans*-cinâmico que formará o ácido *p*-cumárico (ou ácido 4-cumárico). Em seguida, uma molécula de coenzima A (CoA) se une ao ácido *p*-cumárico, gerando 4-cumaroil CoA, um intermediário ativo de muitas ramificações da via dos fenilpropanóides (Yu & Jez, 2008). Observa-se que os compostos desta rota de biossíntese são estruturalmente e funcionalmente diversos, sendo sintetizados em resposta a estímulos ambientais e do próprio desenvolvimento (Chang *et al.*, 2009). Ainda, pode-se afirmar que a via dos fenilpropanóides gera produtos que conferem maior tolerância a um amplo conjunto de estresse e também podem atuar como uma rota alternativa para o uso dos fótons absorvidos sob condições de acúmulo de carboidrato e/ou excesso de absorção de energia luminosa (Grace & Logan, 2000).

Milhares de compostos fenólicos têm sido descritos em diferentes classes, de acordo com suas estruturas químicas básicas e em diferentes subclasses, de acordo com substituições específicas nas estruturas básicas, associações com carboidratos e formas polimerizadas (Farah & Donangelo, 2006).

Dos principais grupos de fenilpropanóides, destacam-se aqueles pertencentes à classe dos ésteres, coletivamente conhecidos como ácidos clorogênicos (CGA). O termo CGA inclui diferentes grupos de compostos e isômeros relacionados, formados pela esterificação de uma molécula de ácido quínico e uma a três moléculas de um ácido *trans*-hidroxicinâmico específico (Farah & Donangelo, 2006; Mondolot *et al.*, 2006). Segundo Clifford *et al.* (2003), o ácido quínico [ácido 1L1-(OH),3,4,5-tetra-hidroxíciclohexanóico] apresenta os grupos hidroxilas axiais nos carbonos 1 e 3 e os equatoriais nos carbonos 4 e 5. Ésteres desse ácido são normalmente formados no carbono 5, mas também nos carbonos 3 e 4. Os ácidos hidroxicinâmicos são ácidos *trans*-fenil-3-propanóicos com diferentes substituições no anel aromático, sendo o mais comum no café o ácido cafêico (ácido 3,4-dihidroxi-cinâmico), seguido pelo ácido ferúlico (ácido 3-metoxi, 4-hidroxi-cinâmico) e ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxi-cinâmico).

É reconhecido que os CGAs desempenham um importante papel na adaptação vegetal a diferentes formas de estresse, com indicações de que esses compostos podem ter funções fisiológicas específicas em plantas de grande interesse econômico das famílias Rubiaceae e Asteraceae, consistente com os altos níveis usualmente encontrados nestas plantas, dentre elas, o café (Perrone *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2009).

1.3. O café

O café pertence ao gênero *Coffea* (família Rubiaceae), que compreende 100 espécies descritas. Dentre essas, *C. arabica*, considerada o padrão de qualidade na avaliação da bebida do

café, corresponde à espécie de maior expressão econômica no mercado internacional, representando 70% da produção mundial do grão. No Brasil, suas variedades comerciais formam 80% do café cultivado, sendo as principais encontradas: *C. arabica* cv. Mundo Novo, *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho e *C. arabica* cv. Bourbon (Lunz, 2006; Perrone *et al.*, 2008).

Considerado uma bebida aromática de consumo disseminado pelo mundo e com grande importância econômica, o café tornou-se um dos principais produtos de exportação de cerca de 40 países em desenvolvimento (Fujioka & Shibamoto, 2008). No mercado mundial, o café aparece como a segunda *commodity* de maior importância, superado apenas pelo petróleo em termos de dólares comercializados. Porém, devido ao excesso de produção e oferta nas últimas três décadas, o produto vem observando uma redução do preço no mercado mundial, sendo necessário investir na melhoria da qualidade do produto, a fim de atrelar-lhe valor (Naidu *et al.*, 2008).

O sabor e o aroma, principais indicadores da qualidade do café, variam amplamente, dependendo da variedade do grão, da região de origem, da altitude onde foi plantado, do solo e do método de colheita. Algumas substâncias presentes no grão de café antes da torragem contribuem para determinar a qualidade do produto final, sendo elas: açúcares, aminoácidos, peptídeos, ácidos clorogênicos, ácidos orgânicos, lipídeos, entre outros (Feldman *et al.*, 1969; Montavon *et al.*, 2008).

Quantitativamente, os CGA são importantes constituintes dos grãos de café, podendo representar de 5 a 7,5% da massa seca do grão de *C. arabica* (Montavon *et al.*, 2008). Farah *et al.* (2006) mencionam que é reconhecida a importância dos CGA para a pigmentação do café, formação do aroma e sua adstringência. Ainda, segundo os autores, a degradação térmica dos CGA durante a torragem promove o surgimento de substâncias fenólicas que contribuem para o amargor da bebida. Nos primeiros estágios da torragem, ocorre isomerização, acompanhada de

hidrólise parcial, produzindo ácido quínico e derivados do ácido cinâmico. Os cinamatos liberados podem ser descarboxilados e degradados, produzindo fenóis simples e outros compostos. Também podem ser formadas lactonas, referidas como clorogeno-lactonas (Geromel *et al.*, 2006). O ácido quínico liberado epimeriza fortemente, formando cerca de oito isômeros, os quais podem vir a representar até 1% do grão torrado. As lactonas são rapidamente hidrolisadas durante o preparo da bebida do café, formando compostos correlacionados com sabor indesejável na bebida (Clifford *et al.*, 2008).

Tendo-se em vista a enorme quantidade de CGA encontrados em grãos de café antes da torragem e as transformações químicas que este processo promove em tais ésteres, a avaliação desses compostos nos grãos de café pode servir como um referencial para a caracterização da bebida, contribuindo para ampliar o conhecimento sobre os fatores que influenciam a qualidade da bebida do café (Feldman *et al.*, 1969).

2. JUSTIFICATIVA

O glyphosate é mundialmente utilizado para o controle de plantas daninhas (Santos *et al.*, 2007; Cedergreen & Olesen, 2010). Condizente com esta grande popularidade do glyphosate, inúmeros estudos acerca das respostas bioquímicas, anatômicas e ecológicas de diversas espécies e comunidades vegetais, quando expostas ao herbicida, podem ser encontradas na literatura (Bervald, 2006; Gravena, 2006; Moldes *et al.*, 2008). Entretanto, apesar dos muitos estudos sobre o controle de plantas daninhas com glyphosate na cultura do café, há poucos estudos relacionando seu efeito direto na planta, que pode se contaminar pela deriva. Dada a enorme importância que o café possui na economia mundial, sobretudo no Brasil e o emprego de glyphosate na cultura do café, conclui-se que se fazem necessários estudos que avaliem as

respostas fisiológicas e bioquímicas de cafeeiros expostos a diferentes formas de aplicação do herbicida glyphosate.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar o comportamento fisiológico e bioquímico de folhas e frutos de café expostos a doses mínimas do herbicida glyphosate, em uma condição de deriva simulada. Para tanto, os objetivos específicos foram:

- a) Avaliar se mudas de *C. arabica* cv. Mundo Novo respondem a glyphosate em doses de deriva simulada, avaliando o conteúdo de chiquimato e de compostos fenólicos totais solúveis;
- b) Identificar os compostos fenólicos que mais respondem ao tratamento com o herbicida;
- c) Avaliar se há alterações no conteúdo de pigmentos foliares, bem como nas trocas gasosas em plantas expostas ao herbicida;
- d) Avaliar se frutos de café, próximos a folhas expostas ao glyphosate, respondem ao herbicida, quantificando os níveis de chiquimato;
- e) Determinar alterações em compostos dos frutos com valor econômico para a bebida do café (ácidos orgânicos, açúcares, compostos fenólicos totais solúveis, cafeína, aminoácidos e proteínas).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal e solos de cultivo

Mudas de café (*C. arabica* cv. Mundo Novo; IAC 376-4) com quatro pares foliares completamente expandidas foram cedidas pela Dra. Maria Bernadete Silvarolla, do Centro de Café Alcides Carvalho, Instituto Agronômico de Campinas (IAC), e plantadas em vasos de 750 ml, contendo três diferentes substratos livres de herbicidas: solo argiloso, coletado na própria Unicamp (“terra”); solo arenoso (“areia”), preparado segundo a proporção de 1:1 (v/v) de areia : matéria orgânica; e solo rico em matéria orgânica (“M.O.”), segundo a proporção 1:3 (v/v) de argila : matéria orgânica. A matéria orgânica foi comprada no comércio local, sendo caracterizada como turfa acrescida de esterco de porco.

As análises das propriedades físico-químicas desses substratos (Tabelas 1 e 2) foram realizadas pelo Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Solos e Recursos Ambientais do IAC a partir de três amostras coletadas de cada substrato, imediatamente antes do plantio das mudas de café.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas dos solos utilizados nos ensaios 1 e 2. Valores médios obtidos a partir de três replicatas.

Substrato	Conteúdo de argila	Conteúdo de silte	Conteúdo de areia total	M.O.	pH (CaCl ₂)	CTC
	----- (g/kg) -----			(g/dm ³)		(mmol/dm ³)
terra	468,0	108,3	423,3	19,7	4,6	64,6
areia	46,0	50,3	904,0	21,0	5,7	38,7
M.O.	437,7	136,0	426,3	64,0	5,5	107,7

Tabela 2. Propriedades físicas e químicas dos solos utilizados nos E1 e E2. Valores médios obtidos a partir de três replicatas.

Amostra	Ca	Mg	K	Fe	Mn	Zn	Cu	P
	-----($\text{mmol}_e/\text{dm}_3$)-----			-----(mg/dm_3)-----				
terra	23,3	4,0	1,7	12,3	4,2	0,5	4,2	5,7
areia	18,3	6,7	2,9	44,3	3,5	1,3	0,6	46,0
M.O.	50,7	20,0	7,3	112,7	6,0	2,2	3,3	73,3

Os vasos foram transferidos para casa de vegetação, sendo irrigados diariamente com água de torneira e, a cada sete dias, com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), por um mês.

Para o terceiro ensaio, foram utilizadas plantas adultas (com idade de aproximadamente 8 anos) de *C. arabica* cv. Catuaí Vermelho, mantidas na Casa de Vegetação do Departamento de Biologia Vegetal do Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas – SP em solo argiloso, denominado “terra”, conforme já mencionado. Deve-se observar que estas plantas já apresentavam frutos em desenvolvimento, com 130 dias contados a partir da data de floração, quando se iniciou este ensaio. A quantidade de plantas daninhas na região próxima a estes cafeeiros foi controlada através de capina manual, sem que fosse utilizado qualquer herbicida.

4.2. Tratamentos

Os tratamentos com as mudas de café iniciaram-se decorrido um mês do seu plantio. Nestes, foi utilizado o herbicida *Roundup Ultra* (Monsanto Company[®], USA). Foram utilizadas três doses simulando uma condição de deriva, correspondentes a 0,5%, 5% e 25% da máxima recomendada pelo fabricante, equivalentes a 7,2; 72 e 360 g/ha, respectivamente, além da dose controle, sem aplicação do herbicida. Estas doses foram designadas como doses 0 (controle), I, II

e III, respectivamente. Deve-se ressaltar que tais doses foram escolhidas a partir de valores médios encontrados na literatura. Foram feitos dois ensaio (E1 e E2):

(E1) aplicação da solução herbicida sobre as folhas, com um pulverizador manual, sem que fosse permitida a aplicação em excesso, ou seja, a formação e queda de gotas de herbicida sobre as folhas. Também se evitou o contato do glyphosate com o solo, cobrindo-o com uma folha plástica e circundando o caule da muda de café;

(E2) aplicação direta, via solo, com um total de 150 ml de solução herbicida por vaso, nas concentrações descritas acima, sem que fosse permitido o contato da solução com a parte aérea da planta. Foi permitido que o excesso da solução de glyphosate drenasse do vaso. Deve-se observar que a solução herbicida foi aplicada no solo somente 30 dias após a transferência das mudas para os diferentes substratos.

Para os E1 e E2, foram avaliadas as respostas das plantas ao herbicida com cinco e 15 dias após a aplicação do herbicida (DAA). Folhas do segundo par de cada muda foram analisadas quanto às suas respostas de trocas gasosas e, imediatamente, coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer a -40°C até as análises bioquímicas.

Para o terceiro ensaio (E3), com plantas adultas de café, ramos contendo uma quantidade semelhante de frutos foram selecionados e isolados com sacos plásticos. Em seguida, suas folhas apicais foram pulverizadas com soluções de glyphosate contendo 0 (controle), 1,42 (72 g/ha) e 7,10 mM (360 g/ha), tratamentos I e II, respectivamente. Da mesma forma como no E1, utilizou-se um pulverizador manual, sem que fosse permitida a aplicação em excesso. Foram utilizadas três plantas (cada uma representando um grupo experimental) e, nestas, três ramos foram isolados para o tratamento. Cerca de dez frutos foram coletados de cada ramo imediatamente antes da aplicação do herbicida (dia 0) e com cinco, 15, 30, 60 e 90 DAA. Deve-se destacar que os frutos da planta “controle” amadureceram aos 90 dias do início do tratamento. Para os tratamentos com

glyphosate, este amadurecimento ocorreu 15 dias mais tarde, ou seja, com 105 DAA, sendo coletados apenas frutos dos grupos tratamento após este tempo. Durante o período de experimento, observou-se que uma maior queda de frutos dos ramos expostos ao herbicida, mas esta queda não foi quantificada neste experimento.

Os frutos coletados neste ensaio foram divididos aleatoriamente em dois grupos com cinco frutos cada: o primeiro teve sua massa fresca total medida separadamente com o auxílio de uma balança analítica. O segundo grupo teve o seu endosperma separado segundo Castro & Marraccini (2006) com o auxílio de um bisturi, medindo-se sua massa separadamente com o auxílio de uma balança analítica. Por fim, avaliou-se o parâmetro “massa fresca da casca”, obtido ao se subtrair a massa fresca do endosperma da massa fresca total do fruto.

Em seguida, os frutos do primeiro grupo foram congelados em nitrogênio líquido e imediatamente armazenados em freezer a -40°C até as análises bioquímicas.

4.3. Avaliações

4.3.1. Medidas de trocas gasosas

Taxa fotossintética (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs) foram determinadas com um analisador portátil de gases por radiação infravermelha (IRGA; ADC modelo LCpro⁺, da Analytical Development Co. Ltd, Hoddesdon, UK). Estas análises foram realizadas dentro da estufa, no período das 8h às 12h. A densidade de fluxo de fótons fotossintéticos (DFFF) nas medidas tomadas foi mantida a $1150 \mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$, correspondente ao valor médio obtido em três dias consecutivos de pleno sol, anteriores aos dias das análises.

4.3.2. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a quantificação de clorofilas (a e b) e de carotenóides totais, 10 mg do material foliar foram triturados com a ajuda de nitrogênio líquido e extraídos em etanol a 96%, a 4°C, protegidos

da luz, por 24 horas (Torres *et al.*, 2006). As amostras foram centrifugadas e, a partir de alíquotas do sobrenadante, foram lidas as absorbâncias a 470, 649 e 665 nm em um espectrofotômetro UV-VIS (Shimazu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). As concentrações de clorofilas e carotenóides totais foram determinadas segundo equações descritas por Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$[\text{Clorofila } a] = \alpha = (13,95 \times \text{Abs}_{665}) - (6,88 \times \text{Abs}_{649})$$

$$[\text{Clorofila } b] = \beta = (24,96 \times \text{Abs}_{649}) - (7,32 \times \text{Abs}_{665})$$

$$[\text{Carotenóides totais}] = [(1000 \times \text{Abs}_{470}) - (2,05 \times \alpha) - (114,8 \times \beta)]/245$$

4.3.3. *Quantificação de chiquimato*

As concentrações de chiquimato foram determinadas segundo Gravena (2006). Para obtenção do extrato, uma amostra de 100 mg de material liofilizado foi triturada em almofariz com 2 mL de tampão HCl 0,25 N. O extrato foi centrifugado a 12.000 xG durante 30 minutos e o sobrenadante recuperado para a determinação do chiquimato pelo método modificado de Gaitonde & Gordon (1958). Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi adicionada a 180 µL de água e, então, misturada a 500 µL de uma solução de ácido periódico (HIO₄) a 1% para oxidar o chiquimato. Após 3 horas, a amostra foi misturada com 500 µL de NaOH 1 N, seguida de 300 µL de glicina 0,1 M para imediata leitura da absorbância em 380 nm em espectrofotômetro. A concentração de chiquimato foi obtida a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas de chiquimato, calculada para o intervalo de concentração de 0,25 a 1,00 mM.

4.3.4. *Quantificação do total de compostos fenólicos solúveis*

O conteúdo total de compostos fenólicos solúveis foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu segundo alterações descritas por Tabata *et al.* (2008), utilizando-se ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA; Sigma) como padrão. As amostras (1g) foram submetidas a nitrogênio líquido, trituradas, adicionando-se 100 mL de metanol aquoso a 70% (v/v) para a extração. Em

seguida, o material foi filtrado através de papel filtro Whatman N°. 1. Do material filtrado, 80 µL foram diluídos em 320 µL água destilada, a fim de que a leitura final da absorbância estivesse dentro da faixa observada para a curva padrão. Então, 80 microlitros desta solução foram misturados com 80 µL de reagente de Folin-Ciocalteu e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. 80 µL de Na₂CO₃ a 10% (w/v) foram misturados à solução, mantendo-a em repouso por 1 hora em temperatura ambiente. A absorbância em 650 nm foi medida em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido chiquímico (Sigma), utilizando-se uma curva padrão calculada para o intervalo de concentração de 0,5 a 2,0 mM.

4.3.5. *Análises de ácidos clorogênicos em amostras de folhas dos Ensaios 1 e 2*

A partir dos extratos metanólicos utilizados para a quantificação de compostos fenólicos totais solúveis, iniciou-se a separação e quantificação de ácidos clorogênicos por cromatografia líquida de ultra-eficiência associada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (UPLC-ESI-MS/MS).

Para cada análise cromatográfica, 5 µL amostra foram injetados e utilizou-se uma coluna Acquity UPLC BEH C18, com partícula de 1,7 µm e tamanho de 2,1 x 5 mm (Waters, Manchester, U.K.). As fases móveis foram compostas de (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila, segundo o gradiente de: 0 a 6 min – 2% de B; 6,1 a 6,5 min – 35% de B; 6,5 a 7 min – 100% de B, 7 a 8 min – 100% de B, perfazendo um total de 8 minutos de análise.

Os espectros de massas foram adquiridos utilizando-se um espectrômetro de massa com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS) acoplado ao UPLC. O equipamento utilizado foi um duplo Quadrupolo TQD da Waters (Waters, Manchester, U.K.), sendo a análise realizada em

modo negativo. A voltagem do capilar foi de 3,5 kV e a do cone de 30 V. A temperatura na fonte foi de 300 °C. Programou-se o equipamento para que selecionasse íons específicos (*Selected Ion Monitoring* ou SIR), com relações massa/carga (m/z) de 191, 353, 421 e 289. Os dados obtidos foram capturados pelo software do equipamento, *MassLynx* 3.5. Análises multivariadas por componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando-se o mesmo software. Estas análises foram realizadas para selecionar as variáveis que melhor discriminavam os diferentes grupos tratamentos.

4.3.6. Análises de ácidos clorogênicos e cafeína em amostras de frutos do Ensaio 3

As quantificações de ácidos clorogênicos e cafeína de frutos de café foram realizadas a partir dos mesmo extratos metanólicos utilizados para a quantificação de compostos fenólicos totais solúveis. As análises em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; Shimadzu System, equipado com sistema de bombas LC-10 Ai e injetor automático) seguiram fielmente o método descrito por Clifford *et al.* (2008). Foram injetados 20 µl do extrato e a identificação ocorreu por comparação do tempo de retenção e com cromatogramas publicados do espectro de absorção (Clifford *et al.*, 2008). Nestas análises utilizou-se um detector de diodo operando entre 190 e 700 nm. A quantificação dos CGAs e de cafeína foi feita a partir de uma curva padrão calculada para os intervalos entre 0,5 a 2,0 mM de padrões (Sigma) de 5-CQA e cafeína, respectivamente.

4.3.7. Extração de açúcares e aminoácidos solúveis

A extração de açúcares e aminoácidos solúveis foi realizada segundo Benatti (2010), com algumas modificações. Cem miligramas de frutos liofilizados foram acondicionados em tubos de ensaio lacrados, contendo 5,0 mL de etanol 80%. Após a incubação em banho-maria a 100 °C, durante 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 6.000 xG por 10 minutos. Coletou-se o sobrenadante e o precipitado foi solubilizado novamente em 5,0 mL de etanol 80%, sendo re-

extraído como mencionado anteriormente por mais duas vezes. Uniram-se as três alíquotas coletadas, perfazendo um total de 15 mL de extrato bruto. Para as análises de açúcares solúveis em HPLC e aminoácidos solúveis por colorimetria, 1 mL de cada amostra teve o etanol evaporado e, em seguida, solubilizou-se o material seco em 1 mL de água destilada.

4.3.8. Quantificação de açúcares solúveis

As análises quantitativas de glicose, frutose e sacarose foram feitas em HPLC (Shimadzu System), equipado com sistema de bombas LC-10 Ai, injetor automático e detector eletroquímico (400 mV). A coluna utilizada foi uma Dionex CarboPacTM PA1 (4 x 250 mm), associada a uma pré-coluna Dionex CarboPacTM PA1 (4 x 50 mm). Injetou-se 5 µL de amostra. A fase móvel utilizada foi 30 mM de NaOH, com um fluxo utilizado de 1,2 mL/min, durante 15 minutos de corrida isocrática. As concentrações foram calculadas em comparação com curvas de calibração de padrões puros destes açúcares (Sigma).

4.3.9. Quantificação de aminoácidos totais solúveis

A dosagem de aminoácidos solúveis totais foi realizada segundo Cocking & Yemm (1954). Brevemente, a 0,1 mL do extrato, em presença de 1,0 mL de uma solução tamponada a pH 5,0 com 0,2 M de citrato, foi adicionado 1,0 mL de ninhidrina a 5% em metoxietanol. Em seguida, 1,0 mL de KCN 0,1 mM e 4,0 mL de água destilada foram adicionados à mistura. Após agitação em vórtex, os tubos lacrados foram mantidos em banho-maria a 90 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente e adicionou-se 1,0 mL de etanol. A imediata leitura da absorbância em 570 nm foi feita em espectrofotômetro UV-VIS. A concentração de aminoácidos solúveis totais foi calculada a partir de curva-padrão feita com leucina (Sigma).

4.3.10. Extração e quantificação de proteínas totais

Proteínas totais foram extraídas a partir de dez miligramas de frutos liofilizados, com 150 µL de solução contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 50 mM de dietilditiocarbamato de sódio

(DIECA) e uréia a 40 mM. A extração ocorreu por 20 minutos por agitação contínua, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado após centrifugação a 14.000 xG, por 10 minutos. Ao precipitado, adicionou-se novamente 150 µL de solução de extração, repetindo-se o procedimento descrito. Este procedimento foi repetido por mais uma vez, sempre unindo as alíquotas do sobrenadante coletado, perfazendo um total de 450 µL. A concentração de proteínas totais foi determinada segundo ensaio de Bradford (1976), utilizando-se o reagente pronto da BioRad, com absorbância lida em 595 nm por espectrofotômetro. Utilizou-se albumina sérica bovina (Sigma) para a construção da curva-padrão.

4.4. Análises dos dados

Os dados foram submetidos à análise de variância, considerando-se os efeitos da dose do herbicida, dia após aplicação e forma de contato com o glyphosate (via pulverização ou via solo). Para cada análise, foram tomadas três repetições estatísticas (cinco para as análises de trocas gasosas e pigmentos foliares e cinco para as análises do ensaio 3) e as medidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Realizaram-se, também, análises de correlação entre os parâmetros avaliados, bem como a análise de variância de dois fatores (*Two Way Anova*), em um esquema de 3 x 2 (solo x dia de coleta), a fim de se avaliar o impacto dos diferentes dias de coleta e dos tratamentos sobre os dados. Para estas análises, utilizou-se o programa GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (Microsoft®), GraphPad® Software, San Diego, California, USA.

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio 1 – aplicação do herbicida via foliar

De acordo com a Figura 1A, pode-se observar que as folhas tratadas com glyphosate apresentaram um aumento dos níveis de chiquimato, proporcional à dose à qual foram expostas. Este aumento permaneceu após 15 dias ($P_{\text{médio}} = 0,0025$), embora menos intenso. Análises estatísticas confirmaram a diferença entre as respostas a cada dose do herbicida em relação à dose controle, tanto para o quinto dia, como para o 15º ($P < 0,0001$ e $P = 0,0004$, respectivamente). Porém, segundo a Figura 1B, observa-se que não houve diferenças significativas para os níveis de fenóis totais entre o controle e os grupos tratamentos, após cinco e 15 dias decorridos da exposição ao herbicida, exceto o grupo exposto à menor dose do herbicida (a dose I), que diferiu significativamente do grupo controle ($P < 0,0001$) com 15 DAA.

A análise qualitativa dos compostos fenólicos de folhas do Ensaio 1 revelaram quatro substâncias mais susceptíveis à exposição ao tratamento. Tais compostos, com m/z de 191, 353, 421 e 289, correspondem ao ácido quínico (Figura 1C), 5-CQA (Figura 1D), quercitina (Figura 1E) e catequina (Figura 1F), respectivamente (Sanoner *et al.*, 1999; Clifford *et al.*, 2003; Sánchez-Rabaneda *et al.*, 2008; Amorim *et al.*, 2009). De forma oposta aos fenóis totais solúveis, análises estatísticas revelaram haver diferenças significativas entre os tratamentos impostos, seja entre amostras coletadas no mesmo dia ou entre dias diferentes ($P_{\text{médio}} < 0,0001$), para cada composto analisado individualmente. No entanto, para 5-CQA, não puderam ser observadas diferenças significativas ($P = 0,2894$) entre as doses analisadas e coletadas apenas no quinto dia após a aplicação do herbicida, embora esta diferença haja com 15 DAA ($P = 0,0475$).

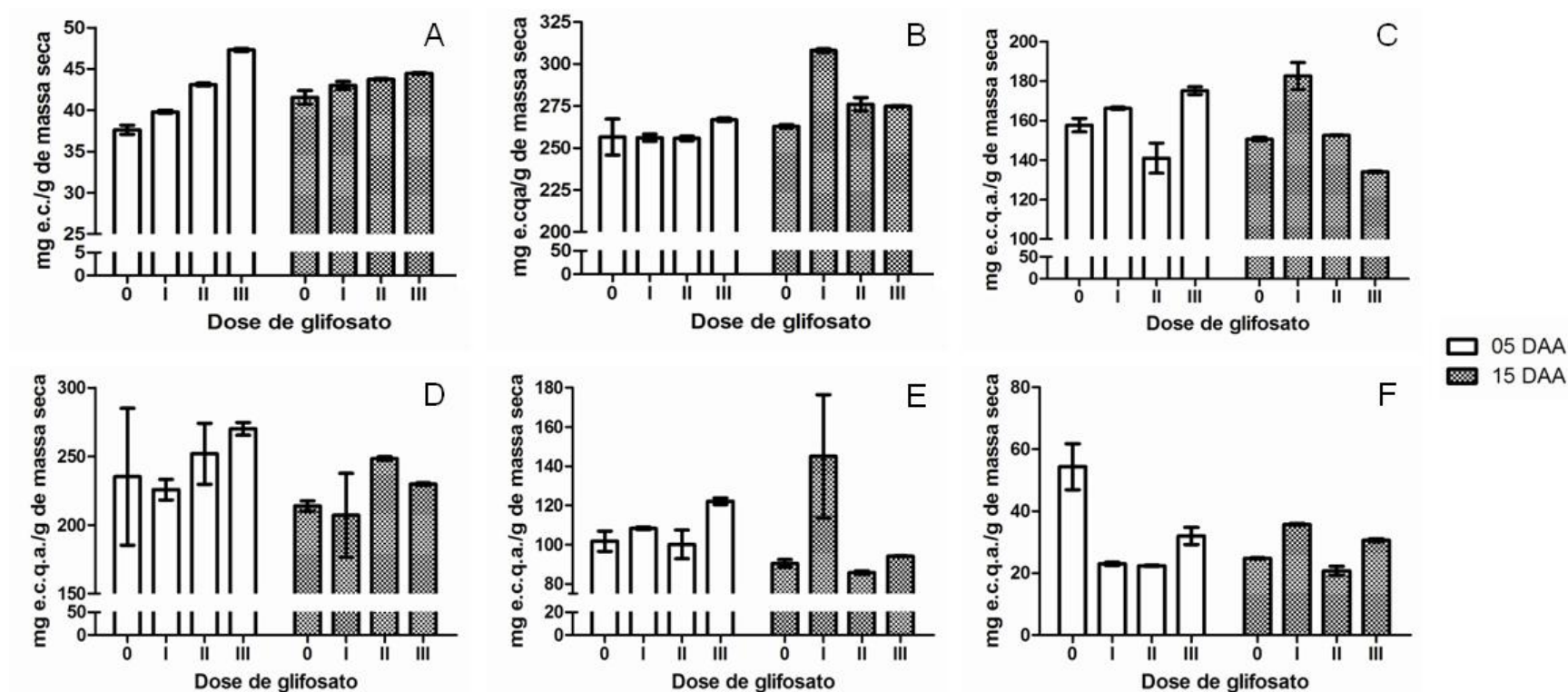


Figura 1. Conteúdo de (a) chiquimato; (b) compostos fenólicos totais solúveis; (c) ácido quínico; (d) ácido 5-cafeoilquínico; (e) quercitina e (f) catequina em folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente), coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Cada composto está expresso segundo seu padrão. Valores médios obtidos a partir de três repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Pode-se observar, nas Figuras 2A e 2B, que a exposição ao herbicida alterou significativamente o conteúdo de clorofilas (clorofilas *a* e *b*) e carotenóides totais após cinco e quinze dias de tratamento ($P < 0,0001$ para ambos os parâmetros, em cada intervalo de tempo). De maneira geral, pode-se destacar uma resposta de aumento nos níveis dos pigmentos foliares à medida que se aumenta a dose de glyphosate à qual as folhas são expostas. Da mesma forma, o contato foliar com diferentes doses de glyphosate afetou a taxa fotossintética (Figura 2C), bem como a relação entre esta taxa e o conteúdo de clorofilas totais (Figura 2D). Entretanto, a forma de resposta variou entre o 5º e o 15º DAA. Após cinco dias de exposição ao herbicida, pode-se verificar uma tendência significativa de redução de ambos os parâmetros mencionados ($P < 0,0001$ para os dois casos); com 15 DAA observa-se um aumento, mas significativo, da taxa fotossintética ($P = 0,0048$) e da relação desta taxa pela quantidade de clorofilas totais ($P = 0,0287$) unicamente nas folhas expostas às doses intermediárias (ou seja, I e II ou 0,5% e 5% daquela recomendada, respectivamente).

Embora as folhas não apresentem diferença significativa quanto à taxa de transpiração (Figura 2E) com cinco dias ($P = 0,4947$), observa-se um importante aumento aos 15 DAA ($P < 0,0001$), somente em folhas expostas à maior dose testada (III). De forma semelhante, este aumento é observado na condutância estomática (Figura 2F) de folhas expostas ao herbicida tendo decorridos 15 dias ($P = 0,0047$) da aplicação, embora não haja uma alteração pronunciada como houve para a taxa de transpiração. Ainda, em relação a este parâmetro, observa-se uma clara tendência à queda em resposta ao glyphosate, embora esta seja pouco afetada pela quantidade do ingrediente ativo presente ($P = 0,0011$).

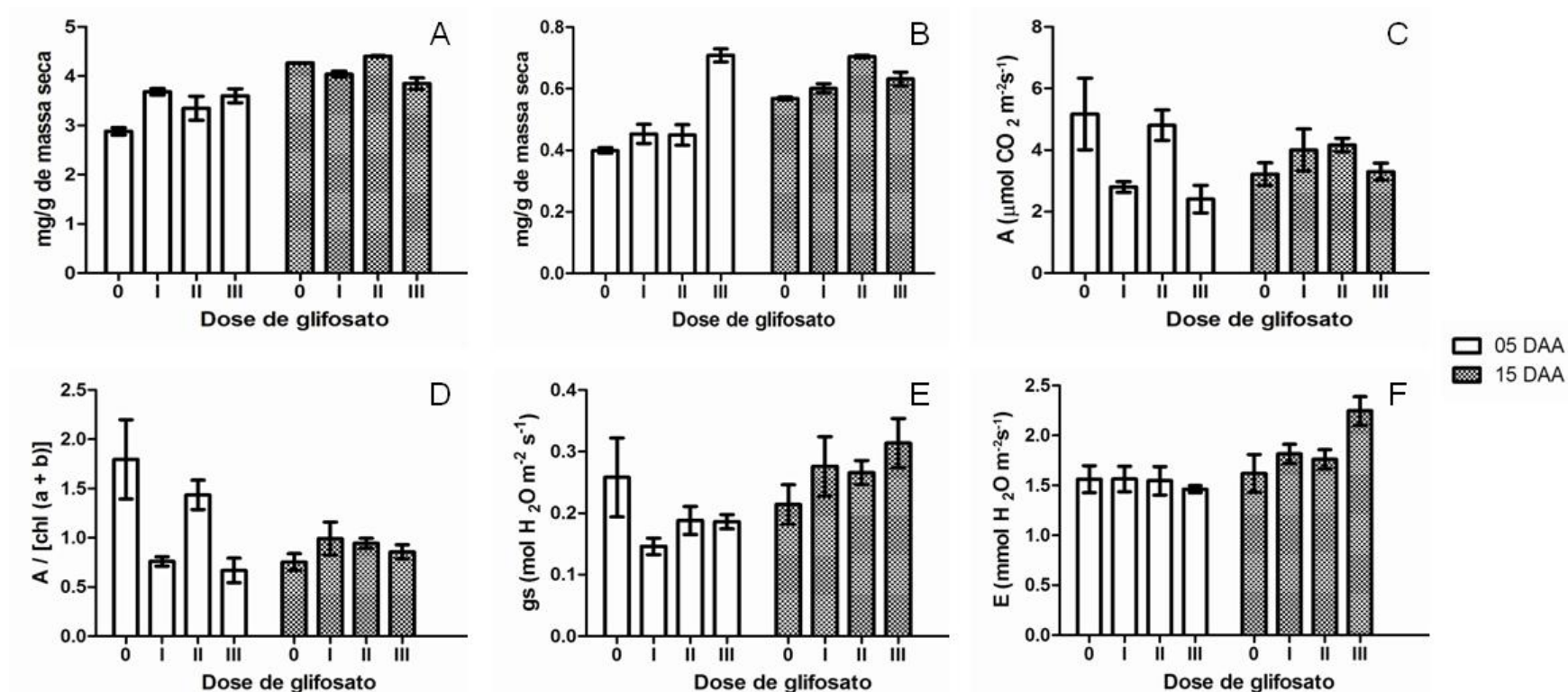


Figura 2. Conteúdo de (a) clorofilas *a* e *b*; (b) carotenóides totais; (c) taxa fotossintética; (d) relação entre a taxa fotossintética pelo conteúdo e clorofilas totais; (e) condutância estomática e (f) taxa de transpiração de folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente), coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

5.2. Ensaio 2 – aplicação do herbicida via três diferentes tipos de solo

De maneira geral, não há diferenças em relação ao conteúdo de chiquimato (Figuras 3A, B e C) em folhas de cafeeiros mantidos nos três tipos de solo aqui estudados e que entraram com contato com o herbicida após a transferência para estes substratos. Observa-se que o seu conteúdo permanece relativamente estável, independente da dose, após cinco dias de exposição ao glyphosate. Já, aos 15 DAA a quantidade de chiquimato aumenta em folhas expostas a maiores doses do herbicida, para plantas de solo argiloso ($P = 0,0017$), arenoso ($P < 0,0001$) e M.O. ($P < 0,0001$). Em relação ao conteúdo de fenóis totais solúveis (Figuras 3 D, E e F), cafeeiros nos três solos demonstram uma redução em relação à dose controle com 5 DAA, menos evidente no solo M.O. (embora significativo, $P < 0,0001$) e mais observável nos solos argiloso e arenoso (ambos com $P < 0,0001$). Com 15 DAA, folhas de plantas cultivadas na terra e M.O. apresentam uma queda (ambos com $P < 0,0001$) dos níveis de fenóis totais solúveis, embora pouco menor que 5 DAA. Em plantas de solo arenoso, todavia, observa-se um aumento dos níveis destes compostos em relação à dose controle, independente da concentração de glyphosate a que tiveram contato tendo decorrido 15 dias da aplicação ($P < 0,0001$).

O mesmo comportamento observado para os níveis de compostos fenólicos totais solúveis pode ser observado na quantidade de cada composto analisado por UPLC-MS.

Dessa forma, observa-se uma queda mais acentuada dos níveis de ácido quínico (Figuras 4A, B e C), 5-CQA (Figuras 4D, E e F), quercitina (Figuras 4G, H e I) e catequina (Figuras 4J, K e L) em plantas expostas ao herbicida via solo argiloso e um pouco menos evidente para plantas mantidas em solo rico em matéria orgânica. Para estes dois grupos experimentais, embora a queda seja perceptível e significativa para o quinto dia após a aplicação do herbicida ($P_{\text{médio}} = 0,0001$ para solo argiloso e $P_{\text{médio}} = 0,0025$ para solo M.O.), é com 15 DAA que este comportamento pode ser observado de forma mais acentuada (ambos, com $P_{\text{médio}} < 0,0001$).

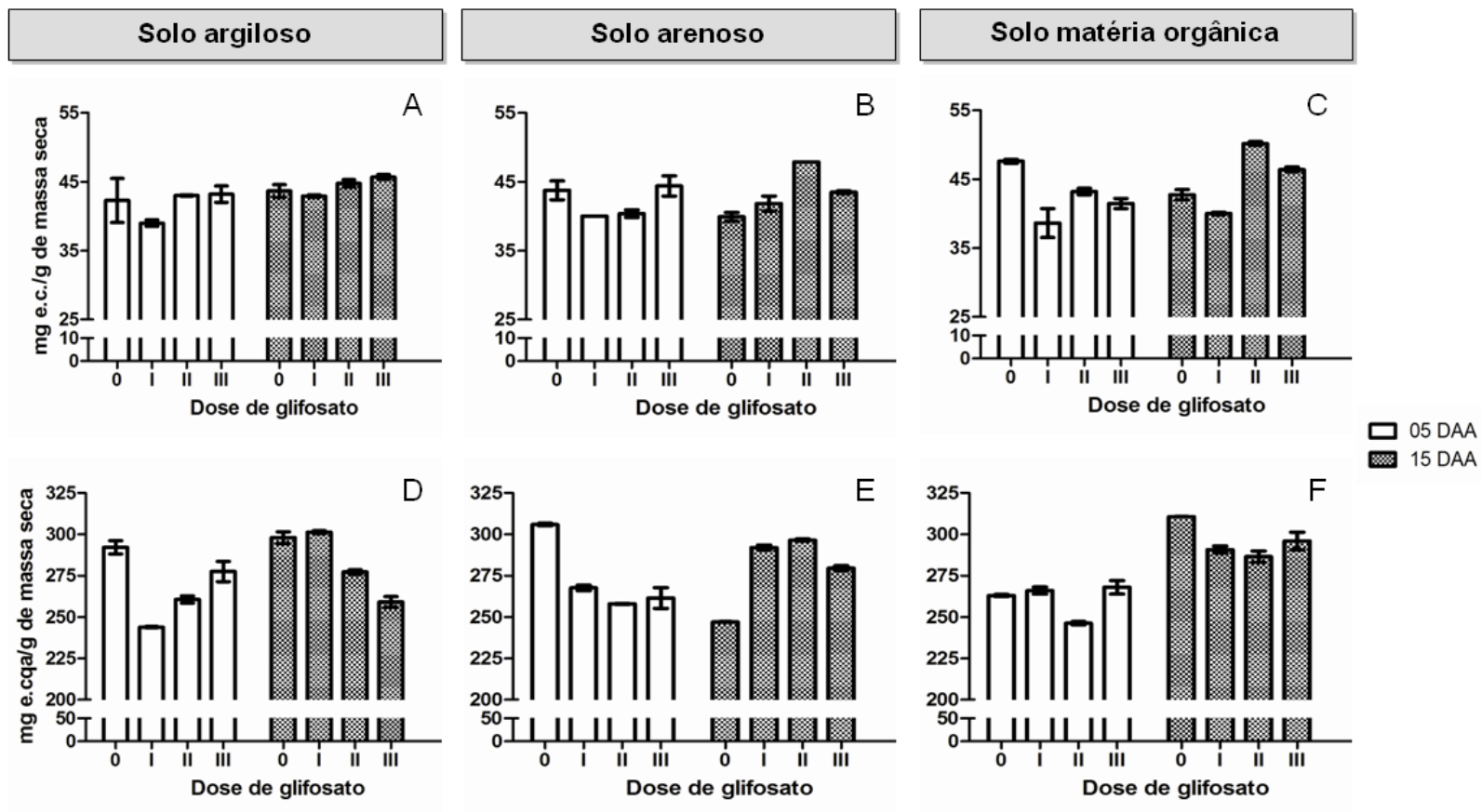


Figura 3. Conteúdo de (a; b; c) chiquimato e (d; e; f;) compostos fenólicos totais solúveis de folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente) via três substratos. As folhas foram coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Valores médios obtidos a partir de três repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Entretanto, deve-se destacar que para as plantas mantidas em solo arenoso esse comportamento apresentou algumas peculiaridades: com exceção da quercitina, os demais compostos apresentaram um pequeno aumento significativo ($P_{\text{médio}} = 0,0008$) dos seus níveis em plantas expostas às doses intermediárias do herbicida (7,2 e 7,2 g/ha) já no quinto dia após sua aplicação. Para as plantas, deste mesmo conjunto, expostas à maior dose de glyphosate (360 g/ha), ocorreu uma queda significativa ($P_{\text{médio}} = 0,0110$) dos níveis de todos os compostos analisados e, posteriormente, um aumento com 15 DAA, como observado para os níveis de fenóis totais deste grupo experimental.

Para os parâmetros fisiológicos, as plantas dos três solos tenderam a responder com um aumento significativo (todos com $P < 0,0001$) dos níveis dos pigmentos foliares (clorofilas *a* e *b*, Figuras 5A, B e C, além de carotenóides totais, Figuras 5D, E e F) a partir da sua exposição a diferentes doses de glyphosate. Estas respostas foram semelhantes, independentemente do período de análise após a aplicação do herbicida (ou seja, 5 DAA e 15 DAA).

A respeito da taxa fotossintética (Figuras 5G, H e I), bem como da relação entre esta taxa e a quantidade de clorofilas totais (Figuras 5J, K e L), as respostas diferiram quantitativamente entre plantas mantidas nos três diferentes substratos. De forma geral, pode-se observar que plantas de solo argiloso apresentaram maiores valores globais para a taxa fotossintética e a relação entre a fotossíntese pelo conteúdo de clorofilas foliares, quando comparada com plantas mantidas nos demais substratos. Para os três solos, embora seja observado, em alguns casos, que o efeito do herbicida parece não ser significativo (solo arenoso e M.O., para 5 DAA em ambos os casos; com $P = 0,0529$ e $P = 0,0550$, respectivamente), nos demais se observa uma clara tendência de redução da fotossíntese à medida que a planta entra em contato com o glyphosate (todos com $P < 0,05$). Esta tendência de dano provocado pelo herbicida torna-se evidente (todos com $P < 0,05$) e generalizada, independente do solo de cultivo ou do dia de coleta dos dados, ao se observar a redução da relação entre fotossíntese pelo conteúdo de clorofilas totais em plantas que entraram em contato com o herbicida.

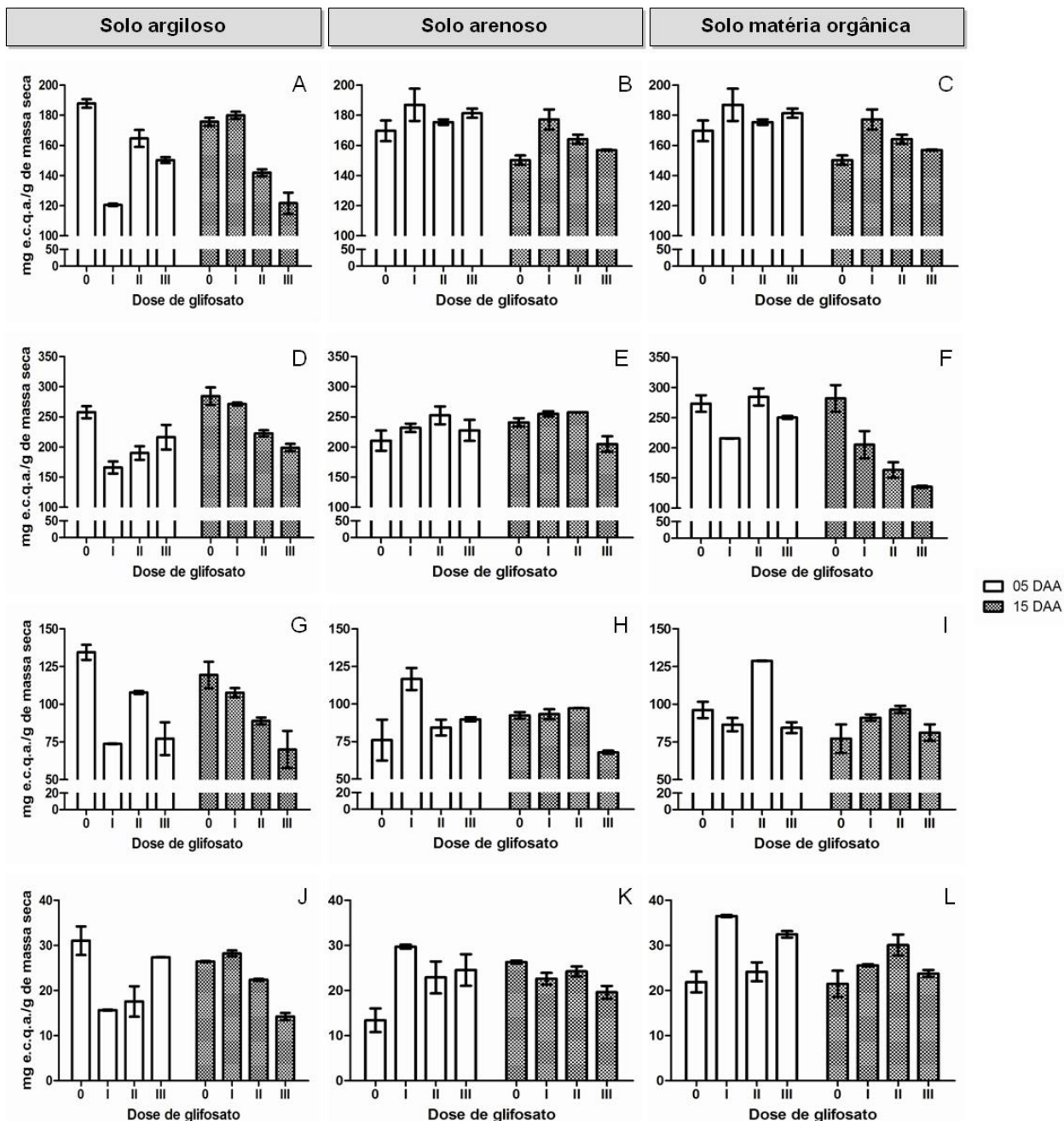


Figura 4. Conteúdo de (a; b; c) ácido quínico; (d; e; f;) 5-CQA; (g; h; i) quercitina e (j; k; l) catequina de folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente) via três substratos. As folhas foram coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Valores médios obtidos a partir de três repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

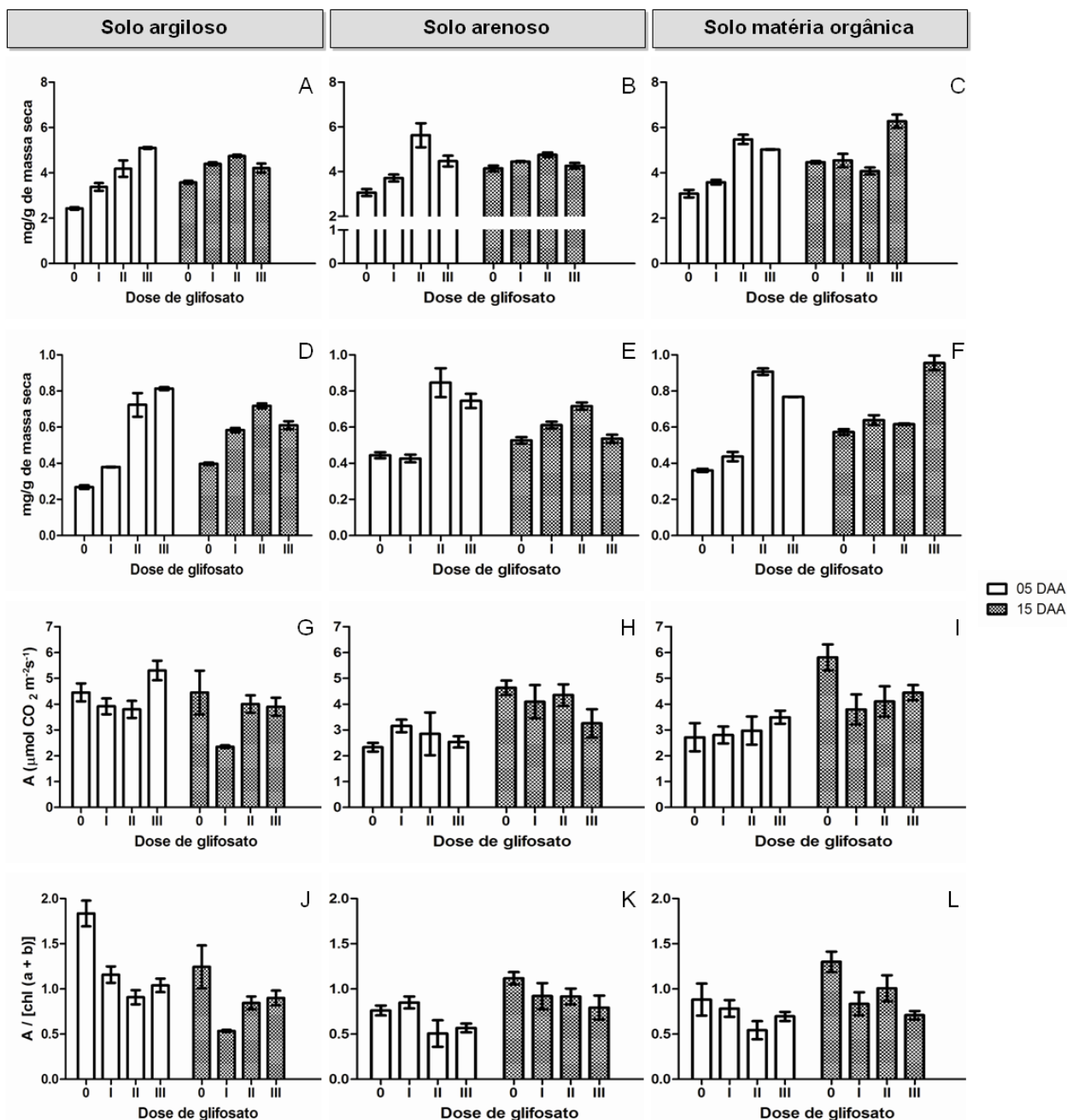


Figura 5. Conteúdo de (a; b; c) clorofilas *a* e *b*; (d; e; f;) carotenóides totais; (g; h; i) taxa fotossintética e (j; k; l) relação entre a taxa fotossintética pelo conteúdo e clorofilas totais de folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente) via três substratos. As folhas foram coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

Por fim, todas as plantas estudadas, independente do solo de cultivo ou do dia de coleta dos dados, apresentaram respostas de queda dos valores de condutância estomática (Figuras 6A, B e C) e taxa de transpiração (Figuras 6D, E e F). Embora essa queda possa não ser tão evidente, como no caso da condutância estomática medida em 5 DAA de plantas de solo arenoso, análises estatísticas garantiram haver diferenças significativas entre todas as respostas ($P < 0,05$).

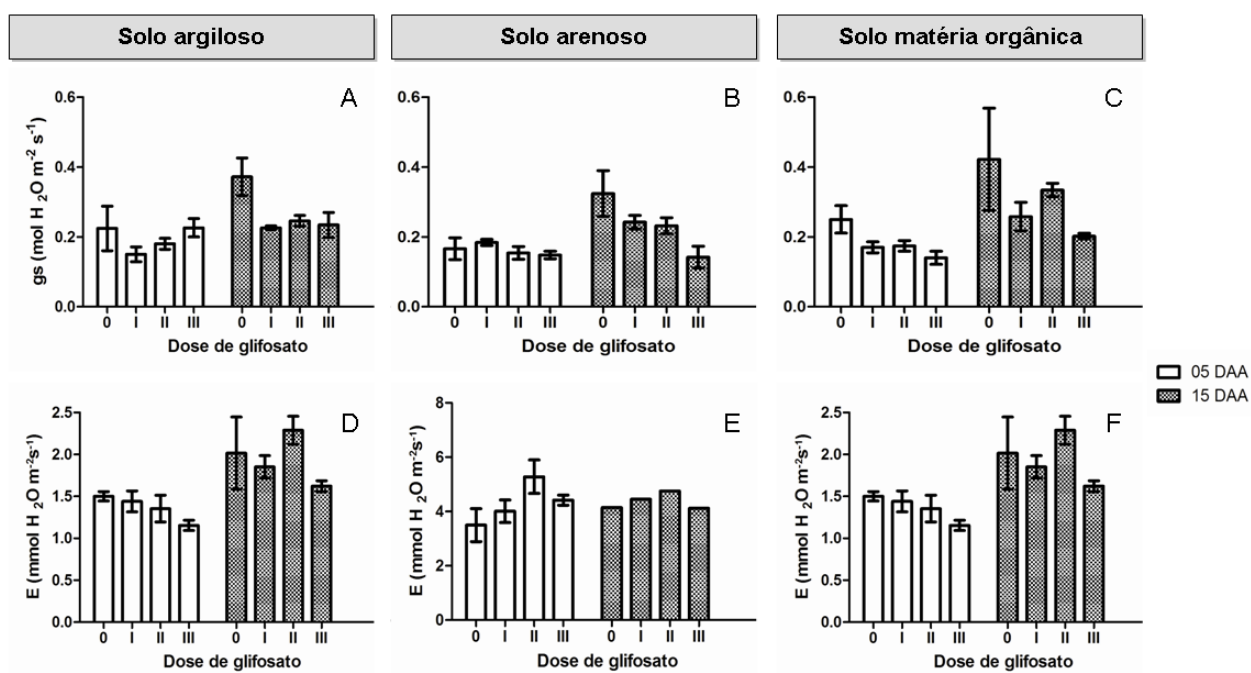


Figura 6. Taxas de (a; b; c) condutância estomática e (d; e; f;) transpiração de folhas de cafeeiro expostos a diferentes doses de glyphosate (0, I, II, III ou 0; 7,2; 7,2 e 360 g/ha, respectivamente) via três substratos. As folhas foram coletadas com 5 e 15 dias após a aplicação (DAA). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições. As barras de erro indicam o desvio padrão.

5.3. Ensaio 3 – aplicação do herbicida via foliar e seu impacto em frutos em desenvolvimento

Com exceção da massa fresca total do fruto ($P_{\text{médio}} = 0,3775$; Figura 7A), os demais parâmetros (massas frescas do endosperma, Figura 7B, e da casca, Figura 7C) apresentam

diferenças estatísticas entre cada dia analisado dentro dos grupos tratamentos e controle (todos com $P < 0,0001$). Também foram observadas diferenças nas massas frescas do endosperma e da casca entre os grupos tratamento e controle ao se avaliar os valores obtidos em cada dia de coleta ($P_{\text{médio}} = 0,0028$).

Conforme já mencionado em Material e Métodos, frutos do grupo controle amadureceram 90 dias após o início do tratamento; já, os dois grupos expostos ao herbicida atrasaram seu amadurecimento em 15 dias, motivo pelo qual sua última coleta é no dia 105 DAA. Neste dia, ambos os grupos não apresentam diferenças estatísticas para os valores de massa fresca total do fruto e do endosperma ($P = 0,7328$ e $P = 0,9361$, respectivamente).

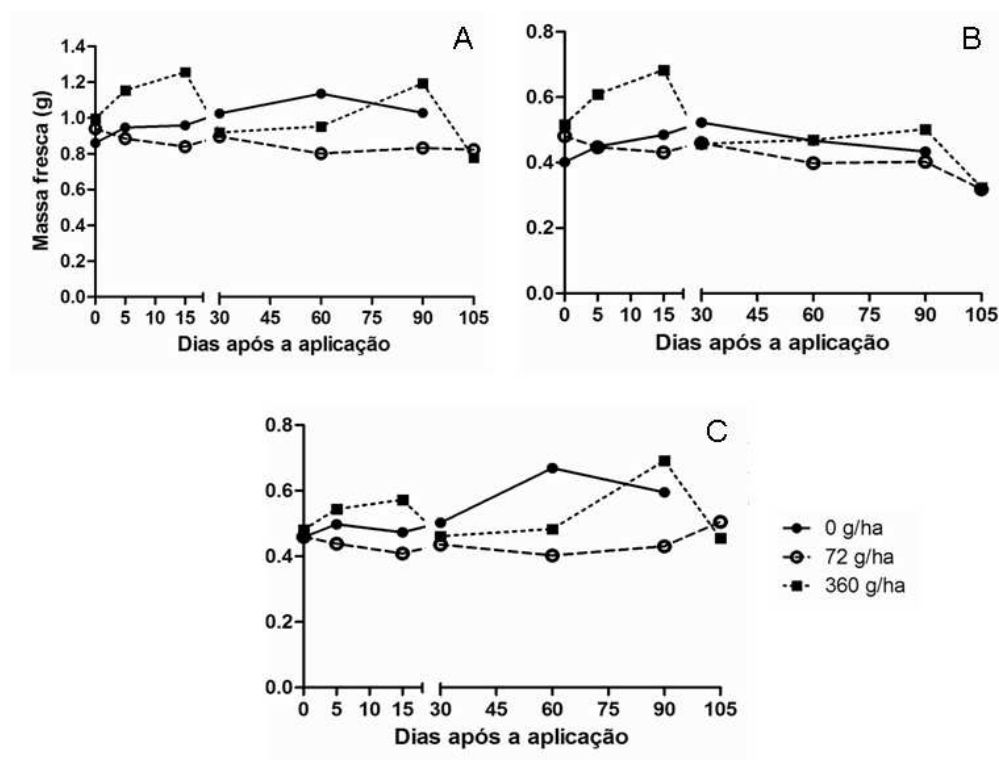


Figura 7. Massas frescas (a) total; (b) endosperma e (c) casca de frutos de café coletados em diferentes dias após a exposição a diferentes doses de glyphosate (0; 72 e 360 g/ha). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições.

Neste trabalho, identificou-se quatro ácidos orgânicos em frutos de café analisados no ensaio 3. São eles: ácidos cítrico (Figura 8A), málico (Figura 8B), succínico (Figura 8C) e fumárico (Figura 8D). Análises estatísticas revelam que todos os compostos analisados diferem entre os grupos controle e tratamentos até o 90º dia após a exposição ao glyphosate ($P_{\text{médio}} = 0,0050$). Com 105 DAA, os dois grupos tratamento diferiram apenas para os parâmetros ácido cítrico ($P < 0,0001$) e málico ($P = 0,0010$). De maneira geral, os grupos controle sempre apresentaram valores maiores de ácidos orgânicos quando comparados com os grupos tratamento. Este comportamento torna-se evidente ao se analisar as Figuras 9 D e E, com 15 DAA

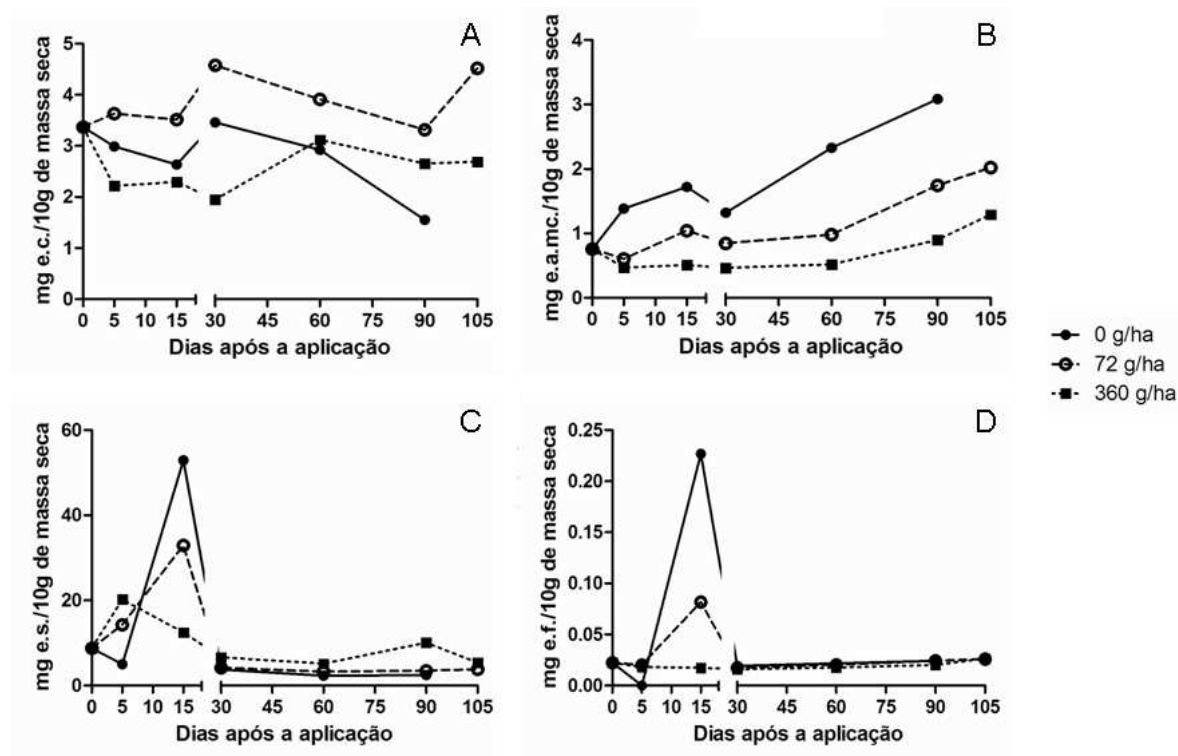


Figura 8. Conteúdo de ácidos (a) cítrico; (b) málico; (c) succínico e (d) fumárico de frutos inteiro de café coletados em diferentes dias após a exposição a diferentes doses de glyphosate (0; 72 e 360 g/ha). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições e expressos como equivalentes de padrões.

Embora difiram quantitativamente ($P_{\text{méd}} = 0,0084$), frutos dos grupos controle e tratamentos apresentam um comportamento semelhante para a quantidade de açúcares analisados até a completa maturação (Figura 9).

Os grupos tratamentos tenderam apresentar um valor acima daquele apresentado pelo grupo controle até 30 DAA para os conteúdos de glicose (Figura 9B) e frutose (Figura 9C). A partir deste dia, os conteúdos destes açúcares apresentaram-se menores nos grupos expostos ao herbicida. Já, a quantidade de sacarose (Figura 9A) sempre se apresentou menor nos grupos tratamentos em relação ao grupo controle até 90 DAA.

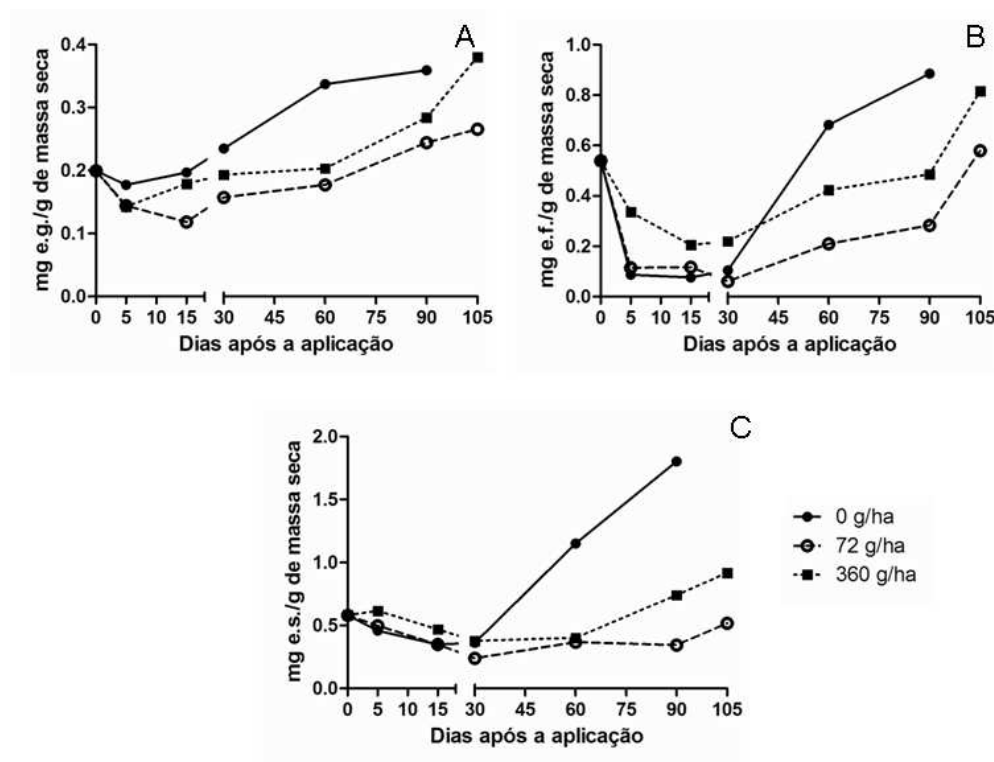


Figura 9. Conteúdo de (a) sacarose; (b) glicose e (c) frutose de frutos inteiro de café coletados em diferentes dias após a exposição a diferentes doses de glyphosate (0; 72 e 360 g/ha). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições e expressos como equivalentes de padrões.

A Figura 10 apresenta a resposta dos frutos de café expostos ao glyphosate para as variáveis chiquimato (Figura 10A), compostos fenólicos totais (Figura 10B), ácidos clorogênicos

(Figura 10C) e cafeína (Figura 10D). Para estas variáveis, todos os grupos diferiram, de forma estatística, entre si do quinto ao 90º DAA ($P_{\text{médio}} = 0,0002$). Tal diferença manteve-se significativa entre os dois grupos tratamento e para todas as variáveis mesmo com 105 dias após a exposição ao glyphosate ($P_{\text{médio}} = 0,0014$).

A respeito do comportamento destas variáveis, todas apresentaram um padrão semelhante de queda com a maturação. Geralmente os valores do grupo controle são inferiores aos dos demais grupos, independente do composto analisado.

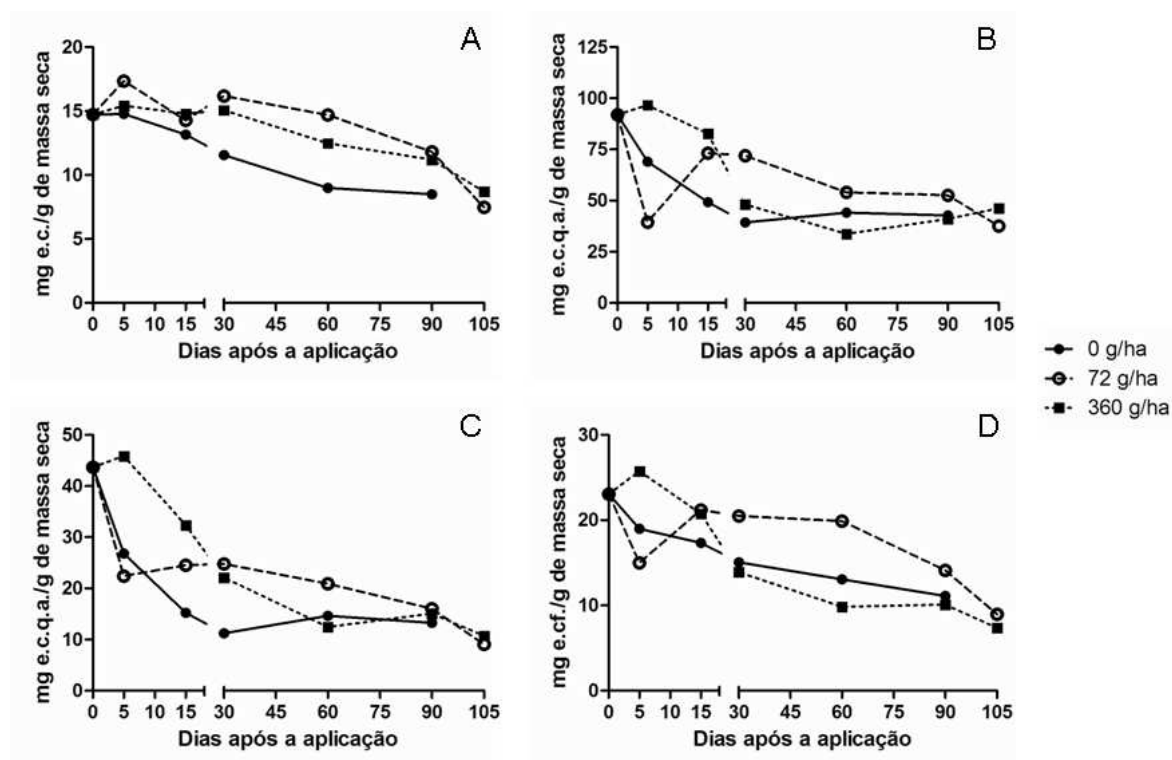


Figura 10. Conteúdo de (a) chiquimato; (b) compostos fenólicos totais solúveis; (c) ácidos clorogênicos e (d) cafeína de frutos inteiro de café coletados em diferentes dias após a exposição a diferentes doses de glyphosate (0; 72 e 360 g/ha). Valores médios obtidos a partir de cinco repetições e expressos como equivalentes de padrões.

Por fim, a Figura 11 apresenta o impacto que a pulverização do herbicida glyphosate em folhas apicais dos ramos exerce na quantidade de aminoácidos (Figura 11A) e proteínas (Figura 11B) totais solúveis de frutos em desenvolvimento. Os três grupos experimentais diferem significativamente entre si de 0 a 90 DAA e aos 105 DAA para os grupos tratamento, com um $P_{\text{médio}} = 0,0002$.

Mesmo dentro de um grupo experimental, esta diferença permanece significativa ($P_{\text{médio}} < 0,0001$) entre os diferentes dias, embora um padrão qualitativo na resposta não possa ser observado.

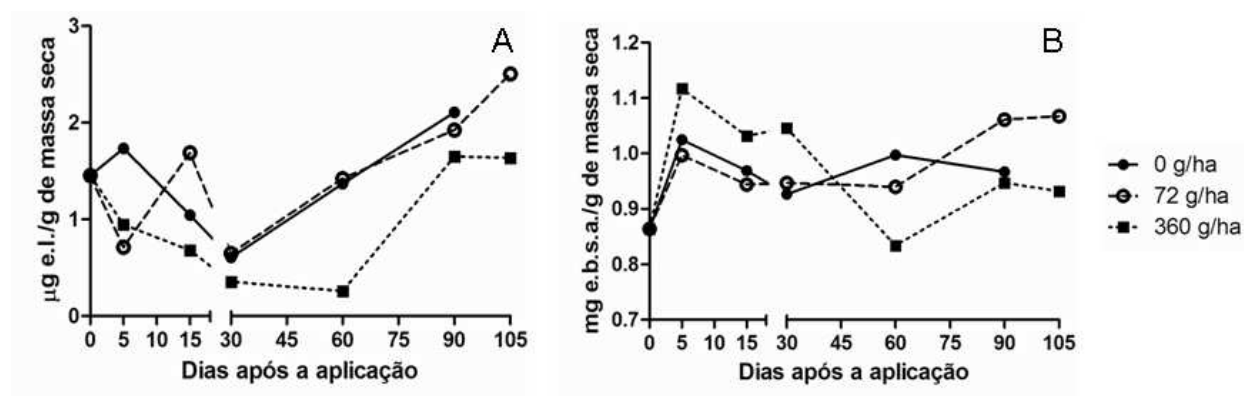


Figura 11. Conteúdo de (a) aminoácidos e (b) proteínas totais solúveis de frutos inteiro de café coletados em diferentes dias após a exposição a diferentes doses de glyphosate (0; 72 e 360 g/ha).

Valores médios obtidos a partir de cinco repetições e expressos como equivalentes de padrões.

6. DISCUSSÃO

6.1. Ação do herbicida glyphosate em folhas de café

Aproximadamente 20 % do carbono fixado pelas plantas são destinados para a rota do chiquimato, responsável por um grande número de produtos de grande valor biológico para as plantas. Cerca de 35 % da massa seca de um organismo vegetal deriva dessa via biossintética

(Bervald, 2006; Cedergreen & Olesen; 2010). Dessa forma, pode-se afirmar que o herbicida glyphosate consegue alterar importantes componentes da fisiologia vegetal. Neste trabalho, independentemente da forma de contato com o glyphosate, puderam ser observadas alterações nos níveis de chiquimato, compostos fenólicos totais solúveis ou, mesmo, em ambos. Conforme relatado por inúmeros autores (Eker *et al.*, 2006; Moldes *et al.*, 2008; Zobiole *et al.*, 2010a), estas alterações são esperadas em plantas submetidas a diferentes doses do herbicida, independente se isto se faz pela via foliar ou via raiz.

Embora comparações devam ser realizadas de forma cautelosa, tendo-se em vista a diferente quantidade de cada solução de herbicida à qual as plantas de café foram expostas nos ensaios 1 e 2, observa-se que aquelas submetidas à aplicação foliar (E1) apresentaram um maior aumento dos níveis de chiquimato em relação àquelas que foram expostas à aplicação via solo. Segundo Piccolo *et al.* (1996) e Tesfamariam *et al.* (2009), o glyphosate pode ser rapidamente inativado no solo ou, quando isto não ocorre, a interação deste composto com cátions polivalentes adsorvidos às partículas do solo tende a torná-lo menos disponível para as plantas em um primeiro momento.

De fato, parte do glyphosate que entra em contato com o solo pode interagir temporariamente com o material orgânico por ligações de hidrogênio, podendo ser liberado depois de algum tempo (Piccolo *et al.*, 1996). As análises de solo revelaram que os substratos utilizados em E2 apresentaram quantidades importantes de matéria orgânica, sobretudo o solo M.O. (Tabela 1).

Outro fator importante que pode ter contribuído para a resposta diferencial, agora entre os diferentes tipos de substrato de E2, é o fato de que a sorção do glyphosate no solo está relacionada com o conteúdo de argila, a capacidade de troca catiônica (CTC), a quantidade de fosfato e dos cátions Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} presentes nos solos (Glass, 1987; Piccolo *et al.*, 1996;

Gimsing *et al.*, 2002; Weidenhamer *et al.*, 2010). Individualmente, o fosfato é capaz de dessorver completamente o glyphosate das partículas de solo, provavelmente por ambos se adsorverem por mecanismos similares devido ao grupo ácido presente na molécula de glyphosate (Gimsing *et al.*, 2002). Assim, o fosfato pode contribuir para a potencial lixiviação do glyphosate do solo.

Observa-se que o solo M.O. é aquele que apresenta maior quantidade de fosfato. Porém, tanto as análises bioquímicas, como as fisiológicas, demonstram que plantas mantidas neste substrato também responderam ao glyphosate, sobretudo com o aumento das doses aplicadas, como pode ser observado nas Figuras 4, 5 e 6. Isto indica que a sorção do glyphosate em solos não é, provavelmente, dominada por apenas um único parâmetro, mas sim pela interação dos diferentes elementos que o compõe (Albers *et al.*, 2009). Também, variáveis como pH e a presença de cátions polivalentes, tais como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} , devem ser considerados (Glass, 1987; Al-Rajab *et al.*, 2008; Albers *et al.*, 2009). Neste trabalho, entretanto, o pH parece interferir pouco sobre os resultados observados, uma vez que os três solos são considerados levemente ácidos, o que poderia proporcionar uma maior sorção das moléculas do herbicida às partículas coloidais do solo (Al-Rajab *et al.*; 2008). Já, a quantidade dos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+} , bem como a CTC, apresenta-se em maiores valores justamente para o solo rico em matéria orgânica. Assim, pode-se supor que a maior quantidade de cátions polivalentes permite uma maior adsorção do glyphosate às partículas deste substrato (M.O.), tornando-o indisponível para a planta em um primeiro momento. Entretanto, como estas plantas foram mantidas em vasos e irrigadas diariamente, isto permitiu que a maior quantidade de fosfato também interagisse com as partículas coloidais e dessorvesse o herbicida, tornando-o disponível na solução de solo e, assim, para as plantas.

Neste trabalho, também se procurou avaliar o impacto que o herbicida glyphosate desempenha sobre compostos fenólicos específicos no café. A partir dos extratos metanólicos

utilizados para a quantificação de fenóis totais solúveis, pode-se identificar e quantificar os principais compostos desta classe por UPLC-MS. Dada a grande diversidade de compostos fenólicos, utilizou-se a Análise em Componentes Principais (ou *Principal Component Analysis* - PCA) para identificar os compostos fenólicos mais susceptíveis aos tratamentos impostos em E1 e E2. Segundo Conceição (2006), a PCA é utilizada para se obter uma visão geral dos dados, identificar agrupamentos e/ou amostras com comportamento anômalo e, também, para gerar variáveis que resumam as principais fontes de variação nos dados, podendo ser utilizada em análises subseqüentes. A partir da PCA, observou-se que o ácido quínico, 5-CQA, quercitina e catequina apresentavam um padrão característico e que melhor explicaria a diferença entre os tratamentos. Tais compostos são derivados da rota dos fenilpropanóides, com o ácido quínico como precursor comum de inúmeros compostos subseqüentes nesta via de biossíntese e, também, do ácido 5-cafeoilquínico, o principal CGA identificado em folhas e frutos de café (Clifford *et al.*, 2003; Mondolot *et al.*, 2006). Já, a quercitina e a catequina são considerados importantes flavonóides (Pignatelli *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2009), desempenhando um papel antioxidante contra diversas formas de estresse abiótico e biótico. Assim, dada sua rota de biossíntese, era esperado que tais compostos tendessem a acompanhar o comportamento observado para os compostos fenólicos totais, ou seja, de queda quando em contato com o herbicida, sobretudo nas maiores doses. No entanto, diferenças pontuais foram observadas em alguns tratamentos e para alguns compostos, tais como um aumento da quantidade de ácido quínico e 5-CQA em plantas mantidas em solo arenoso. Uma possível explicação seria que, dada a baixa capacidade de retenção deste solo, o que permite uma maior percolação do herbicida, a quantidade retida e absorvida pelas plantas seria suficiente para induzir uma resposta de hormese.

Segundo Velini *et al.* (2008) e Cedegreen & Olesen (2010), a hormese é caracterizada pela exposição a doses mínimas de um agente tóxico, estimulando o desenvolvimento e

crescimento de diferentes organismos susceptíveis àquele agente. Assim, a quantidade de glyphosate absorvido pelas plantas daquele tratamento seria suficiente para induzir um aumento nos níveis dos quatro compostos fenólicos. Embora possa parecer um contra-senso, deve-se atentar para o fato de que tais compostos apresentam importante papel antioxidativo e a exposição ao herbicida poderia ser considerada como uma forma de estresse oxidativo (melhor discutido adiante). Mas por que esta resposta não é observada nos demais tratamentos? Não se pode desconsiderar o fato de que cada composto deve ter uma modulação diferencial frente a quantidades diferenciadas de um mesmo agente estressante e, dada as características divergentes dos tratamentos (solos) utilizados neste trabalho, a quantidade de herbicida a qual os grupos experimentais estariam expostos deve ser diferente.

Embora sua ação primária seja sobre a síntese de aminoácidos aromáticos, levando à morte da planta por queda da taxa protéica, efeitos secundários da aplicação do glyphosate também são observados nas plantas e, provavelmente, contribuem para acelerar o dano imposto por este herbicida aos tecidos vegetais (Christensen *et al.*, 2003; Moldes *et al.*, 2008; Gravena *et al.*, 2009).

Segundo inúmeros autores, o contato com o herbicida glyphosate promove uma redução da quantidade de clorofilas totais, chegando a uma queda de 23% ou 32% em relação aos níveis de plantas não tratadas com o herbicida (Sergiev *et al.*, 2006; Nandula *et al.*, 2007; Cakmak *et al.*, 2009; Zobiolo *et al.*, 2010a). A mesma queda motivada pelo glyphosate é observada sobre o conteúdo de carotenóides totais em folhas de soja, mostarda e beterraba (Fuchs *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2003; Moldes *et al.*, 2008). Deve-se destacar que estas reduções foram observadas pelos autores até mesmo para concentrações do herbicida menores que as utilizadas neste trabalho.

Neste estudo, em folhas de café que tiveram duas formas de contato com o herbicida (via aplicação aérea e via raiz), o conteúdo destes pigmentos fotossintéticos aumentou, tanto para 5 DAA, como para 15 DAA. Segundo Eker *et al.* (2006), o glyphosate pode formar sais com ferro e manganês ao longo de todo o corpo vegetal; tais compostos seriam altamente estáveis, mas pouco solúveis, o que contribuiria para a inativação fisiológica destes nutrientes, afetando a síntese de clorofila, conforme observado em seu trabalho com girassol. Da mesma forma, Christensen *et al.* (2003) argumentam que o glyphosate leva à inibição e degradação não somente das clorofilas, como também dos carotenóides, afetando dramaticamente as taxas fotossintéticas de plantas submetidas a este herbicida. Mas o que poderia explicar o aumento dos pigmentos foliares em cafeeiros expostos ao glyphosate, cinco e quinze dias após sua aplicação? Segundo Zhang *et al.* (2006), o óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização endógena em animais e plantas, mediando respostas a diversas formas de estresse oxidativos. Ao tratarem plantas de milho, submetidas ao estresse salino, com um doador de NO, Zhang *et al.* (2006) observaram um aumento dos níveis de clorofilas totais. Dessa forma, uma possível explicação para o aumento inesperado dos níveis de clorofila em folhas de café submetidas ao glyphosate pode dever-se ao estímulo frente a uma forma de estresse abiótico, provocado pelo herbicida. Ahsan *et al.* (2008) e Moldes *et al.* (2008) relatam o caráter de estresse oxidativo das respostas observadas em plantas submetidas ao glyphosate. Embora não tenha sido o objetivo deste trabalho avaliar o papel deste composto, possivelmente o óxido nítrico, isoladamente ou em conjunto com outros sinalizadores moleculares, possa estar envolvido especificamente nesta resposta do cafeeiro. Estudos neste sentido viriam a contribuir significativamente para o entendimento deste evento.

Embora haja um aumento dos níveis dos pigmentos foliares, plantas de café tiveram sua taxa fotossintética diminuída a partir da aplicação de glyphosate. Esta observação está de acordo com os trabalhos realizados por Christensen *et al.* (2003), Cakmak *et al.* (2009) e Zobiole *et al.*

(2010b). Entretanto, há um aumento discreto da fotossíntese, observado em folhas expostas à aplicação aérea tendo-se passado 15 dias de sua aplicação. Aqui, o princípio de hormese parece não ser razoável, mesmo tendo ocorrido em folhas submetidas a 0,5% da dose recomendada do herbicida (7,2 g/ha). A hormese não pode ser considerada nesse caso, uma vez que foi uma resposta isolada e, quando comparada com outras plantas que também receberam o glyphosate nesta dose e período após o contato, como plantas mantidas no solo “terra” (E2), a resposta observada é exatamente a oposta. Tendo em vista que, no caso da aplicação aérea, a quantidade de ingrediente ativo que está presente nesta folha deve ser maior que aquele encontrado nas plantas que o translocaram desde a raiz, como no caso da planta “solo terra”, a hormese, se fosse observada no cafeeiro, deveria tê-lo sido justamente nesta que apresentou uma maior queda da fotossíntese em relação ao conteúdo de clorofilas totais (“solo terra”). Dessa forma, o aumento observado na folha de E1, dose I, após 15 DAA deve-se, provavelmente, a já degradação do glyphosate; este fato pode ser corroborado pelo aumento, em relação à dose controle, dos valores observados para as demais doses no mesmo ensaio e período de coleta de dados (Figura 2C).

Embora a redução da taxa fotossintética nem sempre tenha se apresentado de forma significativa (Figuras 5 H e I), a avaliação da relação entre a taxa fotossintética e a quantidade de clorofilas totais revelou haver diferenças entre todos os tratamentos impostos neste trabalho ($P_{\text{médio}} < 0,05$). A partir destas análises, aliado ao fato do aumento de pigmentos foliares, deduz-se que a situação de estresse imposto pelo glyphosate determina que a taxa fotossintética, *per se*, se mantém em níveis semelhantes àsquelas de plantas que não receberam o herbicida, quando não caem, somente com o estímulo à síntese de clorofilas e carotenóides. Entretanto, nenhum trabalho na literatura relatou a análise destes dados para plantas tratadas com glyphosate.

Segundo Ahsan *et al.* (2008), o glyphosate pode diminuir a taxa fotossintética através da degradação da enzima ribulose bifsfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e do ácido 3-

fosfoglicérico; o glyphosate também pode levar a uma desorganização importante do aparelho fotossintético, tais como os *grana* e os *intergrana*, sugerindo que os mecanismos de difusão do oxigênio seriam prejudicados. Complementar à idéia de Ahsan *et al.* (2008), Christensen *et al.* (2003) argumentam que a ligação do glyphosate com o complexo EPSPs-substrato, no citosol, leva a uma divisão irregular da eritrose-4-fosfato (E4P) na via do chiquimato e, então, a uma inibição da redução da ribulose bisfosfato (RBP). Assim, essa partição de carbono como E4P do ciclo de Calvin diminui os níveis de RBP, levando, ultimamente, a uma maior redução da cadeia fotossintética de elétrons e à fotoinibição do fotossistema II (PSII). Simultaneamente, a inibição da ligação EPSPs-substrato leva à inibição da produção de ácido homogentísico, um metabólito requerido para a redução da plastoquinona, um componente da cadeia de transferência de elétrons da fotossíntese, responsável por mediar o fluxo de elétrons do PSII para o complexo citocromo b6-f (Christensen *et al.*, 2003). Assim, dadas tais alterações, o resultado final será uma redução, ou mesmo, supressão da taxa fotossintética final de plantas expostas ao glyphosate.

Por fim, da mesma maneira que a reportada por Fuchs *et al.* (2002) e Zobiole *et al.* (2010a,b), os valores de condutância estomática (*gs*) e taxa de transpiração (*E*) foram afetadas pelo glyphosate. Deve-se desconsiderar o aumento observado da *gs* e da *E* em plantas submetidas à aplicação aérea após 15 DAA, fato explicado pela menor susceptibilidade destes parâmetros à quantidade de composto ativo presente tendo decorridos 15 DAA, dada sua degradação parcial. A resposta de queda observada em todos os outros grupos experimentais dos valores daqueles parâmetros deve-se, segundo Fuchs *et al.* (2002), a possíveis danos ao sistema radicular, provocados pelo herbicida em contato direto (quando há a aplicação via solo) ou translocado (quando há a aplicação foliar). Estes danos podem afetar a capacidade de absorção de água e, conseqüentemente, promover um fechamento gradual dos estômatos.

6.2. Ação do herbicida glyphosate no fruto de café

O aroma é considerado o critério mais importante para a determinação da qualidade do café e, também, um dos principais motivos para o consumo desta bebida (Farah *et al.*, 2006). Inúmeros parâmetros estão associados com a alta qualidade da bebida fornecida pela espécie Arábica (*Coffea arabica*), a mais apreciada pelos consumidores por apresentar um menor amargor e melhor sabor quando comparada com a segunda espécie de café de maior produção mundial, a Robusta ou *C. canephora* (Ky *et al.*, 2001). As condições ambientais e os métodos de cultivo são alguns dos fatores que exercem um grande impacto no valor final da bebida. A quantidade de compostos como sacarose, cafeína, ácidos clorogênicos, dentre outros, presentes no fruto maduro será decisiva na “química do aroma”, determinada pelo processo de torragem do café (Castro & Marraccini, 2006; Farah *et al.*, 2006).

Segundo Castro & Marraccini (2006), como em outras espécies vegetais, compostos presentes nos frutos maduros de café são produzidos em outros órgãos vegetais (tais como as folhas), sendo transportados para os frutos via floema ou sintetizados *de novo*. Como o herbicida glyphosate também é translocado na seiva do floema, pode-se supor que o herbicida aplicado sob folhas de ramos contendo frutos em desenvolvimento pode ser translocado para estes frutos, alterando o metabolismo de diversos compostos, como é observado nas Figuras 7 a 11. Outra evidência de alterações no desenvolvimento dos frutos de café é a maior queda de frutos abortados em ramos que foram expostos ao herbicida, embora não tenha sido avaliado quantitativamente.

A acidez da bebida do café é uma das primeiras características observadas na sua apreciação. Em geral, é determinada por compostos coletivamente denominados ácidos orgânicos. Dentre os inúmeros compostos ácidos encontrados no fruto de café, os ácidos succínico, fumárico, málico e cítrico desempenham papel fundamental na qualidade da bebida

(Jham *et al.*, 2002; Galli & Barbas, 2004; Rodrigues *et al.*, 2009). Deve-se destacar, ainda, que compostos como os ácidos clorogênicos também exercem tal papel, sendo discutidos mais adiante. Segundo a Figura 8, o tratamento com o herbicida glyphosate alterou a quantidade destes ácidos nos primeiros dias após sua aplicação. Observa-se que frutos cujas folhas apicais receberam 360 g/ha de glyphosate apresentaram a maior queda da quantidade de ácidos orgânicos “totais”, não apresentando o aumento expressivo aos 15 DAA, observado nos frutos controle. O grupo que recebeu 72 g/ha do herbicida, embora tenha apresentado uma queda dos valores totais, apresenta um aumento maior que o outro grupo tratamento.

Embora haja essas diferenças, os grupos experimentais convergem para uma quantidade semelhante ao grupo controle já com 30 DAA, para os ácidos succínico e fumárico ($P_{\text{médio}} > 0,05$), indicando que a ação do herbicida sobre eles não é duradoura. Já, para os ácidos cítrico e málico, os valores dos grupos expostos ao herbicida diferem do controle mesmo com a completa maturação ($P_{\text{médio}} < 0,0001$). Assim, pode-se afirmar que tais compostos são mais sensíveis à presença do glyphosate. Estas diferenças podem se dever a alterações da regulação na síntese destes ácidos (melhor discutido a seguir).

O aumento da quantidade de ácidos orgânicos no início do tratamento é congruente com a fase de desenvolvimento do endosperma. Geromel *et al.* (2006) afirmam que nesta fase, alterações na composição de ácidos orgânicos no fruto cria um gradiente de pressão hidrostática, permitindo um fluxo de água e nutrientes para o tecido. Fougère *et al.* (1991) e Ma *et al.* (2001) observam que os ácidos orgânicos são capazes de alterar o perfil osmótico de tecidos vegetais quando presentes em maiores concentrações. Dessa forma, espera-se que o aumento de ácidos orgânicos observado na fase de desenvolvimento do endosperma auxilie na criação daquele gradiente de pressão hidrostática, levando ao desenvolvimento do fruto de café. Porém, nos frutos que entraram em contato com o glyphosate, e que tiveram o aumento na quantidade de ácidos

orgânicos prejudicado, a massa fresca do fruto como um todo, bem como do endosperma, permaneceu maior que a do grupo controle (Figura 7). O que poderia explicar tal fato?

A sacarose aparece como outro composto de grande importância para a qualidade da bebida do café, uma vez que é rapidamente degradada durante a torragem, fornecendo açúcares anidros e outros compostos como o glioxal. Tais moléculas são capazes de reagir com aminoácidos e produzir ácidos alifáticos, furanos, pirazinas e compostos carbonil, essenciais para o aroma do café. Para a planta, o valor biológico dos açúcares presentes em seus frutos é servir como substrato energético para divisões celulares e criar um gradiente osmótico, a fim de aumentar o fluxo de nutrientes e água para o desenvolvimento do fruto, conforme já mencionado, além de servir como reserva energética para a germinação da semente (Castro & Marraccini, 2006; Geromel *et al.*; 2006). No entanto, o conteúdo de sacarose em frutos de café torna-se expressivo somente após determinado tempo de maturação, com o desenvolvimento do endosperma. Até este aumento da quantidade de sacarose nos frutos, as hexoses glicose e frutose presentes, sobretudo, no perisperma, no início da maturação do fruto, correspondem aos principais componentes do total de açúcares solúveis. Somente com a maturação, o conteúdo das hexoses apresenta uma redução no endosperma e um aumento expressivo no pericarpo (casca) (Rogers *et al.*, 1999; Geromel *et al.*, 2006; Joët *et al.*, 2009).

Conforme a Figura 9 apresenta, mesmo os níveis de sacarose aumentando expressivamente no grupo controle após 30 DAA, os níveis de glicose e frutose ainda apresentam um aumento até o completo amadurecimento dos frutos. Uma vez que se analisou o fruto como um todo, este aumento provavelmente é devido ao aumento observado no pericarpo, sendo possível que decorra da hidrólise de pectina por ação de β -galactosidase e glicosidases e sua posterior conversão em açúcares redutores e sacarose, então, pelas atividades de sacarose sintase e invertases (Kerith *et al.*, 1993; Geromel *et al.* 2006).

Já, nos grupos expostos ao herbicida glyphosate, embora o mesmo padrão descrito para o grupo controle seja observado, sua intensidade é significativamente menor, sobretudo para o nível de sacarose. A primeira parte deste trabalho mostrou que o herbicida glyphosate impacta negativamente a taxa fotossintética, determinando uma situação de estresse oxidativo. Dessa forma, é esperado que a quantidade de carbono fotoassimilado seja reduzida, tanto nas folhas expostas ao herbicida, como nos frutos em desenvolvimento, nos ramos destas folhas expostas.

Sabe-se que a ação primária do glyphosate baseia-se inibição da ligação do complexo EPSPs-S3P com fosfoenolpiruvato, levando a um aumento da quantidade de chiquimato. Portanto, o aumento da quantidade de chiquimato observado em frutos do E3 (Figura 10A) é uma resposta esperada. Vale ressaltar que, mesmo havendo este aumento, os níveis de chiquimato tendem a cair à medida que o fruto se torna maduro, seja no grupo controle, ou nos grupos experimentais.

Em última análise, o ácido chiquímico é um dos precursores da via dos fenilpropanóides (Yu & Jez, 2008). Dentre os principais compostos fenólicos presentes em frutos de café, aparecem os CGAs, compostos que representam uma importante parcela do total de antioxidantes consumidos por apreciadores desta bebida (Ky *et al.*, 2001; Lepelley *et al.*, 2007). Tais compostos compreendem uma família de ésteres entre ácidos *trans*-cinâmicos específicos, tais como os ácidos caféico e ferúlico, com o ácido quínico. Embora haja mais de 30 diferentes CGA identificados nos grãos de café, a maioria quase absoluta é composta por três classes principais: os ácidos cafeoilquínicos (dentre eles, o 5-CQA), os ácidos dicafeoilquínicos e os ácidos feruloilquínicos (Castro & Marraccini, 2006; Lepelley *et al.*, 2007). Aqui cabe destacar que a Figura 10C apresenta o total de ácidos clorogênicos quantificados, sem discriminar de quais classes são.

Como pode ser observado nesta Figura, bem como para os níveis de compostos fenólicos totais (Figura 10B), há uma expressiva queda destes compostos até a completa maturação do fruto de café. Joët *et al.* (2009) afirmam que a deposição de CGA termina precocemente ao longo da maturação dos frutos de café. Seu acúmulo apresenta-se de forma expressiva no começo do desenvolvimento do endosperma, sugerindo que estes compostos são sintetizados nos tecidos do perisperma e, em seguida, mobilizados via apoplasto para o endosperma em desenvolvimento (Castro & Marraccini, 2006; Joët *et al.*, 2009). Após o término de deposição de ácidos clorogênicos, os frutos de café apresentam uma queda drástica do seu conteúdo total, que ocorre simultaneamente à expansão do endosperma (Castro & Marraccini, 2006; Lepelley *et al.*, 2006). Uma possível explicação para esta queda, segundo Joët *et al.* (2009), seria a reorientação destes compostos como precursores para a via de biossíntese de lignina.

As Figuras 10B e C mostram, ainda, que a queda de compostos fenólicos totais solúveis (incluindo os CGA) apresentou-se de forma menos intensa nos grupos de frutos que receberam o herbicida em suas folhas apicais, embora tenham convergido para valores praticamente idênticos ao do grupo controle ao término da maturação. Novamente, o princípio da hormese discutido anteriormente pode ser aplicado para este caso. Neste ensaio, folhas apicais de ramos contendo fruto em desenvolvimento foram expostas ao herbicida e, conforme já foi mencionado, o glyphosate pode ser transportado via floema até um dreno importante, como os frutos. No entanto, espera-se que uma parcela significativa do herbicida seja retida nas folhas e parte seja complexada com minerais da seiva. Dessa forma, a baixa quantidade que chegaria até os frutos seria suficiente para induzir alterações importantes no metabolismo de açúcares, cafeína e ácidos orgânicos, bem como induzir um estímulo para a síntese de compostos fenólicos. Outra possível explicação para esta queda ser menos intensa em grupos expostos ao herbicida seria uma possível

alteração do perfil protéico responsável pela síntese de lignina, conforme argumentado por Joët *et al.* (2009).

Segundo Castro & Marraccini (2006), a quantidade do alcalóide cafeína permanece constante no endosperma ao longo da maturação do fruto de café. O principal aumento do conteúdo deste alcalóide ocorre nos estádios finais, correspondendo à expansão do endosperma (Castro & Marraccini, 2006). A análise da Figura 10D revela um cenário diferente daquele destacado pelos autores: há uma queda da quantidade de cafeína até o momento da completa maturação do fruto. Porém, deve-se ressaltar que, no fruto maduro, o pericarpo representa aproximadamente 60% da massa do fruto e este tecido apresenta menos cafeína que o endosperma (Geromel *et al.*, 2006), o que poderia explicar este menor valor, uma vez que se considerou o fruto inteiro para a análise.

Observaram-se diferenças entre a quantidade de cafeína dos grupos controle e tratamentos, sobretudo aquele com maior dose do herbicida, ou 360 g/ha. Novamente, a hipótese da hormese não pode ser descartada, uma vez que há um aumento do conteúdo de cafeína na dose de menor concentração. Entretanto, para que esta hipótese seja aceita, tem que se considerar a diferença na regulação metabólica entre ácidos clorogênicos (analisados anteriormente) e a cafeína. Esta consideração é necessária devido ao fato de que, para os ácidos clorogênicos, embora haja estímulo de sua produção na menor dose, é com 360 g/ha de glyphosate que a maior produção é observada; já, para a cafeína, a hormese seria observada somente para a quantidade de glyphosate, translocado e absorvido pelo fruto, menor que os 1,42 mM (72 g/ha) aplicados, dada a degradação foliar e no floema de parte deste herbicida. Dessa forma, pode-se afirmar que o glyphosate e o estresse induzido pelo herbicida passa a ser um modulador negativo da síntese de cafeína e positivo da síntese de CGA, quando se analisa a maior dose utilizada. Uma possível explicação para esta resposta seria o papel biológico de cada composto: como os CGA

desempenham importante papel antioxidante (Azuma *et al.*, 2000; Clifford *et al.*, 2003) e a cafeína aparece como importante fator que desestimula a herbivoria (Castro & Marraccini, 2006), o estresse oxidativo determinado pelo glyphosate pode ser sinalizado e estimular a síntese de compostos com valor antioxidante, em oposição aos compostos contra herbivoria. Outra explicação possível é que como a resposta hormética do conteúdo de cafeína foi observada somente em plantas expostas à menor dose do herbicida, sugere-se que o metabolismo da cafeína seja mais sensível à presença do herbicida glyphosate quando comparado com o dos ácidos clorogênicos, não havendo uma resposta de estímulo quando exposta à maior dose analisada neste trabalho. Entretanto, somente uma análise mais apurada, como a avaliação da atividade enzimática de proteínas-chave das duas vias de biossíntese poderia confirmar ou refutar tal hipótese.

Conforme já sugerido, alterações no perfil protéico dos frutos expostos ao herbicida também poderiam ter causado algumas das alterações já descritas. De maneira geral, a quantidade de proteínas totais solúveis permaneceu semelhante entre o grupo controle e aquele exposto à menor dose do herbicida, diferindo apenas do grupo exposto a 7,10 mM (360 g/ha) de glyphosate. Já, para a quantidade de aminoácidos totais solúveis, embora seus níveis tenham permanecido menores no grupo exposto a 7,10 mM (360 g/ha) de glyphosate, ao 90º dia após a exposição, este mesmo grupo conseguiu recuperar-se para quantidades próximas às dos demais grupos.

Os padrões de evolução da quantidade de proteínas e aminoácidos apresentados na Figura 11 também podem fornecer importantes dados acerca do impacto que o herbicida glyphosate tem sobre frutos em desenvolvimento. A principal contribuição desses compostos para a qualidade final da bebida do café consiste na sua participação das reações de Maillard, segundo as quais, proteínas e aminoácidos reagem com açúcares redutores, levando à formação de compostos que

irão interferir negativamente no aroma do café, conforme já mencionado (Knopp *et al.*, 2006; Mukovic & Derler, 2006).

Segundo a literatura, sabe-se que o conteúdo de aminoácidos totais de grãos de café pode variar de forma significativa, dentro de um mesmo cultivar, dependendo das condições ambientais a quais são expostos (Silva *et al.*, 2005; Joët *et al.*, 2009). Neste trabalho, frutos de café expostos indiretamente ao herbicida glyphosate tenderam a apresentar menores quantidades de aminoácidos totais, quando comparados com o grupo controle. Este comportamento torna-se mais evidente no grupo exposto à maior dose do herbicida (Figura 11A). Embora sejam necessárias mais análises, este comportamento poderia indicar uma melhor qualidade da bebida preparada a partir destes frutos, uma vez que, segundo Silva *et al.* (2005) e Joët *et al.* (2009), amostras de café contendo uma maior quantidade de aminoácidos solúveis apresentaram uma menor qualidade da bebida final.

Por fim, o último componente, de grande importância para a qualidade do café e analisado neste trabalho foi a quantidade de proteínas totais ao longo do desenvolvimento dos frutos. Acuña *et al.* (1999) destacam que as plantas acumulam e estocam, em suas sementes, carboidratos, lipídeos e proteínas que, posteriormente, serão utilizadas durante sua germinação, servindo como fontes de energia, carbono e nitrogênio. O padrão de expressão das proteínas de semente durante seu desenvolvimento é fortemente regulado por fatores metabólicos e externos. Embora exerça grande impacto na qualidade final da bebida, poucos estudos sobre a evolução protéica ao longo do desenvolvimento do fruto de café podem ser encontrados na literatura (Acuña *et al.*, 1999; Montavon *et al.*, 2003). Um importante grupo de proteínas estocadas em grãos de café é formado pelas proteínas legumina 11S. Em *Coffea arabica*, as proteínas de estocagem 11S só puderam ser identificadas a partir da expansão do endosperma, ou seja, na etapa final de amadurecimento do fruto (Rogers *et al.*, 1999; Castro & Marraccini, 2006; Joët *et al.*, 2009). Seguindo este modelo, a

Figura 11B mostra um aumento da quantidade de proteínas totais solúveis no período, característico do desenvolvimento do endosperma, como já confirmado por outros parâmetros analisados. Deve-se destacar o aumento da quantidade de proteínas no grupo exposto à maior dose do herbicida, justamente nos primeiros dias após o início dos tratamentos, quando a probabilidade de existir glyphosate ainda ativo, pouco metabolizado, é maior; da mesma maneira, o impacto do herbicida também pode ser observado no final de amadurecimento dos frutos expostos a 1,42 mM (72 g/ha) do composto, levando a uma maior quantidade de proteínas totais neste grupo. Tais comportamentos observados nas análises de aminoácidos e proteínas totais, opostos ao esperado pela ação primária do herbicida, vêm fornecer novas idéias para trabalhos futuros, objetivando avaliar as diferenças qualitativas entre os tratamentos, talvez por técnicas como eletroforese bidimensional para proteínas e a discriminação dos aminoácidos por HPLC, como descritas por Castro & Marraccini (2006).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim, as principais conclusões que podem ser tomadas são:

- a) Plantas de *Coffea arabica* cv. Mundo Novo responderam ao glyphosate em doses de deriva simulada, através do acúmulo de chiquimato, seja em folhas ou frutos;
- b) O glyphosate alterou as respostas bioquímicas (níveis de fenóis totais e CGA) e fisiológicas (conteúdo de pigmentos foliares, fotossíntese, condutância estomática e taxa de transpiração) de folhas e frutos de cafeeiros submetidos à aplicação foliar direta ou aplicação via solo, independente da dose aplicadas;

- c) A avaliação da relação entre a taxa fotossintética pelo conteúdo de clorofilas totais foi uma importante ferramenta a fim de se complementar o entendimento da ação do glyphosate, dada sua maior sensibilidade à presença do herbicida;
- d) A composição do solo afetou o grau de comprometimento das plantas tratadas com glyphosate;
- e) Embora não tenha sido o objetivo inicial, a resposta hormética foi observada neste trabalho para diferentes parâmetros analisados em folhas e frutos de cafeeiros expostos ao glyphosate

A partir dos dados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que:

- i) Uma vez aplicado em folhas, o herbicida glyphosate pode ser translocado via floema, no sentido fonte-dreno, para frutos em desenvolvimento e para o sistema radicular de *C. arabica* cv. Mundo Novo;
- ii) O glyphosate deve induzir uma resposta de estresse oxidativo em *C. arabica* cv. Mundo Novo, possivelmente mediada via intermediários de óxido nítrico;
- iii) Possivelmente, os diferentes metabólitos primários e secundários analisados neste trabalho tiveram uma resposta diferenciada ao glyphosate devido ao grau de sensibilidade distinto apresentado por suas rotas de biossíntese.

Dessa maneira, sugere-se para trabalhos futuros, avaliar as vias de sinalização ao estresse induzido pelo glyphosate e se estas vias envolvem o composto óxido nítrico e seus derivados. Também se sugere a avaliação da atividade de reguladores metabólicos das vias bioquímicas de ácidos clorogênicos, açúcares solúveis, cafeína, ácidos orgânicos e de aminoácidos, compostos marcadamente importantes para a economia do cafeeiro.

Por fim, deve-se ressaltar que todos os ensaios realizados neste trabalho objetivaram simular uma situação de deriva, ou seja, de um problema comum da aplicação de herbicidas e que

pode ser intensificada devido a uma aplicação incorreta. Inúmeros trabalhos na literatura já demonstraram a eficácia e os benefícios da utilização do glyphosate em larga escala, observando-se a correta aplicação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abassi, B. H.; Tian, C. L.; Murch, S. J.; Saxena, P. K.; Liu, C. Z. *Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of Echinacea purpurea*. Plant Cell Rep. 26. 1367–1372. 2007.
- Acuña, R.; Bassüner, R.; Beilinson, V.; Cortina, H.; Cadena-Gómez, G.; Montes, V.; Nielsen, N. *C. Coffee seeds contain 11S storage proteins*. Physiologia Plantarum. 105. 122-131. 1999.
- Ahsan, N.; Lee, D.; Lee, K. W.; Alam, I.; Lee, S. H.; Bahk, J. D.; Lee, B. H. *Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach*. Plant Physiology and Biochemistry. 46. 1062-1070. 2008.
- Albers, C. N.; Banta, G. T.; Hansen, P. E.; Jacobsen, O. S. *The influence of organic matter on sorption and fate of glyphosate in soil – Comparing different soils and humic substances*. Environmental Pollution. 157. 2865–2870. 2009.
- Al-Rajab, A. J.; Amellal, S.; Schiavon, M. *Sorption and leaching of ¹⁴C-glyphosate in agricultural soils*. Agron. Sustain. Dev. 28. 419-428. 2008.
- Amorim, A. C. M.; Hovell, A. M. C.; Pinto, A. C.; Eberlin, M. N.; Arruda, N. P.; Pereira, E. J.; Bizzo, H. R.; Catharino, R. R.; Morais Filho, Z. B.; Rezende, C. M. *Green and Roasted Arabica Coffees Differentiated by Ripeness, Process and Cup Quality via Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting*. J. Braz. Chem. Soc. 20 (2). 313-321. 2009.

- Azuma, K.; Ippoushi, K.; Nakayama, M; Ito, H.; Higashio, H.; Terao, J. *Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration*. J. Agric. Food Chem. 48. 5496-5500. 2000.
- Benatti, L. B.. *Controle da biossíntese de cafeína em cafeeiro Coffea arabica naturalmente descafeinados*. Tese de doutorado apresentada na Universidade Estadual de Campinas, pelo Instituto de Biologia. Campinas, SP, Brasil. p. 1-111. 2010.
- Bervald, C. M. P. *Desempenho fisiológico e metabolismo de sementes de soja convencional e transgênica submetidas ao glyphosate*. Tese de mestrado apresentada na Universidade Federal de Pelotas, pela Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, RS, Brasil. p. 1-53. 2006.
- Bradford, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72. 248-254. 1976.
- Cakmak, I.; Tutus, A. Y.; Ozturk, L. *Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean*. Europ. J. Agronomy. 31. 114-119. 2009.
- Castro, R. D. & Marraccini, P. *Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee*. Braz. J. Plant Physiol. 18 (1). 175-199. 2006.
- Cataneo, A.C.; Destro, G. F. G.; Ferreira, L. C.; Chmma, H. L.; Sousa, D. C. F.; *Atividade da glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (Zea mays)*. Planta Daninha. 21 (2). 307-312. 2003.
- Cedergreen, N. & Olesen, C. F. *Can glyphosate stimulate photosynthesis?* Pesticide Biochemistry and Physiology. 96 (3). 140-148. 2010.

- Chang, J.; Luo, J.; He, G. *Regulation of polyphenols accumulation by combined overexpression/silencing key enzymes of phenylpropanoid pathway*. Acta Biochim. Sin. 123-130. 2009.
- Christensen, M. G.; Teicher, H. B.; Streibig, J. C. *Linking fluorescence induction curve and biomass in herbicide screening*. Pest Manag Sci. 59. 1303-1310. 2003.
- Clifford, M. N.; Kirkpatrick, J.; Kuhnert, N.; Roozendaal, H.; Salgado, P. R. *LC-MSⁿ analysis of the cis isomers of chlorogenic acids*. Food Chemistry. 106. 379-385. 2008
- Clifford, M. N.; Johnston, K. L.; Knight, S.; Kuhnerts, N. *Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51. 2900-2911. 2003.
- Cocking, E. & Yemm, E. *Estimation of aminoacids by ninhidrin*. Biochem. J. 58. 12-13. 1954.
- Conceição, P. R. N. *Utilização de análise multivariada de dados na otimização de misturas de minerais industriais para a formulação de tintas*. Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela Escola de Engenharia, RS, Brasil. p1-166. 2006
- Coupland, D. *Metabolism of glyphosate in plants*. In: Grossbard E., Atkinson, D. A. (Ed.). The herbicide glyphosate. London: Butterworths. p.25-34. 1985.
- Eker, S.; Ozturk, L.; Yazici, A.; Erenoglu, B.; Romheld, V.; Cakmak, I. *Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (Helianthus annuus L.) plants*. J. Agric. Food Chem. 54. 10019-10025. 2006.
- Ermakova, I. T., Shushkova, T. V., Leont'evskii, A. A. *Microbial degradation of organophosphonates by soil bacteria*. Microbiology. 77 (5). 615-620. 2008.
- Farah, A. & Donangelo, C. M. *Phenolic compounds in coffee*. Braz. J. Plant Physiol. 18 (1). 23-36. 2006.

- Farah, A., Monteiro, M. C., Calado, V., Franca, A. S., Trugo, L. C. *Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee*. Food Chemistry. 98. 373-380. 2006.
- Feldman, R. S., Ryder, W. S., Kung, J. T. *Importance of nonvolatile compounds to the flavor of coffee*. J. Agric. Food Chem. 17 (4). 733-739. 1969.
- Fougère, F.; Rudulier, D. L.; Streeter, J. G. *Effects of salt stress on amino acid, organic acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (Medicago sativa L.)*. Plant Physiol. 96. 1228-1236. 1991.
- Franz, J. E.; Mao, M. K.; Sikorski, J. A. *Glyphosate: a unique global herbicide*. Washington: ACS monograph. 653p. 1997.
- 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. 74. 27-39. 2002.
- Fujioka, K. & Shibamoto, T. *Chlorogenic acid and caffeine contents in various commercial brewed coffees*. Food Chemistry. 106. 217-221. 2008.
- Gaitonde, M. & Gordon, M. *A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid*. J. Biol. Chem. 230. 1043-1050. 1958.
- Galli, V. & Barbas, C. *Capillary electrophoresis for the analysis of short-chain organic acids in coffee*. Journal of Chromatography A. 1032. 299-304. 2004.
- Geromel, C.; Ferreira, L. P.; Guerreiro, S. M. C.; Cavalari, A. A.; Pot, D.; Pereira, L. F. P.; Leroy, T.; Vieira, L. G. E.; Mazzafera, P.; Maraccini, P. *Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (Coffea arabica) fruit development*. Journal of Experimental Botany. 57 (2). 3243-3258. 2006.
- Gimsing, A. L. & Borggaard, O. K. *Effect of phosphate on the adsorption of glyphosate on soils, clay minerals and oxides*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 82. 545-552. 2002.

- Glass, R. L. *Adsorption of Glyphosate by Soils and Clay Minerals*. J. Agric. Food Chem. 35 (4). 97-500. 1987.
- Grace, S. C. & Logan, B. A. *Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 355. 1499-1510. 2000.
- Gravena, R. *Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo glyphosate*. Tese de doutorado apresentada na Universidade de São Paulo, pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, Brasil. p. 1-145. 2006
- Gravena, R.; Filho, R. V.; Alves, P. L. C. A.; Mazzafera, P.; Gravena, A. R. *Low glyphosate rates do not affect Citrus limonia (L.) Osbeck seedlings*. Pest Manag Sci. 65. 420-425. 2009.
- Hoagland, D. & Arnon, D. I., *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment Station Circular. 347. 1-32. 1950.
- Jham, G. N.; Fernandes, S. A.; Garcia, C. F.; Silva, A. A. *Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee*. Phytochem. Anal. 13. 99-104. 2002.
- Joët, T.; Laffargue, A.; Salmona, J.; Doulebeau, S.; Descroix, F.; Bertrand, B.; de Kochko, A. ; Dussert, S. *Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds : Coffea arabica as a case study*. New Phytologist. 182. 146-162. 2009.
- Kerith, D.; Golden, K.D.; Johna, M.A.; Kean, E.A. *β -Galactosidase from Coffea arabica and its role in fruit ripening*. Phytochemistry. 34(2). 355-360. 1993.
- Knopp, S.; Bytof, G.; Selmar, D. *Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans*. Eur Food Res Technol. 223. 195-201. 2006.
- Ky, C. -L.; Louarn, J.; Dussert, S. Guyot, B.; Hamon, S.; Noiro, M. *Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild Coffea arabica L. and C. canephora P. accessions*. Food Chemistry. 75. 223-230. 2001.

- Lepelley, M.; Cheminade, G.; Tremillon, N.; Simkin, A.; Caillet, V.; McCarthy, J. *Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in C. canephora*. Plant Science. 172. 978-996. 2007.
- Lichtenthaler, H. K. & Wellburn, A. R. *Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents*. Transactions. 603. 591-592. 1983.
- Lunz, A.M.P., *Crescimento e produtividade do cafeeiro sombreado e a pleno sol*. Tese de doutorado apresentada na Universidade de São Paulo, pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP, Brasil, 2006. pp. 1-95.
- Ma, F. J.; Ryan, P. R.; Delhaize, E. *Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids*. TRENDS in Plant Science. 6 (6). 273-278.2001.
- Moldes, C. A.; Medici, L. O.; Abrahão, O. S.; Tsai, S. M.; Azevedo, R. A. *Biochemical responses of glyphosate resistant and susceptible soybean plants exposed to glyphosate*. Acta Physiol Plant. 30. 469-479. 2008.
- Mondolot, L.; la Fisca, P.; Buatois, B.; Talansier, E.; de Kochko, A.; Campa, C. *Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during Coffea canephora leaf development*. Annals of Botany. 98. 33-40. 2006.
- Montavon, P., Duruz, E. Rumo, G., Pratz, G. *Evolution of green coffee protein profiles with maturation and relationship to coffee cup quality*. J. Agric. Food Chem. 51 (8). 2328-2334. 2003.
- Murkovic, M. & Derler, K. *Analysis of amino acids and carbohydrates in green coffee* J. Biochem. Biophys. Methods. 69. 25-32. 2006.
- Naidu, M. M., Sulochanamma, G., Sampath, S. R., Srinivas, P. *Studies on extraction and antioxidant potencial of green coffee*. Food Chemistry. 107. 377-384. 2008.

- Nandula, V. K.; Reddy, K. N.; Rimando, A. M.; Duke, S. O.; Poston, D. H. *Glyphosate-resistant and -susceptible soybean (Glycine max) and canola (Brassica napus) dose response and metabolism relationships with glyphosate*. J. Agric. Food Chem. 55. 3540-3545. 2007.
- Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. A. *Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in Lolium multiflorum*. Planta. 226. 395-404. 2007.
- Perrone, D. Farah, A., Donangelo, C. M., Paulis, T. Martin, P. R. *Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars*. Food Chemistry. 106. 859-867. 2008.
- Peters, D. *Raw materials*. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 105. 1-30. 2007.
- Piccolo, A.; Celano, G.; Conte, P. *Adsorption of glyphosate by humic substances*. J. Agric. Food Chem. 44. 2442-2446. 1996.
- Pignatelli, P.; Pulcinelli; F. M.; Celestini, A.; Lenti; L.; Ghiselli; A.; Gazzaniga, P.P.; Violi, F. *The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide*. Am J Clin Nutr. 72. 1150-1155. 2000.
- Pline-Srnic, W. *Physiological mechanisms of glyphosate resistance*. Weed Technology. 20. 290-300. 2006.
- Preston, C. & Wakelin, A. M. *Resistance to glyphosate from altered herbicide translocation patterns*. Pest Manag Sci. 64. 372-376. 2008.
- Reade, J. P. H. & Cobb, A. H. *Herbicides: modes of action and metabolism*. In. Naylor REL (ed) Weed management handbook. Oxford: Blacwell Science. p134-170. 2002.
- Reddy, K. N., Rimando, A. M., Duke, S. O., Nandula, V. K. *Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate*. J. Agric. Food. Chem. 56. 2125-2130. 2008.

- Robars, K. & Antolovich, M. *Analytical chemistry of fruit bioflavonoids a review*. The Analyst. 122. 11R-34R. 1997.
- Rodrigues, C. I.; Marta, L.; Maia, R.; Miranda, M.; Ribeirinho, M.; Máguas, C. *Application of solid-phase extraction to brewed coffee caffeine and organic acid determination by UV/HPLC*. Journal of Food Composition and Analysis. 20. 440-448. 2007.
- Rogers, W. J.; Michaux, S.; Bastin, M.; Bucheli, P. *Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (Coffea canephora) and Arabica (C. arabica) coffees*. Plant Science. 149. 115-123. 1999.
- Sánchez-Rabaneda, F.; Jáuregui, O.; Casals, I.; Andrés-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventós, R. M. *Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (Theobroma cacao)*. Journal of Mass Spectrometry. 38. 35-42. 2008.
- Sanoner, P.; Guyot, S.; Marnet, N.; Molle, D.; Drilleau, J.-F. *Polyphenol profiles of french cider apple varieties (Malus domestica sp.)*. J. Agric. Food Chem. 47. 4847-4853. 1999.
- Santos, L. D. T.; Meira, R. M. S. A.; Ferreira, F. A.; Sant'Anna-Santos, B. F.; Ferreira, L. R. *Morphological responses of different eucalypt clones submitted to glyphosate drift*. Environmental and Experimental Botany. 59. 11-20. 2007.
- Santos, L. D. T. *Efeitos diretos e indiretos do glyphosate em eucalipto*. Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal de Viçosa, pelo Centro de Ciências Agrárias, MG, Brasil. p. 1-90. 2006.
- Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmarsh, M. *Polyphenols: antioxidants and beyond*. Am. J. Clin. Nutr. 81(suppl). 215S-217S. 2005.

- Sergieiev, I. G.; Alexieiva, V. S.; Ivanov, S. V.; Moskova, I. I.; Karanov, E. N. *The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 85. 139-146. 2006.
- Silva, E. A.; Mazzafera, P.; Brinini, O.; Sakai, E.; Arrida, F. B.; Mattoso, L. H. C.; Carvalho, C. R. L.; Pires, R. C. M. *The influence of water management and environmental conditions on the chemical composition and beverage quality of coffee beans*. Braz. J. Plant Physiol. 17. 229-238. 2005.
- Singh, B. K. & Shaner, D. L. *Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants*. Weed Technology. 12. 527-530. 1998.
- Tabata, H.; Katsube, T.; Tsuma, T.; Ohta, Y.; Imawaka, N.; Utsumi, T. *Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, Mallotus japonicus*. Food Chemistry. 109. 64-71. 2008.
- Tan, S., Evans, R., Singh, B. *Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops*. Amino Acids. 30. 195-204. 2006.
- Tesfamariam, T; Bott, S.; Cakmak, I.; Römheld, V.; Neumann, G. *Glyphosate in the rhizosphere - Role of waiting times and different glyphosate binding forms in soils for phytotoxicity to non-target plants*. Europ. J. Agronomy. 31. 126-132. 2009.
- Torres, C. A.; Andrews, P. K., Davies, N. M. *Physiological and biochemical responses of fruit exocarp of tomato (Lycopersicon esculentum Mill.) mutants to natural photo-oxidative conditions*. Journal of Experimental Botany. 57(9). 1933–1947. 2006.
- Velini, E. D.; Alves, E.; Godoy, M. C.; Meschede, D.; Souza, R. T.; Duke, S. O. *Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth*. Pest Manag Sci. 64. 489-496. 2008.
- Weidenhamer, J. D. & Callaway, R. M. *Direct and indirect effects of invasive plants on soil chemistry and ecosystem function*. J Chem Ecol. doi 10.1007/s10886-009-9735-0. 2010.

- Yu, O. & Jez, J. M. *Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides*. The Plant Journal. 54. 750-762. 2008.
- Zhang, Y.; Wang, L.; Liu, Y.; Zhang, Q.; Wei, Q.; Zhang, W. *Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast*. Planta. 224. 545-555. 2006.
- Zobiolo, L. H. S.; Oliveira Jr, R. S.; Huber, D. M.; Constantin, J.; Castro, C.; Oliveira, F. A.; Oliveira Jr., A. *Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans*. Plant Soil. 328. 57-69. 2010a.
- Zobiolo, L. H. S.; Oliveira Jr., R. S.; Kremer, R. J.; Constantin, J.; Yamada, T.; Castro, C.; Oliveira, F. A.; Olivera Jr., A. *Effect of glyphosate on symbiotic N_2 fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans*. Applied Soil Ecology. 44. 176-180. 2010b.