

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE TRANSLOCAÇÃO
DE PRÓTONS NA DESINTOXICAÇÃO DO HERBICIDA
MESOTRIONE EM PLANTAS DE MILHO**

JUARES OGLIARI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO–
UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2007

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE TRANSLOCAÇÃO
DE PRÓTONS NA DESINTOXICAÇÃO DO HERBICIDA
MESOTRIONE EM PLANTAS DE MILHO**

JUARES OGLIARI

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal

**Orientador: Prof. Dr. Silvério de Paiva Freitas
Co-orientador: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO - 2007

**ENVOLVIMENTO DO SISTEMA PRIMÁRIO DE TRANSLOCAÇÃO
DE PRÓTONS NA DESINTOXICAÇÃO DO HERBICIDA
MESOTRIONE EM PLANTAS DE MILHO**

JUARES OGLIARI

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal

Aprovada em 05 de Junho de 2007

Comissão Examinadora:

Prof. Tocio Sedyama (D.Sc. Fitotecnia) – UFV

Prof^a. Anna L. Okorokova Façanha (D.Sc. Ciências Biológicas) – UENF

Prof. Ricardo Enrique Bressan-Smith (D.Sc. Fisiologia Vegetal) – UENF

Prof. Silvério de Paiva Freitas (D.Sc. Fitotecnia) – UENF
Orientador

Dedico este trabalho

Em especial a meu pai, *in memoriam*,
a minha mãe,
a meus irmãos e sobrinhos.

AGRADECIMENTO

A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Silvério de Paiva Freitas, pela orientação, incentivo, confiança e por ter acreditado na realização desta pesquisa. Meus sinceros agradecimentos;

Ao grande amigo Prof. Arnaldo Rocha Façanha, pela co-orientação e valiosos ensinamentos transmitidos, estímulo constante durante toda esta pesquisa;

Ao Prof. Ricardo Bressan-Smith, pela amizade e sugestões para a realização deste trabalho, desde a elaboração do projeto à conclusão da tese;

Ao meu querido amigo Dr. Alessandro Coutinho Ramos, pela imensa ajuda e incentivo em trabalhar com os transportadores primários de prótons com o Prof. Arnaldo;

Aos Professores Anna Okorokova Façanha e Tocio Sedyama, pelas críticas e sugestões apresentadas para a melhoria deste trabalho;

Ao doutorando Joseph Albert Medeiros Evaristo, pela amizade, sugestões e ajuda na realização da eletroforese de proteínas;

À doutora Glória, pela ajuda e amizade;

Aos técnicos Jader e Acácio pela ajuda na condução dos experimentos;

Ao professores José Tarcísio de Lima Thiebaut, Claudio Retamal, Lino Ferreira da Silva, Pedro Henrique Monerat e Eliemar Campostrini pela amizade e ajuda;

A todos os professores e colegas do laboratório de Fitotecnia e Fisiologia Vegetal;

Aos professores e técnicos do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/CBB) pelo ótimo convívio durante todo esse período, em especial à professora Maura da Cunha e aos professores Flávio Costa Miguês e Lev Okorokov;

Aos amigos Ismael, Wellington, Rafael, Luiz Augusto (Guto) e Marcelo Gabetto pela amizade e ajuda valiosa;

Aos colegas de laboratório: Cláudia, Erval, Alessandra e Luciana;

Ao doutorando Daniel Zandonadi, pela amizade e ajuda;

Aos amigos de república, Adriano e Fernando;

Aos professores, funcionários e amigos da UENF, pelos excelentes serviços prestados, pelo convívio e amizade;

Às secretárias da Pós-graduação, Fátima, Luciana e Patrícia, e às bibliotecárias pela atenção dispensada;

À minha namorada Simone, pelo apoio incondicional durante todos os momentos;

A todos muito obrigado.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS</u>	<u>x</u>
<u>RESUMO</u>	<u>xi</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>xiii</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>2.0. REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>4</u>
2.1. Cultura do milho	4
2.2. Plantas daninhas	5
2.3. Herbicida mesotrione	6
2.3.1. Eficiência do mesotrione	11
2.3.2. Absorção e translocação do mesotrione	11
2.4. Transportadores de membrana plasmática envolvidos na entrada de herbicida para o citoplasma	12
2.5. Desintoxicação de herbicida no interior da célula	18
<u>a) Oxidação de herbicidas pela enzima citocromo P450</u>	<u>20</u>
<u>a) Conjugação de herbicidas na Fase II com açúcares pelas enzimas UDP-O ou N-Glicosiltransferases</u>	<u>23</u>
<u>Por outro lado, o uso extensivo do herbicida propanil na cultura de arroz tem resultado na resistência da plantas daninhas Echinochloa colonum, dificultando o controle devido à conjugação deste herbicida com a glicose (Cole, 1994).</u>	<u>24</u>
<u>b) Conjugação de herbicida com glutationa (GSH) na Fase II pela enzima Glutationa S-transferase (GSTs)</u>	<u>24</u>

2.6. Eletroforese -----	32
<u>3.0. OBJETIVOS-----</u>	<u>34</u>
3.1. Objetivos específicos-----	34
<u>4.0. MATERIAL E MÉTODOS-----</u>	<u>35</u>
4.1. Condições de cultivo das plantas de milho-----	35
4.2.1. Preparação da fração microssomal-----	36
4.2.2. Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto-----	37
4.2.3. Determinação da atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPases do tipo P e V e H ⁺ -PPase-----	37
4.2.4. Monitoramento do gradiente de prótons-----	38
4.3. Avaliação do perfil protéico por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Unidimensional) -----	39
4.3.1. Análise computacional-----	40
4.4. Avaliação das trocas gasosas e eficiência fotoquímica-----	41
4.5. Medição da fluorescência da clorofila a-----	41
4.6. Leitura do SPAD-----	42
4.7. Análise de nutrientes das folhas -----	42
O cultivo das plantas de milho para análise de nutrientes foi realizado nas mesmas condições do experimentos descritos no item 4.2. Neste experimento foram utilizadas 10 plantas por tratamento, cultivadas individualmente em vaso de 4,5 L.-----	42
4.8. Efeito do mesotrione no crescimento das plantas de milho-----	43
<u>5. RESULTADOS-----</u>	<u>44</u>
5.1. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase de tonoplasto-----	44
5.1.1. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase em folha de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	44
5.1.2. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase em folha de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	45
5.1.3. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase em folha de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	46
5.1.4. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase no caule de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	50
5.1.5. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase no caule aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	51
5.1.6. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase no caule de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	53
5.1.7. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase em raiz de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	57
5.1.8. Atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase em raiz de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione -----	58

5.1.9. Estimulação da atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase da K ⁺ -dependente em folha, caule e raiz de milho	64
5.1.9. Estimulação da atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase da K ⁺ -dependente em folha, caule e raiz de milho	64
5.1.10. Estimulação da atividade hidrolítica da H ⁺ -PPase total em folha, caule e raiz de milho	66
5.2. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo V em vesícula de tonoplasto	67
5.2.1. Atividade hidrolítica da V-ATPase em folhas de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione	67
5.2.2. Atividade hidrolítica da V-ATPase em caule de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione	69
5.2.3. Atividade hidrolítica da V-ATPase em raiz de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione	70
5.2.4. Estimulação da atividade hidrolítica da V-ATPase em folha, caule e raiz de milho	71
5.3. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo P de membrana plasmática	72
5.3.1. Atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase em folha de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione	72
5.3.2. Atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase no caule de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione	73
5.3.3. Atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase no caule de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione	74
5.3.4. Atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase no caule de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione	76
5.3.5. Atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase em raiz de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione	77
5.3.6. Estimulação da atividade hidrolítica da H ⁺ -ATPase em folha, caule e raiz de milho	78
5.4. Fotossíntese	80
5.5. Medição da fluorescência da clorofila a	82
5.6. Crescimento das plantas de milho	84
5.7. Leituras do clorofilômetro (SPAD) em folhas de milho	87
5.8. Teor de nutriente nas folhas de milho	88
<u>6. DISCUSSÃO</u>	<u>90</u>
<u>7. CONCLUSÕES</u>	<u>104</u>
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>105</u>
European Commission (2003) Commission working document. Health e consumer protection directorate-general Review report for the active substance mesotrione. p.22.	110
<u>Hall, M. G., Wilks, M. F., Provan, W. M., Eksborg, S., Lumholtz, B. (2001) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-</u>	

[hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase \(HPPD\) following a single dose to healthy male volunteers. British Journal of Clinical Pharmacology. n. 2, p.169-177.-----112](#)

Johnson, C. B., Young, B. G. (2002) Influence of temperature and relative humidity on the foliar activity of mesotrione. *Weed Science*, n.50, p.157-161.-----114

Maeshima, M., Nakanishi, Y. (1998) Molecular Cloning of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and Its Developmental Expression in Growing Hypocotyl of Mung Bean. *Plant Physiol.* n. 116, p.589-597.-----116

Masiunas, J., Pataky, J., Sprague, C., Williams, M., Wax, L. (2004) Sweet Corn Cultivar Tolerance to Mesotrione. *Weed Science Society Of America Meeting Abstracts*.18. -----117

Mayer, M. P., Nivelstein, V., Beyer, P. (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplast of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol Biochem.* n.30, p. 389-398.-----118

Mayonado, D. J., Hatzios, K. K., Orcutt, D. M., Wilson, H. P. (1989) Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide SC-0051 by HPLC análisis. *Pestic. Biochem. Physiol.* n.35, p.138-145.-----118

Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E. M., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K., Wichert, R. A. (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science.* v. 57, p.120-128.-----118

Nakanishi, Y., Maeshima, M. (1998) Molecular Cloning of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and Its Developmental Expression in Growing Hypocotyl of Mung Bean. *Plant Physiol.* n.116, p.589-597.-----119

Norris, S. R., Barrette, T. E., DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* define plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant cell.* n.7, p.2139-2149.-----119

Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R., Larsson, C. (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p.20470-20475.-----119

Prysbilla, M. P., Onisjo BCShribbs, J. M., Rllis, M. K., Hawkes, T. R., Mutter, L. C. (1993) The novel mechanism of action of the herbicidal triketones, *Proc. Brighton Crop Prot. Conf, Weeds, BCPC, Farnham, Surrey, UK*, p.731-738. -----120

- Sandmann, G., Böger, P. (1997) Phytoene desaturase as target for bleaching herbicides. In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed by Roe, R. M., Burton, J. D. and Kuhr, R. J., IOS Press, Amsterdam, p.1-10.-----122
- Shiratake, K., Kanayama, Y., Maeshima, M., Yamaki, S. (1997) Changes in H⁺-Pumps and a Tonoplast Intrinsic Protein of Vacuolar Membranes during the Development of Pear Fruit. *Plant Cell Physiol.* n.38, p.1039-1045.-----123
- Soeda, T., Uchida, T. (1987) Inhibition of pigment synthesis by 1,3-dimethyl-4-(2,4-dichlorobenzoyl)-5-hydroxypyrazole, norflurazon and new herbicidal compounds in radish and flatsdge plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* n.29, p.35-42.-----124

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACMA	9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
DAP	Dias após o plantio
DAA	Dias após a aplicação do herbicida mesotrione
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno-diamino tetracético
H ⁺ -ATPase	Próton ATPase de membrana plasmática
V-ATPase	H ⁺ -ATPase de tonoplasto
H ⁺ -PPase	Próton pirofosfatase
K _m	Constante de Michaelis-Menten (concentração de substrato referente à metade da velocidade máxima)
MOPS	Ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico
P _i	Fosfato inorgânico
PP _i	Pirofosfato inorgânico
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil) aminometano
IAA	Ácido indolacético
GST	Glutathione S-transferase
GSH	Glutathione
P450	Citocromo P-450 Monooxigenase-Dependente
Glc	Glicose

RESUMO

OGLIARI, Juares, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Junho de 2007. Envolvimento do sistema primário de translocação de prótons na desintoxicação do herbicida mesotrione em plantas de milho. Orientador: Prof. Silvério de Paiva Freitas e Co-orientador: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

Objetivou-se verificar a participação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPases do tipo P e V e da H⁺-PPase na desintoxicação do herbicida mesotrione em tecidos de *Zea mays* L. (híbrido Braskalb 330) em três épocas de avaliação após a aplicação do herbicida. Aos 15 dias após o plantio foram aplicados 192 g ha⁻¹ do mesotrione em pós-emergência. A raiz, o caule e a folha foram coletados aos três, sete e 12 dias após aplicação (DAA) para o fracionamento celular e isolamento das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto. A atividade fotossintética e a fluorescência da clorofila *a* foram avaliadas como indicadores da toxicidade do herbicida em um, dois, três, cinco e sete DAA. Também foi avaliado o perfil eletroforético de proteína no citoplasma aos três e sete DAA. O mesotrione afetou a taxa fotossintética nos primeiros três DAA, apresentando aparente desintoxicação a partir do quinto dia e recuperação total aos sete DAA. Este herbicida promoveu maior síntese de proteínas ou polipeptídeos nos tecidos de

folha e caule e menor na raiz na faixa de peso molecular de 20 a 64 kDa. O tratamento com o herbicida mesotrione promoveu ativação da atividade hidrolítica, principalmente da H⁺-PPase vacuolar nas folhas de 568% e 290%, caules de 191% e 144 % e raízes de 114% e 67% aos três e sete DAA, respectivamente, em relação ao controle. A hidrólise de ATP associada à membrana plasmática do caule desencadeou modulação diferencial sendo estimulada em 64% aos três DAA e inibida aos sete e 12 DAA em 40% e 76%, respectivamente. A hidrólise de ATP associada ao tonoplasto também foi afetada pelo tratamento, mas em menor intensidade, atingindo máximo de 57% de ativação aos sete DAA. Os resultados indicaram que os principais sistemas de transporte primário da célula vegetal são modulados em resposta ao tratamento com mesotrione atingindo ativação máxima nos primeiros DAA, indicando possivelmente participação no processo de desintoxicação da planta. Os dados também indicam que a H⁺-PPase vacuolar seria a principal enzima a responder ao tratamento com mesotrione, podendo assim exercer função chave na energização do tonoplasto e compartimentalização deste herbicida no vacúolo, principalmente nas células de folhas e caule de milho.

ABSTRACT

OGLIARI, Juares, D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, June 2007. Involvement of the primary system of translocation of protons of in detoxification of herbicide mesotrione in corn of plants. Advisor: Prof. Silvério de Paiva Freitas and Co-advisor: Prof. Arnaldo Rocha Façanha.

The aim of this work was to investigate the role of P- and V-type H⁺-ATPases and vacuolar H⁺-PPase hydrolytic activity on the detoxification of herbicide (mesotrione) in *Zea mays* L (hybrid Braskalb 330) in three evaluation points after herbicide application. Post-emergence herbicide was applied (192 g ha⁻¹) on the 15th day after plantation, and the H⁺-pumps activities were evaluated in root, mesocotyl and leaf on the 3rd, 7th and 12th day after application (DAA) of mesotrione. The plant tissues collected on the three periods were submitted to the cell fractionation to isolate the plasma membrane and tonoplast vesicles. The photosynthetic and fluorescence activity of the chlorophyll *a* was evaluated as indicators of toxicity of the herbicide on the 1st, 2nd, 3rd, 5th and 7th DAA. Also, was evaluated the cytoplasm protein electrophoresis profile on the 3rd and 7th DAA. The mesotrione affected the photosynthetic rate on the 1st, 2nd and 3rd DAA due a likely detoxification on the 5th day and a total recovery on the 7th DAA. This herbicide has enhanced the synthesis of proteins or polypeptides ranging from 20 to 64 kDa in the leaf and stem but decreased in the root. The treatment with herbicide promoted activation of hydrolytic activity, mainly in the H⁺-PPase from leaves (568% and 290 %) and roots (114% and 67%) to 3rd and 7th DAA respectively. In regards to mesocotyl the stimulus was 191%, 144% and 110% on the 3rd, 7th and 12th DAA, in comparison to control. The P-H⁺-ATPase ATP hydrolysis in mesocotyl had a differential modulation being stimulated on the 3rd DAA (+64%) and inhibited on the 7th and 12th day (-40% and -76%, respectively). The V-ATPase hydrolysis was also affected, but with lower intensity (maximum activation of 57%) on the 7thDAA. The results showed that the primary H⁺ transport systems of plant cell are modulated in response to the treatment with mesotrione, reaching the maximum activation on the first DAA, indicating possible contribution to the plant detoxification process. The data also demonstrated that the H⁺-PPase was more

sensitive to mesotrione, functioning as a key enzyme on the tonoplast energization and herbicide compartmentalization in vacuole mainly in leaves and mesocotyl maize cells.

1. INTRODUÇÃO

O mesotrione é um herbicida de ação sistêmica indicado para o controle de plantas daninhas na cultura de milho (*Zea mays*) em pré ou em pós-emergência (Rodrigues e Almeida, 2005; Sprague et al., 1999). As plantas absorvem este herbicida por meio das raízes e folhas, apresentando excelente movimento apoplástico (Mitchell et al., 2001). As espécies de plantas susceptíveis ao mesotrione começam a apresentar sintomas de amarelecimento nas folhas aos três dias após a aplicação (DAA), com posterior branqueamento, progredindo para a necrose e morte da planta em até duas semanas. Os sintomas se desenvolvem mais rapidamente na presença de luz (Johnson e Young, 2002; Wichert et al., 1999).

O mesotrione provoca leve sintoma de intoxicação em algumas variedades ou híbrido de milho, embora não promova perdas na produtividade de grãos (Masiunas et al., 2004). O milho é tolerante ao mesotrione devido, provavelmente, à capacidade de desativação do princípio ativo e à translocação para compartimentos celulares, como vacúolo ou para o meio extracelular (Johnson e Young, 2002; Mitchell et al., 2001; Kreuz et al., 1996). Por isso, possivelmente a grande maioria das classes de herbicida é translocada para o interior do citoplasma com gasto de energia para romper a barreira da plasmalema (Riechers et al., 1998; Hess, 1995; Briskin, 1994). Esta energia é fornecida pelos transportadores primários de prótons (H^+ -ATPase) localizados na membrana plasmática, que irão energizar as proteínas transportadoras

secundárias (Hull e Cobb, 1998; Coleman et al., 1997). Os herbicidas no citoplasma, em plantas tolerantes, são removidos para o vacúolo ou apoplasto, através dos transportadores secundários, energizados pelas bombas primárias de prótons, que geram gradiente eletroquímico, através da membrana vacuolar, produzindo força motriz para o transporte ativo secundário (Kreuz et al., 1996, Gaillard et al., 1994; Rus et al., 1994; Martinoia et al., 1993; Ros et al., 1990).

Em plantas tolerantes, a metabolização e a desintoxicação dos herbicidas são realizadas por quatro fases distintas (Coleman et al., 1997; Kreuz et al., 1996). Na Fase I (ativação) ocorre a exposição ou introdução de grupos funcionais, por meio de reações que normalmente envolvem hidrólise, oxidação ou redução, tornando as moléculas de herbicida ativas para as enzimas atuarem na Fase II (Eerd et al., 2003; Coleman et al., 1997; Kreuz et al., 1996). Na Fase II (conjugação) o herbicida ativado é conjugado por meio de moléculas hidrofílicas endógenas, como a glutatona e/ou Uridina-5'-difosfoglicose por meio da ação das enzimas *Glutathione S-transferase* (Riechers et al., 1998; Lamoureux et al., 1991), *O* ou *N-Glicosiltransferases* (Leah et al., 1992; Lamoureux et al., 1991) respectivamente, e aminoácidos – possivelmente sem a necessidade de enzimas para formar o conjugado (Eerd et al., 2003; Coleman et al., 1997; Hatzios, 1997; Kreuz et al., 1996). Na Fase III (eliminação) o conjugado é translocado para o interior do vacúolo ou excretado para o apoplasto através de transportadores primários (transportadores ABC, *ATP-binding cassette*) e/ou secundários sendo energizados pelas bombas primárias H^+ -ATPase e a pirofosfatase (H^+ -PPase) (Eerd et al., 2003; Harzios, 1997; Martinoia et al., 1993). Na Fase IV (transformação) os conjugados que foram transportados para o vacúolo ou apoplasto são posteriormente hidrolisados ou degradados (De Prado e Franco, 2004; Coleman et al., 1997; Kreuz et al., 1996; Sandermann, 1992).

Existem vários estudos relatando a atuação dos herbicidas no metabolismo das plantas, no entanto, há poucos trabalhos que descrevem a participação dos transportadores primários de prótons de membrana (plasmalema e tonoplasto) na translocação da grande maioria das classes de herbicidas para o interior da célula, e a eliminação para o apoplasto. Alguns estudos verificaram a dependência do gradiente eletroquímico gerada pelas bombas H^+ , em promover a translocação do herbicida para o interior da célula (Hull e Cobb, 1998; Coudercher e Retzlaff, 1991), e também a compartimentalização no vacúolo (Bartholomew et

al., 2002; Martinoia et al., 1993). Dessa forma, é importante compreender como as diversas classes de herbicidas interagem com os transportadores primários de prótons, em plantas sensíveis e/ou tolerantes. No caso do milho, tolerante ao herbicida mesotrione, não há informação se este produto químico interfere no gradiente eletroquímico da H^+ das membranas.

A relevância deste trabalho consiste em conhecer quais são os possíveis transportadores primários de prótons de membrana plasmática e de tonoplasto em plantas de milho, que são mais afetados pelo herbicida mesotrione. Diante do exposto, foi elaborada a seguinte hipótese: é provável a participação do sistema de transporte primário de prótons na desintoxicação do herbicida mesotrione nas plantas de milho.

2.0. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é considerado a terceira cultura mais importante do mundo depois do arroz e do trigo (Baligar et al., 1997), devido ao seu potencial produtivo, à sua composição química e ao seu valor nutritivo. Essa planta pode ser cultivada em climas variados, desde a zona temperada à tropical a 58^o de Latitude Norte até 40^o de Latitude Sul e, ainda, em regiões com altitude de até 4000 m (Fancelli e Neto, 2000; Pinazza, 1993; Fageria, 1989).

No Brasil, o milho é considerado uma das principais culturas agrícolas, principalmente, por ser a base da alimentação humana, animal e fonte de matéria-prima para diversos produtos industriais. No entanto, um dos fatores que comprometem o rendimento da cultura é a interferência exercida pelas plantas daninhas. As perdas ocasionadas pela competição de plantas daninhas com a cultura podem variar de 10 a 90%, dependendo das espécies envolvidas, do grau de infestação, do período de convivência, bem como do estágio de desenvolvimento da cultura e das condições climáticas que as espécies são submetidas (Silva et al., 2005; Fancelli e Neto, 2000; Ford e Pleasant, 1994). Portanto, para expressar o potencial produtivo do milho é necessário o controle adequado das plantas daninhas (Deuber, 1992).

2.2. Plantas daninhas

As plantas daninhas são ameaças constantes para a agricultura em todo mundo, ocasionando grande prejuízo na produção de alimentos, por serem altamente competitivas e se adaptam bem a qualquer tipo de ecossistema. Com a crescente demanda por alimentos, os agricultores têm procurado meios mais rápidos e menos onerosos de aumentar a produtividade das lavouras (Basu et al., 2004).

Os herbicidas são amplamente utilizados no controle das plantas daninhas, principalmente em grandes plantações nas quais outros métodos seriam inviáveis. Comparados aos outros métodos de controle, os herbicidas destacam-se pela eficiência, rapidez na operação e redução nos custos. Dentre os herbicidas aplicados em pós-emergência das plantas daninhas na cultura do milho, merecem destaque o atrazine e alguns herbicidas do grupo químico das sulfoniluréias, como o nicosulfuron, o foramsulfuron e o iodosulfuron methyl sodium (Zagonel, 2002), além do mesotrione (Rodrigues e Almeida, 2005).

O controle das infestantes no milho, quando realizado com herbicidas de pós-emergência, tem a vantagem da flexibilidade para escolha do produto e da dose a ser aplicada para as espécies presentes e também, em função da infestação da área. Nessa modalidade de aplicação, a seletividade dos herbicidas, juntamente com a época de aplicação, é muito importante (Vidal et al., 2002). A época de aplicação do herbicida na cultura do milho varia com a espécie de planta daninha, a população e a época de incidência (Zagonel et al., 2000). Em geral, essa cultura deve ser mantida livre da presença das plantas invasoras entre o período de 14 e 42 dias após a semeadura ou plantio (Ramos e Pitelli, 1994; Blanco, 1982). No entanto, quando a infestação é predominantemente de *poaceas* (gramíneas), e/ou ocorrer altas populações de plantas daninhas que incidem desde o início do desenvolvimento da cultura, o controle deve ser executado mais cedo (Zagonel et al., 1998; Pitelli, 1985), visto que os herbicidas são mais eficientes em plantas daninhas menos desenvolvidas.

As plantas daninhas verdadeiras apresentam determinadas características que as possibilitam sobreviver em condições adversas como: solos encharcados, alcalinos ou ácidos e temperaturas variadas (Brighenti, 2001; Silva et al., 2000). De acordo com Brighenti (2001) e Cardenas et al. (1972) as

principais características das plantas daninhas são: ciclo de vida semelhante ao da cultura, plasticidade populacional, germinação desuniforme (mecanismo de sobrevivência em função da dormência e da quiescência), liberação de substâncias químicas (efeitos alelopáticos), habilidade de produzir grande número de sementes viáveis com adaptações que facilitam a dispersão da espécie e formas variadas de multiplicação (tubérculos, estolões, rizomas e bulbos).

Entretanto, as plantas daninhas não devem ser vistas sempre como inimigas ou indesejáveis, pois podem ser úteis em determinadas situações como: controle da erosão, reciclagem de nutrientes (Ruedell, 1995), produção de compostos medicinais e também produção de néctar para as abelhas e outros insetos de interesse à cadeia ecológica. Outra questão favorável a ser considerada é a cobertura viva e morta que as plantas daninhas proporcionam ao solo, reduzindo o aquecimento deste, e auxiliando na retenção de umidade (Brighenti, 2001; Silva et al., 2000).

A cultura do milho, apesar de apresentar boa capacidade competitiva e de ser enquadrada entre o grupo de culturas que mais sombreiam o solo (Keeley e Thullen, 1978), sofre intensa interferência das plantas daninhas, com sérios prejuízos no crescimento, na produtividade e na operacionalização da colheita (Ramos, 1992). Portanto, o controle delas é de fundamental importância para aqueles que desejam obter bons rendimentos, tornando necessário controlá-las na época oportuna, por meio de métodos adequados (Karan et al., 2003).

2.3. Herbicida mesotrione

O mesotrione (2-(4-metil-2-nitrobenzoi)-1,3-ciclohexano-1,3-dione) é recomendado no controle de plantas daninhas na cultura do milho, e integra o grupo químico das 2-benzoi-ciclohexano-1,3-dione (tricetonas), o qual atua inibindo a enzima *4-hidroxifenilpiruvato* dioxigenase - HPPD, EC1.13.11.27 - Figura 01 - (Mitchell et al., 2001; Sprague et al., 1999; Young et al., 1999; Lee et al., 1997). Na Tabela 01 estão descritas algumas propriedades físicas e químicas mais importantes do mesotrione.

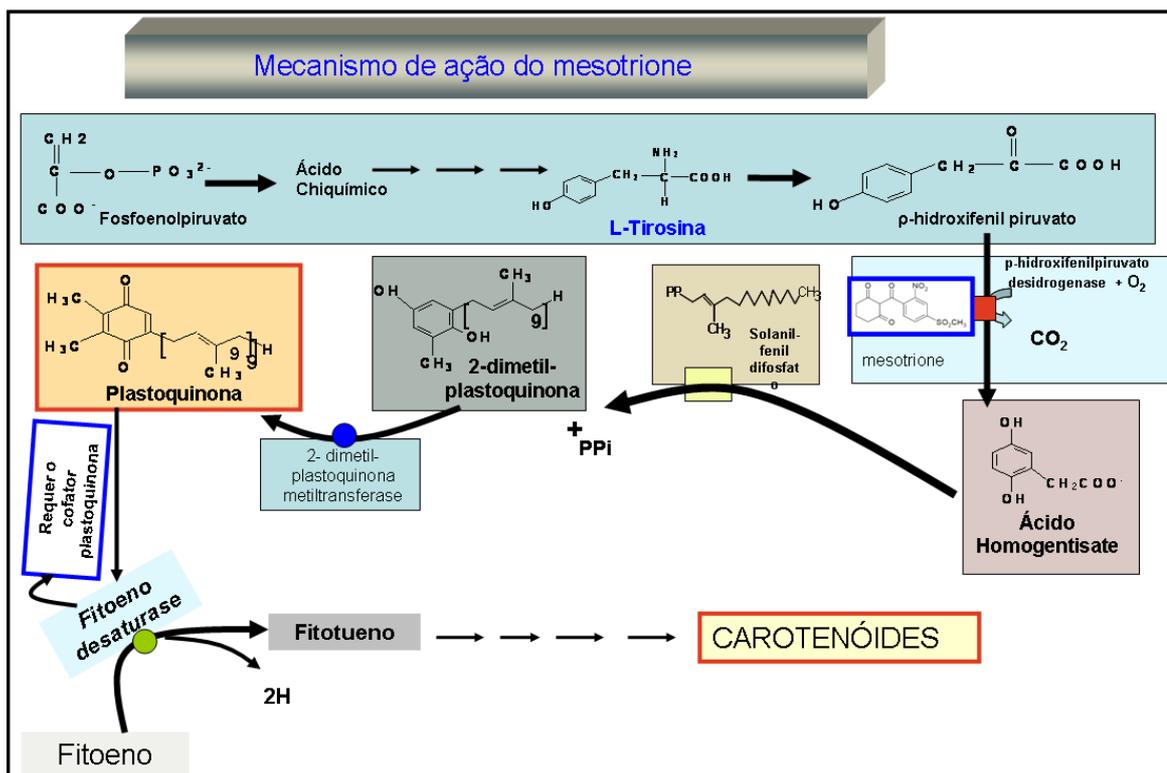


Figura 01: Mecanismo de ação do herbicida mesotrione - inibidor da biossíntese de carotenóides. (Fonte: adaptado de Fritze et al., 2004; Hall et al., 2001).

Tabela 01: Propriedades físicas e químicas do herbicida mesotrione

Fórmula molecular	C ₁₄ H ₁₃ NO ₇ S
Massa Molecular	339,3
Ponto de Fusão	165,3 °C
Solubilidade em água	168,7 mg L ⁻¹
Densidade	0,6736 g mL ⁻¹
Coeficiente de partição octano/água (Kow) a 25 °C	pH 5: - 1,076 pH 7: < -1,0
Constante de dissociação (pKa) 25 °C	3,12
Absorção UV/VIS (máx)	256 nm
Tipo de formulação	Solução concentrada (SC)
Pressão de vapor	< 7,5 x 10 ⁻⁹ mm Hg
Concentração (g L ⁻¹ i.a.)	480 g L ⁻¹

Fonte: Rodrigues e Almeida (2005) e European Commission (2003); pKa = pH em que o herbicida esta 50% dissociado.

Em plantas, a HPPD é uma enzima da rota biossintética, que converte a tirosina em plastoquinona e α-tocoferol. A acumulação da tirosina, e o

esgotamento de plastoquinona (Prysbilla et al., 1993) com a elevação do nível do fitoeno (Mayonado et al., 1989; Soeda e Uchida, 1987) têm sido observados em tecidos meristemáticos da planta *Ipomoea hederacea*, tratadas com benzoilciclohexanedione.

A plastoquinona é um co-fator crítico para a *fitoeno desaturase*, e componente da reação enzimática da biossíntese dos carotenóides (Norris et al., 1995; Mayer et al., 1992). Desse modo, a redução do nível de plastoquinona pela inibição da HPPD, provocado pelo mesotrione, resulta no esgotamento dos carotenóides, o que leva o branqueamento dos tecidos, (Böger e Sandmann, 1998; Sandmann e Böger, 1997), principalmente os meristemáticos (Mayonado et al., 1989; Soeda e Uchida, 1987). Por outro lado, Pallette (2000) sugere que podem existir outras três cascatas ou ramificações independentes quando ocorre a redução da síntese da plastoquinona, por meio da competição do mesotrione com a enzima HPPD, como é demonstrando na Figura 02, na qual todas as divisões contribuem para a morte da planta.

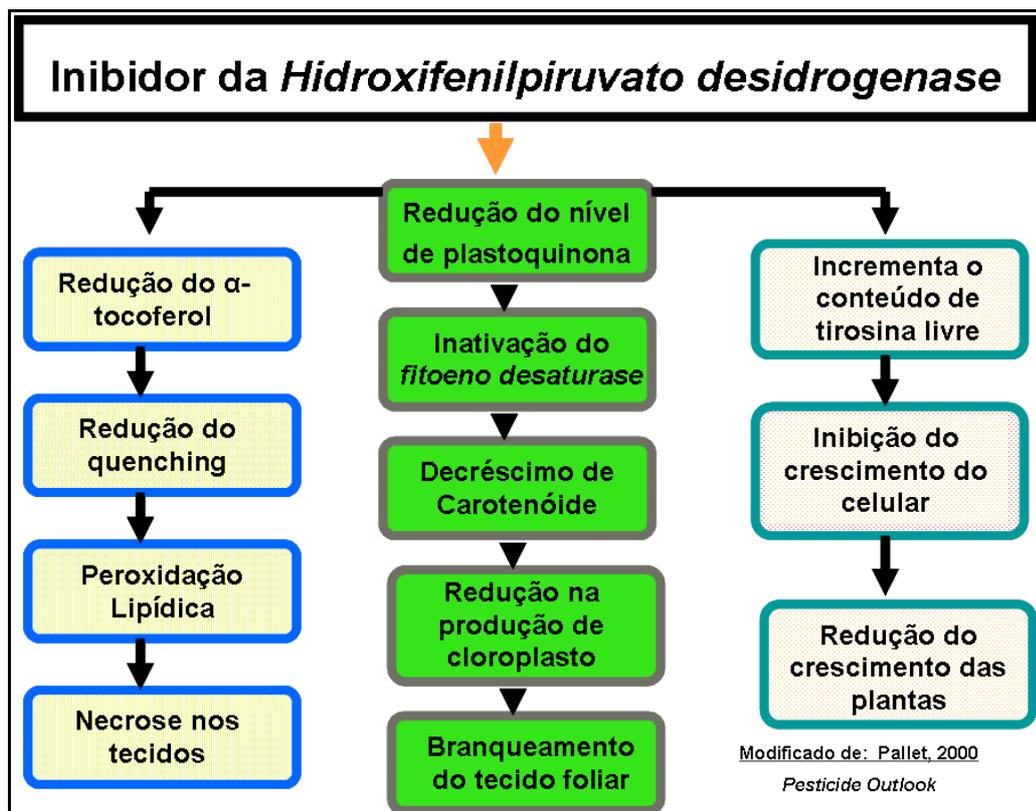


Figura 02: Efeitos secundários de fitotoxicidade em planta sensível ao herbicida mesotrione quando a plastoquinona não for mais sintetizada após a inibição da enzima *4-hidroxfenilpiruvato* dioxigenase (HPPD).

A depleção da síntese de plastoquinona pelo mesotrione vai desencadear a inibição da síntese, principalmente, das moléculas de carotenóides e α -tocoferol,

as quais servem como agentes fotoprotetores das membranas tilacoidais, onde atuam eliminando o excesso de energia (Hess, 2000) - Figura 03. A redução da síntese da plastoquinona também reduz o transporte de elétrons nos fotossistemas II para I, e gera moléculas de clorofilas no estado triplet (^3Chl). Nesse estado, elas dão origem a uma reação em cadeia formando radicais livres (R^*)¹ como: oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^*) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que irão peroxidar os lipídios das membranas, proteínas, pigmentos, ácidos nucleicos e outras moléculas da célula, induzindo a desorganização e, conseqüentemente, a morte da célula (Fuerst e Norman, 1991).

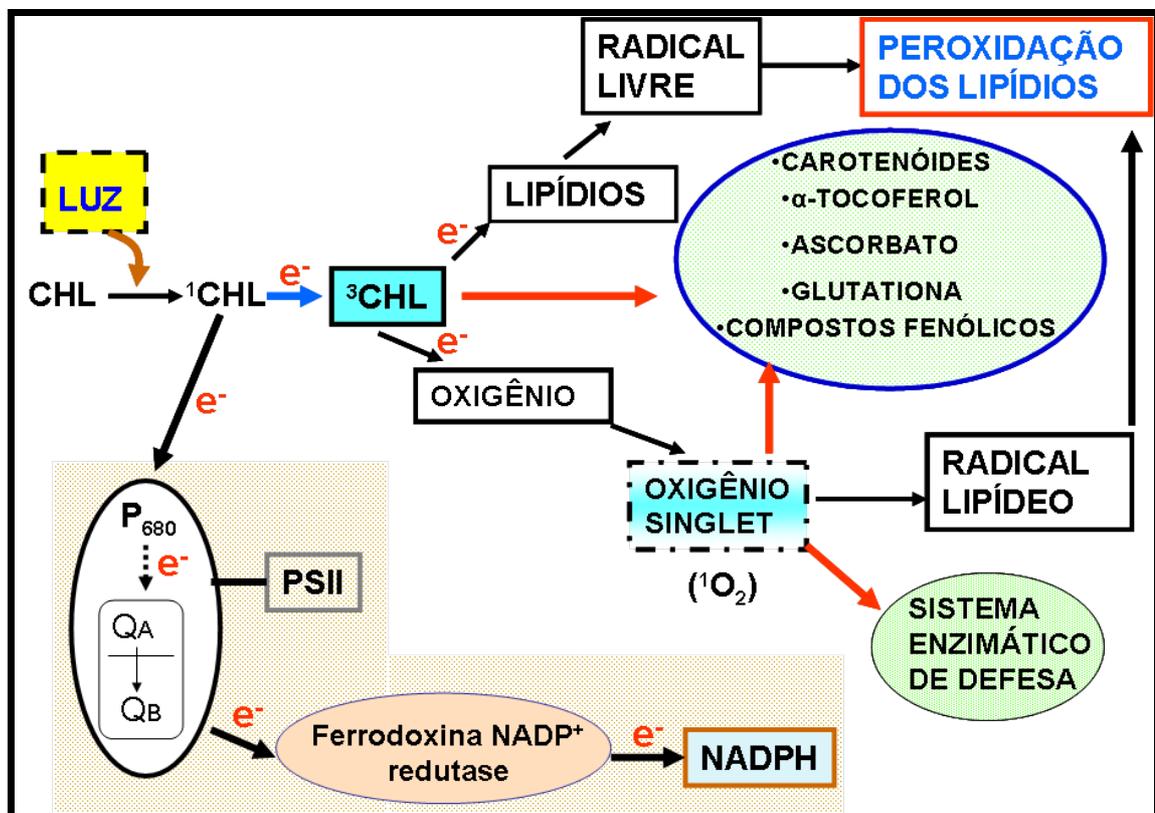


Figura 03: Esquema representativo que o herbicida mesotrione pode acarreta no fotossistema II da fotossíntese, pela inibição da síntese de plastoquinona, no qual interrompe o fluxo de elétrons entre os fotossistemas (FS II e I), sendo que os elétrons e a energia da clorofila no estado *triplet* é dissipada, principalmente pelos carotenóides e α -tocoferol, ácido ascórbico, glutatona e compostos fenólicos. A clorofila *triplet* pode desencadear a peroxidação lipídica dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana do cloroplasto e da membrana plasmática. PSII = fotossistema II; CHL = clorofila; ^1CHL = clorofila singlet; ^3CHL = clorofila triplet; Q_A e Q_B = plastoquininas. Fonte: adaptado de Hess (2000).

¹ Radical livre é definido como qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência.

As plantas em condições normais de desenvolvimento possuem mecanismos alternativos no sistema fotossintético para dissipar o excesso de energia luminosa, quando absorvem grande quantidade e não conseguem transformá-la em energia química. Esta energia em excesso pode levar à produção de pequena quantidade de radicais reativos, podendo ocorrer danos às células se não forem dissipadas com segurança, por mecanismos dissipadores de energia (Taiz e Zeiger, 2004). Entretanto, quando as plantas são tratadas com herbicidas que interferem no aparelho fotossintético, a quantidade de radicais reativos produzidos ultrapassa a capacidade de desintoxificação dos mecanismos de dissipadores de energia. Por isso, a atuação dos carotenóides, α -tocoferóis, ácidos ascórbicos, glutatonas e os compostos fenólicos presentes nos cloroplastos, protegem contra o oxigênio singlet (1O_2) e as clorofilas no estado triplet (3Chl) na peroxidação lipídica, dissipando o excesso de energia da clorofila e a eliminação de radicais tóxicos (Gronwald, 1994; Fuerst e Norman, 1991). Por outro lado, a formação de pequena quantidade de 1O_2 pode ser benéfica à célula, atuando como mensageiro secundário na tradução de sinal em resposta ao estresse ambiental e/ou por herbicidas, podendo desencadear a expressão de genes para ativar o sistema enzimático de defesa ou antioxidante como a *Superóxido dismutase*, *Catalase*, *Guaiacol peroxidase*, *Glutaciona redutase*, *Ascorbato peroxidase*, *Tioredoxina redutase*, sendo esses capazes de remover ou neutralizar os radicais livres (Mittler, 2002; Scandalios, 1993) - Figura 04.

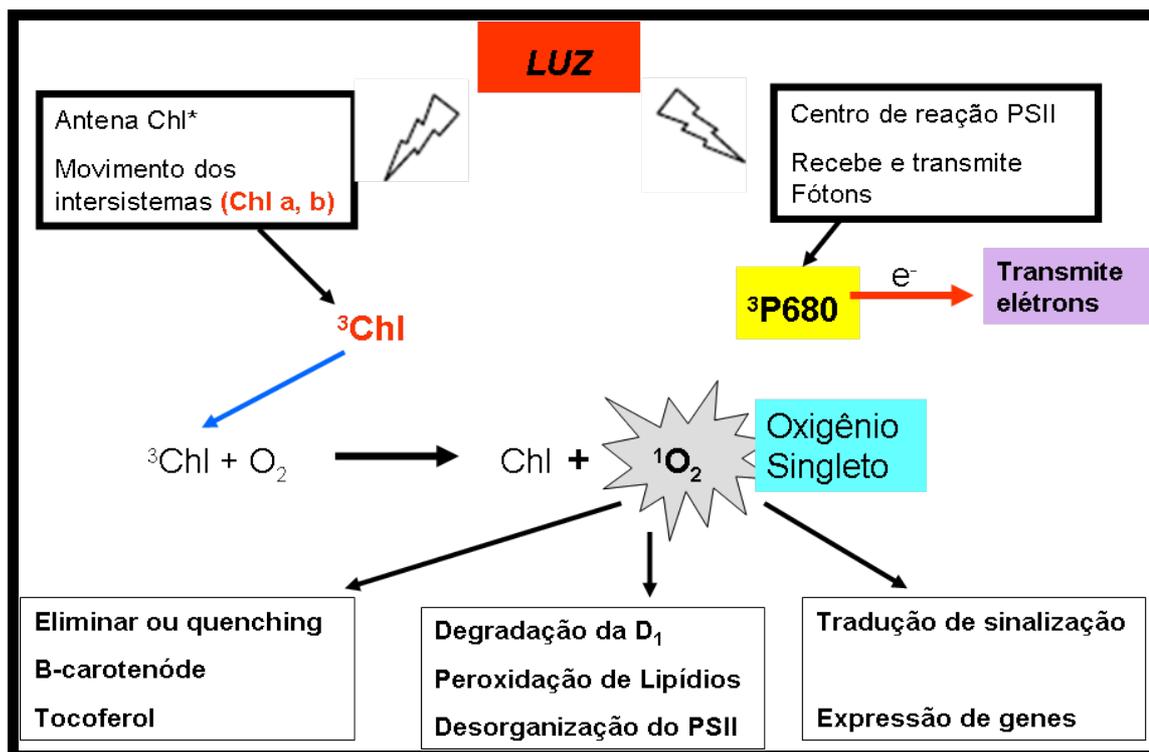


Figura 04: Produção de oxigênio **singlet** no fotossistema II e mecanismo de proteção, com possíveis danos a célula.

2.3.1. Eficiência do mesotrione

O mesotrione é um herbicida seletivo de ação sistêmica, indicado para o controle em pré-emergência e, principalmente, em pós-emergência das plantas daninhas principalmente, das dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas na cultura do milho. A quantidade do produto recomendado quando aplicado em pré-emergência é de 100,0 a 225,0 g ha⁻¹ (Mitchell et al., 2001) e em pós-emergência é de 144,0 a 192,0 g ha⁻¹ (Rodrigues e Almeida, 2005).

Muitos testes realizados na cultura do milho nos Estados Unidos e na Europa não constataram intoxicação nas aplicações em pré-emergência, e média inferior a 3% nas aplicações em pós-emergência. Masiunas et al. (2004) descreveram que o mesotrione tem, ocasionalmente, provocado injúria em alguns híbridos de milho quando aplicado em pós-emergência, porém, não promoveu perda na produtividade de grãos.

2.3.2. Absorção e translocação do mesotrione

Trabalhos realizados por Wichert et al. (1999) para verificar a magnitude da absorção da molécula do mesotrione marcada com o [¹⁴C] em folhas de milho,

observaram que 90% do herbicida absorvido ocorria no período de até 24h após a aplicação e destes, 60% na primeira hora. A absorção pode ocorrer pelas raízes e folhas das plantas, apresentando excelente movimentação aposimplástica e translocamento no interior da planta por ambos movimentos: acrópeto e basípeto. Young et al. (1999) demonstraram que a aplicação foliar do mesotrione melhora o espectro de controle das plantas daninhas em relação às realizadas via solo. A atividade do herbicida na folha é frequentemente influenciada por fatores ambientais, tais como temperatura e umidade relativa (Bayer, 1987; Cudney, 1987). O milho é tolerante ao mesotrione devido à sua capacidade de ser metabolizado rapidamente, produzindo metabólitos sem atividade tóxica para a planta, o que não ocorre nas plantas daninhas sensíveis. Por apresentar seletividade natural ao milho, não foi necessário desenvolver um antídoto para o mesotrione (Mitchell et al., 2001).

2.4. Transportadores de membrana plasmática envolvidos na entrada de herbicida para o citoplasma

O estudo das membranas biológicas ocupa importante área da investigação, visto que as membranas protegem as células das adversidades e flutuações ambientais, além disso, definem os compartimentos controlando todos os tipos de interações entre o interior e o exterior celular. Além do mais, quanto ao aspecto bioquímico, muitos dos processos celulares fundamentais ocorrem em membranas, ou envolvem as membranas (Laura e Almeida, 2004).

Apesar da enorme variedade de seres vivos e dos diferentes tipos celulares existentes nos organismos, é comprovado que todas as membranas biológicas possuem uma bicamada lipídica (Figura 05). Além de grande diversidade de lipídios, os principais constituintes das membranas são proteínas, que são essencialmente responsáveis pela atividade bioquímica. A proporção relativa dos dois tipos de componentes nas biomembranas varia de 20% a 80% de proteína no modelo do mosaico fluído. Algumas membranas podem ter até 10% de glicídios, estando presentes sempre na forma de glicolipídios ou glicoproteínas. As propriedades físicas dos lipídios das membranas influenciam as atividades das proteínas integrais da membrana, incluindo as H⁺-ATPases e os transportadores secundários, que regulam o transporte de íons e outros solutos na célula (Laura e Almeida, 2004).

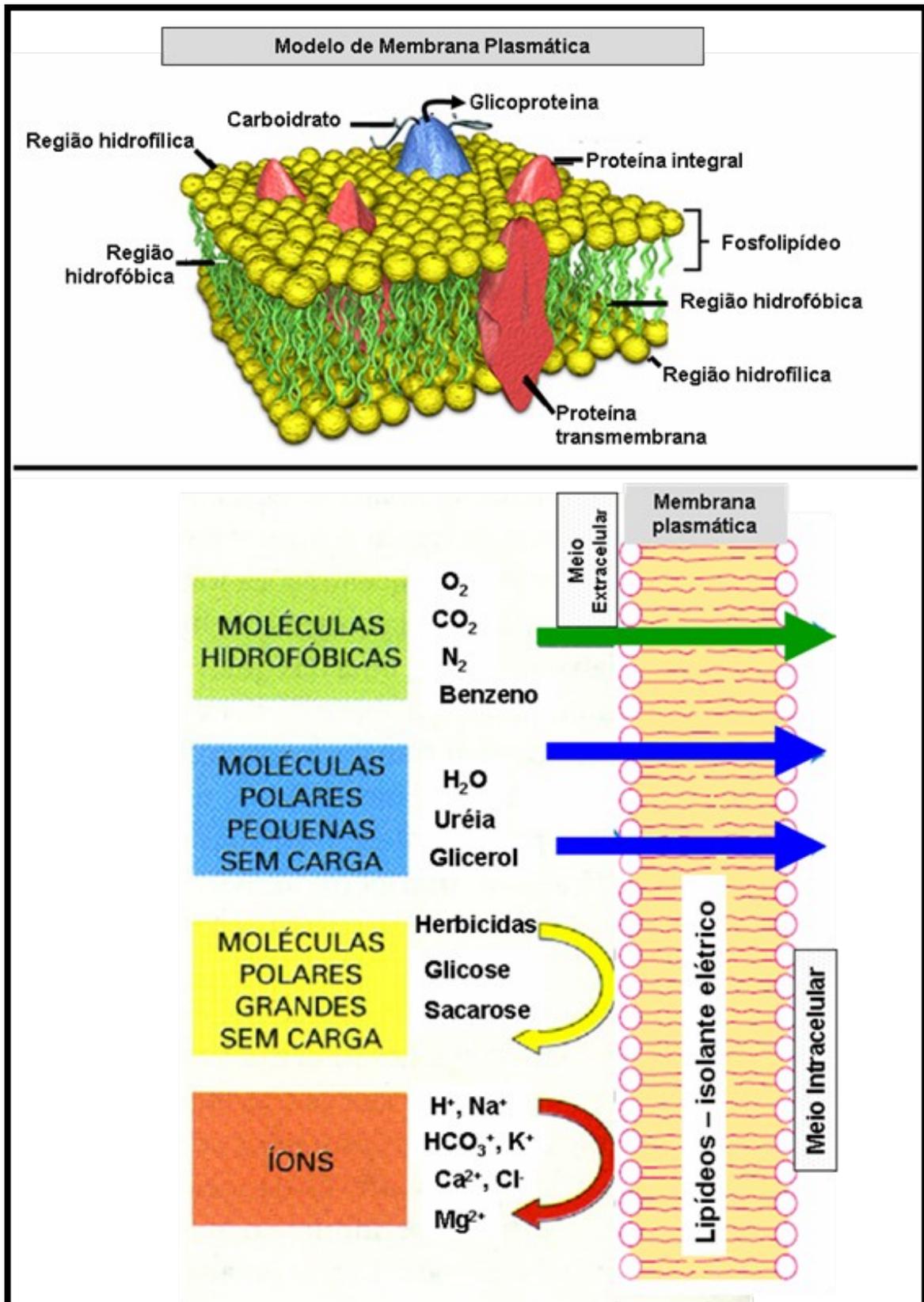


Figura 05: Esquema representativo da membrana plasmática constituído de uma bicamada de fosfolípidios, sendo **permeável** a pequenas moléculas hidrofóbicas (O_2 , CO_2 , N_2 e etanol). É **ligeiramente permeável** à água e uréia, e **impermeável** a íons e grande moléculas polar sem carga. (FONTE: adaptado de Laura e Almeida, 2004).

Dessa forma, uma das proteínas mais importantes da membrana plasmática de plantas, fungos e animal é a H^+ -ATPases do tipo P, que realiza a hidrólise do ATP e o bombeamento de H^+ para o meio extracelular. A função da ATPase é gerar um gradiente eletroquímico para promover o transporte de substâncias para o interior e o exterior da célula. A H^+ -ATPase da membrana plasmática é uma enzima eletrogênica, que bombeia carga positivas (H^+) do interior da célula para o exterior da membrana, formando assim, um potencial eletroquímico de membrana (carga negativa no lado interno e positiva no lado externo), podendo ultrapassar 200 mV (Hirsch et al., 1998). Como os prótons são acumulados no lado de fora da célula, o pH do apoplasto decresce a valores de pH 5–6, tornando-se mais ácido que o citoplasma. Em tais condições, os cátions são atraídos pela célula devido ao potencial negativo de membrana podendo entrar na célula por proteínas de canal. Os ânions, cátions, solutos neutros e muitas classes de herbicidas são todos capazes de entrar na célula através de várias proteínas carreadoras, podendo o transporte de prótons ocorrer concomitantemente. A inibição da H^+ -ATPase de membrana plasmática pode resultar no colapso do gradiente de prótons transmembrana e na morte da planta (Palmgren, 1991). Assim, a maioria das proteínas transportadoras de membrana identificadas em plantas necessitam de energia produzida indiretamente pela ação das bombas H^+ -ATPase (Laura e Almeida, 2004; Palmgren, 1991)-Figura 06.

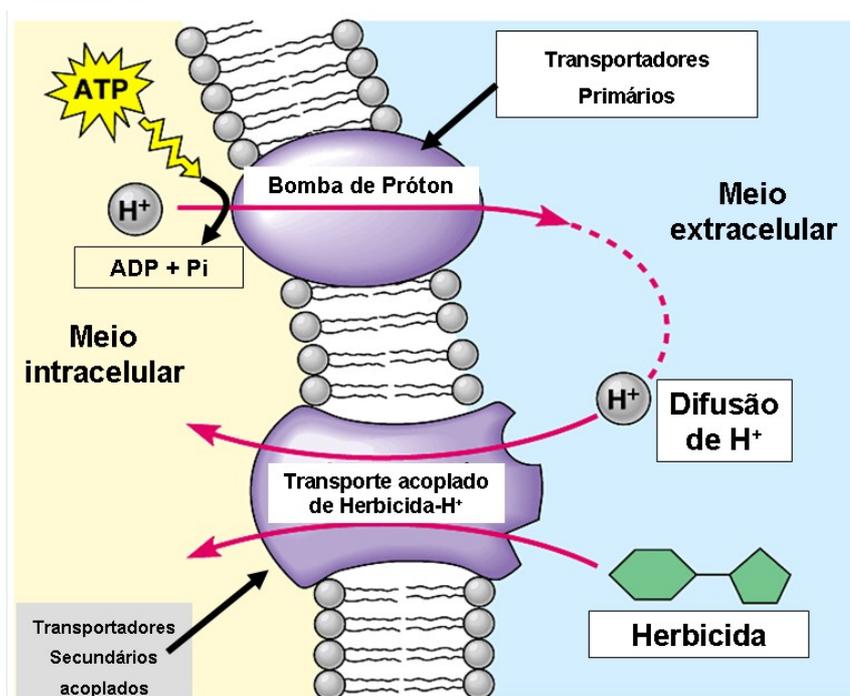


Figura 06: Proteínas transportadoras de membrana plasmática (Fonte: adaptado de Laura e Almeida, 2004 e Palmgren, 1991).

A membrana plasmática pode atuar como importante meio para a entrada de herbicida no interior da célula (Sterling, 1994; Devine et al., 1993) devido ao estabelecimento de um gradiente de prótons promovido pelas H⁺-ATPases (Hull e Cobb, 1998). Nesse sentido, o gradiente eletroquímico gerado por esta bomba primária de membrana plasmática está diretamente envolvido com dois mecanismos fundamentais do desenvolvimento vegetal: primeiro com a energização de sistemas secundários de translocação de íons e moléculas; segundo com o aumento da plasticidade da parede celular, que possibilita o crescimento e a divisão da célula vegetal (Rayle e Cleland, 1992).

A atividade H⁺-ATPase do tipo P pode ser também influenciada por uma variedade de condições ambientais adversas e fisiológicas, incluindo estresse salino, hormônio (auxina), luz, ataque de patógenos Palmgren (2001) e, por herbicidas (Tanguy et al. 2005).

Possivelmente, muitas classes de herbicidas são translocadas para o interior da célula por difusão não facilitada, através dos transportadores presentes na membrana plasmática. Como exemplo, o herbicida glyphosate postula ser translocado para o interior da célula por transportadores secundários de fosfato. Enquanto, que o herbicida paraquat é absorvido através dos transportadores secundários de putrecina e controlado por putrecina - Figura 07 (Deletage-Grandon et al., 2001) Por outro lado, o herbicida Amitrole é translocado, provavelmente, para o interior da célula de tabaco via difusão simples, sem a necessidade de energia (Singer e McDaniel, 1982). Enquanto, o mecanismo de transporte do mesotrione não é conhecido.

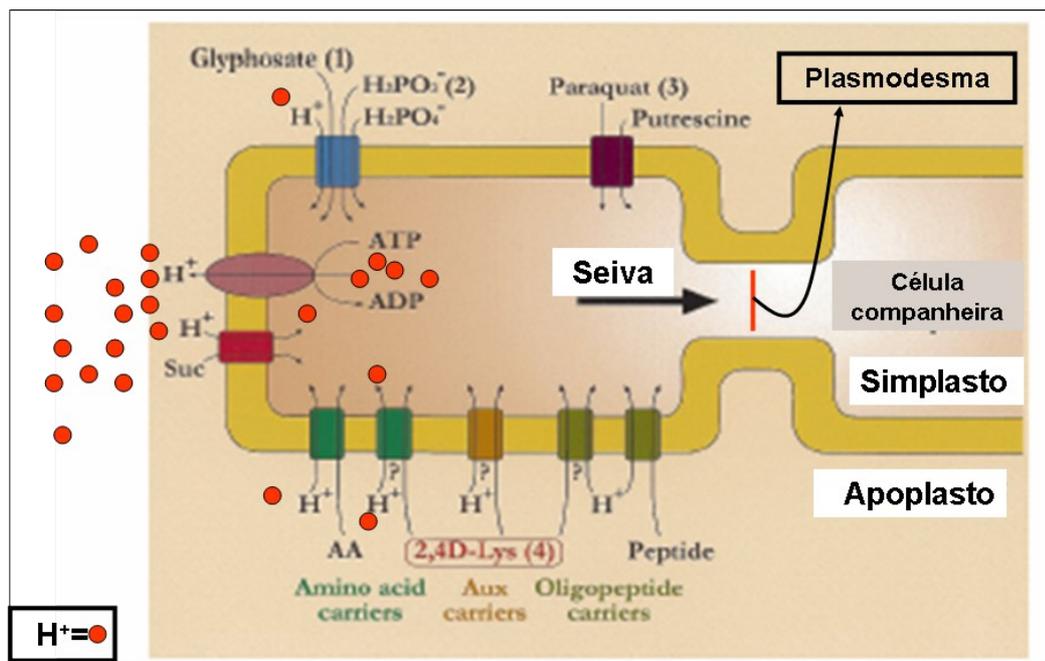


Figura 07: Possíveis proteínas carregadoras (transportadores secundários) envolvidas na translocação de herbicidas pelo tecido do floema. Translocação mediada por carregadores de glyphosate, paraquat e 2,4-D-Lys (adaptado de Delétage-Grandon et al., 2001).

Para alguns autores, o herbicida 2,4-D pode ser transportado pelos carregadores de aminoácidos, de auxinas ou de oligopeptídeos (Denis e Delrot, 1993). No entanto, Delétage-Grandon et al. (2001) sugerem que o 2,4-D pode ser transportado especificamente por meio de carregadores de auxina. Chollet et al. (1997) relataram que o 2,4-D inibe o sistema de transporte de aminoácido, enquanto Delétage-Grandon et al. (2001) descreveram que a absorção da sacarose e tirosina (Tir) era inibida por 0,1 mM de 2,4-D. Porém, nas mesmas condições experimentais e em concentração de 2,5 mM de 2,4D-Lis (lisina), a absorção de Tir era inibida drasticamente, embora o influxo de sacarose não era afetado. Delétage-Grandon et al. (2001) constataram que os conjugados 2,4D-Lis são hábeis em atravessar a membrana plasmática e atingir o floema em folhas de feijão, sendo averiguado claramente, que o conjugado é progressivamente hidrolisado no interior dos tecidos em lisina e 2,4-D. O herbicida 2,4-D apresenta característica de ácido fraco que se liga a íons e acumula-se no interior das células.

Alguns herbicidas altamente lipossolúveis, como exemplo o MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético), afetam significativamente a organização da membrana plasmática de planta, danificando a função de barreira seletiva, conduzindo à

dissipação do gradiente eletroquímico da transmembrana e a inibição de outras funções da membrana plasmática, tais como o transporte de nutrientes e de solutos (Weber e De Bont, 1996). Entretanto, em *Saccharomyces cerevisiae* o herbicida MCPA estimula a H⁺-ATPase, provavelmente para eliminar a molécula para fora da célula (Cabral et al., 2004).

Gronwald et al. (1993) trabalhando com plantas de milho, constataram que a translocação do herbicida imazethapyr para o interior da célula foi reduzido pelo uso de inibidores da H⁺-ATPase na membrana plasmática, como vanadato e diethylstibestrol. Similarmente, a absorção do herbicida sethoxydim na cultura do trigo também foi reduzida, mas por outro lado foi constatado o incremento da incidência do fungo patogênico *Fusarium*, podendo ser decorrente do aumento do pH extracelular (Couderchet e Retzlaff, 1991). Nenhum herbicida é relatado como inibidor das funções de membranas celulares de plantas, embora, Ball et al. (1987) tenham verificado que o herbicida SW26 (inibidor da fotossíntese) inibe H⁺-ATPase de membrana plasmática.

Hull e Cobb (1998) estudaram a atividade das bombas H⁺-ATPase de membrana plasmática de *Beta vulgaris* (beterraba) utilizando 25 herbicidas de diferentes classes e obtiveram seqüência decrescente de inibição da atividade enzimática: tiocarbamato > ariloxifenoxipropionato > ciclohexanediona > cloroacetamide > tipo auxínico. Neste trabalho, as classes dos tiocarbamatos e dos ariloxifenoxipropionatos causaram elevada inibição da H⁺-ATPase em duas espécies de plantas (*Beta vulgaris* e *Alopecurus myosuroides*). De todos os herbicidas testados, o 2,4-D (grupo químico dos auxínicos) foi o que menos inibiu a atividade da bomba H⁺-ATPase em relação ao controle. Por outro lado, Jahn et al. (1996) relataram que os herbicidas de tipo auxínicos promovem estimulação do bombeamento de H⁺ pela ativação da bomba H⁺-ATPase acarretando o aumento da taxa de alongamento celular.

Alguns herbicidas interferem em rotas enzimáticas específicas da biossíntese de muitos produtos (aminoácidos, ácidos graxos). É o caso do herbicida gramicida do grupo químico ariloxifenoxipropionato relatado como um inibidor da *acetil-CoA carboxilase* (ACCase), enzima chave na biossíntese de ácidos graxos. Estes herbicidas interferem no crescimento induzido por auxina e no efluxo de H⁺, despolarizando o potencial de membrana, reduzindo a seletividade e, conseqüentemente, inibindo a biossíntese dos ácidos graxos (Kafiz

et al., 1989; Wright e Shimabukuro, 1987; Shimabukuro et al., 1982). Barnwell e Cobb (1993) propuseram também que o ariloxifenoxipropionato interfere diretamente nos processos que controlam o efluxo de H^+ no coleóptilo de *Avena sativa*, atuando como inibidores competitivos, nos quais se ligam aos receptores de auxinas. Eles também constataram que o efluxo de H^+ na membrana plasmática era pouco afetado, quando se utilizava a combinação dos herbicidas auxínicos (2,4-D, clopyralid e MCPA) aplicados simultaneamente com o herbicida aryloxyphenoxypropionato.

2.5. Desintoxicação de herbicida no interior da célula

A atividade bioquímica das plantas afeta a quantidade de herbicida absorvido que chega a enzima específica, podendo ser suficiente ou não para que a intoxicação seja manifestada. Dessa forma, as plantas são equipadas por um versátil sistema de proteção contra possíveis danos causados por herbicidas (Yuan et al., 2006).

As plantas são tolerantes aos herbicidas devido à capacidade de alterar a estrutura química da molécula, promovendo a desintoxicação e resultando em uma substância não-tóxica (Gaillard et al., 1994; Sandermann, 1992). Por isso, a seletividade de herbicida na maioria das espécies vegetais é baseada na desintoxicação metabólica (Cole, 1994; Lamoureux et al., 1991). Isto é realizado por determinadas enzimas e moléculas de defesa que possuem ampla faixa de especificidade, possibilitando que muitos herbicidas sejam metabolizados por uma ou várias enzimas e moléculas de defesa (Hatzios e Penner, 1982).

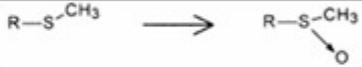
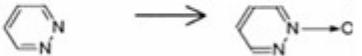
Dessa forma, o mecanismo de desintoxicação dos herbicidas em plantas tolerantes pode ser dividido em quatro fases (Coleman et al., 1997; Ishikawa, 1992; Sandermann, 1992):

- **FASE I (ativação)**

Na Fase I ocorre a exposição ou introdução de grupos funcionais nas moléculas de herbicidas por meio de reações que normalmente envolvem hidrólise, oxidação e/ou redução, tornando as moléculas de herbicida ativas para as enzimas ou moléculas de defesa atuar na Fase II (Tabela 02). Essas reações

são importantes para promoverem mudanças na molécula do herbicida diminuindo a habilidade em interagir com as membranas biológicas (hidrofóbicas), que deste modo restringe a distribuição dentro da célula e nos tecidos. A Fase I é mediada, principalmente pela enzima *Citocromo P-450 Monooxigenase-Dependente* em que o herbicida pode ser oxidado, reduzido ou hidrolisado para introduzir ou expor um grupo funcional (Eerd et al., 2003).

Tabela 02: Reações que ocorrem na Fase I do metabolismo de alguns herbicidas nas plantas

FASE I -Ativação	REAÇÃO	Exemplo de Herbicida	Exemplo de reações químicas
Fase I – Oxidação –			Herbicida + O ₂ → Herbicida – O + H ₂ O
	Aril/Alquil hidroxilação	Chlortoluron	
	O-dealquilação	Ethametsulfuron	R---OCH ₃ → R---OH
	N-dealquilação	Ethametsulfuron	R---NHCH ₃ → R---NH ₂
	Deaminação oxidativa	Metribuzin	R---NH—NH ₂ → R---NH ₂
	Sulfoxidação	Prometrine	
	Oxidação de nitrogênio	Credazide	
Fase I – Redução	Nitroredução	Trifluralin (-H)	R---NO ₂ → R---NH ₂
Fase I - Hidrólise			Herbicida + H ₂ O → Herb - OH + H
	Ester	Diclofop-methyl	
	Amida	Propanil	
	Nitrila	Cyanazine	R—C≡N → R—C—O—NH ₂

(Fonte: Eerd et al., 2003)

A exposição ou introdução de grupos funcionais nos herbicidas torna-os mais hidrofílicos quando comparado aos herbicidas originais (Coleman et al., 1997). Nesta fase os herbicidas também podem ser hidrolisados pela ação das enzimas *esterases*, constatado com o herbicida aryloxyphenoxypropionates em plantas de trigo (Haslam et al., 2001). Pode-se citar também, as *amidases*, aril acilamidases e nitrilases (enzima que hidrolisa amida, carbamato e ester). Mas, na maioria dos herbicidas, ocorrem reações oxidativas que são catalisadas

principalmente, pela enzima *citocromo P450 monooxigenases* (P450), responsável pela hidroxilação de anéis aromáticos, liberando grupos metil ou heteroátomos. A enzima P450 prepara o herbicida para ser desintoxicado pela adição de um grupo funcional e também, introduz cargas negativas aumentando a solubilidade do herbicida em água, o que é de fundamental importância para a ocorrência das reações da Fase II, que servem para bloquear os grupos reativos gerados na Fase I (Rea et al., 1998). Esta enzima também realiza as seguintes reações: desidratação, dimerização, deaminação, dehidrogenação, desalquilação de heteroátomo, epoxidação, redução, hidroxilação, oxidação e clivagem de C–C e C=N (Hartizios, 1997).

Os produtos da Fase I nem sempre diminuem a fitotoxicidade. Em alguns casos aumentam a fitotoxicidade (Hartizios, 1997). Se os herbicidas apresentarem grupo funcional, eles passarão direto para a Fase II do metabolismo, podendo a desintoxicação proceder sem a necessidade do metabolismo da Fase I (Eerd et al., 2003).

a) Oxidação de herbicidas pela enzima citocromo P450

A enzima *Citocromo P450 monooxigenase* (P450) é formada por cinco proteínas codificadas por uma variedade de genes - mais de 60 isoformas desta enzima foram identificadas em *Arabidopsis* (Bolwell et al., 1994). Ela desempenha importante função na oxidação de herbicidas nas células de plantas, por meio da reação expressada na seguinte equação: $XH + O_2 + NADPH \rightarrow XOH + H_2O + NADP^+$, em que XH é o herbicida e XOH é o produto oxidado. Para realizar a atividade catalítica, essa enzima necessita de oxigênio molecular e de NADPH, que são produzidos a partir da ação da enzima *NADPH-citocromo redutase* - Figura 08 - (Caboni et al., 2003; Barrett, 1995; Frear, 1995).

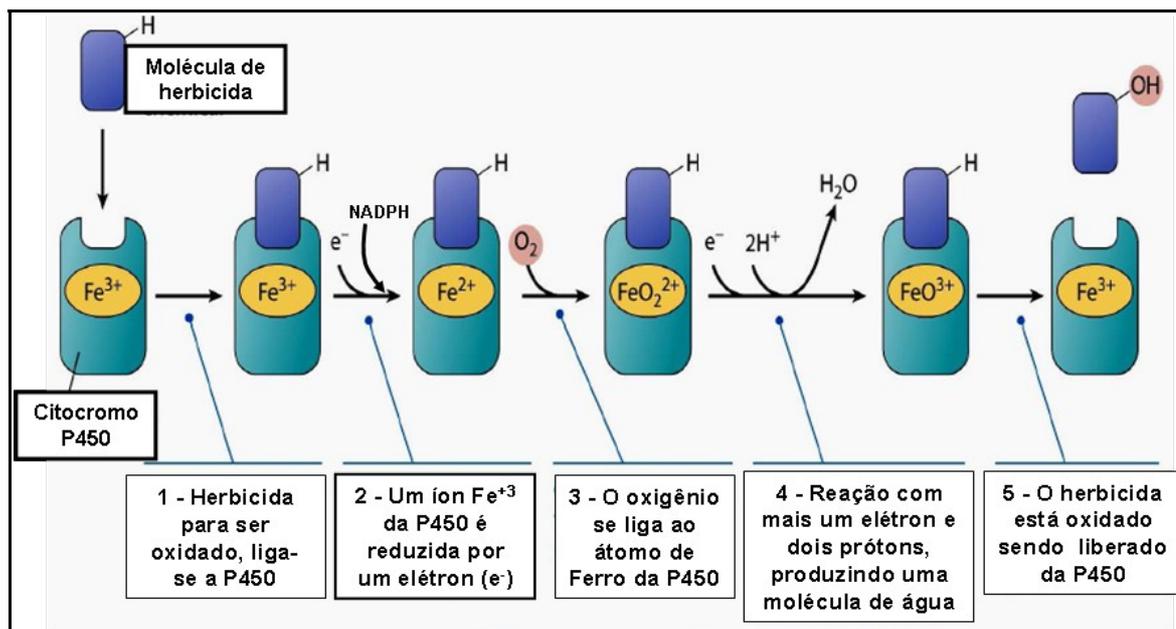


Figura 08: Reação de hidroxilação em moléculas de herbicidas catalizada pela enzima Citocromo P450 (Fonte: adaptado de Caboni et al., 2003).

Nessa enzima, não se conhece ainda a função das diferentes isoformas, mas sabe-se que ela realiza inúmeras reações de biossíntese de produtos importantes para o desenvolvimento da planta como: fenilpropanóides, esterol, isoflavonóides, terpenos, ácidos graxos, cianogênico, giberelina, ácido abscísico, citocinina, lignina, e na catálise de diversos substratos de herbicidas (Schuler, 1996; Barrett, 1995; Durst e O'Keefe, 1995). A P450 é responsável pela degradação dos seguintes herbicidas: monuron, chlorotoluron, metolachlor, alachlor, bentazon, chlorotoluron, 2,4-D, diclofop-methyl, flumetsulam, primisulfuron, prosulfuron e triasulfuron. Portanto, a enzima P450 tem atraído recentemente muita atenção, e o número de novas isoformas, inicialmente caracterizadas e clonadas, são ampliadas constantemente (Schuler, 1996).

- **Fase II (conjugação)**

Na Fase II o herbicida é catabolizado por enzima *Transferase*, na qual o composto ativado é conjugado por substâncias hidrofílicas tais como, glutatona, glicose, proteínas, aminoácidos e também, outros complexos formando um conjugado solúvel em água, de forma que ocorra a desativação do herbicida (Hsieh et al., 1998; Cole, 1994).

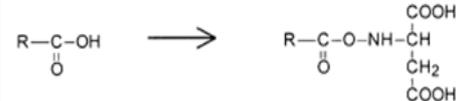
Com isso, o herbicida pode ser conjugado a uridina-5`-difosfoglicose, sendo essa reação catalizada pela enzima *glicosiltransferases* (Tabela 03) e podendo ser também, conjugado a glutathione pela ação da enzima *Glutathione-S-transferase* (GST). Outras enzimas podem estar atuando na conjugação como a *N-acetiltransferase*, *metiltransferase* e *sulfotransferases* (Caboni et al., 2003). Logo, a Fase II é uma importante fase protetora no processo de desintoxicação da célula (Cole, 1994).

Os resultados desta conjugação são: (a) inativação do mecanismo de ação do herbicida; (b) o conjugado torna-se mais hidrofílico, apresentando menor mobilidade na planta que o herbicida original e, (c) facilita a realização de atividades químicas que podem incluir conjugação secundária, degradação e compartimentalização no vacúolo ou apoplasto (Kreuz et al., 1996).

Nessa Fase II, outra enzima importante é a GST (formada por uma superfamília de isoformas, com grau variado de especificidade para diferentes compostos), que realiza a formação do conjugado glutathione-herbicida (GS-herbicida), promovendo a desintoxicação de herbicidas em plantas.

Por isso, a seletividade dos herbicidas é atribuída à formação do conjugado herbicida-GS em espécies de plantas tolerantes, levando à diminuição de injúrias promovidas pelos herbicidas, entretanto o mesmo processo não ocorre nas espécies suscetíveis (Kreuz, 1993).

Tabela 03: Reações e conjugação na FASE II do metabolismo de herbicida em plantas

Fase II	REAÇÃO	Exemplo de Herbicida	Exemplo não específico de reações químicas
Conjugação		Herbicida conjugado a moléculas	Herbicida conjugado
Glicose + (<i>N, O-glicosiltransferase</i>)	O-glicosides	metribuzin	$R-OH \longrightarrow R-O\text{---}glicose$
	N-glicosides	Flumetsulam	$R-NH_2 \longrightarrow R-N-glicose$
	Ester glicose	2,4-D	
Aminoácidos		2,4-D	
Glutathiona + <i>glutathiona S-transferase</i>		Vários herbicidas Ex: atrazine	

Fonte: Eerd et al., (2003)

a) Conjugação de herbicidas na Fase II com açúcares pelas enzimas **UDP-O ou N-Glicosiltransferases**

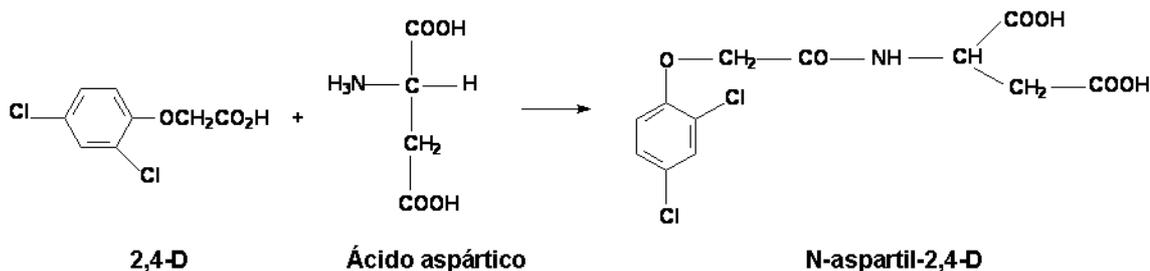
A oxidação ou hidrólise de herbicida realizada pela enzima P450 serve para introduzir um grupo hidroxil, amino ou função de ácido carboxil, sendo freqüentemente seguida por uma rápida glicosilação (Lamoureux et al., 1991). Os ésteres *O-β-D-Glicose*, *N-glucosides* e *1-O-Glicose (Glc)* são os grupos representantes mais comuns de açúcares conjugados. Estas reações são catalisadas pelas enzimas *O e N-glicosiltransferases*, que também atuam na glicosilação² de diferentes produtos do metabolismo secundários de plantas utilizando UDP-Glc como doador de açúcar (Cole e Edwards, 2000; Leah et al., 1992):

As *glicosiltransferases* têm massa molecular que varia de 40 a 62 kDa, e são descritas como enzimas solúveis ou ligadas à membrana, responsáveis pela clivagem e transferência de grupos glicosídicos que são vitais para o crescimento normal e para o desenvolvimento das células, sendo amplamente distribuídas em mamíferos, plantas e microrganismos (Leah et al., 1992; Lamoureux et al., 1991).

² Processo de adição de grupo glicosil em uma proteína para formar glicoproteína

Embora essas enzimas normalmente necessitem de UDP-Glc como doador de glicose (Glc), a sua especificidade para o acceptor de glicosil pode variar consideravelmente. As *glicosiltransferases* estão envolvidas na biossíntese de uma variedade de produtos secundários da planta como flavonóides, glicosides de cianogênico, glicosinolates, glicocalcóides, ácido salicílico, glicosides e glucosides³ de IAA, atuando também na ligação de toxinas endógenas e exógenas para conduzi-las até o vacúolo ou para o apoplasto (Bartholomew et al., 2002; Pflugmacher e Sandermann; 1998).

Os herbicidas que possuem grupamento funcional ácido carboxílico, tais como 2,4-D ou diclofop, podem ser convertidos em esteres de glicose ou em conjugado de amida com um aminoácido. Entretanto, em alguns casos o conjugado formado torna um herbicida ativo, não resultando em efetiva desintoxicação, como é o caso do 2,4-D (Hess, 1995):



Por outro lado, o uso extensivo do herbicida propanil na cultura de arroz tem resultado na resistência da plantas daninhas *Echinochloa colonum*, dificultando o controle devido à conjugação deste herbicida com a glicose (Cole, 1994).

b) Conjugação de herbicida com glutathiona (GSH) na Fase II pela enzima *Glutathiona S-transferase* (GSTs)

A *Glutathiona S-transferases* (GSTs; EC; 2.5.1.18) é uma família de enzimas multifuncionais em plantas e animais, conhecida pelo seu papel na desintoxicação de herbicidas ou xenobióticos (Riechers et al., 1998; Kreuz et al., 1996; Marrs, 1996).

³ Glicoside: produção de glicose pela hidrólise de amido ou glicosilato - qualquer derivado de açúcar que contém um oxigênio ou átomo de nitrogênio e que em hidrólise produz um açúcar (como glicose)

As reações de conjugação envolvem grupo tiol (um grupo funcional –SH) da glutathiona (GSH), e são importantes para o metabolismo de herbicidas nas plantas. Esta reação ocorre quando o ânion tiolato do GSH é atacado por um substrato de natureza eletrófilo, ocorrendo o deslocamento concomitante de uma substância nucleófila (Kreuz et al., 1996).

A GST ocorre no citoplasma como homodímero (complexo protéico composto por duas cadeias polipeptídicas iguais) ou heterodímero de proteínas com subunidades de massas moleculares de 24 a 30 kDa. Essa enzima desempenha atividades específicas para cada espécie de planta (Marrs, 1996).

A primeira conjugação de GSH foi observada com o herbicida atrazine, em plantas de milho - Figura 09 (Lamoureux et al., 1970). Desde então, o número de isoenzimas GST tem sido sequenciado, principalmente em espécies de milho e também, em outras espécies de plantas. As diferentes isoenzimas de GSTs diferem na forma de regulamentação e expressão e, às vezes, requerem um substrato específico no metabolismo das espécies. A susceptibilidade das espécies também se altera nos diferentes herbicidas (Jepson et al., 1994; Irzyk e Fuerst, 1993).

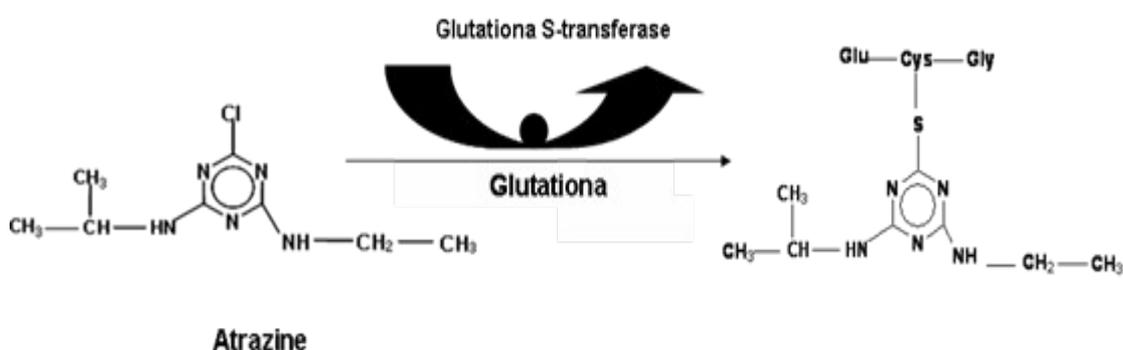


Figura 09: Exemplos de reações de catálise da glutathione S-transferase com o herbicida atrazine (Lamoureux et al., 1970).

A GSH também atua como *GSH peroxidase* podendo reduzir naturalmente a toxicidade dos ácidos graxos, provocada por hidróxidos e/ou peróxidos formados durante a utilização de herbicidas que afetam o sistema fotossintético ou mitocondrial como resultado do estresse oxidativo.

No ano de 1997 foram descritos 35 genes que codificam diferentes isoformas da enzima GST, identificados em 13 espécies de plantas, nos quais

sete, desses 35 genes, estão envolvidos no metabolismo de herbicidas em plantas de milho (Droog, 1997).

Ao contrário das plantas de milho, as enzimas GSTs desempenham baixas atividades de desintoxicação em muitas plantas daninhas, tornando-as susceptíveis aos herbicidas, com exceção a espécie de planta daninha dicotiledônea *Abutilon theophrasti*, que desenvolveu resistência ao herbicida atrazine. Essa resistência se deve à mutação ocorrida na enzima alvo, e não no aumento da concentração, o que levou ao aumento na atividade catalítica (Plaisance e Gronwald, 1999).

A enzima GST conjuga o herbicida com glutathione, em que esta é constituída por um tripeptídeo – glicina, ácido glutâmico e cisteína (Mannervik e Danielson, 1988). A glutathione é um metabólito importante por ser um agente redutor protegendo a célula contra o estresse oxidativo e também, atua como um nucleófilo contra agentes químicos tóxicos (Foyer et al., 1994). Portanto, qualquer redução nos níveis de glutathione pode prejudicar severamente a defesa de muitas plantas contra herbicidas (Rennenberg e Brunold, 1994).

c) Conjugação de herbicida com aminoácidos ou proteínas na Fase II

A conjugação com aminoácidos é particularmente comum com os herbicidas ácidos fenoxiacético, tal como o 2,4-D (Figura 10). A ligação ocorre com o grupo amino do aminoácido ao grupo do ácido carboxílico do herbicida. A primeira evidência da conjugação de um aminoácido com o herbicida 2,4-D foi com o ácido aspártico. Outros aminoácidos podem realizar a conjugação como o glutamato, valina, leucina, fenilalanina e triptofano. No entanto, os aminoácidos mais comuns que conjugam com herbicidas em plantas são o aspartato e o glutamato. Esses conjugados podem tornar o herbicida mais fitotóxico. Há evidência também, que os aminoácidos conjugados a herbicidas podem ser excretados para a parede celular (Delétage-Grandon et al., 2001; Fisher et al., 1998).

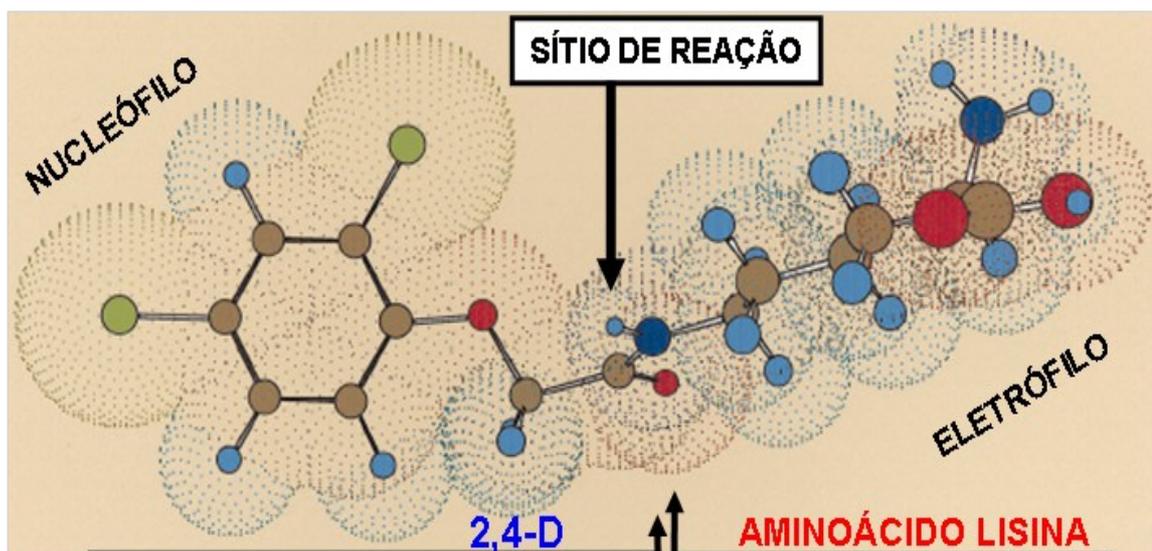


Figura 10: Estrutura tridimensional do conjugado 2,4D-Lys. Os átomos estão circundados por uma nuvem de elétrons e denotados pelas cores das esferas: carbono (marrom); hidrogênio (azul-claro); cloro (verde); oxigênio (vermelho) e nitrogênio (azul-escuro) (Fonte: Delétage-Grandon et al., 2001).

- **Fase III (eliminação)**

O vacúolo de plantas consiste em um compartimento com múltiplas funções. Possui enzimas *hidrolíticas* e pode funcionar como uma organela digestiva semelhante aos lisossomos de células animais, sendo também um compartimento ácido, devido ao bombeamento de H^+ promovido pelas bombas H^+ -ATPase (do tipo V-ATPase) e H^+ -pirofosfatase - V-PPase - (Marty, 1999). Nele podem ser depositados produtos do metabolismo secundário como alcalóides, ácidos orgânicos, antocianinas, compostos de defesa ou sinalizadores e também, herbicidas e constituintes da digestão citoplasmática (Marty, 1999; Müntz, 1998; Staswick, 1994).

Outra função importante do vacúolo é a homeostase celular que atua regulando a entrada de íons, controlando o pH citoplasmático, o turgor e o alongamento celular. Todas essas atividades são conduzidas por dois mecanismos de transporte ativo primário presentes na membrana vacuolar. Tais mecanismos usam substrato de elevada energia (ATP e PPI) para bombear prótons para o interior do vacúolo, estabelecendo um potencial eletroquímico de prótons na membrana vacuolar que promove o transporte secundário de compostos (Maeshima, 2001; Terrier et al., 1998).

O vacúolo, na maioria das vezes, serve como depósito do conjugado de herbicida (Sandermann, 1992), sendo primeiramente demonstrado com conjugado de ácido 2,4-diclorofenoxiacético em feijão (Schmitt e Sandemann, 1982). Um avanço importante veio com a demonstração de que o vacúolo de plantas tem um transportador ativo dependente de ATP, que transporta conjugado de glutathione pela membrana (Martinoia et al., 1993). Também foram identificados no vacúolo outros transportadores dependentes de ATP, diferentes daqueles responsáveis pelo transporte do conjugado glutathione (Hörtenstenier et al., 1993). O transporte do conjugado glutathione do citoplasma para o vacúolo ou para o exterior da célula (apoplasto) requer a passagem pelas membranas do vacúolo (tonoplasto) ou plasmática. Evidências indicam que a translocação desse conjugado através do tonoplasto é realizada pela ação de um transportador dependente de ATP, que reconhece o conjugado de glutathione como substrato (Martinoia et al., 1993).

A conjugação de herbicidas com a glicose ou com a GSH, na maioria dos casos, promove a desintoxicação celular. Além disso, esses conjugados, não sendo removidos do citoplasma, podem exercer outras atividades biológicas. Eles reduzem a disponibilidade da enzima GST, podendo prejudicar a capacidade da metabolização de outros herbicidas. Neste caso, pode-se citar o herbicida Tridifane convertido dentro da planta pela conjugação com a GSH, dependente da enzima GST, acarretando a diminuição na concentração de GST, o que ocasiona a inibição no metabolismo dos herbicidas dos grupos químicos chloroacetanilide e atrazine, que é dependente da enzima GST (Lamoureux e Rusness, 1986).

A remoção do conjugado no citoplasma e a imobilização em compartimento especializado na célula são de fundamental importância para efetivar a desintoxicação celular (Coleman et al., 1997). Os conjugados de herbicidas com GSH ou Glc podem ser ligados a resíduos de metabólitos presentes na matriz extracelular ou armazenados como metabólitos solúveis em água no interior do vacúolo (Lamoureux et al., 1991), sempre necessitando de uma fonte de energia para ser seqüestrado (Bartholomew et al., 2002).

Os transportadores de tonoplastos são constituídos por duas bombas primárias de prótons as H⁺-ATPase (V-ATPase) e H⁺-pirofosfatase (V-PPase), que são responsáveis por estabelecer e manter um gradiente eletroquímico que pode ser usado para ativar os transportadores secundários (Martinoia, 1992; Rea e

Sanders, 1987). Existe também uma outra bomba primária que transloca diretamente conjugados denominada de ATP-binding cassette (ABCs).

Os estudos relatam que as bombas primárias do tipo ABCs são independentes do potencial eletroquímico entre as membranas. Estas bombas utilizam energia do ATP para realizar o transporte de substâncias, como aminoácidos, açúcares, íons inorgânicos, compostos do metabolismo secundários e herbicidas (Theodoulou, 2000; Higgins, 1995). A família dos transportadores ABC presentes na membrana do vacúolo e a bomba H⁺-ATPase presente na membrana plasmática são inibidas pelo inibidor vanadato (Martinoia et al., 2002).

A estrutura molecular dos transportadores ABCs inclui dois domínios hidrofóbicos responsáveis pela translocação do substrato, por meio da membrana, e dois domínios hidrofílicos nos quais ocorrem ligação e hidrólise do ATP, fornecendo condições energéticas ao substrato para ser transportado (Theodoulou 2000).

Todas as substâncias translocadas pelos transportadores ABCs são primeiramente conjugadas com a glicose (açúcares) e glutatona, sendo energizadas diretamente por MgATP. O mecanismo de acoplamento (ligação) do conjugado (substrato-enzima) e do ATP ao transportador ABC ocorre no citoplasma por um mecanismo ainda não muito conhecido (Rea et al., 1998).

Pirofosfatase vacuolar ou H⁺-PPase (EC. 3.6.1.1)

Uma característica própria das plantas é a existência de vias metabólicas paralelas que usam tanto nucleotídeos (ATP) quanto pirofosfato (PPi) como fontes alternativas de energia. Esta maior versatilidade das plantas em relação aos mamíferos se deve à presença de duas bombas que funcionam em paralelo em membranas de células vegetais. Uma delas é a H⁺-ATPase, a qual está presente em todos os eucarióticos e a outra é a Pirofosfatase (H⁺-PPase) que tem sido encontrada em todas as plantas e em algumas bactérias fototrópicas. Por isso, já está bem estabelecido que a membrana vacuolar de células vegetais possui duas bombas de prótons, a V-ATPase e a H⁺-PPase (Rea e Poole, 1993).

A H⁺-PPase consiste de um único peptídeo de 761 a 771 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 73 KDa (Nakanishi e Maeshima, 1998). A seqüência de aminoácidos é altamente conservada em plantas com 86 a 91% de indentidade (Maeshima, 2001). Essa enzima funciona como um sistema

de conservação de energia pelo estabelecimento de um gradiente de pH no tonoplasto, que é utilizado para energizar o transporte ativo secundário. Pode também funcionar como mecanismo de regulação do pH citoplasmático, do turgor celular e apresentar diferentes isoformas, podendo ser reguladas por fatores ambientais (Margolles-Clark et al., 2000; Martinoia e Ratajczak, 1997). A H⁺-PPase é presumivelmente essencial para as células de plantas para tornar os vacúolos gigantes (Sarafian et al., 1992). O nível desta enzima varia de acordo com as condições fisiológicas e com resposta aos estresses ambientais (Maeshima, 2000). A pirofosfatase tem um papel vital no metabolismo energético, pois o pirofosfato (PPi) é um subproduto natural de várias reações biossintéticas como proteína, RNA, celulose (Buchanan et al., 2000). A hidrólise do PPi pela PPases favorecem a diminuição da concentração citoplasmática deste produto (Jiang et al., 1998).

Nas plantas, em diversas condições fisiológicas e de estresse, o pirofosfato pode assumir o papel do ATP atuando como doador de energia metabólica da célula (Stitt, 1998). No tonoplasto, a H⁺-PPase atua na energização dos sistemas de transporte secundários da membrana vacuolar, exercendo também, o controle da homeostase citoplasmática, em sincronismo com a V-ATPase de tonoplasto e com a H⁺-ATPase de plasmalema (Sze et al., 1999).

Carystinos et al. (1995) demonstraram que em condições de anoxia, ocorria aumento na atividade da bomba H⁺-PPase em até 75 vezes em vesículas de tonoplasto isolada de mudas de arroz. O aumento na atividade da H⁺-PPase refletiu em aumento na transcrição dessa proteína. Portanto, a elevada atividade da H⁺-PPase durante anoxia funcionaria para conservar níveis de ATP, e manter o tonoplasto energizado e o pH citoplasmático em homeostase. Isto tudo são exigências essenciais para a sobrevivência das plantas sob baixa tensão de oxigênio.

Segundo Sze et al. (1999), a H⁺-PPase necessita de K⁺ e Mg²⁺ como importantes ativadores alostéricos, ou seja, esta enzima é dependente de magnésio e estimulada por potássio (Karlsson, 1975). A H⁺-PPase requer Mg²⁺ como co-fator essencial que estabiliza e ativa a enzima (Maeshima, 2000; Gordon-Weeks, 1996). O íon potássio é um co-fator essencial para a pirofosfatase, o qual estimula a atividade hidrolítica em mais de três vezes, em muitos casos. Concentração relativamente alta de K⁺ pode estimular a H⁺-PPase,

enquanto excesso PPI , Ca^{2+} , Na^+ e F inibem a atividade da enzima (Rus et al., 2004; Maeshima, 1991).

- **Fase IV (transformação)**

Na Fase IV os conjugados que são transportados para o interior do vacúolo e/ou meio extracelular são, posteriormente, substituídos ou degradados possivelmente por enzimas, a produtos não fitotóxicos (Bartholomew et al., 2002). Dessa forma, já foi isolada uma *carboxipeptidase* no vacúolo de cevada capaz de degradar conjugado com glutatona (Wolf et al., 1996). Já as moléculas ou conjugados de herbicidas que são excretados para o apoplasto podem ser combinados e/ou ligar-se a estruturas celulares insolúveis como a lignina (Salt, 1998). Um esquema resumindo todas as etapas desde a entrada até a eliminação dos herbicidas nas células de plantas tolerantes a herbicidas pode ser observado na Figura 11.

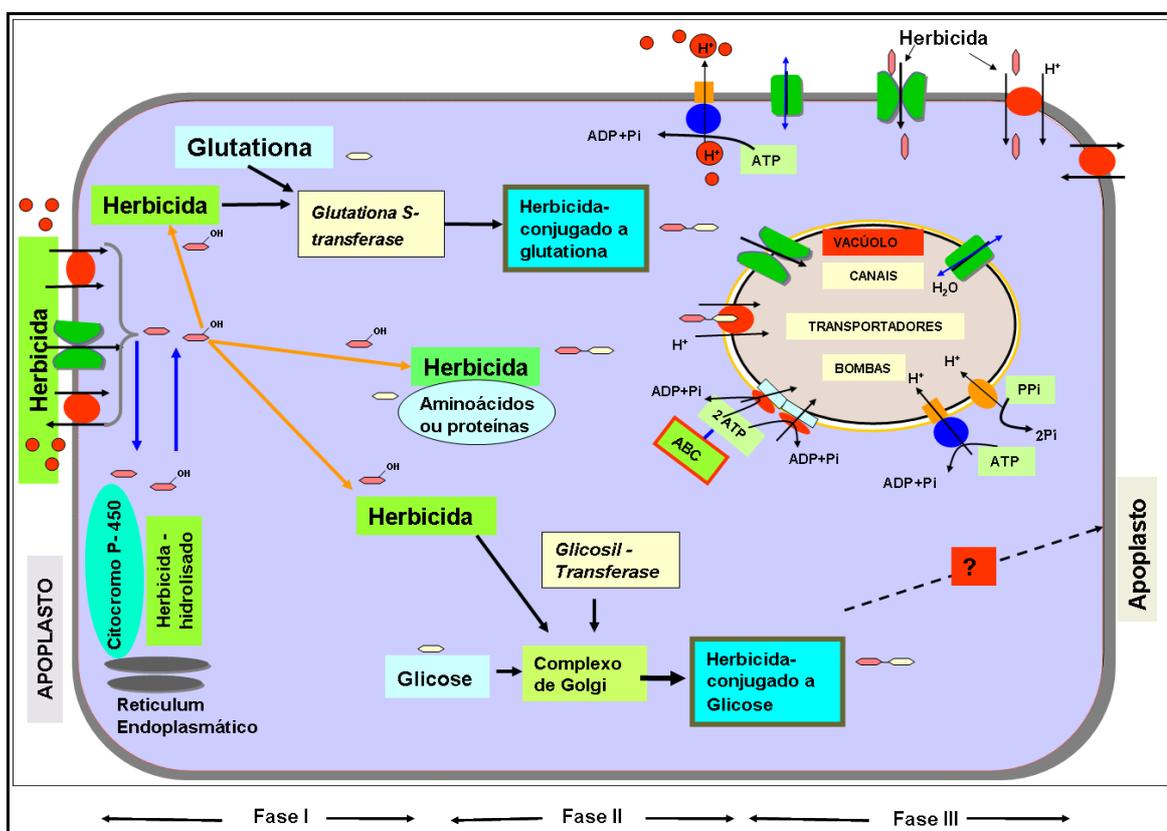


Figura 11: Reações enzimáticas responsáveis pela desintoxicação de herbicidas no citoplasma de plantas. (Fonte: adaptado de Coleman et al., 1997).

2.6. Eletroforese

As proteínas são os biopolímeros mais versáteis que se encontra na natureza. Elas desempenham funções estruturais, enzimáticas, reguladoras e de reserva dentro da célula (Green et al,1991). A eletroforese pode ser utilizada para o estudo de proteínas e isoenzimas em plantas, como resposta a possíveis alterações da sua qualidade gênica ou bioquímica promovida por herbicidas.

A eletroforese é uma técnica relativamente simples, rápida e de alto valor informativo, que consiste na separação de compostos com base na migração de moléculas ionizadas de acordo com as cargas elétricas e peso molecular em campo elétrico (Alfenas et al., 1991). A aplicação deste método possibilita evidenciar proteínas ou polipeptídios que podem ser afetados ou incrementados pela ação dos herbicidas, e também abre caminho para identificar possivelmente, quais destes compostos têm maior participação na desintoxicação de determinados herbicidas em plantas tolerantes ou resistentes.

A expressão de proteínas no citoplasma de plantas pode mudar de acordo com as condições do ambiente, principalmente no que se refere aos genes relacionados à defesa vegetal contra estresses bióticos e abióticos, que alteram em muito a expressão, de acordo com o nível de risco ambiental tolerado ou não pela planta (Haynes, 1998).

Quando ocorrem severas mudanças nas condições normais de crescimento da planta, a célula pode responder de uma maneira específica e rápida selecionando o aumento ou diminuição da expressão de genes específicos. Os genes, cuja expressão é aumentada durante o tempo de tolerância ao estresse ou fitotoxides, presumivelmente são críticos para a adaptação do organismo à condição adversa. Por isso, um exame dos genes, os quais são ativados em resposta a perturbações que ocorrem na planta, pode mostrar-se útil no entendimento da resposta biológica. Os sistemas genéticos que respondem aos danos da planta são de interesse não somente devido ao seu papel de apoiar a planta sob estresse, mas também por sua utilidade em estudo de eventos moleculares que controlam o nível quantitativo da expressão gênica (Bohnert et al., 1995).

Nem toda resposta metabólica é considerada deletéria ou prejudicial, e o maior desafio para os bioquímicos e fisiologistas é distinguir entre estas

respostas, que representa um sintoma prejudicial e aquelas respostas que são verdadeiramente adaptativas, que favorecem o crescimento continuado durante a recuperação ao estresse ou fitotoxides. Na verdade para qualquer variável no metabolismo deve existir uma faixa ótima, onde abaixo dela a planta possa sofrer privação, e exceder essa faixa pode levar à toxicidade (Dey e Harborne, 1997).

3.0. OBJETIVOS

- ❖ Avaliar a contribuição das H⁺-ATPases (tipo P e V) e H⁺-PPases na desintoxicação do herbicida mesotrione em plântulas de milho;
- ❖ Avaliar as diferenças do perfil protéico citoplasmático nos tratamentos por eletroforese em gel unidimensional;
- ❖ Avaliar o funcionamento do sistema fotossintético, teor de nutriente nas folhas e crescimento da planta.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar a atividade hidrolítica da H⁺-ATPases do tipo P e V e H⁺-PPase na desintoxicação do herbicida mesotrione nos tecidos de raiz, caule e folha de milho (híbrido DKB 330) em três épocas de avaliação, após a aplicação do herbicida (três, sete e 12 dias após aplicação - DAA);
- Analisar o perfil protéico nos tratamentos em tecidos de folha, caule e raiz em duas épocas de avaliações (três e sete DAA);
- Avaliar o grau de danos fisiológicos em nível foliar que o herbicida mesotrione provoca no milho, por meio das seguintes medições:
 - Fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas em cinco épocas de avaliações (um, dois, três, cinco e sete DAA);
 - Teor de clorofila por meio do medidor portátil SPAD em sete épocas de avaliações (um, dois, três, quatro, cinco, seis e sete DAA);

- Nutrição mineral da terceira e quarta folha (sete DAA).

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Condições de cultivo das plantas de milho

As plantas de milho (híbrido Braskalb 330) foram cultivadas na Unidade de Apoio a Pesquisa (UAP) do CCTA, no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes – RJ. O milho foi semeado em vasos de 4,5 litros com substrato areia e solo (2:1) e com adubação complementar em cada vaso: superfosfato simples (3 g), sulfato de amônia (1,5 g) e cloreto de potássio (0,50 g). Foram semeadas quatro sementes de milho por vaso, permanecendo apenas uma planta após o desbaste, realizado aos oito dias após o plantio (DAP). Neste dia também foi adicionado 350 mL de solução nutritiva de Clark (1975). As plantas foram irrigadas diariamente, mantendo-se o teor de umidade no vaso próximo à capacidade de campo.

A dose do herbicida mesotrione utilizado nas pulverizações, em pós-emergência foi de 192 g ha⁻¹, que corresponde à máxima concentração recomendada para o controle das plantas daninhas na cultura do milho, (Rodrigues e Almeida, 2005). A aplicação foi realizada aos 15 dias após o plantio (DAP), quando o milho apresentava quatro folhas desenvolvidas. A aplicação do herbicida foi realizada com pulverizador costal, pressurizado a CO₂, com a pressão constante de 3,0 kgf cm⁻² e equipado com um bico Teejet DG 8002, o

qual foi calibrado para aplicar o equivalente a 230 L ha⁻¹ de calda. A aplicação foi realizada no horário de 6h da manhã em dias com pleno sol, e umidade relativa acima de 60% e velocidade do vento inferior a 10 km h⁻¹. As épocas de avaliações para a atividade da enzima transportadora de prótons foram realizadas aos 03, 07 e 12 dias após a aplicação do herbicida (DAA), e cada unidade experimental era composta de 07 plantas por tratamento.

Os tecidos do milho utilizados para análise foram as raízes, o caule e a terceira e quarta folhas (Figura 12) mais desenvolvidas na época de aplicação do herbicida, e que receberam maior quantidade de herbicida no momento da pulverização. Os materiais coletados foram armazenados e encaminhados para pesagem da raiz (18 g), do caule (12 g) e da folha (8 g) e posterior extração das proteínas. A partir da retirada das plantas do vaso, todas as etapas foram realizadas no gelo, e as soluções utilizadas para a purificação das proteínas foram previamente mantidas a baixa temperatura.

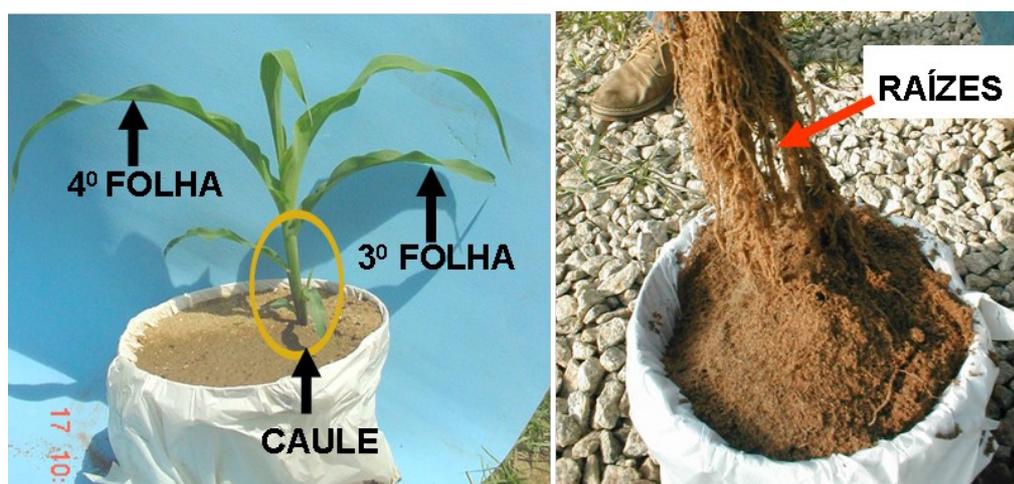


Figura 12: Partes dos tecidos da planta de milho analisadas, raiz, caule e folhas.

4.2.1. Preparação da fração microssomal

O isolamento das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto foram realizados por meio de centrifugação diferencial, como descrito por Giannini e Briskin (1987) com modificações (Façanha e De Meis, 1998).

Os tecidos (raiz, caule e folhas), depois de pesados, foram macerados com auxílio de um gral e pistilo em meio tamponado com pH 8,0 composto de 250 mM sacarose, 100 mM KCl, 15% glicerol, 100 mM tris-base, 05 mM EDTA, 5 mM

DTT, 1 mM PMSF, 0,8% PVP-40T e 1 mM benzamidina. Seguiu-se a filtração por meio de quatro camadas de gaze e centrifugação a 3000g por 15min a 4°C (Centrifuga Himac CR21 marca Hitachi). O sobrenadante foi centrifugado novamente em Ultracentrifuga (modelo CP 75 β, HITACHI, Japan) a 30000g por 10min a 4°C. O precipitado, composto principalmente de mitocôndrias e peroxissomos, foi descartado, e o sobrenadante foi novamente centrifugado na mesma centrifuga a 100.000g por 30min a 4°C. Após a centrifugação o precipitado foi ressuspenso em um homogeneizador de vidro com pistilo de teflon (“potter”), com solução tampão de: 15% glicerol, 70 mM Tris-HCl (pH 7,6), 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM benzamidina e 1 mM PMSF.

4.2.2. Purificação das vesículas de membrana plasmática e de tonoplasto

A fração microssomal ressuspenso de membranas totais em tampão foi adicionada sobre um gradiente de concentração descontínuo de sacarose de 46% e 25% para a fração dos tecidos de raiz e de caule e, de 46%, 40% e 32% na folha com 25 mM tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF e 1 mM benzamidina como descrito por Serrano (1989), com modificações. Esses gradientes foram submetidos a uma centrifugação de 100.000g por 2h a 4°C, com a formação de duas bandas contendo as vesículas mais leves de tonoplasto e de plasmalema. As bandas foram coletadas e armazenadas em freezer a menos 70°C até o momento das análises. O conteúdo de proteína das membranas plasmática e de tonoplasto foi determinado utilizando o método descrito por Bradford (1976).

4.2.3. Determinação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPases do tipo P e V e H⁺-PPase

As atividades hidrolíticas das H⁺-ATPase e H⁺-PPase foram determinadas colorimetricamente pela liberação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) ou do pirofosfato inorgânico (PPi) como descrito por Fiske e Subbarrow (1925), com modificações (Façanha e De Meis, 1998).

As concentrações finais dos reagentes no meio de reação para atividade ATPásica em vesículas de membrana plasmática foram as seguintes: 50 mM

MOPS-KOH e pH 7,0 para fração vacuolar; 3 mM MgSO₄; 100 mM KCl; 1 mM ATP (ou 0,1 mM PPI). Cada amostra foi colorida com mistura de solução de 0,5% de molibdato de amônio, mais 2% ácido sulfúrico com uma solução de 10% de ácido ascórbico, na proporção de 10:1 sendo preparada após parar com TCA. Depois de coloridas, as amostras foram incubadas por 10min a 37°C em banho-maria, realizando-se imediatamente a leitura da absorbância no comprimento de onda de 750 nm, obtendo-se a densidade ótica. A atividade da H⁺-ATPase da membrana plasmática foi avaliada utilizando o inibidor vanadato, a concentração de 2 mM (com e sem) e a H⁺-PPase das vesículas de membrana do tonoplasto pelo potássio (com e sem).

A atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo P representou as atividades totais, sensíveis e insensíveis da enzima em pH 6,5. No caso da atividade total, não foi adicionado o inibidor específico; na insensível, ocorreu o inverso da anterior e, na sensível foi calculada a diferença entre as duas primeiras. Já a atividade hidrolítica da PPase foi determinada pela subtração dos valores do Pi na presença de KCl e na ausência do cloreto de potássio. Essas atividades foram transformadas em percentagem de aumento ou de inibição do tratamento com mesotrione em relação ao controle. Nesse sentido, os valores obtidos em $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ são médias da atividade hidrolítica da velocidade inicial de quatro repetições com concentração única do mesotrione (192 g ha⁻¹).

O meio de reação utilizado na atividade hidrolítica *in vitro* com mesotrione nas vesículas de membrana plasmática e tonoplasto foi à mesma nos dois últimos parágrafos discritos.

4.2.4. Monitoramento do gradiente de prótons

O isolamento das proteínas da fração vacuolar e da membrana plasmática foi realizado como já descrito, e posteriormente mediu-se o transporte de prótons. O gradiente de prótons foi monitorado pelo decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente ACMA (9-amino-6-chloro-2-methoxyacridi) excitada com um feixe de 415 nm de comprimento de onda e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se fluorímetro. A concentração final de cada reagente no meio de reação para monitoramento do gradiente de prótons foi de: 10 mM HEPS-KOH pH 6,5 (membrana plasmática) ou 7,0 (tonoplastos), 100

mM KCl, 2 μ M ACMA, 3 mM MgSO₄ e 1 mM ATP ou ,1 mM PP_i0; e 0,06 mg/mL de proteína. O monitoramento do gradiente de prótons foi realizado somente na época 07 DAA, porém, nas outras épocas não foi possível obter gradiente.

4.3. Avaliação do perfil protéico por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Unidimensional)

As plantas de milho foram cultivadas na Unidade de Apoio e Pesquisa (UAP) do CCTA na UENF, com 10 repetições por tratamento (com e sem o herbicida mesotrione) em duas épocas (três e sete DAA), sendo uma planta de milho (híbrido Braskalb 330) por vaso, conduzidas nas mesmas condições do experimento anterior, descrito no item 4.2.

A análise das proteínas solúveis do citoplasma foi realizada nos tecidos de raiz, de caule e de folha de milho. Após a colheita nas respectivas épocas, as plantas foram mantidas no gelo e encaminhadas para o laboratório para a extração das proteínas. Primeiramente foram pesadas individualmente, seguindo-se a maceração, em almofariz, com N líquido e colocado em tubos Folcon de 50 mL na presença de tampão de extração (70 mM Tris-HCL pH 8,0; 250 mM Sacarose; 10% Glicerol; 150 mM K; 0,2% PVP; 2 mM PMSF; 2 mM Benzamidina; 2 mM DDT e 5 mM EDTA) na proporção de 1:2 peso/volume (material vegetal: tampão de extração). O homogeneizado foi centrifugado a 8000g por 15min, a 4°C, e o sobrenadante foi centrifugado por mais duas vezes a 10000g por 30min. O sobrenadante da última centrifugação foi coletado para análise de eletroforese, armazenado em Eppendorfs de 02 mL e armazenado a -70 °C, enquanto o precipitado foi descartado. As proteínas solúveis extraídas tiveram a concentração total mensuradas pelo método colorimétrico de Bradford (1976).

Do extrato total de proteínas extraídas, conforme descrito anteriormente, 30 μ L de cada amostra foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes segundo o método de Laemmli (1970). A aplicação do extrato total seguiu a seguinte ordem: foi adicionada uma parte de tampão de amostra (contendo SDS 2%, β -mercaptoetanol 4% e uréia 8M) para cada três partes de extrato total de proteínas. Um volume de 50 μ L do extrato total, extraído do citoplasma de cada um dos três tecidos, diluído em tampão de amostra, foi aplicado por poço, visando à separação por eletroforese

em SDS-PAGE em mini-gel. A separação protéica ocorreu sob corrente de aproximadamente 150 V - 20 mA, até a linha de frente atingir a parte inferior do gel. Os géis foram corados durante 12 horas em Coomassie Blue Brilliant a 0,05%, conforme Alfenas et al. (1991), e descorados em solução de ácido acético 10%.

4.3.1. Análise computacional

A quantificação e a determinação da massa molecular relativa das proteínas do citoplasma foram realizadas por meio da comparação da mobilidade das proteínas das amostras processadas, com a mobilidade das proteínas de massa molecular conhecida (Figura 13) kDa (SIGMA), mediante densitografia computacional efetuada com o programa GEL PERFECT (Bozzo e Retamal, 1991), obtendo-se previamente as imagens formato tiff (gray) por meio de um *scanner*.

Rf	Tira	area	%	PM kD
0.02	—	191	2.7	64.94
0.08	—	278	3.9	62.13
0.23	—	567	8.0	52.66
0.40	—	391	5.5	45.00
0.43	—	268	3.7	43.29
0.59	—	781	11.0	38.00
0.68	—	318	4.5	29.29
0.90	—	332	4.7	23.24
0.95	—	312	4.4	20.43
0.98	—	461	6.5	0.00

Figura 13: Tabela densitografia computacional efetuada com o programa GEL PERFECT das proteínas de massa molecular conhecida

O programa computacional GEL PERFECT disponibiliza a informação por meio de um gráfico no qual o eixo das abscissas representa a migração relativa de uma banda (Rf), e o eixo das ordenadas, a área relativa dos picos das distintas bandas referentes à concentração máxima de uma determinada proteína. O programa mostra uma tabela de dados de cada banda, mostrando uma mancha que representa o Rf, a área que ocupa a concentração relativa em relação ao total

da proteína carregada em cada canal e massa molecular em kiloDalton - kDa (Figura 13).

4.4. Avaliação das trocas gasosas e eficiência fotoquímica

O estudo foi realizado na Unidade de Apoio e Pesquisa (UAP) do CCTA na UENF. No experimento foram utilizadas 05 plantas por tratamento – controle e mesotrione - sendo uma planta de milho (híbrido BKD 330) por vaso, aplicando-se os tratamentos iguais às condições dos experimentos anteriores conforme descrito no item 4.2.

A taxa fotossintética líquida (assimilação fotossintética do carbono) e transpiração foi determinada por meio do sistema portátil de medição das trocas gasosas, modelo LI-6200 (LI – COR, Lincoln, NE, USA). Para isso, foi utilizada uma câmara de 0,25 L, com área foliar de medição de aproximadamente 6,8 cm². Utilizou-se aparelho com analisador de gás no infravermelho LI-6200 (Licor., NE, USA), com um conjunto de lâmpadas tipo LED (“light emitting diode”) acoplado à superfície da câmara do IRGA, possibilitando a obtenção de um fluxo de fótons fotossintéticos de 500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, sem aquecimento do tecido foliar. As épocas de avaliações foram as seguintes: 01, 02, 03, 05 e 07 dias após a aplicação, realizadas no horário entre 07 e 10 horas da manhã. A medição foi realizada na 4ª folha do milho, na posição central do limbo foliar.

4.5. Medição da fluorescência da clorofila a

A taxa fotossintética líquida e a eficiência fotoquímica, com base na fluorescência da clorofila **a**, foram todas determinadas nos mesmos períodos e épocas, mantendo-se a metodologia semelhante à de desenvolvimento das plantas, descrito no item 4.2. Para estudo da fluorescência, foram utilizadas 20 plantas por tratamento, cultivadas individualmente em vasos de 4,5 litros. A medição foi realizada na 4ª folha do milho, na posição central do limbo foliar.

As folhas do milho foram pré-adaptadas no escuro, com uso de pinças, por 30min antes das determinações de fluorescência. Esse tempo é suficiente para o “relaxamento” de todo o sistema transportador de elétrons do processo fotossintético, garantindo o estado oxidado dos receptores de elétrons.

As determinações relativas à emissão de fluorescência da clorofila **a** foram efetuadas na temperatura ambiente, por meio de um fluorímetro de luz não-

modulada, modelo PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK), no qual era registrado o valor da fluorescência inicial (F_0), máxima (F_m) e variável (F_v) e o rendimento quântico máximo do PS II (F_v/F_m) e a área (área acima da curva da cinética de emissão da fluorescência).

4.6. Leitura do SPAD

As plantas de milho para medição do SPAD foram cultivadas nas mesmas condições adotadas para os experimentos anteriores conforme descrito no item 4.2. Foram realizadas 25 repetições por tratamento, com quatro medições por folha (terceira e quarta) de milho, obtendo-se valor médio das oito medições. As leituras com o SPAD foram realizadas nas épocas 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 07 DAA. Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância e, quando significativo submetido ao teste de Tukey a 5% de significância.

O medidor de clorofila, modelo Minolta SPAD-502, usa diodos que emitem luz na faixa de 650 a 940 nm através da folha. O comprimento de onda de 650 nm situa-se próximo aos dois comprimentos primários de onda associadas com a atividade da clorofila (645 e 663 nm). O comprimento de onda, de 940 nm, serve como referência interna para compensar diferenças na espessura da folha e no teor de água. O clorofilômetro mede a diferença de atenuação da luz entre 650 e 940 nm, como um índice de intensidade de cor ou de concentração de clorofila (Yadava, 1986).

4.7. Análise de nutrientes das folhas

O cultivo das plantas de milho para análise de nutrientes foi realizado nas mesmas condições do experimentos descritos no item 4.2. Neste experimento foram utilizadas 10 plantas por tratamento, cultivadas individualmente em vaso de 4,5 L.

A análise dos nutrientes foi realizada somente da terceira e quarta folhas do milho na época de 07 DAA. O conteúdo de N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn das folhas foram determinados depois que as amostras foram desidratadas em estufa em ventilação forçada, à temperatura em torno de 75 °C, por 48 horas (Malavolta et al., 1989). Uma vez desidratado, o material foi moído em moinho tipo Willey, peneirado em malha de 20 “mesh” e armazenado em frascos

hermeticamente fechados. Os nutrientes P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Silva (1997), e o N, pelo método de Nessler (Jackson, 1958). Os resultados foram submetidos à análise de variância.

4.8. Efeito do mesotrione no crescimento das plantas de milho

As plantas de milho para análise de crescimento do milho foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item 4.2. Neste experimento foram utilizados 25 repetições por tratamento, e aos sete DAA as plantas de milho foram coletadas para avaliação da altura, do peso úmido e seco da parte aérea e seco da raiz.

5. RESULTADOS

5.1. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase de tonoplasto

5.1.1. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em folha de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione

De todos os transportadores primários de prótons analisados, a H⁺-PPase foi a que apresentou maior participação na desintoxicação do mesotrione, principalmente nas vesículas de tonoplasto isolados de folha. Na primeira avaliação realizada aos três DAA neste tecido, a H⁺-PPase apresentou a maior estimulação em relação aos outros transportadores primários de H⁺. Observa-se na Figura 14, que no meio de reação com K⁺ o tratamento com herbicida foi maior (0,2027 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) em comparação ao controle (0,1476 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹). Por outro lado, na ausência de K⁺ no meio reacional, o tratamento com mesotrione apresentou atividade hidrolítica praticamente semelhante ao controle (0,1366 e 0,1271 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹). Assim, ao observar a atividade da pirofosfatase com potássio-dependente, a hidrólise foi maior no tratamento com mesotrione (0,0757 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) em relação ao controle (0,0113 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹).

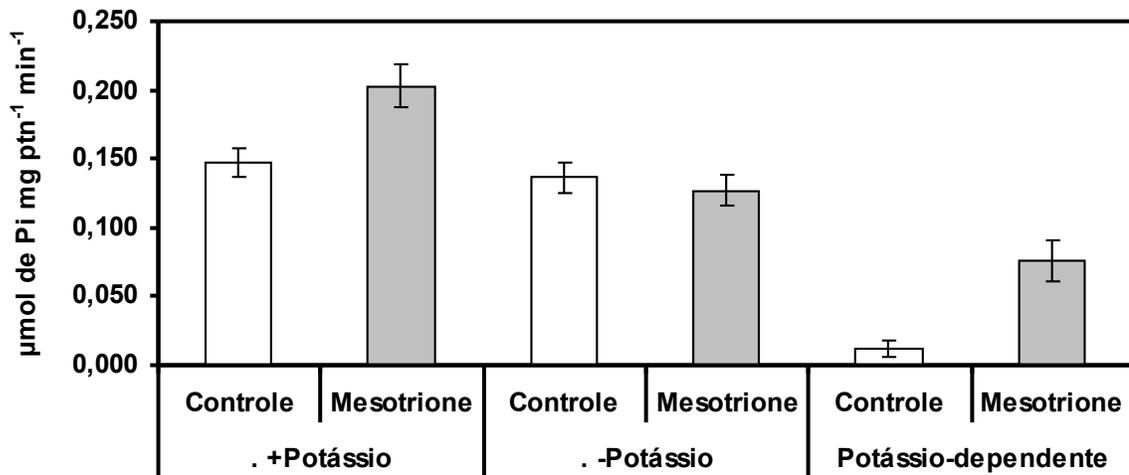


Figura 14: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas das folhas de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos **03 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

5.1.2. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em folha de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Ao analisar a atividade da H⁺-PPase aos sete DAA, constatou-se que houve aumento na hidrólise no meio de reação com K⁺, no tratamento com mesotrione (0,228 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) em relação ao controle (0,167 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) (Figura 15). Ao comparar o desempenho dessa enzima na ausência de K⁺, constatou-se que não ocorreu diferença na atividade hidrolítica entre os tratamentos. A atividade PPásica foi maior na potássio-dependente com mesotrione (0,0796 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) em comparação ao sem herbicida (0,0204 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹).

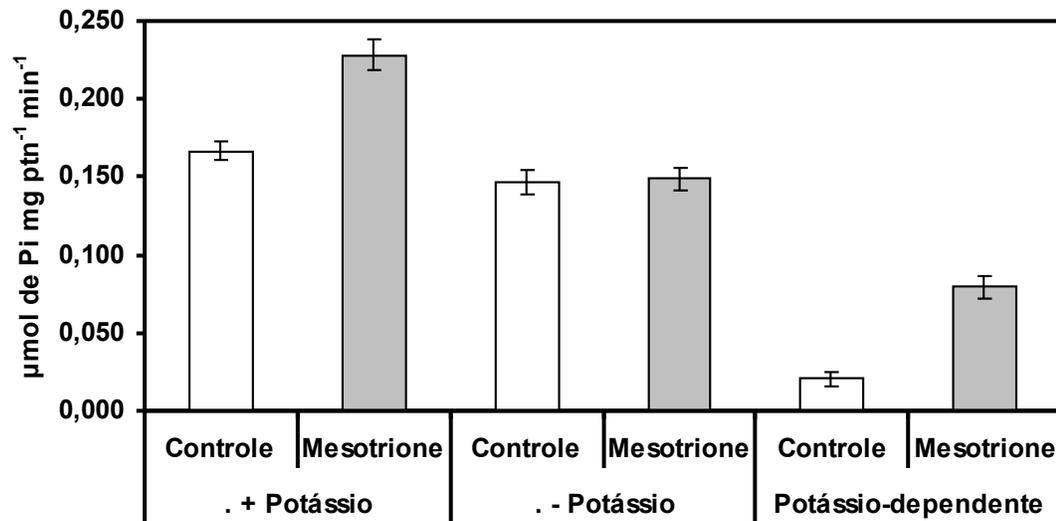


Figura 15: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas das folhas de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos **07 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

5.1.3. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em folha de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione

As plantas de milho após 12 DAA estavam completamente sem sintoma de intoxicação do mesotrione, aparentando desenvolvimento semelhante às plantas controle (Figura 43). Ao averiguar o comportamento da H⁺-PPase das folhas neste período, constatou-se que a atividade hidrolítica no meio de reação com e sem K⁺ não apresentou diferenças. Por outro lado, no mesotrione com potássio-dependente, a PPásica apresentou atividade menor (0,075 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) em relação ao controle - 0,124 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹ (Figura 16).

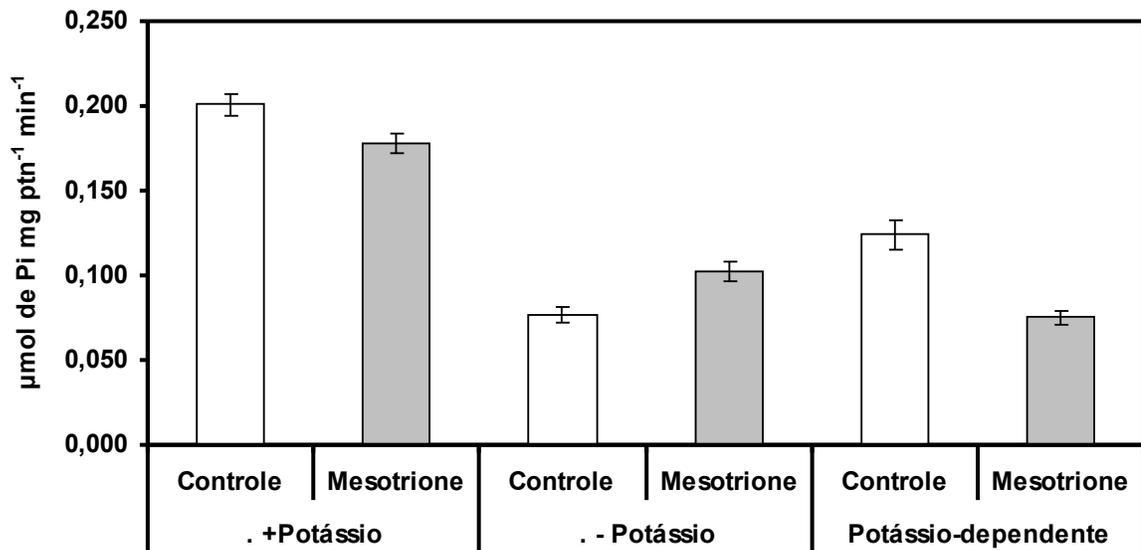


Figura 16: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas das folhas de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos **12 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas, obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

Observa-se na Figura 17 A e Tabela 05 que no período aos três DAA houve maior síntese de proteínas, no tratamento com mesotrione em relação ao controle, nas bandas com peso molecular de 27, 28, 48, 51, 55, 59 e 62 kDa, com aumento em percentagem das bandas (área) em 30%, 29%, 45%, 47%, 235%, 196% e 76%, respectivamente. Quando comparado ao perfil eletroforético aos sete DAA, verificou-se que o tratamento com herbicida proporcionou maior síntese das proteínas ou polipeptídios, nas bandas com peso molecular em kDa de 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 32, 35, 39, 41, 45, 62 e 64 e com aumento das banda (área) em percentagem(%) de 28, 24, 27, 20, 28, 33, 22, 37, 18, 19, 20, 38, 39, 47 e 67 respectivamente, em relação ao controle (Figura 17 B e Tabela 05).

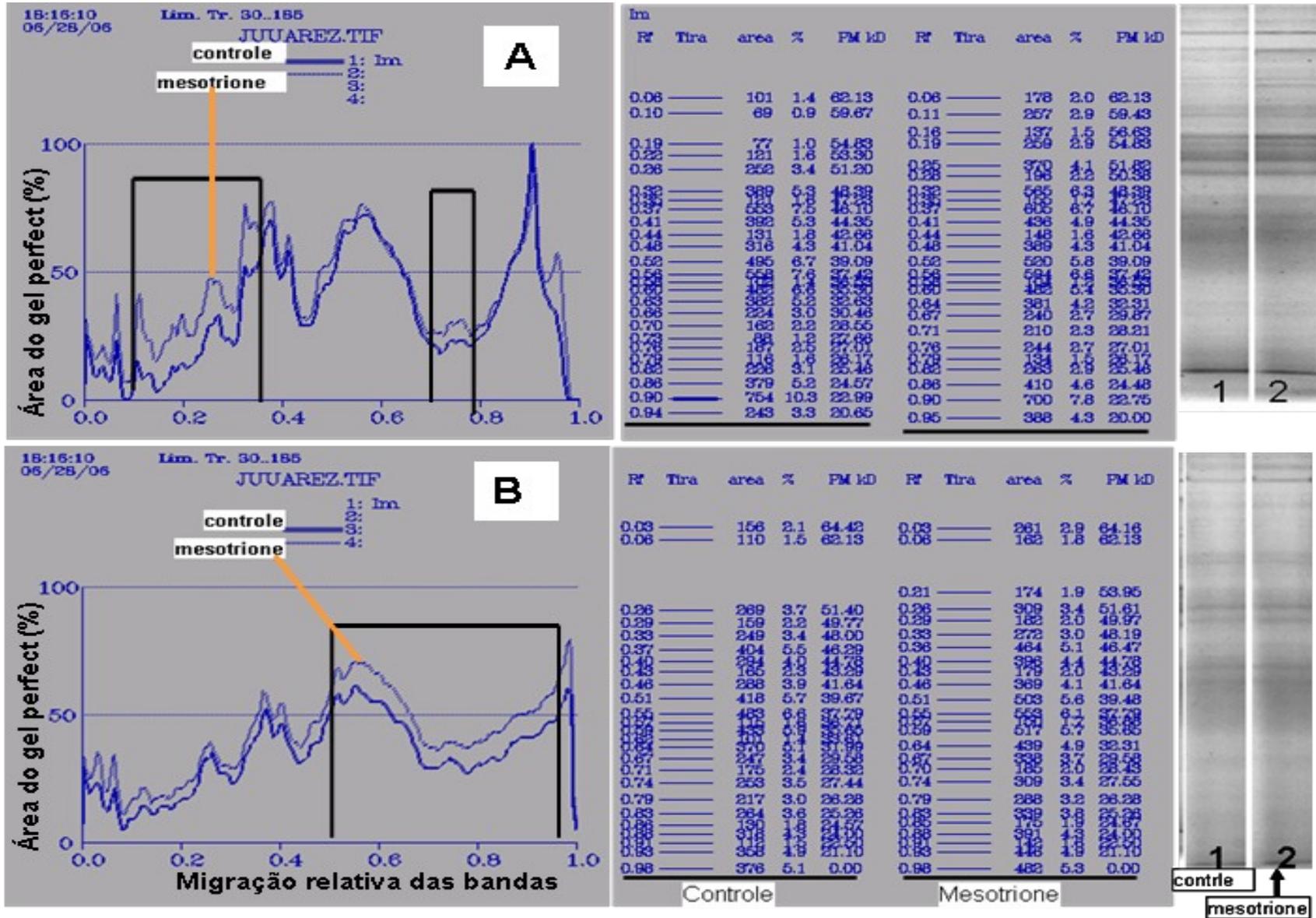


Figura 17: Perfil eletroforético de proteínas (unidimensional) do citoplasma de **folhas** de milho em duas épocas de avaliação nos tratamentos com e sem mesotrione. **A** - aos **três** DAA e **B** – **sete** DAA.

Tabela 04: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **folhas** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **três** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Porcentagem (%) de aumento da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,06	62	101	178	76
0,10	59	88	257	192
0,19	55	77	258	235
0,25	51	252	370	47
0,32	48	389	565	45
0,37	46	553	605	9
0,41	44	392	436	11
0,44	42	131	148	13
0,48	41	316	368	16
0,70	28	162	210	29
0,76	27	187	244	30
0,82	25	226	263	16
0,86	24	378	410	8

Tabela 05: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **folhas** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **sete** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Porcentagem (%) de aumento da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,03	64	156	261	67
0,06	62	110	162	47
0,26	51	268	308	15
0,29	49	158	182	15
0,33	48	246	272	10
0,40	45	284	396	39
0,43	43	165	178	8
0,46	41	266	368	38
0,51	39	418	503	20
0,55	37	483	553	14
0,58	35	433	517	19
0,64	32	370	438	18
0,67	28	247	338	37
0,74	27	253	308	22
0,78	26	217	288	33
0,83	25	264	338	28
0,88	24	318	381	20
0,91	22	112	142	27
0,93	21	358	446	24
0,98	20	376	482	28

5.1.4. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase no caule de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Observa-se, na Figura 18 que o mesotrione afetou a atividade hidrolítica das H⁺-PPase no tecido do caule em milho aos três DAA. No meio de reação com potássio, a atividade hidrolítica da PPásica foi maior no tratamento com mesotrione (0,115 $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em comparação ao controle (0,042 $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). E sem a utilização do K⁺ no meio de reação, a atividade hidrolítica do tratamento com mesotrione foi maior (0,0142 $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação

ao controle ($0,00721 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Já com potássio-dependente no mesotrione a atividade foi maior ($0,101 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,035 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Como o mesotrione é um herbicida sistêmico, possivelmente certa proporção do herbicida depositado na folha tenha se movido por meio do floema para o caule, sendo então seqüestrado pelo vacúolo e impedindo a translocação para as folhas novas em desenvolvimento.

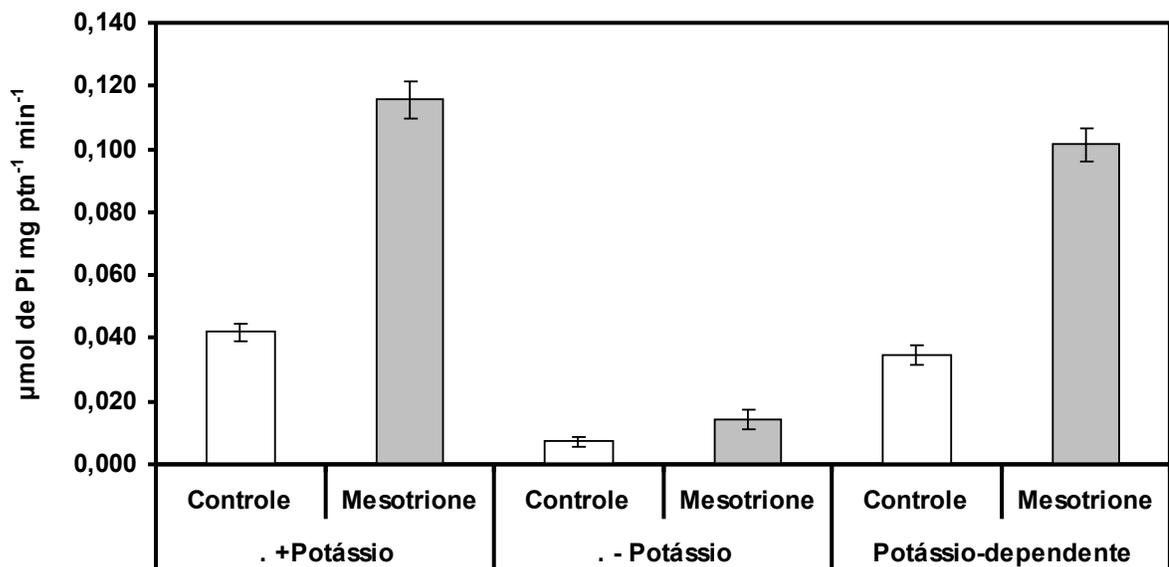


Figura 18: Atividade hidrolítica da H^+ -PPase em vesículas de tonoplasto isoladas do caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos **03 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

5.1.5. Atividade hidrolítica da H^+ -PPase no caule aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Aos sete DAA, as vesículas de tonoplasto do caule apresentaram atividade PPásica maior ($0,071 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) no tratamento com mesotrione com potássio comparado ao controle ($0,047 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) - Figura 19. Já a quantidade de Pi hidrolisado sem adição de potássio permaneceu constante nos dois tratamentos. Por outro lado, a atividade com potássio-dependente, com mesotrione foi superior ($0,061 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,025 \mu\text{mol de$

P_i mg $ptn^{-1} min^{-1}$), como também a formação de um gradiente de H^+ dependente de PPI medido pela queda da fluorescência (Figura 20).

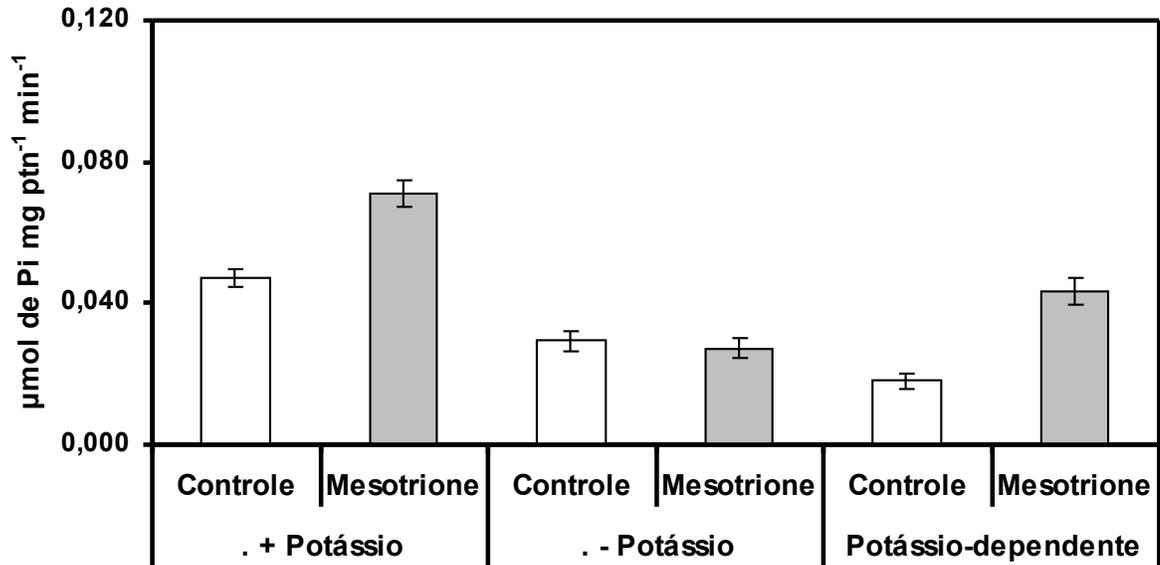


Figura 19: Atividade hidrolítica da H^+ -PPase em vesículas de tonoplasto isoladas do caule de milho tratadas ou não com mesotrione ($192 g ha^{-1}$) aos 07 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

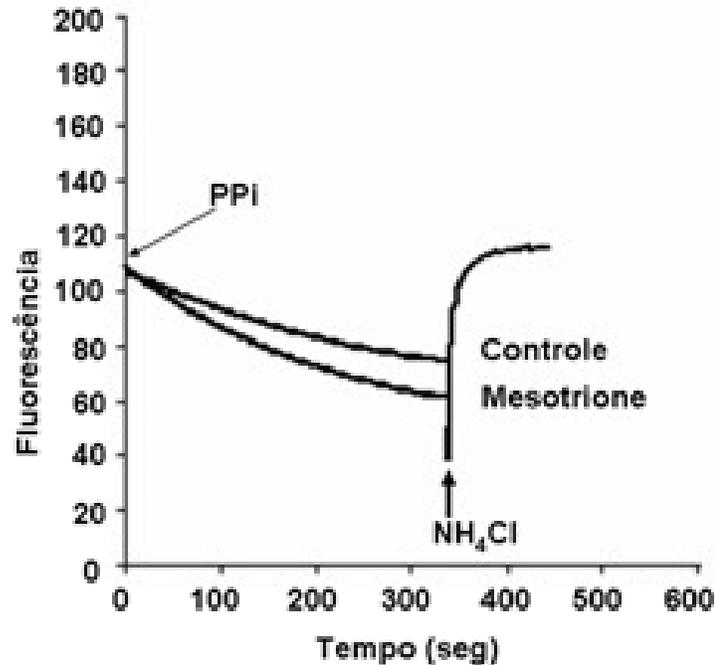


Figura 20: Formação do gradiente de prótons pela H^+ -PPase de vesículas isoladas de caule de milho tratadas com e sem mesotrione aos **07 DAA**. O meio de reação conteve 10 mM Mops-Tris (pH 7,0), 3 mM $MgCl_2$, 100 nM KCl, 02 μ M de ACMA e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com adição de 1 mM de PPI a 30 °C. Após o declínio do gradiente de H^+ , o protonóforo NH_4Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência-base.

5.1.6. Atividade hidrolítica da H^+ -PPase no caule de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione

A avaliação da atividade PPásica do caule das plantas de milho na época de 12 DAA indicou que o meio de reação com potássio, no tratamento com mesotrione, foi maior ($0,130 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,080 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Vale lembrar que, nesta época, as plantas de milho estavam praticamente sem sintomas de intoxicação nas folhas. Por outro lado, não houve diferença nos dois tratamentos sem o potássio no meio de reação. Já no potássio-dependente, a H^+ -PPase com herbicida foi superior ($0,184 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) à testemunha ($0,056 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) respectivamente (Figura 21).

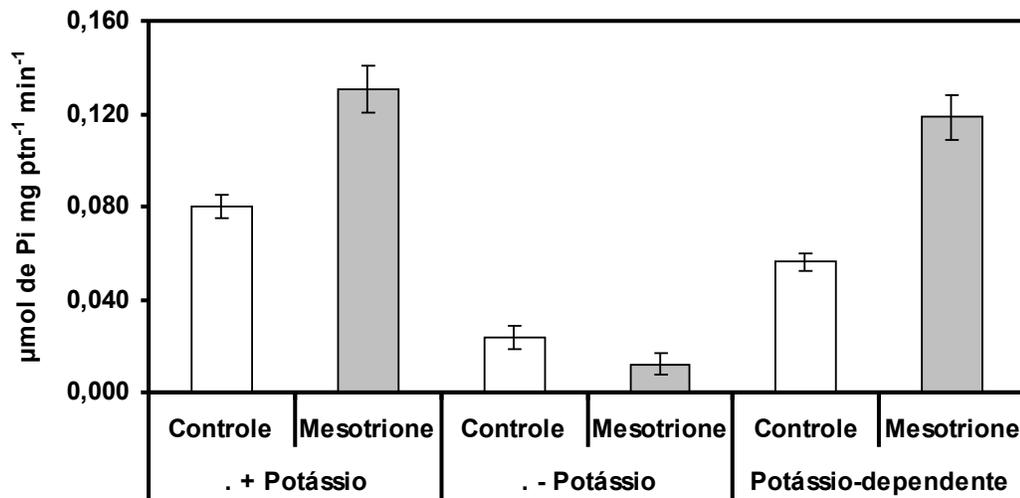


Figura 21: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas de caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos 12 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

O estímulo à resposta de defesa das plantas tolerantes ou resistentes à ação de herbicida envolve, também, reações da planta ligadas à ativação de genes de defesa em reação de hipersensibilidade (RH), à resistência sistêmica adquirida e à produção de lignina, fitoalexinas, enzimas hidrolítica e enzimas antioxidantes (Dangl et al., 2000). Por isso, observa-se que os padrões eletroforéticos unidimensional das proteínas no citoplasma, nas duas épocas, em tecido do caule de milho apresentaram comportamento muito semelhante, quanto ao perfil do tecido da folha (Figura 22 A e B). Por sua vez, constatou-se no período de três DAA, no tratamento com mesotrione, aumento na biossíntese de proteína ou peptídios de peso molecular de 21, 25, 28, 30, 32, 41, 43, 44, 46, 47, 48, 51, 55, 60 e 62 kDa, e com aumento das bandas (área) em 77%, 28%, 45%, 51%, 18%, 34%, 20%, 24%, 21%, 36%, 62%, 63%, 253%, 307% e 101% respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figura 22 A e Tabela 06). Enquanto, no estágio de sete DAA não ocorreram mudanças tão expressivas quanto na época anterior (03 DAA), mesmo assim houve pequeno aumento na síntese de proteínas com peso molecular de 22, 26, 29, 41, 43, 50, 53, 62 e 64 e com aumento das bandas (área) em percentagem em 39%, 23%, 28%, 18%, 33%, 19%, 24%, 33%, 37% e 67%, respectivamente (Figura 22 B e Tabela 07).

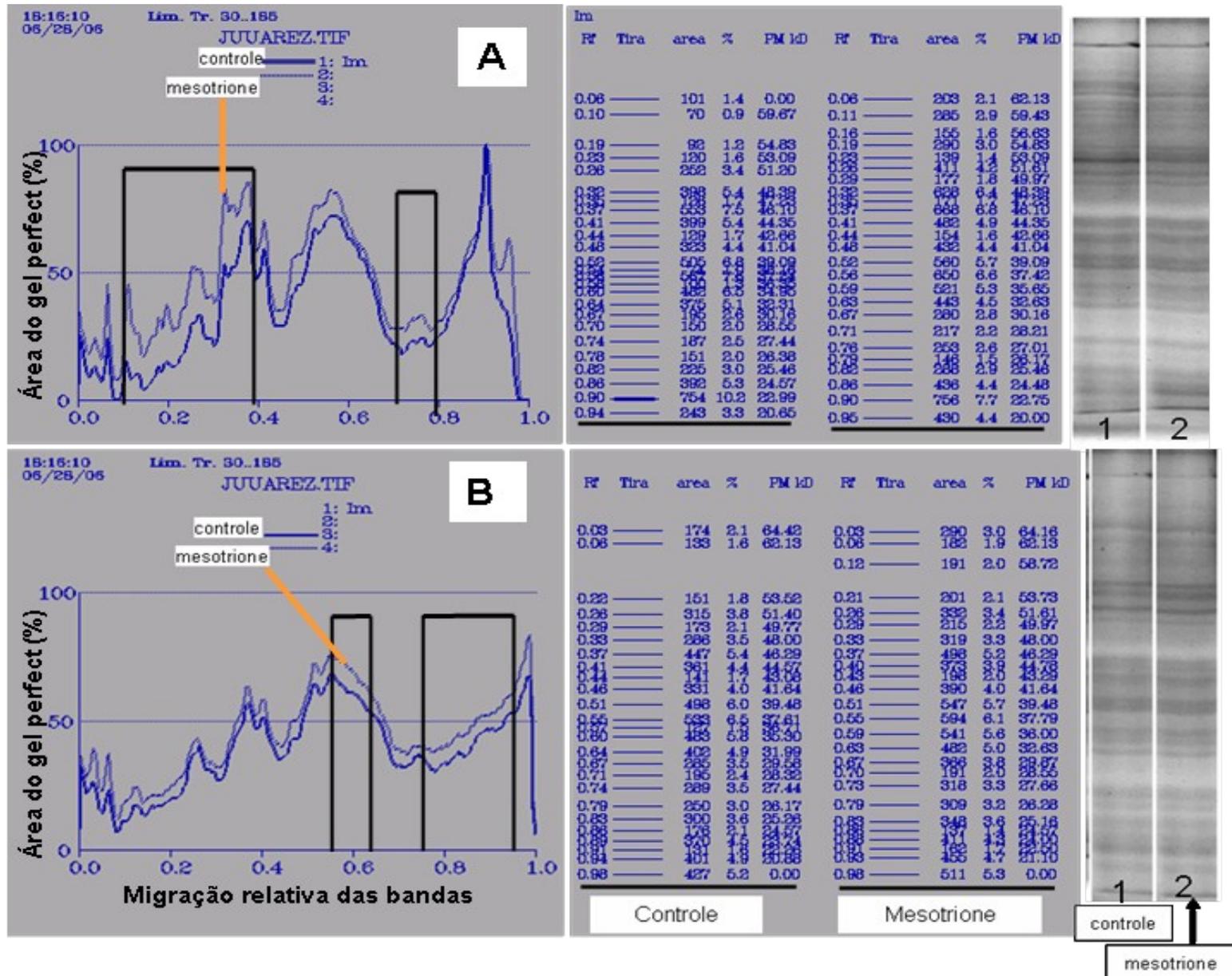


Figura 22: Perfil eletroforético de proteína do citoplasma de caule de milho nos tratamentos controle e mesotrione. **A** - aos três DAA e **B** - aos sete DAA.

Tabela 06: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **caule** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **três** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Porcentagem (%) de aumento da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,06	62	101	203	101
0,10	60	70	285	307
0,19	55	82	290	253
0,26	51	252	411	63
0,32	48	388	628	62
0,35	47	126	171	36
0,37	46	553	668	21
0,41	44	388	482	24
0,44	43	128	154	20
0,46	41	323	432	34
0,52	39	505	580	15
0,56	35	587	650	11
0,64	32	375	443	18
0,67	30	185	280	51
0,70	28	150	217	45
0,82	25	225	288	28
0,86	24	382	436	14
0,94	21	243	430	77

Tabela 07: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **caule** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **sete** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Porcentagem (%) de aumento da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,03	64	174	290	67
0,06	62	133	182	37

0,22	53	151	201	33
0,29	50	173	215	24
0,33	48	266	318	19
0,37	46	447	498	11
0,44	43	141	188	33
0,46	41	331	390	18
0,51	39	498	547	10
0,55	37	533	594	11
0,64	32	402	462	15
0,67	29	285	366	28
0,74	27	288	318	10
0,78	26	250	308	23
0,83	25	300	348	16
0,91	22	131	182	39
0,94	21	401	455	13

5.1.7. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em raiz de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Os dados na Figura 23 mostram que a atividade PPásica em raiz de milho no tratamento com mesotrione, aos três DAA, foi superior ao controle. Isto possivelmente ocorreu por causa da absorção de moléculas do herbicida pelas raízes, presente na solução do solo. Com isso, no tratamento com mesotrione a atividade PPásica com potássio foi maior ($0,106 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) a do controle ($0,059 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$), enquanto que, no meio de reação sem potássio, não houve diferença entre os tratamentos. Por outro lado, a atividade foi maior no mesotrione com potássio-dependente, no qual apresentou uma atividade de $0,075 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ em relação à testemunha, que foi de $0,035 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 23). Sendo assim, o mesotrione, na presença de K⁺, promove estímulo da H⁺-PPase.

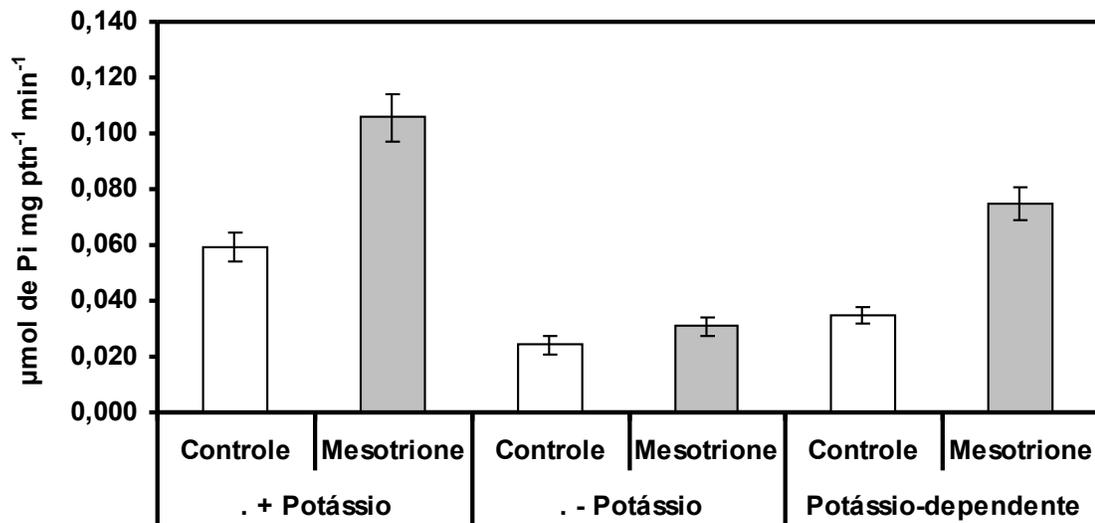


Figura 23: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas de raiz de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos 03 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

5.1.8. Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em raiz de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Ao estudar atividade hidrolítica da pirofosfatásica, em raiz de milho aos sete DAA constatou-se que o herbicida ativou esta enzima (Figura 24). Sendo assim, a atividade com potássio foi de 92% superior (0,107 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) no tratamento com mesotrione em relação à testemunha (0,055 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹). No entanto, no meio de reação sem potássio não houve diferença entre os tratamentos. Já a atividade PPásica no mesotrione no meio de reação com potássio-dependente foi de 0,074 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹, sendo superior ao controle, que se manteve em 0,033 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹. Também foi maior no mesotrione, a formação do gradiente de H⁺ dependente de PPI, medida pela queda da fluorescência (Figura 25).

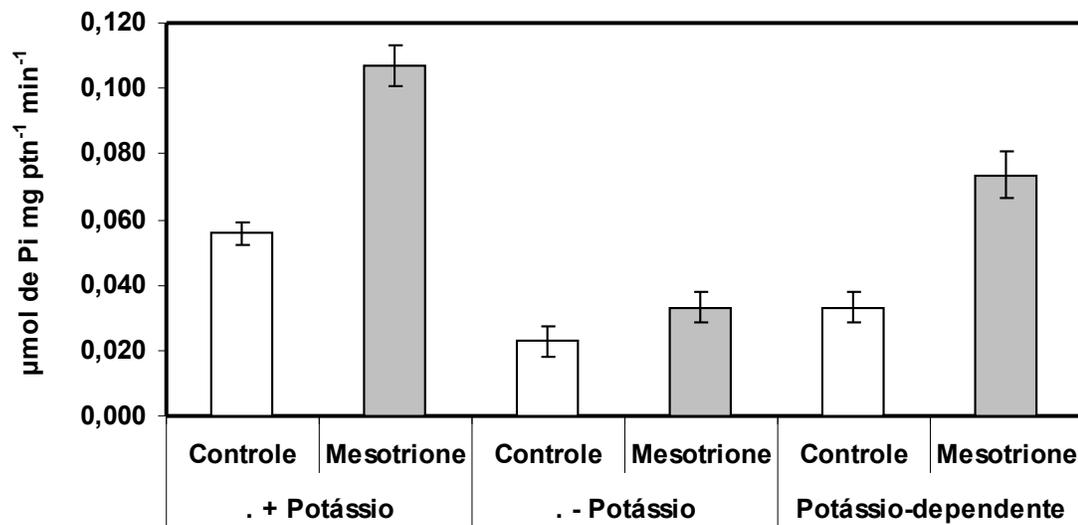


Figura 24: Atividade hidrolítica da H⁺-PPase em vesículas de tonoplasto isoladas de raiz milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos 07 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação com K, sem K e pela subtração destas obteve-se o K-dependente. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

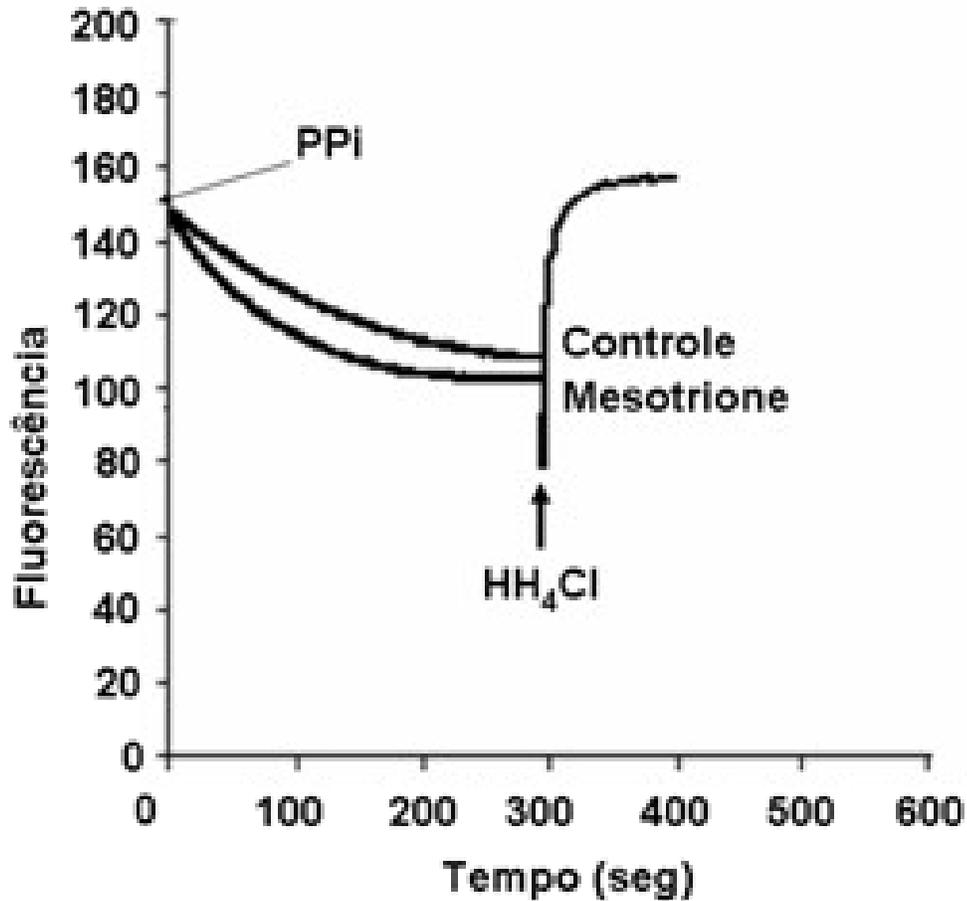


Figura 25: Formação do gradiente de prótons pela H^+ -PPase de vesículas isoladas de raiz de milho tratadas com e sem mesotrione aos 07 DAA. O meio de reação conteve 10 mM Mops-Tris (pH 7,0), 3 mM $MgCl_2$, 100 nM KCl, 02 μ M de ACMA e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com adição de 1 mM de PPI a 30 °C. Após o declínio do gradiente de H^+ , o protonóforo NH_4Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência-base.

O perfil eletroforético das proteínas do citoplasma, em raiz de milho, foi afetado negativamente no tratamento com mesotrione nas duas épocas de avaliação (Figura 26 A e B). Houve redução no conteúdo protéico no tratamento com herbicida aos três DAA, na faixa de peso molecular 20, 25, 26, 27, 35, 39, 42, 45, 53, 56, 63 e 65 kDa, com redução em porcentagem das bandas (área) em 49%, 80%, 26%, 29%, 18%, 19%, 49%, 27%, 73%, 63%, 40% e 55%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 26 A e Tabela 08).

Ao verificar o padrão eletroforético de proteínas aos sete DAA, observou-se redução das proteínas e/ou polipeptídios do citoplasma de raiz no tratamento com

mesotrione em relação ao controle. Este comportamento foi semelhante aos três DAA. Por isso, a redução do peso molecular dos polipetídios com mesotrione, em relação ao controle, nas bandas de peso molecular de 21, 25, 26, 37, 41, 45, 46, 48, 53, 56 e 63 kDa foi de 39%, 18%, 31%, 82%, 48%, 38%, 60%, 36%, 82%, 76% e 30%, respectivamente de redução das bandas (área) (Figura 26 B e Tabela 09).

Tabela 08: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **raiz** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **três** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Percentagem (%) de redução da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,02	65	127	57	55
0,05	63	562	336	40
0,17	56	554	208	63
0,23	53	440	121	73
0,38	45	367	268	27
0,46	42	404	207	49
0,51	39	602	488	19
0,59	35	708	583	18
0,75	27	465	332	29
0,79	26	533	395	26
0,85	25	674	136	80
0,94	20	815	415	49

Tabela 09: Perfil eletroforético das proteínas (unidimensional) do citoplasma de **raiz** de milho nos tratamentos com e sem mesotrione aos **sete** DAA

Migração relativa da banda - Rf	Peso molecular de cada banda - PM kD	Área da banda no Controle	Área da banda no Mesotrione	Porcentagem (%) de redução da banda (área) com mesotrione em relação ao controle
0,05	63	440	308	30
0,17	56	380	131	76
0,23	53	359	65	82
0,33	48	252	161	36
0,36	46	506	202	60
0,39	45	374	234	38
0,48	41	364	190	48
0,56	37	702	126	82
0,64	32	502	443	12
0,66	30	398	334	16
0,73	28	384	325	16
0,77	26	384	266	31
0,82	25	465	384	18
0,87	25	525	483	8
0,94	21	237	146	39

5.1.9. Estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-PPase da K⁺-dependente em folha, caule e raiz de milho

5.1.9. Estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-PPase da K⁺-dependente em folha, caule e raiz de milho

Os diferentes valores obtidos de estimulações da H⁺-PPase nos tecidos de milho com mesotrione sugerem quais os períodos que mais foram afetados pelo herbicida (Figura 27).

Ao constatar a porcentagem de aumento ou inibição da H⁺-PPase em folha de milho, submetidas ao tratamento com e sem o mesotrione nas três épocas estudadas, observa-se (Figura 27) um estímulo em 568% na presença do herbicida aos três DAA em relação ao controle.

Do mesmo modo, aos sete DAA a estimulação foi de 290%. Nas duas épocas analisadas, as plantas de milho apresentaram leve sintoma de clorose nas folhas (ver Figura 42). No entanto, aos 12 DAA ocorreu inibição em 40% da H⁺-

PPase no tratamento com mesotrione. Nesse período, aparentemente as plantas de milho tratadas com mesotrione estavam com as folhas praticamente sem sintomas de intoxicação (ver Figura 43).

Ao comparar a percentagem de estímulo da H^+ -PPase em tecido de caule de milho tratadas com mesotrione (Figura 27), observa-se estimulação na primeira época de avaliação (03 DAA) de 191%. Já aos sete DAA, a estimulação foi de 144% e aos 12 DAA de 110%.

Na análise do tecido da raiz, o mesotrione estimulou a PPásica em 114% aos três DAA (Figura 27). Como a superfície dos vasos não foi protegida no momento da aplicação do mesotrione, o solo foi contaminado com o herbicida, e as raízes do milho, provavelmente, absorveram moléculas do mesotrione, o que possivelmente explica essa ativação das H^+ -PPase neste tecido. Dessa forma, aos sete DAA, possivelmente ainda existiam moléculas de mesotrione no solo, sendo absorvidas pelas raízes, os quais promoveram estimulação de 123%, enquanto que aos 12 DAA não houve praticamente nenhuma ativação (Figura 27).

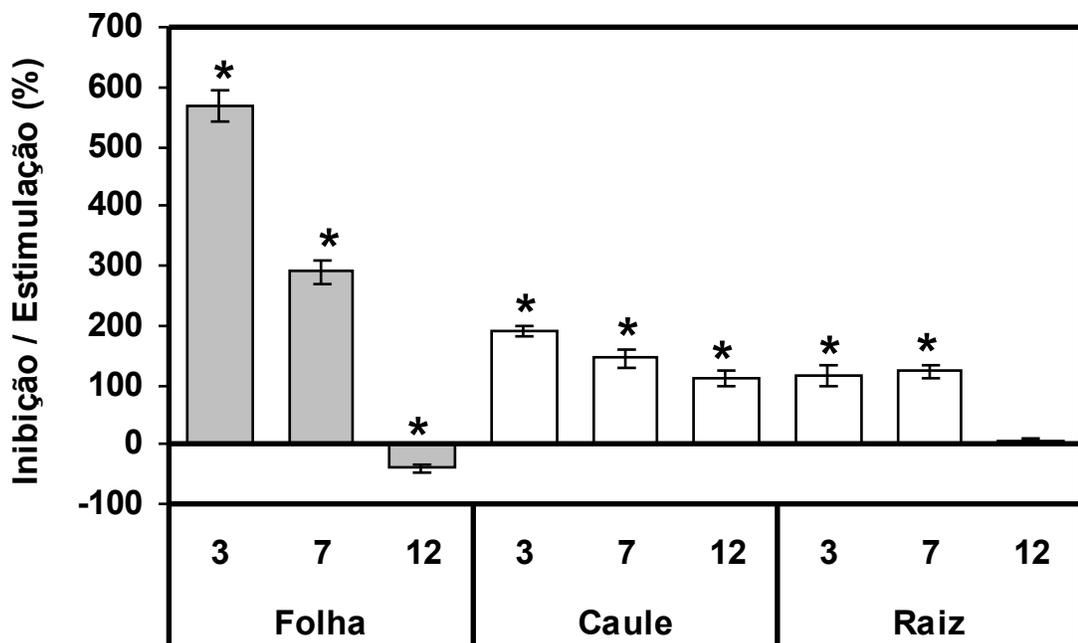


Figura 27: Porcentagem de estimulação (+) ou inibição (-) em relação ao controle, da atividade hidrolítica da H^+ -PPase do K^+ -dependente em vesículas de tonoplasto isoladas nos tecidos de folha, caule e raiz de milho aos 03, 07 e 12 DAA do herbicida mesotrione. Resultado expresso como média \pm

desvio-padrão (n=4). Os asterísticos (*) denotam estatisticamente significativos pelo teste F ($p < 0,05$) em relação ao controle e em cada tecido e época.

5.1.10. Estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-PPase total em folha, caule e raiz de milho

No ítem 5.1.9. estudou-se as formas de H⁺-PPase com K⁺-dependente em vesículas de tonoplasto isoladas nos tecidos, mas existem também as formas de H⁺-PPase com K⁺-independente, ou seja hidrolisa o PPI sem a necessidade do potássio como co-fator. As plantas possuem dois tipos (I e II) filogeneticamente distintos de H⁺-PPase no tonoplasto: o tipo I depende de potássio no citoplasma para realizar a atividade hidrolítica, e o tipo II são insensíveis ao potássio no citoplasma (Gaxiola et al., 2007).

Observa-se na Figura 28 que a estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-PPase Total em folhas de milho, no tratamento com mesotrione foi de 37% aos três e sete DAA e, com inibição de 12% aos 12DAA, não sendo significativo em relação ao controle. Portanto, ao fazer uma comparação com a estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-PPase com K⁺-dependente, constatou-se que esta foi superior em 15 e 7,8 vezes aos três e sete DAA, em relação à estimulação Total.

Logo, o tecido do caule, houve uma estimulação de 175% aos três DAA no tratamento com mesotrione em relação ao controle e, aos sete e 12 DAA a estimulação foi de 50% e 63%. Nas raízes do milho o aumento da atividade hidrolítica aos três, sete e 12 DAA foi de 78%, 92% e 48%.

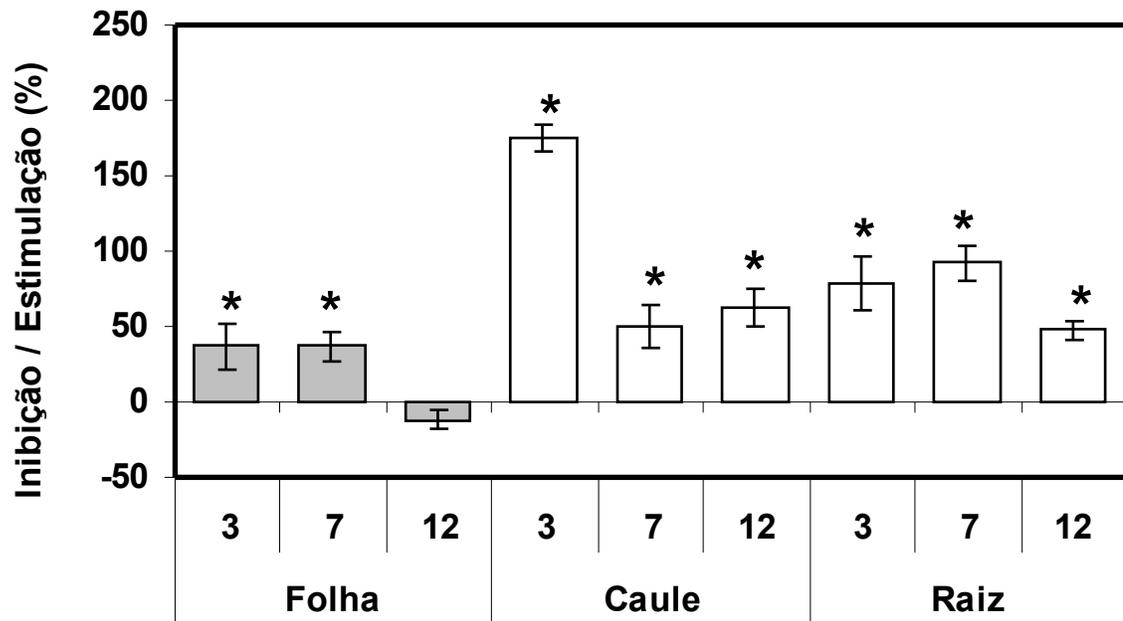


Figura 28: Porcentagem de estimulação (+) ou inibição (-) em relação ao controle, da atividade hidrolítica da H⁺-PPase **total** em vesículas de tonoplasto isoladas nos tecidos de folha, caule e raiz de milho aos 03, 07 e 12 DAA do herbicida mesotrione. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4). Os asterísticos (*) denotam estatisticamente significativos pelo teste F ($p < 0,05$) em relação ao controle e em cada tecido e época.

5.2. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo V em vesícula de tonoplasto

5.2.1. Atividade hidrolítica da V-ATPase em folhas de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione

Ao analisar a atividade hidrolítica da V-ATPase em folhas de milho aos três DAA verificou-se valores praticamente iguais nos tratamentos. Com isto, a atividade V-ATPásica de vesículas de tonoplasto com mesotrione foi de $0,061 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$, não diferindo do tratamento controle que foi de $0,057 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 29).

Ao analisar a V-ATPase de vesícula de tonoplasto de folha aos sete DAA, constatou-se atividade hidrolítica maior no tratamento com mesotrione ($0,08 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,0507 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) após a incubação das proteínas no meio de reação (Figura 29). Também foi maior a formação do gradiente de H^+ dependente de ATP medido pela queda da fluorescência da sonda ACMA no mesotrione (Tabela 10).

Já no período de 12 DAA não houve praticamente diferença na atividade hidrolítica da V-ATPase nos dois tratamentos, por isso a liberação de Pi pela hidrólise do ATP no tratamento com mesotrione foi de $0,051 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e no controle de $0,058 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 29).

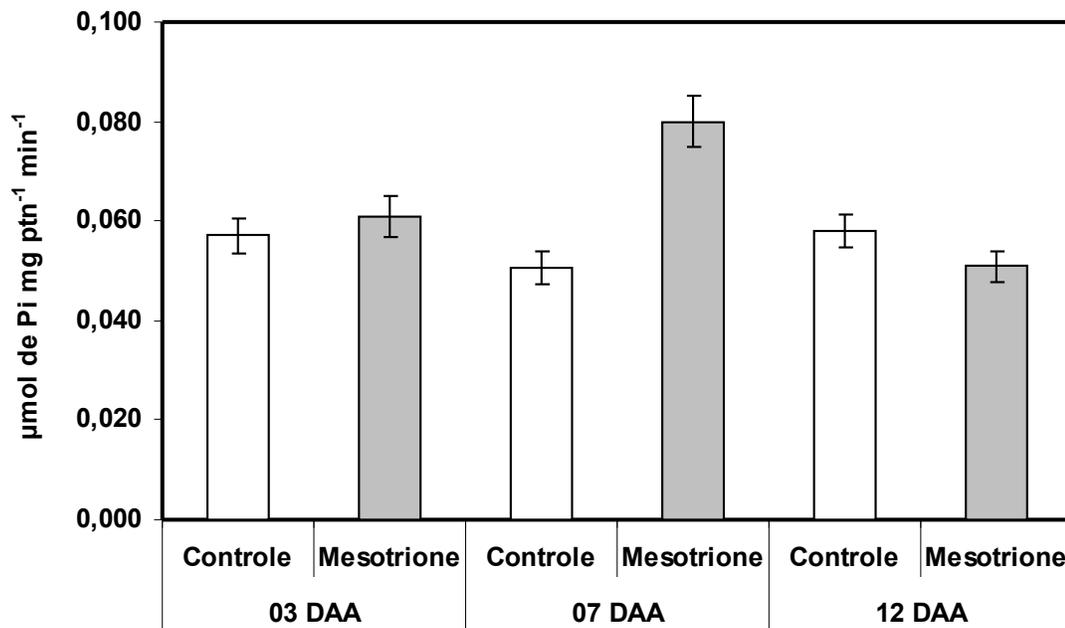


Figura 29: Atividade hidrolítica da V-H⁺-ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de folha de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos 03, 07 e 12 DAA. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

Tabela 10: Formação do Gradiente de Prótons pela V-ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de folha aos sete DAA com e sem mesotrione

Tecido	Controle		Mesotrione	
	Vo (%min)	$\Delta\text{F MAX.}(\%)$	Vo (%min)	$\Delta\text{F MAX.}(\%)$
V-ATPase - folha	3,0	3,0	4,50	11,0

5.2.2. Atividade hidrolítica da V-ATPase em caule de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione

Não houve diferença nos tratamentos da atividade hidrolítica da V-ATPase no tecido de caule aos três DAA (Figura 30), sendo que no mesotrione foi de $0,088 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e no controle de $0,073 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Ao deparar com o comportamento da V-ATPase no caule de milho aos sete DAA, verificou-se que houve diferença na atividade hidrolítica entre os tratamentos (Figura 30). Por isso, após a incubação da proteína no meio de reação, esta enzima apresentou atividade de $0,042 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ no mesotrione, e de $0,059 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ no controle. Já aos 12 DAA, a atividade hidrolítica nos tratamentos permaneceu constante, nos quais a hidrólise do ATP pela V-ATPase com mesotrione foi de $0,099 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e no controle foi de $0,085 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 30).

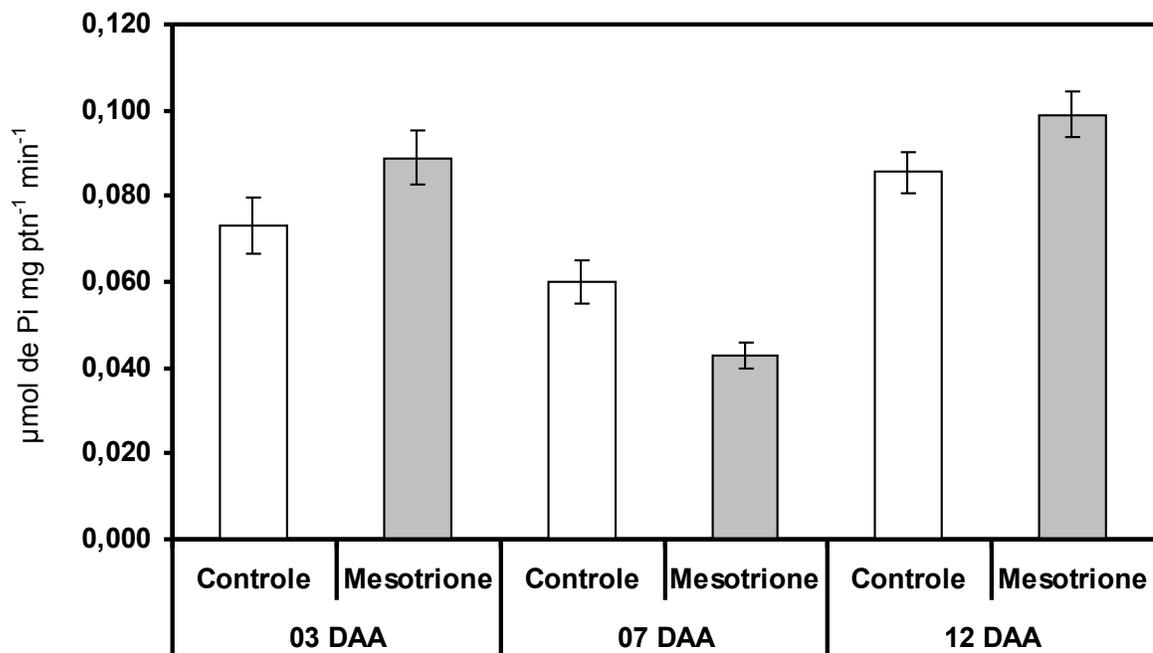


Figura 30: Atividade hidrolítica da V-ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos 03, 07 e 12 DAA. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão (n=4).

5.2.3. Atividade hidrolítica da V-ATPase em raiz de milho nas três épocas após aplicação (três, sete e 12 DAA) do mesotrione

A atividade hidrolítica da V-ATPase no tecido de raiz de milho aos três DAA foi praticamente igual nos dois tratamentos (Figura 31). Deste modo, após a incubação da proteína no meio de reação com vesícula de tonoplasto, a hidrólise do ATP pela V-ATPásica no tratamento com mesotrione foi de $0,123 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e no controle de $0,115 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Aos sete DAA constatou-se que a atividade da V-ATPase da raiz de milho, submetida ao tratamento com mesotrione, foi maior ($0,148 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) comparada ao controle ($0,097 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Em compensação, aos 12 DAA, a atividade hidrolítica com o herbicida ($0,238 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) foi praticamente igual ao controle - $0,241 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Figura 31).

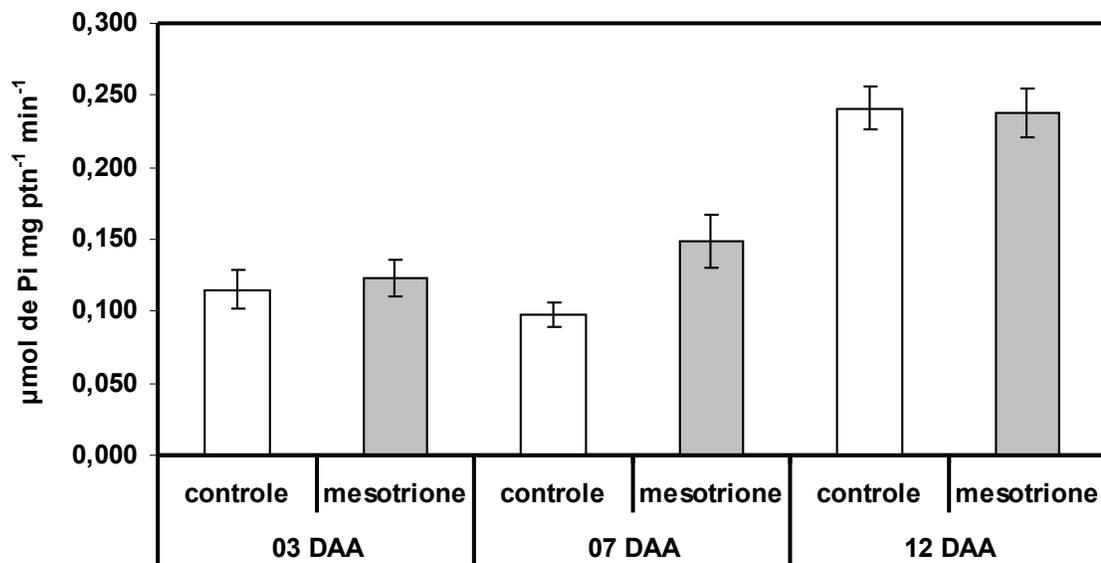


Figura 31: Atividade hidrolítica da V-ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de raiz de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos 03, 07 e 12 DAA. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

55.2.4. Estimulação da atividade hidrolítica da V-ATPase em folha, caule e raiz de milho

A estimulação da V-ATPase nos diferentes tecidos da planta de milho, submetidas ao tratamento com mesotrione (Figura 32) não foi tão ativada quanto as H^+ -PPases nos mesmos tecidos analisados. No entanto, pesquisas têm demonstrado que a relação estequiométrica no transporte de H^+ e na hidrólise de ATP (H^+/ATP) pela V-ATPase varia de 1,75 a 3,28, dependendo do pH citoplasmático e do lúmen do vacúolo (Davies et al., 1994). Já a proporção de H^+ e hidrólise de PPI (H^+/PPi) pela V-PPase é de 1,0 (Maeshima, 2001).

No tecido de folha, a estimulação da V-ATPase foi de 57% com mesotrione aos sete DAA. Porém, aos 03 e aos 12 DAA, não houve alteração nos tratamentos, enquanto que, no tecido do caule aos 07 DAA, o mesotrione inibiu a V-ATPase em menos 28%, e aos 03 e aos 12 DAA, ocorreu um pequena estimulação de 21% e 15%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 32).

Na raiz de milho, na época aos 07 DAA, a V-ATPase foi estimulada pelo mesotrione em 52%, porém, no período de 03 e de 12 DAA, não houve praticamente estimulação (Figura 32).

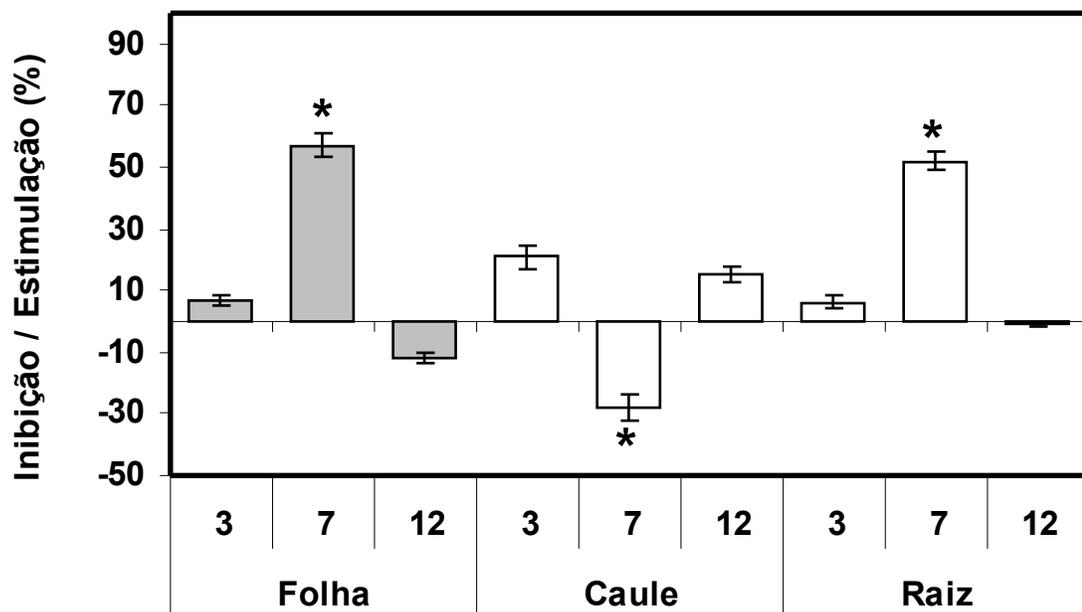


Figura 32: Percentagem de estimulação (+) ou inibição (-) em relação ao controle da atividade hidrolítica da V-ATPase em vesículas de tonoplasto isoladas de folha, caule e raiz de milho aos 03, 07 e 12 DAA do herbicida mesotrione. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão (n=4). Os asterísticos (*) denotam estatisticamente significativos pelo teste F ($p < 0,05$) em relação ao controle e em cada tecido e época.

5.3. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo P de membrana plasmática

5.3.1. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase em folha de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione

O efeito do herbicida na atividade da H⁺-ATPase de membrana plasmática nos tecidos de folha, caule e raiz foi estudado com base nas medidas da hidrólise do ATP total (sem vanadato), insensíveis (com vanadato) e sensíveis (sem vanadato menos com vanadato) (Figura 33).

Nos ensaios enzimáticos, nos quais foram utilizadas vesículas isoladas de membrana plasmática de folha de milho aos 07 DAA, a atividade ATPásica sem vanadato no tratamento com mesotrione foi superior em 28% ($0,05996 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) ao controle ($0,0466 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Por outro lado, no meio de reação com vanadato, houve uma estimulação no tratamento com mesotrione de 69% ($0,016 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,009 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) (Figura 33), enquanto a atividade ATPásica sensível não diferiu nos tratamentos com mesotrione ($0,043 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em relação ao controle ($0,037 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Já no período de 03 e 12 DAA, não foi observada alteração entre os tratamentos (dados não apresentados).

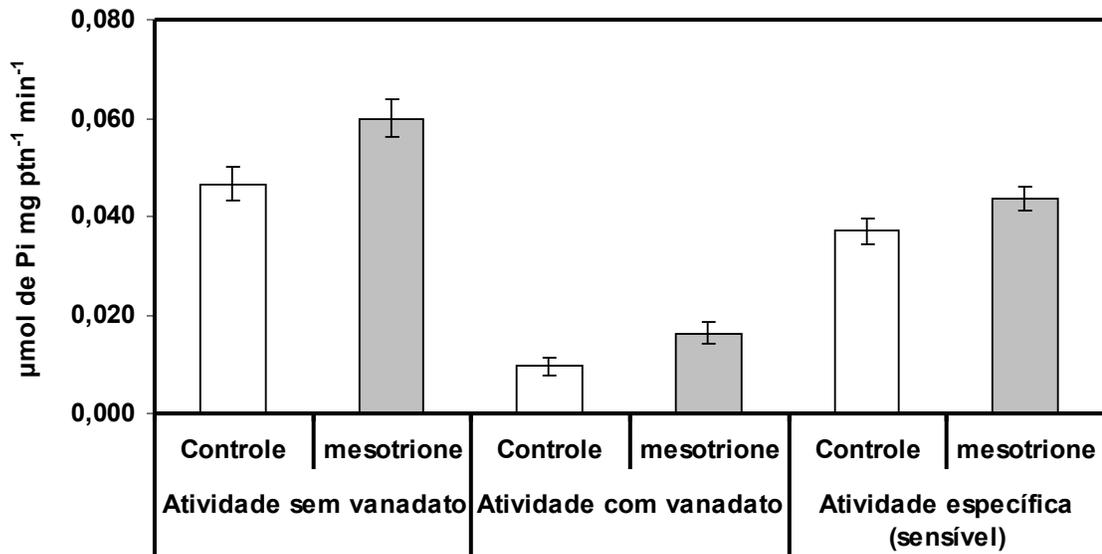


Figura 33: Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase em vesículas de membrana plasmática isoladas de folha de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos 07 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação sem vanadato (inibidor), com vanadato e pela subtração destas obteve-se a atividade específica (sensível). Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

5.3.2. Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase no caule de milho aos três dias após aplicação (DAA) do mesotrione

O atividade da ATPásica de membrana plasmática pode ocorrer por meio do incremento do ciclo catalítico ou do aumento da expressão de genes que codificam maior quantidade de bombas H⁺ (Oufattole et al., 2000; Harper et al., 1994). A atividade hidrolítica da H⁺-ATPase do tipo P em tecido do caule, aos 03 DAA, no tratamento com mesotrione no meio de reação sem vanadato foi maior (0,127 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹) do que o controle - 0,080 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹ (Figura 34). Por outro lado, não houve diferença na atividade nos tratamentos no meio de reação com vanadato, entretanto ocorreu diferença na atividade específica (sensível) no tratamento com mesotrione (0,097 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹), quando comparado ao sem herbicida (0,059 μmol de Pi mg ptn⁻¹ min⁻¹). Becker et al. (1993) relatam que a atividade específica de vesícula de membrana plasmática purificada está na faixa de

01 a 02 $\mu\text{mol Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$, superior aos valores encontrados no presente trabalho.

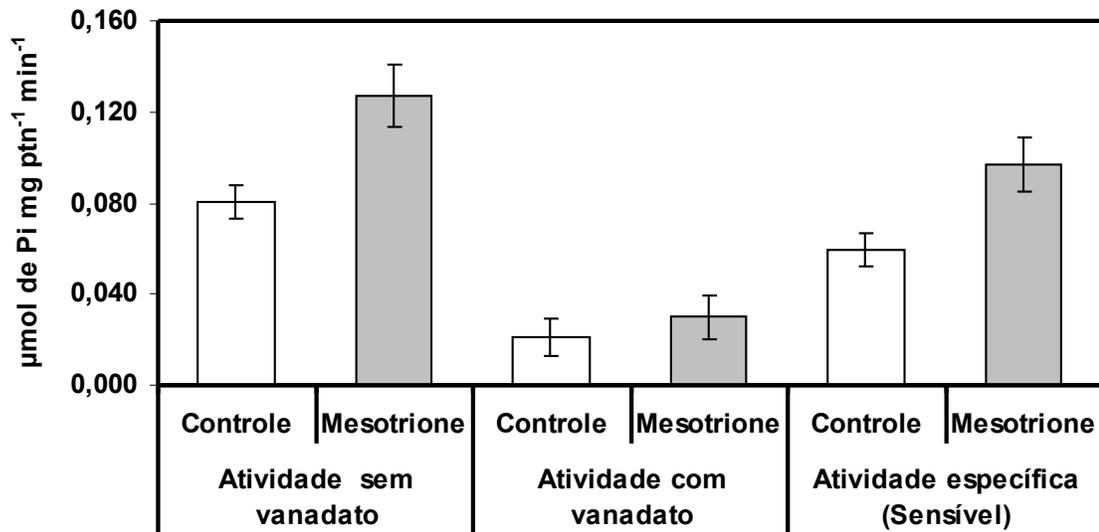


Figura 34: Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase em vesículas de membrana plasmática isoladas de caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos 03 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação sem vanadato (inibidor), com vanadato e pela subtração destas obteve-se a atividade específica (sensível). Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

5.3.3. Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase no caule de milho aos sete dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Como se observa na Figura 35, no meio de reação com vanadato, a atividade hidrolítica da H^+ -ATPase do caule aos 07 DAA não diferiu nos dois tratamentos. Por outro lado, a atividade sem o vanadato foi menor no tratamento com mesotrione ($0,091 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$) quando comparado ao controle ($0,127 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$), já a atividade específica (sensível) com mesotrione ($0,059 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$) foi menor em comparação ao controle ($0,098 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$). Também foi menor no tratamento com mesotrione a formação do gradiente de H^+ dependente de ATP medido pela queda da fluorescência da sonda ACMA (Figura 36).

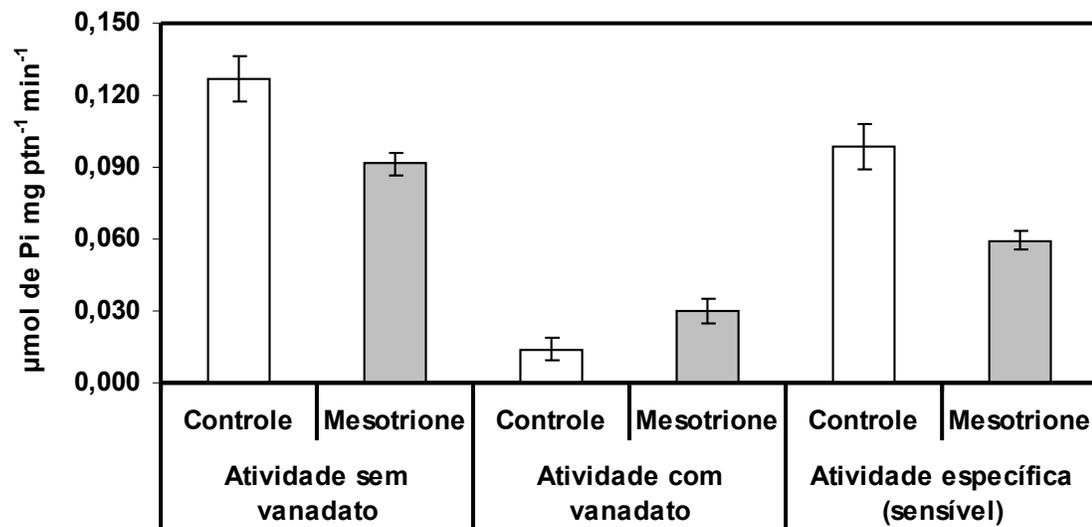


Figura 35: Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase em vesículas de membrana plasmática isoladas de caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos **07 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação sem vanadato (inibidor), com vanadato e pela subtração destas obteve-se a atividade específica (sensível). Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=4).

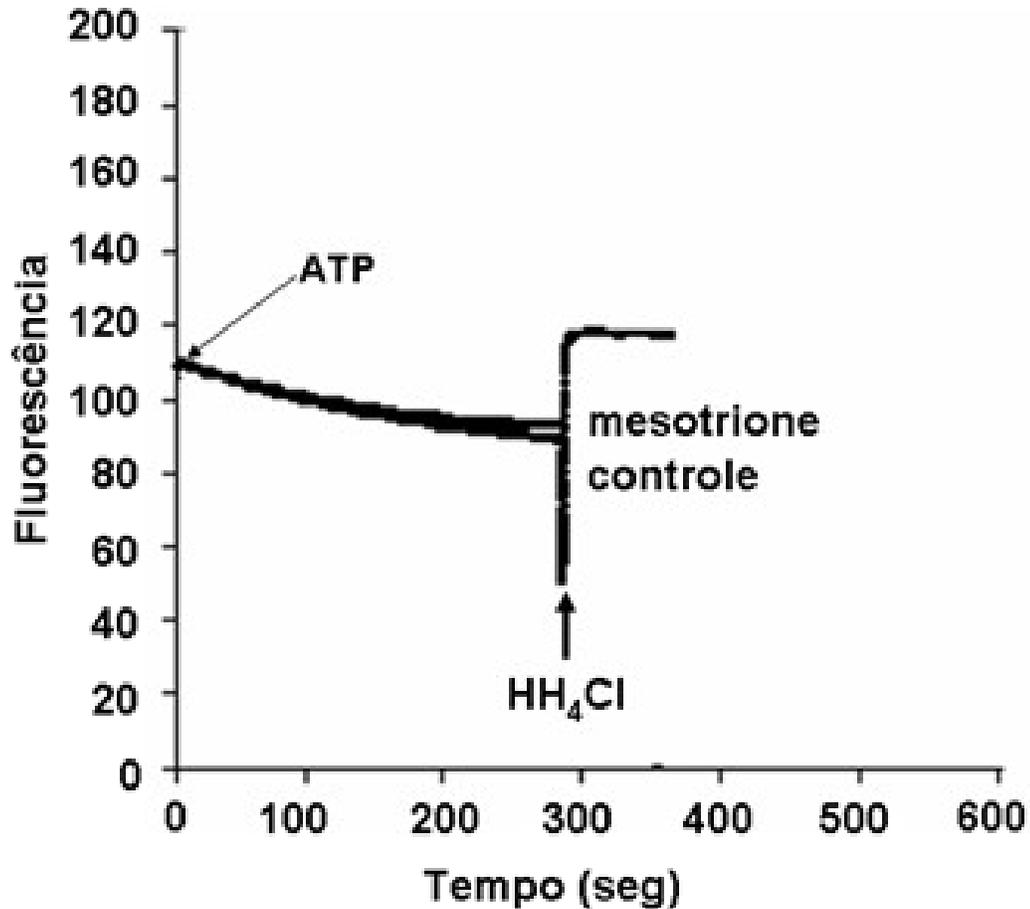


Figura 36: Formação do gradiente de prótons pela H^+ -ATPase de vesículas isoladas de caule de milho tratadas com e sem mesotrione aos 07 DAA. O meio de reação conteve 10 mM Mops-Tris (pH 7,0), 03 mM $MgCl_2$, 100 nM KCl, 02 μ M de ACMA e 50 μ g de proteína. A reação foi iniciada com adição de 01 mM de PPi a 30 °C. Após o declínio do gradiente de H^+ , o protonóforo NH_4Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência-base.

5.3.4. Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase no caule de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Segundo os resultados apresentados na Figura 37, a atividade ATPásica de membrana plasmática do caule aos 12 DAA foi menor no meio de reação sem vanadato quando submeteram-se as plantas ao mesotrione ($0,064 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) em comparação ao controle ($0,184 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Comportamento semelhante foi observado no meio de reação com o inibidor

vanadato, no qual a atividade com o herbicida foi de $0,033 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$, em relação ao tratamento sem herbicida que foi de $0,066 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

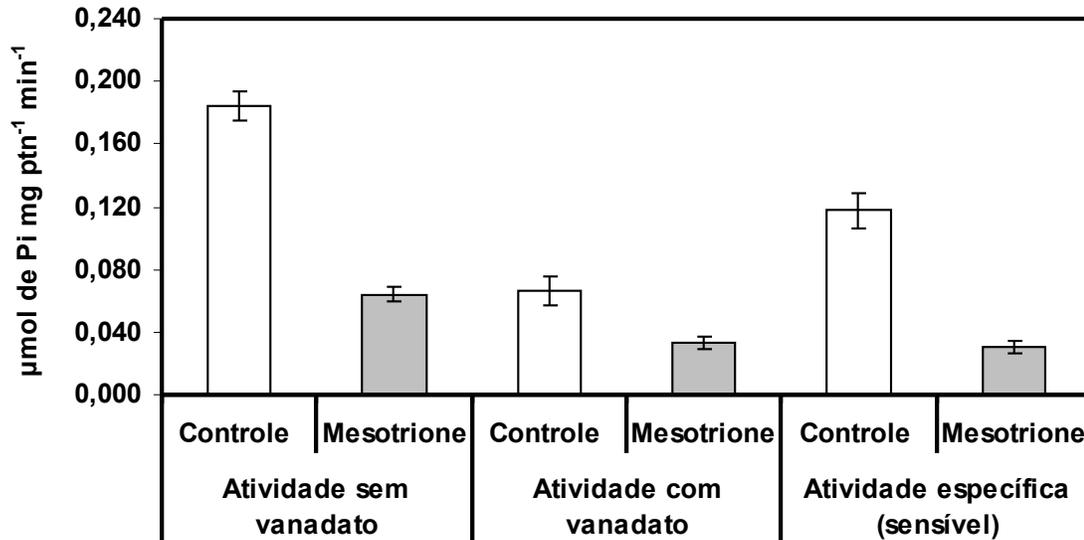


Figura 37: Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase em vesículas de membrana plasmática isoladas de caule de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha^{-1}) aos **12 DAA**. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação sem vanadato (inibidor), com vanadato e pela subtração destas obteve-se a atividade específica (sensível). Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$).

5.3.5. Atividade hidrolítica da H^+ -ATPase em raiz de milho aos 12 dias após aplicação (DAA) do mesotrione

Ao analisar a atividade ATPásica da membrana plasmática de raiz de milho, na época de três e sete DAA, não se constatou alteração no tratamento com mesotrione em relação ao controle (dados não apresentados).

Por outro lado, na Figura 38 deparou-se com a atividade ATPásica em vesículas isoladas de membrana plasmática de raiz aos 12 DAA. Observou-se que, no meio de reação sem vanadato, os tratamentos apresentaram atividade semelhante no mesotrione ($0,589 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e no controle ($0,500 \mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Também no meio de reação com vanadato (inibidor) os

tratamentos apresentaram praticamente valores semelhantes. Por fim, em relação à atividade específica (sensível) da H⁺-ATPásica, verificou-se que o tratamento com mesotrione apresentou atividade hidrolítica maior (0,390 $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$) do que o controle (0,296 $\mu\text{mol de Pi mg ptn}^{-1} \text{min}^{-1}$).

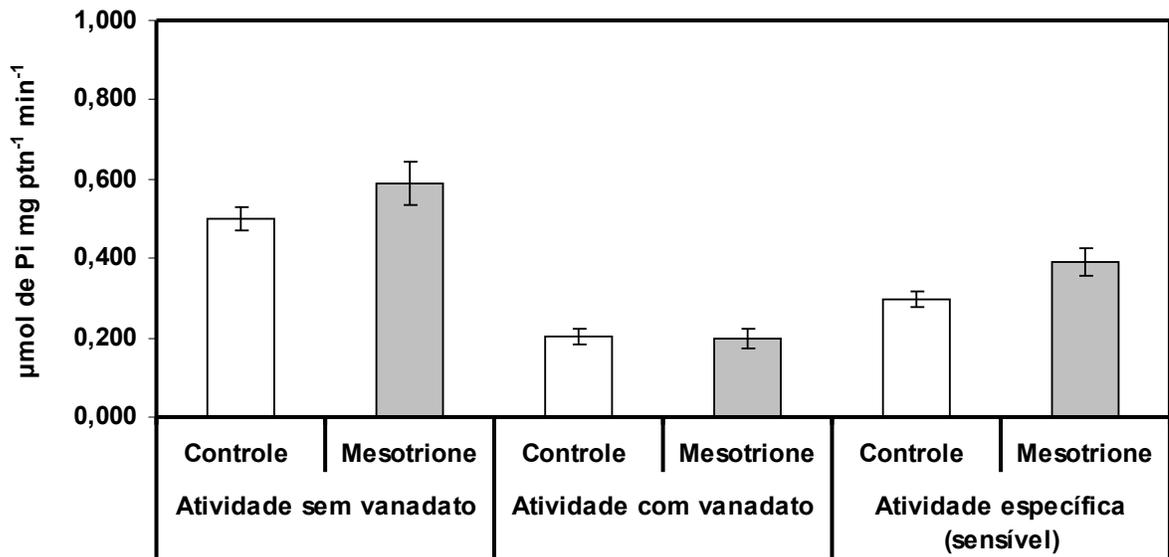


Figura 38: Atividade hidrolítica da H⁺-ATPase em vesículas de membrana plasmática isoladas de raiz de milho tratadas ou não com mesotrione (192 g ha⁻¹) aos 12 DAA. As atividades enzimáticas foram realizadas em meio de reação sem vanadato (inibidor), com vanadato e pela subtração destas obteve-se a atividade específica (sensível). Resultado expresso como média \pm desvio-padrão (n=4).

5.3.6. Estimulação da atividade hidrolítica da H⁺-ATPase em folha, caule e raiz de milho

Ao verificar a percentagem de estímulo das vesículas da H⁺-ATPase de membrana plasmática nos três tecidos analisados (Figura 39), constatou-se que esta bomba primária de prótons não foi afetada pelo mesotrione. Nesse sentido, não houve praticamente estímulo ou inibição da H⁺-ATPase da plasmalema de folha tratada com mesotrione nas três épocas analisadas.

Por outro lado, as vesículas de H⁺-ATPase do caule tratadas com o herbicida comportaram-se de maneira diferente em cada época avaliada, quando comparadas

ao controle (Figura 39). Assim, essa enzima apresentou estimulação com mesotrione de 64% aos três DAA. Por outro lado, nos períodos de sete e 12 DAA, ocorreu inibição no tratamento com mesotrione na ordem de 40 e 76%. No tecido de raiz de milho não houve estimulação da ATPásica com mesotrione nas duas primeiras épocas de avaliação (três e sete DAA), enquanto que, aos 12 DAA, esta enzima apresentou estimulação significativa de 32%.

De acordo com os resultados obtidos, a H^+ -ATPase do caule de milho foi a mais afetada nos três períodos avaliados, quando submetidas ao tratamento com mesotrione.

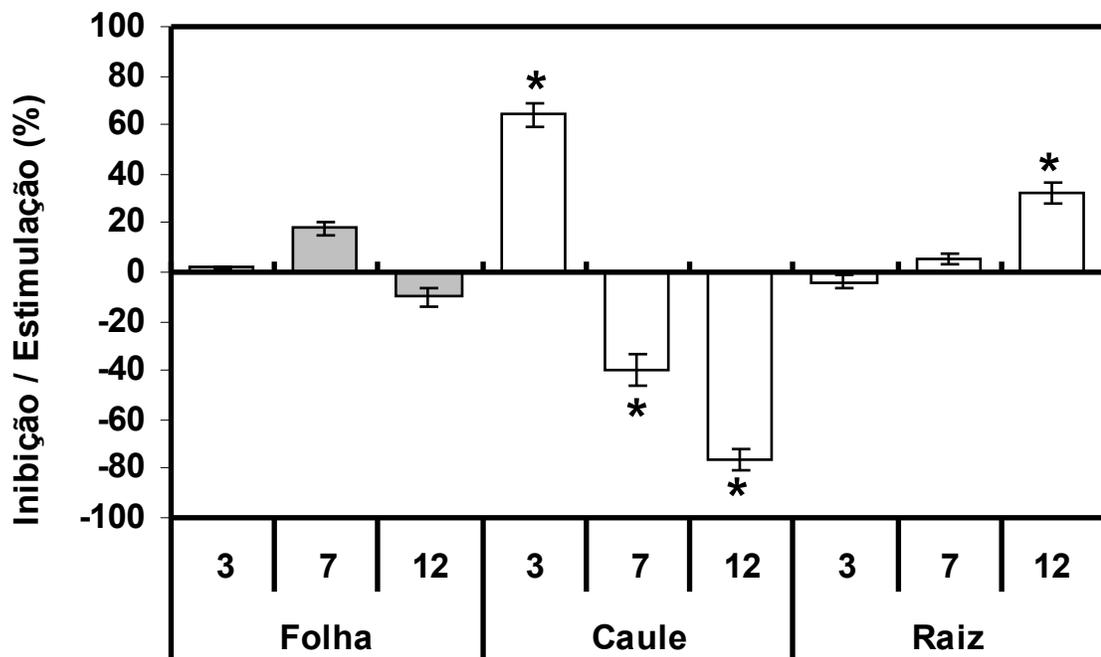


Figura 39: Percentagem de estimulação (+) ou inibição (-) em relação ao controle da atividade hidrolítica da H^+ -ATPase em vesículas isoladas de membrana plasmática de folha, caule e raiz de milho aos 03, 07 e 12 DAA do herbicida mesotrione. Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=4$). Os asterísticos (*) denotam estatisticamente significativos pelo teste F ($p < 0,05$) em relação ao controle e em cada tecido e época.

5.4. Fotossíntese

A taxa fotossintética em plantas de milho no tratamento com mesotrione foi reduzida quando comparada ao controle (Figura 40 A), principalmente nos primeiros cinco dias após aplicação do herbicida. Assim, o valor da taxa fotossintética no tratamento com mesotrione nas épocas 01, 02, 03 e 05 DAA foi reduzida em 78, 66, 75 e 25% respectivamente, em relação ao controle. Por outro lado, aos 07 DAA, os valores da fotossíntese nos dois tratamentos praticamente se igualaram, correspondendo a $8,95 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no controle, e a $8,26 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ no tratamento com mesotrione (Figura 40 A).

Já a condutância estomática foi menor nos três primeiros DAA do herbicida no tratamento com mesotrione, observando-se redução de 44%, 31% e 59%, respectivamente, nos estádios de 01, 02 e 03 DAA (Figura 40 B). Esta redução da condutância pode ter ocorrido devido ao fechamento do estômato, restringindo o influxo de CO_2 nas células do mesófilo. No entanto, os valores dos tratamentos aos 05 e 07 DAA foram praticamente iguais. Nesse sentido, os parâmetros de condutância podem ser utilizados como indicadores de danos de herbicida em plantas de milho.

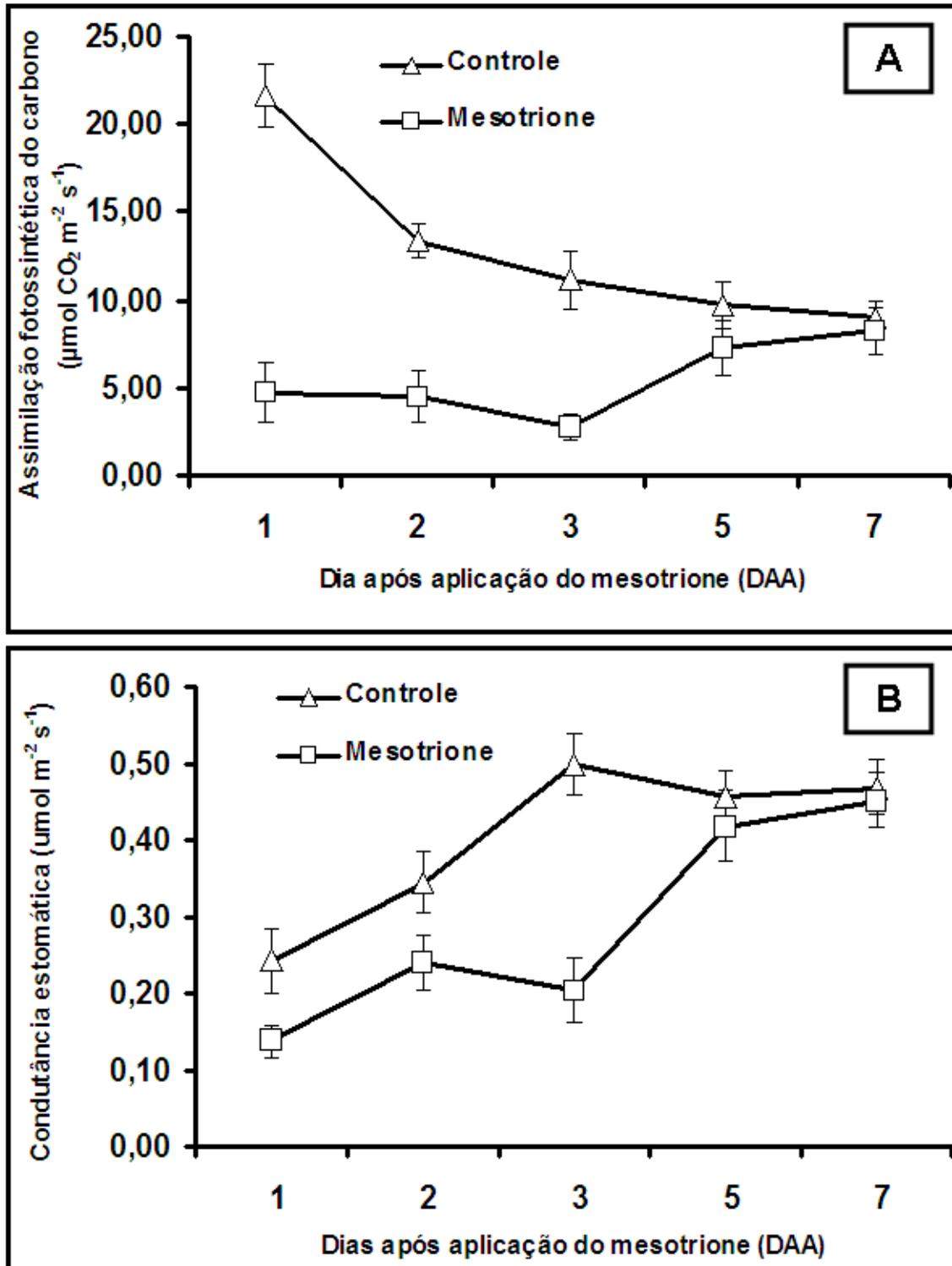


Figura 40: **A** - Taxa fotossintética e **B** – Condutância estomática em plantas de milho em 07 épocas de avaliação após a aplicação do herbicida mesotrione (192 g ha^{-1}). Resultado expresso como média \pm desvio-padrão ($n=5$).

5.5. Medição da fluorescência da clorofila *a*

Ao realizar a medição de fluorescência da clorofila *a* nas plantas de milho tratadas com e sem o mesotrione, por meio do aparelho PEA II (Hansatech Instruments Co. UK) constatou-se que o herbicida afetou o rendimento quântico máximo (F_v/F_m), *AREA* (área acima da curva da cinética de emissão da fluorescência), F_o e F_m . Bolhàr-Nordenkampf e Öquist (1993) descrevem que a ocorrência de alteração em alguns desses parâmetros de fluorescência pode indicar a ausência ou a presença de danos no processo fotossintético.

A razão entre as fluorescências variável e máxima - F_v/F_m - expressa a eficiência relativa de captura da energia de excitação pelos centros de reação abertos do FS II (Krause e Weis, 1991) que, segundo Haehnel et al. (1982), pode representar a eficiência quântica do transporte de elétrons por meio do FS II. Dessa forma, pode-se verificar, na Figura 41A, que houve diferença no valor de F_v/F_m no tratamento com mesotrione (0,308) a partir do primeiro (01) DAA em relação ao controle (0,643). Esta diferença se prolongou com menor diferença até aos 03 DAA do herbicida, porém, após os 05 e 07 DAA, não houve alteração entre os tratamentos. Portanto, aos 07 DAA, o valor de F_v/F_m no mesotrione foi de 0,739 e, na testemunha foi de 0,76 estando muito próximo da faixa ideal que pode variar segundo Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989), de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses.

A *AREA*, que significa valores acima da curva de fluorescência compreendida entre F_o e F_m , é proporcional à quantidade dos aceptores de elétrons aptos na captura de fótons. Por isso, a área da curva é drasticamente reduzida se a transferência dos centros de reação para o *pool* de plastoquinona for bloqueada (de Q_a para Q_b) por algum tipo de estresse como, por exemplo, os herbicidas, principalmente os inibidores do fotossistema II (Murata e Fork, 1975). Dessa forma, observa-se, na Figura 41B, que o tratamento com mesotrione afetou a *AREA* nas primeiras cinco avaliações em relação ao controle. Portanto, nos intervalos de 01, 02, 03 e 05 DAA do herbicida, o mesotrione reduziu a área em torno de 91%, 86%, 51% e 38% em comparação ao controle, respectivamente. Por isso, esta redução foi decrescendo com o passar dos dias analisados, nos quais 07 DAA não houve mais diferença entre os tratamentos (Figura 41B).

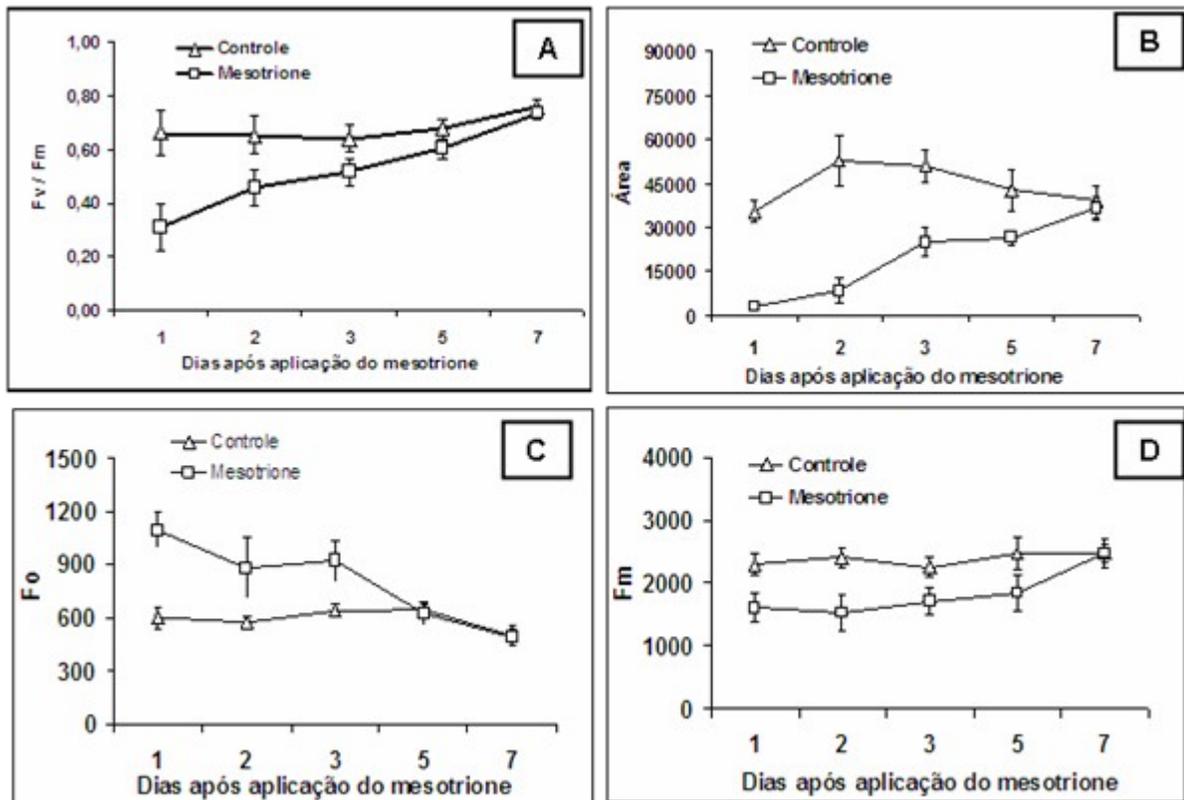


Figura 41: Valores médios dos parâmetros de fluorescência da clorofila **a** em folha de milho tratadas com e sem herbicida mesotrione (192 g ha^{-1}) em 05 épocas de medição. **A-** F_v/F_m , **B-** AREA (área acima da curva da cinética de emissão da fluorescência ou curva de Kautsky), **C-** F_0 , **D -** F_m . Resultado expresso como média \pm desvio-padrão (n=20).

A fluorescência inicial - F_0 - é definida por Van Kooten e Snel (1990) como a intensidade de fluorescência quando todos os centros de reação do fotossistema II (FS II) estão abertos e sem energia. Dessa forma, observa-se na Figura 41C, que os valores de F_0 , nos tratamento com e sem herbicida, comportaram-se de forma diferente nas três primeiras medições. Assim, nos períodos 01, 02 e 03 DAA, o tratamento com mesotrione reduziu os valores de F_0 em 82%, 53% e 44% em relação ao controle, respectivamente, sendo que após os 05 DAA não houve mais diferença entre os tratamentos. Os valores de F_0 a partir dos 05 DAA podem estar relacionados com a recuperação do aparato fotossintético da planta.

Admite-se que a fluorescência inicial é originada das moléculas de clorofilas do sistema antena do FS II, não ligadas aos centros de reação, e a energia de excitação gerada nesses pigmentos não é extinta pelos centros de reação abertos, o que pode elevar a intensidade de F_o (Krause e Weis, 1991).

A fluorescência máxima – F_m - é definida como a intensidade de fluorescência em que todos os centros de reação do FS II estão abertos, ou seja, a extinção fotoquímica é igual a zero, e todos os processos de extinção não-fotoquímica estão no mínimo (coeficiente de extinção não-fotoquímico igual a zero) (Van Kooten e Snel, 1990). Por isso, pode-se verificar que os valores de F_m , neste trabalho, apresentaram diferenças nos parâmetros obtidos do tratamento com mesotrione em relação ao controle, até o estágio de 05 DAA (Figura 41 D). Sendo assim, a partir dos 07 DAA, os valores do tratamento com mesotrione (2474) se aproximam do controle (2476). Para Bacarin e Mosquim (1998) a diminuição nos valores de F_m pode estar relacionada à redução nos teores de clorofila.

5.6. Crescimento das plantas de milho

Com relação à análise das variáveis biométricas como altura da planta, ganho da biomassa verde, biomassa seca da raiz e parte aérea na época aos 07 DAA, não foi constatada externamente indícios de diferença significativa entre os tratamentos no crescimento (Tabela 11).

Tabela 11: Valores médios para o crescimento das plantas de milho aos 07 dias após a aplicação do herbicida mesotrione (192 g ha^{-1})

Tratamentos	Altura	Massa verde da	Massa seca	Massa seca da
	(cm)	parte aérea (g)	da raiz (g)	parte aérea (g)
Controle	62,12 a	36,67 a	5,99 a	3,93 a
Mesotrione	62,80 a	35,90 a	5,78 a	3,87 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na época, aos três DAA do herbicida, foram observados sintomas de intoxicação nas plantas de milho com mesotrione, principalmente na 3ª e na 4ª

folhas, cujos sintomas aumentaram progressivamente até o período de 05 DAA (Figura 42). Contudo, tais sintomas foram diminuindo após este período, restando pouca evidência de intoxicação aos 12 DAA (Figura 43). As folhas que surgiram após a aplicação do herbicida não apresentavam sintomas de intoxicação.

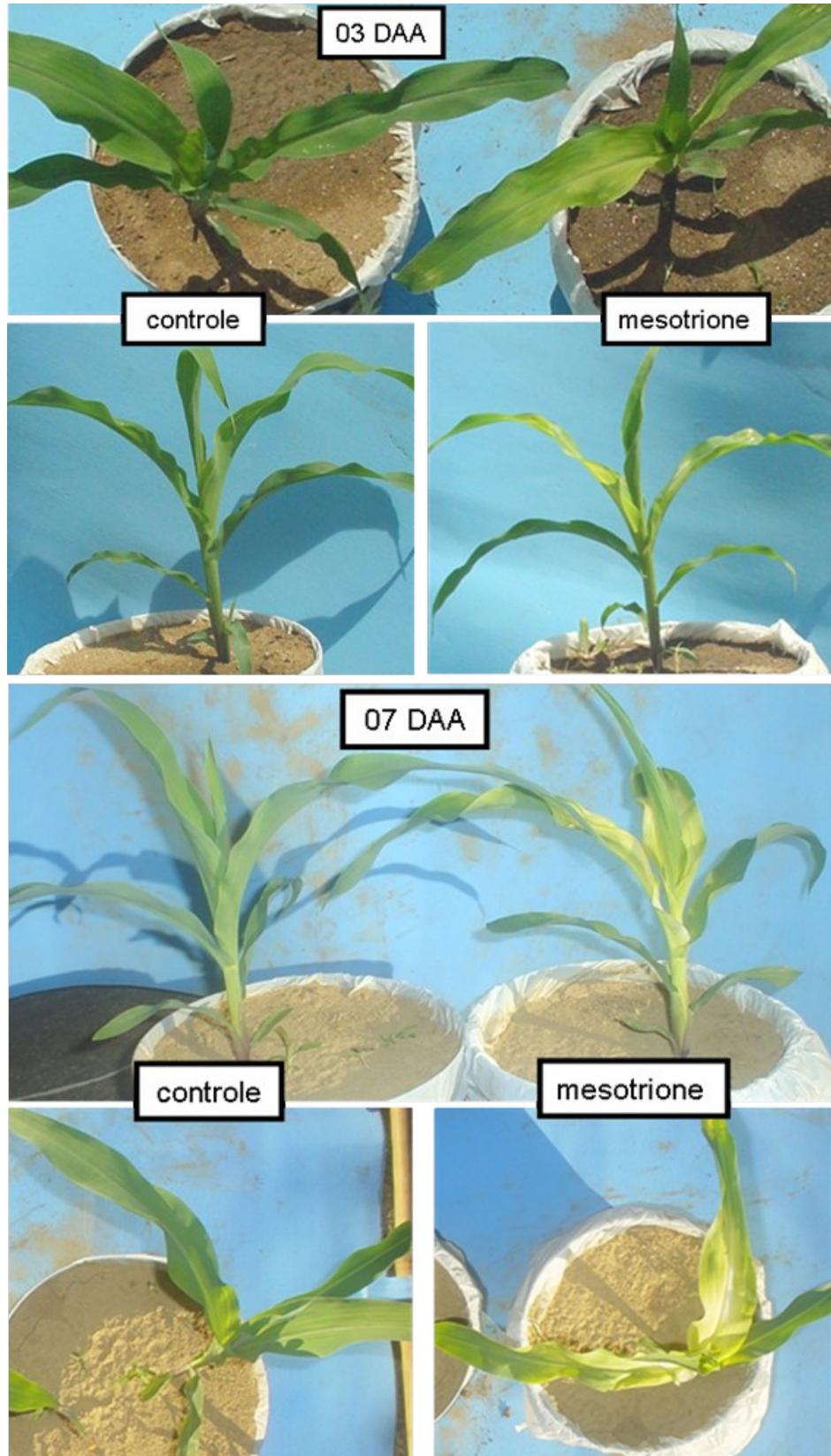


Figura 42: Sintomas visuais de intoxicação por mesotrione em plantas de milho, aos 03 e 07 DAA. **A** – Controle; **B** – Herbicida mesotrione (192 g ha^{-1}).

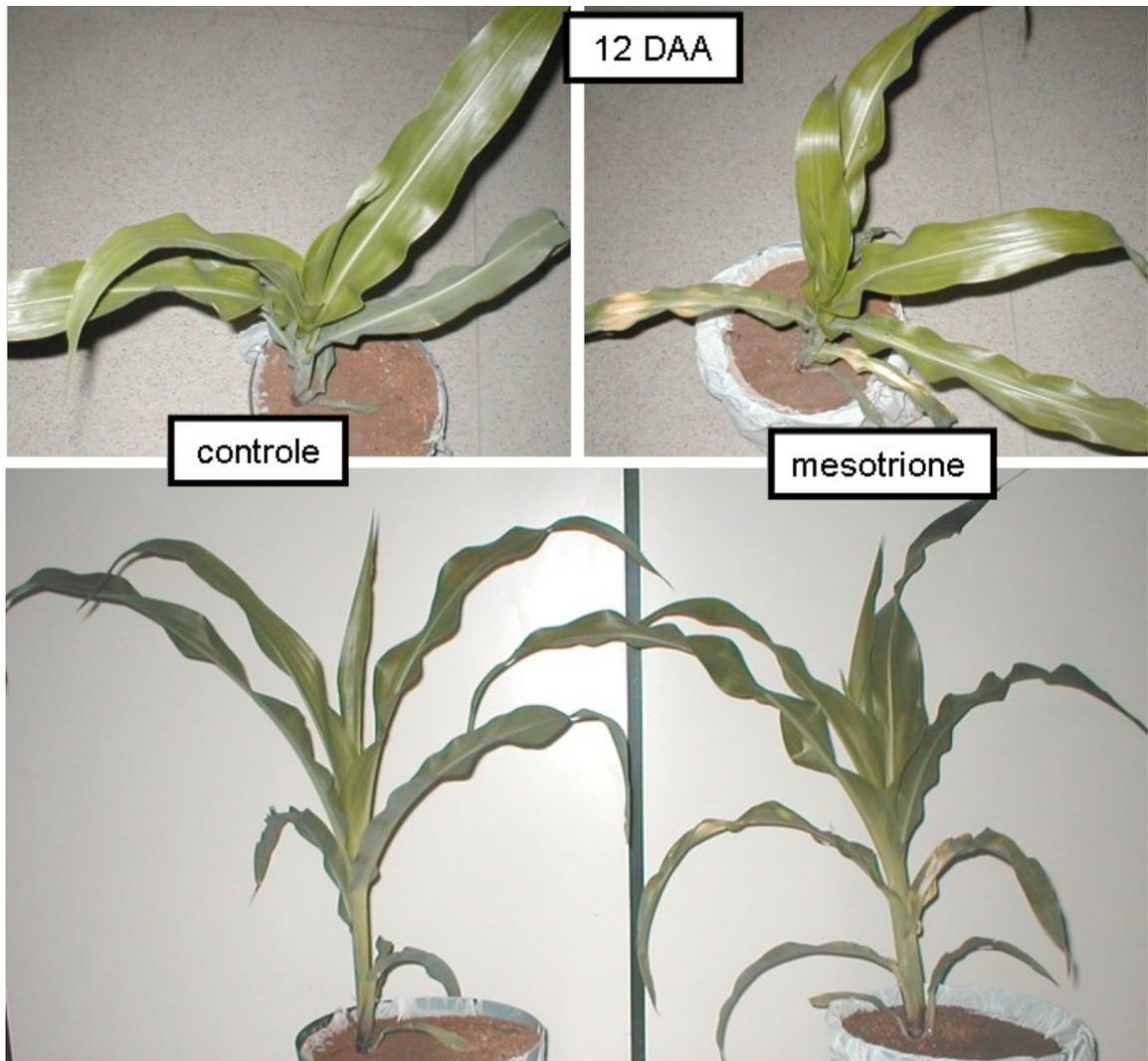


Figura 43: Sintomas visuais de intoxicação por mesotrione em plantas de milho, aos 12 DAA. **A** – controle; **B** – herbicida mesotrione (192 g ha^{-1}).

5.7. Leituras do clorofilômetro (SPAD) em folhas de milho

O Índice Relativo de Clorofila (IRC) obtido pelo equipamento SPAD no tratamento com mesotrione indicou efeito significativo em todas as épocas analisadas (Figura 44). O mesotrione afetou o teor de clorofila nas folhas de milho nas 07 épocas analisadas. Este método, acompanhado de outras técnicas, pode ser utilizado como ferramenta importante em plantas submetidas a herbicidas para averiguação do teor relativo de clorofila na folha.

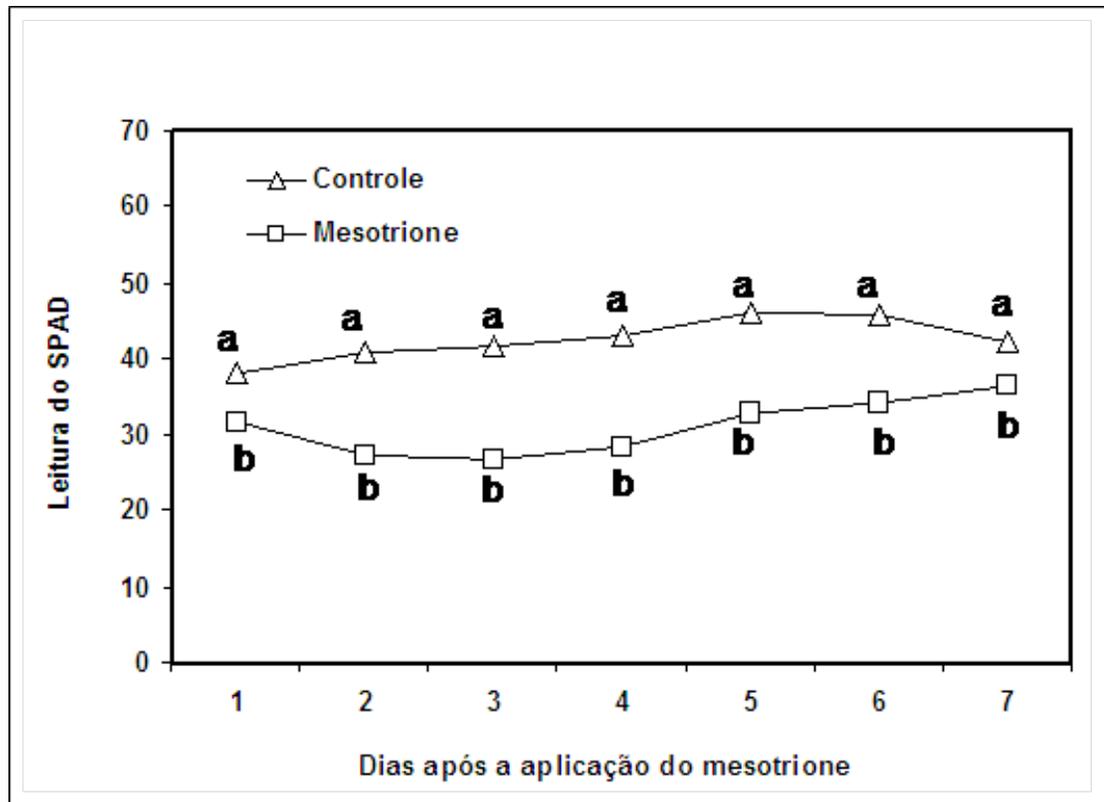


Figura 44: Leituras do SPAD em folhas de milho sem e com tratamento de herbicida mesotrione (192 g ha^{-1}) em 07 épocas diferente. Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade ($n=25$).

5.8. Teor de nutriente nas folhas de milho

Os resultados do teor de nutrientes obtidos no presente estudo indicam que o herbicida mesotrione não afetou esse parâmetro nas terceira e quarta folhas do milho em relação ao controle, aos 07 DAA (Tabela 12). Nesse sentido, dentre os teores ideais de nutrientes encontrados nas folhas do milho, apenas o Mg está deficiente nos dois tratamentos, estando o restante na faixa ideal para a cultura do milho (Martinez et al., 1999).

Tabela 12: Teor de nutriente em folha de milho aos Sete DAA do herbicida mesotrione (192 g ha⁻¹)

	Macronutriente - g kg ⁻¹					Micronutriente - mg kg ⁻¹			
	N	P	K	Ca	Mg	Mn	Fe	Zn	Cu
Controle	40,496	3,685	29,7	7,14	1,68	111,3	199,3	36,24	9,14
Mesotrione	40,272	3,916	32,9	7,26	1,60	104,4	203,3	33,88	8,84

N – nitrogênio; P – fósforo; K - potássio; Ca – cálcio; Mg – magnésio; Mn – manganês; Fe – ferro; Zn – zinco; Cu – cobre. Todos os valores médios na coluna não foram significativos pelo teste F ao nível de 5% de probabilidade (n=10).

6. DISCUSSÃO

O controle químico das plantas daninhas tem sido o método mais utilizado na agricultura brasileira, apresentando vantagens em relação aos outros métodos, principalmente, na redução de mão-de-obra e rapidez na aplicação. O mesotrione é um herbicida recentemente lançado no mercado (MAPA - Diário oficial da união, 2003) e, vem sendo utilizado na cultura do milho como herbicida seletivo no controle em pré e em pós-emergência das plantas daninhas dicotiledôneas e, também, de muitas monocotiledôneas (Rodrigues e Almeida, 2006).

Tem sido postulado que o mesotrione atua inibindo a enzima *p-hidroxifenilpiruvato dioxigenase* (HPPD, EC1.13.11.27) em plantas, a qual manifesta efeito tóxico (Norris et al., 1998; Pallet et al., 1998). Em plantas tolerantes, como é o caso do milho, devem existir sistemas bioquímicos que promovam a eliminação do herbicida (Bartlett e Hall, 2000; Kreuz et al., 1996; Cole, 1994). Entretanto, algumas variedades parecem ser mais sensíveis, pois apresentam sintomas de intoxicação que começam a aparecer a partir do terceiro dia após a aplicação (Masiunas et al., 2004), o que foi observado neste trabalho (Figura 42). Nos primeiros dias após aplicação, o mesotrione promoveu leve sintoma de clorose e branqueamento na terceira e quarta folhas do milho (híbrido Braskalb 330), as quais estavam mais desenvolvidas no momento da aplicação (Figura 42). Este sintoma pode ser atribuído à molécula do herbicida no citoplasma, de modo que, o aparato bioquímico da planta não realizou a desativação de todo mesotrione (Masiunas et al., 2004; Norris et al., 1998), porém, a partir dos 07 DAA as plantas de milho apresentavam sinais de desintoxicação (Figura 43). Foi observado também que as folhas novas que surgiram após a aplicação do herbicida não apresentavam sintomas de intoxicação, mesmo sendo o mesotrione de ação sistêmica na planta (Mitchell et al., 2001), possivelmente as moléculas deste herbicida não foram translocadas para os tecidos em desenvolvimento.

A absorção foliar de herbicida é um processo complexo, envolvendo a passagem das moléculas da superfície externa da folha, através da cutícula, para o

interior da célula (Figura 45). Essa passagem para o interior da folha é também, função da natureza química e física da cutícula, da característica e concentração do produto, da formulação do ingrediente ativo e do ambiente em que as folhas se desenvolvem (Devine et al., 1993).

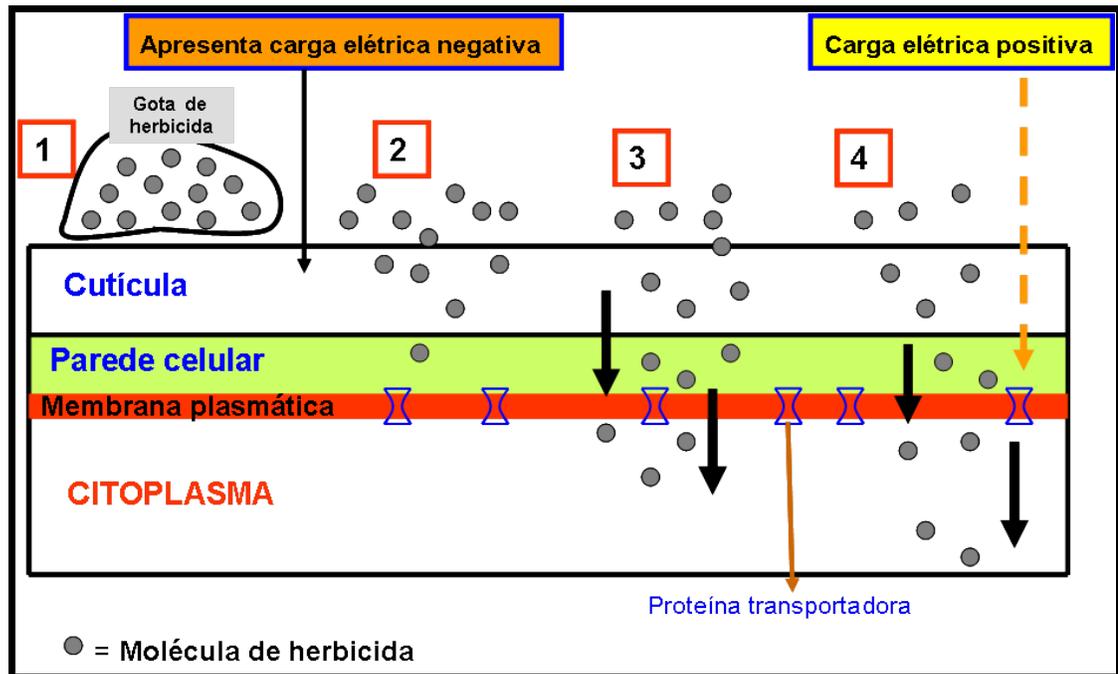


Figura 45: Esquema representativo da translocação das moléculas de herbicida através da superfície de folha até a cutícula e parede celular, por diferença de gradiente de concentração. (Fonte: Adaptado de Merotto e Fischer, 2004).

A hipótese inicialmente proposta sobre a possível participação dos transportadores primários de prótons, na desintoxicação do mesotrione, em plantas de milho, pode ser confirmada pelos resultados apresentados. A abordagem científica utilizada para comprovar os resultados descreve as épocas de maior desintoxicação do herbicida e a estimulação das enzimas.

Vale ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura relacionando o comportamento desses transportadores na desintoxicação de herbicidas nas plantas. Dessa maneira, é interessante frisar a importância de se estudar as bombas primárias de prótons, como uma ferramenta simples e rápida para testar a eficiência de herbicidas em determinada espécie de planta de interesse econômico, podendo ser estudado em células *in vitro* (Cole, 1994). Para auxiliar também os estudos das

bombas primárias de prótons, com herbicidas, é importante correlacionar com o aparelho fotossintético, a fim de conhecer melhor os possíveis danos que os herbicidas possam provocar nas plantas tratadas.

A molécula do mesotrione, ao atravessar a membrana plasmática da planta, pode interferir no metabolismo ou ser desativada e/ou eliminada do citoplasma. Provavelmente a translocação das moléculas para o interior da célula é realizada por transportadores secundários, mediante a formação de um gradiente eletroquímico gerado pelas bombas primárias de prótons - H^+ -ATPase tipo P- (Bressan et al., 1998; Hull e Cobb, 1998). Possivelmente, pelos resultados obtidos neste trabalho, as bombas primárias de prótons de membrana plasmática e de tonoplasto das plantas de milho tiveram participação na tolerância ao mesotrione.

Os resultados indicam que a H^+ -ATPase do tipo P pode ter sofrido uma modulada diferencial (ativação e inibição), na atividade hidrolítica nos diferentes tecidos e épocas analisados. Possivelmente esta enzima atuou reduzindo as condições de entrada do herbicida para o interior da célula nos tecidos analisados. A H^+ -ATPase realiza a hidrólise da ATP (gerando ADP e P_i) e o transporte de prótons para o apoplasto, que vai desencadear uma diferença de pH e um potencial elétrico através da membrana plasmática (Morsomme e Boutry, 2000). Ou seja, o papel principal da H^+ -ATPase de membrana plasmática é ativar o sistema de transporte secundário, que vai desencadear a absorção de nutriente mineral, compostos orgânicos (açúcares, aminoácidos) e muitas classes herbicidas para o interior da célula (Logan et al., 1997). Por outro lado, Tomlin, (1997) relata que as moléculas de herbicidas que são altamente lipossolúveis podem afetar significativamente a organização da membrana plasmática como barreira, desencadeando a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons e levando a morte da célula.

É postulado que as folhas de milho tenham sido a principal rota de entrada do herbicida mesotrione, em relação ao caule e à raiz, observada neste trabalho, pelos dados da atividade hidrolítica das bombas primárias de prótons e, também pelo desempenho fotossintético. Nos primeiros três DAA o mesotrione prejudicou o aparelho fotossintético das plantas de milho (Figura 40 e 41), e também o teor de clorofila até os sete DAA (Figura 44). Isto possivelmente deve ter danificado a plastoquinona do esquema em Z da fotossíntese e a formação do potencial

eletroquímico entre o estroma e o lume da membrana do tilacóide. Este potencial é responsável pela produção de ATP, podendo ter ocasionado a redução desta molécula energética para a H⁺-ATPase do tipo P e V. Isso indica uma das prováveis conseqüências da baixa participação, principalmente, da V-ATPase (Figura 32) aos três DAA, na compartimentalização do mesotrione no vacúolo, em relação a H⁺-PPase, que foi estimulada em 568% em relação ao controle na folha (Figura 27). Os locais mais prováveis para a acumulação ou compartimentalização das substâncias potencialmente tóxicas da célula é o interior do vacúolo e/ou o apoplasto (Bressan et al., 1998; Serrano, 1996), sendo possivelmente o caminho seguido pelo mesotrione no milho.

A estimulação da H⁺-PPase aos três DAA, provavelmente, gerou um gradiente eletroquímico, energizando os transportadores secundários, que promoveram a remoção do herbicida para o interior do vacúolo impedindo a morte da célula. Os resultados aqui obtidos são corroborados por Bartholomew et al. (2002), que descreveram que os herbicidas sulfonilureias são translocados para o interior do vacúolo, por meio de um gradiente eletroquímico gerado pelas bombas de prótons. Também, Mornet et al. (1997) relataram que o herbicida paraquat pode ser removido para o interior do vacúolo por transportadores secundários de aminoácidos.

A ativação da pirofosfatase de tonoplasto pelo herbicida aos três DAA na folha, pode estar relacionada à maior quantidade de PPI produzido neste tecido. Nos vegetais o PPI é considerado um substrato alternativo ao ATP, podendo ativar o metabolismo energético em condições de estresse, quando ocorre a redução dos níveis de ATP no citoplasma (Stitt, 1998). O ATP na planta é produzido por meio da glicólise, fosforilação oxidativa e fotossíntese (Nakanishi e Maeshima, 1998), sendo que a taxa fotossintética e a fluorescência da clorofila *a* foram muito afetadas pelo mesotrione até aos cinco DAA, com recuperação após este período (Figura 40 e 41).

Por isso, uma grande quantidade do PPI produzida pela planta, durante biossíntese, pode ser utilizada para aumentar a eficiência energética de vários processos citológicos (Plaxton, 1996), como, por exemplo, a desintoxicação de moléculas de herbicidas pelas H⁺-PPase. Logo, em tecidos de crescimento são sintetizados RNAs, proteínas e celulose para a construção de células e, como resultado, quantidades elevadas de PPI são produzidas, como subproduto destes

processos metabólicos. O PPI acumulado em altas concentrações no citoplasma é tóxico à célula. Com isso, a H⁺-PPase é um dos sistemas que consome PPI do citoplasma, utilizado como fonte de energia para o transporte ativo de prótons (Maeshima, 2000; Shiratake et al., 1997). Já o fosfato (Pi) gerado pelas bombas primárias de prótons, é utilizado como macronutriente essencial na planta, sendo utilizado no processo metabólico, principalmente como substrato em muitas reações de catálise da fotossíntese e respiração (Raghothama, 1999).

O elevado estímulo da H⁺-PPase aos três DAA também pode ter ocorrido pelo aumento da atividade catalítica ou superexpressão de genes que codificam a H⁺-PPase do tonoplasto, necessitando de futuros trabalhos para evidenciar imunologicamente a maior presença desta enzima em vesículas isoladas de tonoplasto, tratadas com mesotrione. Para Carystinos et al. (1995), o aumento da atividade hidrolítica possivelmente, é devido ao incremento da H⁺-PPase de tonoplasto e/ou aumento da hidrólise de PPI. A regulação da expressão desta enzima é simples de ocorrer porque apresenta peso molecular de aproximadamente 80 kDa, e é constituída por um único polipeptídeo, sendo facilmente sintetizada pela célula (Schumacher, 2006). Ao contrário da V-ATPase, que possui peso molecular em torno de 750 kDa, apresentando até 10 multisubunidades de acordo com a espécie de planta, destacando-se dentre as enzimas mais complexas encontradas na natureza (Maeshima, 2001).

A atividade da H⁺-PPase aos três e sete DAA em folhas de milho foi influenciada com a adição de potássio no meio de reação nos tratamentos (Figura 14 e 15), e verificou-se maior ativação desta enzima com mesotrione, quando o potássio foi incluído no meio de reação. Por outro lado, sem o potássio, não houve diferença entre os tratamentos. Desta forma, o mesotrione estimulou a PPásica no meio de reação com potássio-dependente (Figura 15 e 16). Nesse sentido pode-se verificar a importância do K⁺ na estimulação da H⁺-PPase no tratamento com mesotrione. Segundo Mimura et al. (2005) e Davis et al. (1992), a atividade PPásica é estimulada na presença de K⁺ no citoplasma.

Foi postulado também o envolvimento do mesotrione na estimulação da atividade hidrolítica das bombas primárias de prótons. Porém, em ensaios prévios realizados em meio de reação *in vitro* com vesículas de tonoplasto de caule, com

mesotrione, não foi constatada mudança na atividade hidrolítica da PPásica e da V-ATPásica nas concentrações até 0,8 mM de herbicida (Figura 46 A e B). Entretanto, a H⁺-ATPase de membrana plasmática de raiz foi altamente afetada, à medida que a concentração do herbicida aumentava (Figura 46 C), e em folha, também foi afetada até 0,2 mM de mesotrione (Figura 46 D). Como não foram realizadas hidrólise *in vitro* no restante dos outros tecidos, pôde-se extrapolar o mesmo efeito de inibição possivelmente, para a H⁺-ATPase do caule, pois esta enzima pode ter isoformas praticamente idênticas nos diferentes tecidos da mesma espécie (Alexandersson et al., 2004).

Nesses dados *in vitro* em membrana plasmática realizados ao extrapolar para o caule com mesotrione, pôde-se exemplificar melhor os resultados da Figura 39, onde a célula modulou ou reduziu a atividade da ATPásica aos sete e 12 DAA, provavelmente para não ser danificada por altas concentrações de herbicida. Isso leva a sugerir que a H⁺-ATPase do tipo P reduz ao máximo a atividade hidrolítica, à medida que o sistema celular se depara com o aumento da concentração do mesotrione, podendo ser uma estratégia da célula para sobreviver (Figura 47). Por isso, novas pesquisas devem ser realizadas nesse sentido, com o princípio ativo puro do mesotrione e não somente com o produto comercial, para certificar de possíveis alterações das bombas primárias de prótons de membrana plasmática e vacuolar.

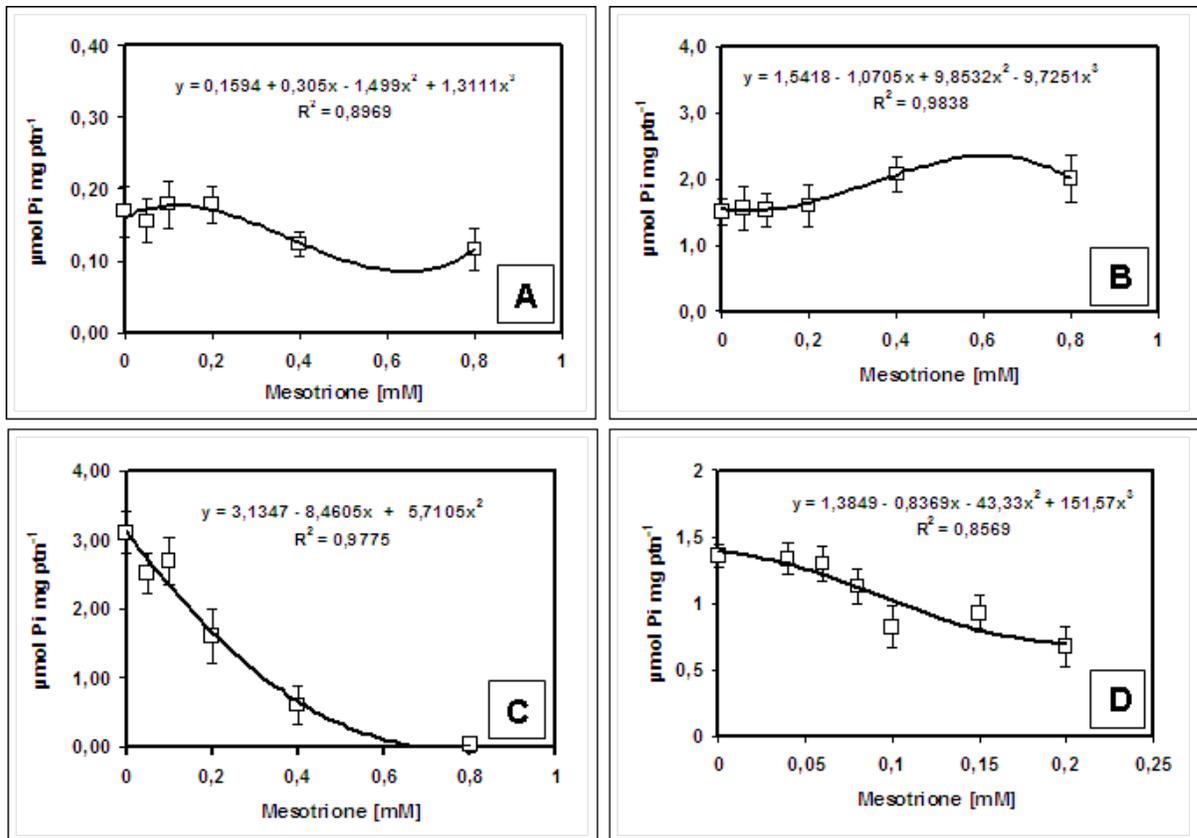


Figura 46: Atividade hidrolítica das bombas primárias de prótons *in vitro* com mesotrione. **A** - V-ATPase de tonoplasto de **Caule**; **B** - H⁺-PPase de tonoplasto de **Caule**; **C** - H⁺-ATPase de membrana plasmática de **Raiz** e **D** - H⁺-ATPase de membrana plasmática de **Folha**. Resultado expresso como média ± desvio-padrão (n=3).

A atividade hidrolítica das bombas de prótons que foram afetadas nos tecidos do caule, quando tratados com mesotrione, foram a H⁺-PPase e a H⁺-ATPase do tipo P. A H⁺-ATPase do caule apresentou uma modulação diferencial no tratamento com mesotrione nas três épocas. Aos três DAA o herbicida promoveu estimulação em torno de 64%. Postula-se que a concentração do mesotrione nesse tecido era baixa até este período, provocando leve ativação. Como foi discutida anteriormente, a H⁺-ATPase de vesícula de membrana plasmática *in vitro* com mesotrione em baixas concentrações (0,06 mM) não é inibida (Figura 46 D). À medida que se aumentava a concentração do herbicida no meio de reação, concomitantemente incrementava a inibição da ATPásica (0,6 mM), o que não foi constatado com a V-ATPase e H⁺-

PPase de tonoplasto, que praticamente não foram inibidas até a concentração de 0,8 mM de mesotrione (Figura 46 D).

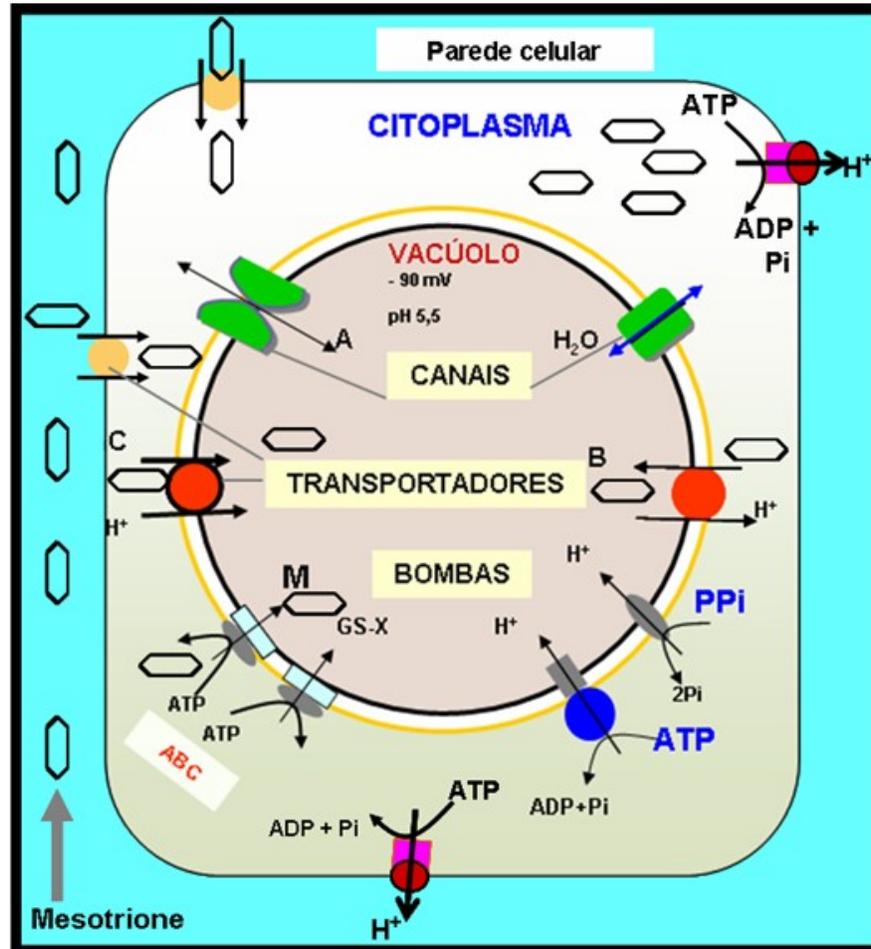


Figura 47: Esquema representativo do transporte (primário e secundário) de membrana plasmática e de tonoplasto que translocam moléculas do mesotrione para o citoplasma e a eliminação para o vacúolo. (Fonte: adaptado de Marty, 1999).

A H^+ -ATPase do caule pode ter apresentado certa habilidade ao deparar com possível aumento na quantidade de herbicida no interior da célula, o que, possivelmente, reduziu a atividade hidrolítica, para não comprometer a sobrevivência da planta. Essa inibição de 40% e 76% aos sete e 12 DAA (Figura 39) em relação ao controle, possivelmente gerou condições para reduzir ao máximo a entrada de herbicida para o interior do citoplasma. Este fato ocorreu provavelmente, porque com o passar dos dias, após a aplicação do herbicida, as moléculas foram sendo translocadas das folhas, por meio das gotas de água, até o caule (Figura 48). Postula-se, com o passar dos dias após a aplicação do herbicida, ter ocorrido

elevada concentração do mesotrione neste tecido. Com isso, o caule deve ter recebido elevada concentração de herbicida, o que fez com que a célula reduzisse ao máximo a atividade hidrolítica da H^+ -ATPase, gerando baixo gradiente eletroquímico e, conseqüentemente, proporcionando pouca translocação do herbicida para o interior da célula (Figura 47). Por outro lado também, muitas moléculas de mesotrione podem ter sido hidrolisadas e conjugadas no apoplasto, promovendo a inativação ou desativação, como foi sugerido por Jacobson e Shimamabukuro, (1984) em planta de aveia resistente ao herbicida diclofop-methyl.

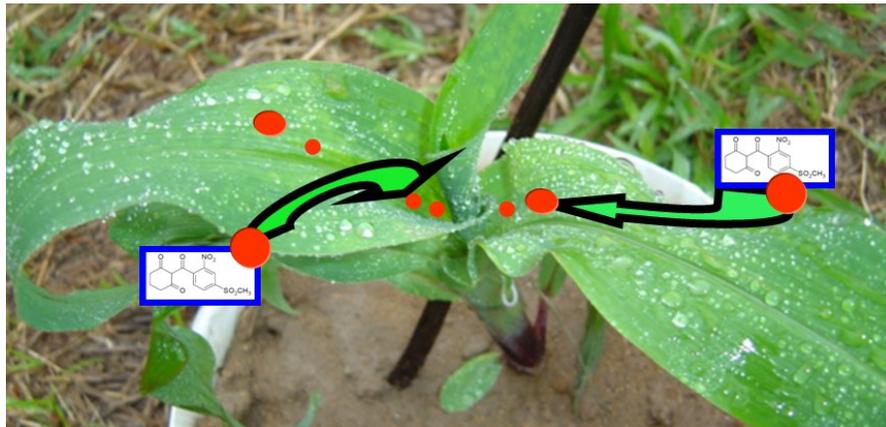


Figura 48: Esquema representativo da possibilidade das moléculas do mesotrione serem translocadas da superfície da folha para o tecido do caule.

O caule, além de ter sido atingido pelo herbicida no momento da aplicação, possivelmente pode ter sido contaminado pela translocação do mesotrione da folha, para o caule, por meio de vasos do floema (Figura 49). Segundo Delétage-Grandon et al. (2001), em regra geral, a mobilidade de herbicida no floema está relacionada com a sua propriedade físico-química e com os parâmetros das plantas, especialmente a velocidade e o pH da seiva no floema. A seiva é, preferencialmente, translocada das áreas de produção (fontes), para as áreas do metabolismo ou armazenamento -drenos - (Taiz e Zeiger, 2004).

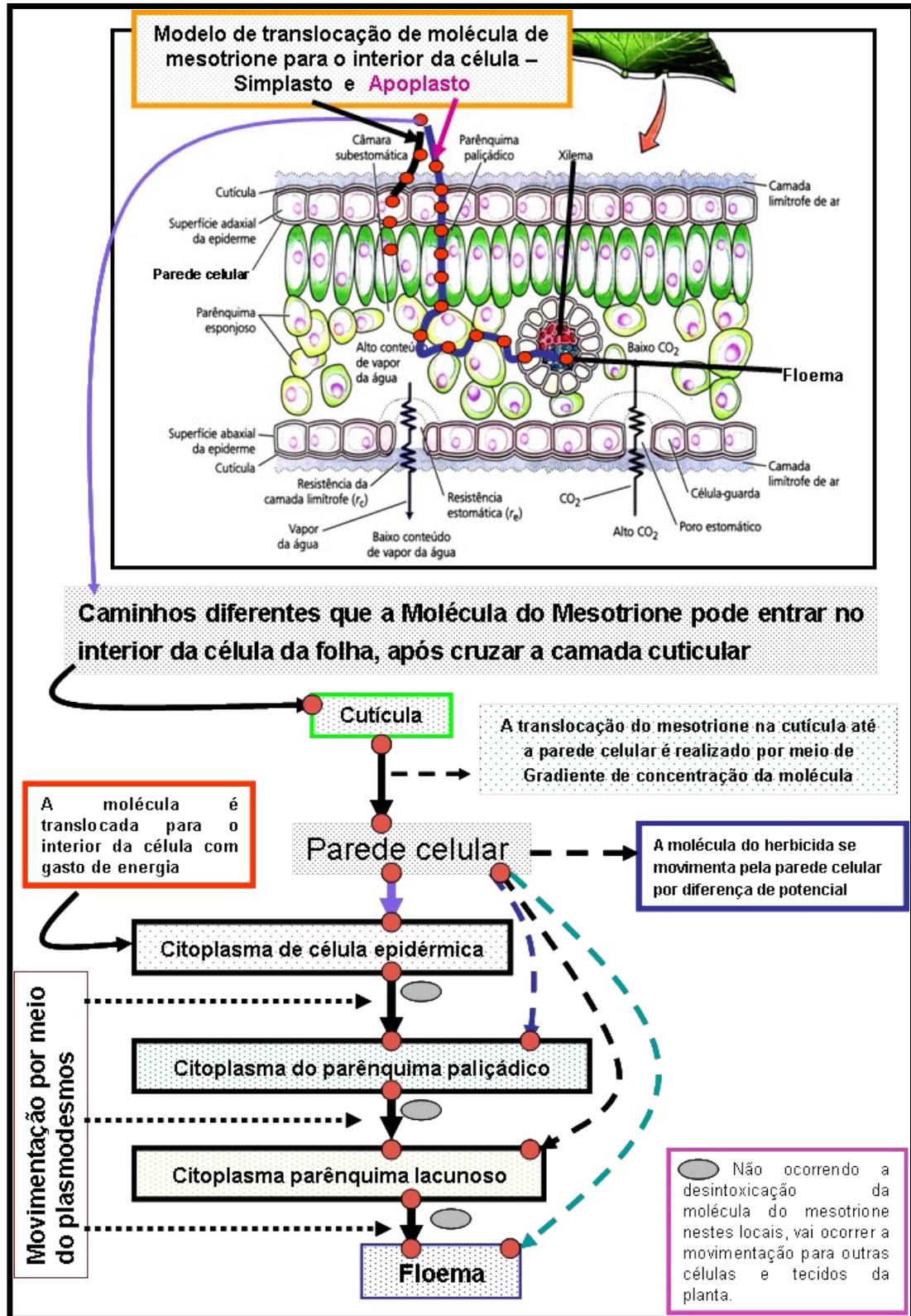


Figura 48: Esquema representativo mostrando as várias possibilidades como a molécula do herbicida mesotrione se movimenta para o interior da célula de folha, e possivelmente para o floema. (Fonte: adaptado de Taiz e Zeiger, 2004).

Shimabukuro e Hoffer, (1992) evidenciaram que o herbicida diclofop-methyl, utilizado no controle de algumas plantas monocotiledôneas, atua especificamente nestas espécies, por meio do aumento da permeabilidade de prótons na membrana plasmática, mas não age diretamente na H⁺-ATPase. Este herbicida também pode interagir com a membrana ou com os componentes de membrana (Ratterman e Balke, 1989) e, possivelmente, nas proteínas receptoras da membrana extracelular, provavelmente uma glicoproteína que desencadeia a disrupção do potencial eletroquímico da plasmalema (Wright, 1994; Shimabukuro e Hoffer, 1992). Por outro lado, DiTomaso et al. (1993) sugerem que o herbicida diclofop age como um ionóforo específico no transporte de prótons, através da membrana, o qual desencadeia a dissipação do gradiente de H⁺ danificando a integridade de membrana e o movimento livre de íons.

As moléculas de mesotrione translocadas para o interior da célula do caule, possivelmente eram imediatamente compartimentalizadas no vacúolo, por meio das bombas H⁺-PPase. Esta enzima apresentou estimulação de 191%, 144% e 110% aos 03, 07 e 12 DAA (Figura 27). Assim, os resultados de ativação das bombas H⁺-PPase e a modulação da H⁺-ATPase do tipo P, pelo mesotrione, reforçam a hipótese de que este tecido possivelmente participou na redução da entrada e no seqüestro do mesotrione.

Já a V-ATPase de folha aos sete DAA apresentou leve estimulação (57%) no tratamento com mesotrione (Figura 32), associada à formação do gradiente eletroquímico de prótons, verificado por meio do monitoramento do transporte de H⁺ (Tabela 07). Esta enzima possivelmente teve alguma participação na desintoxicação da molécula de herbicida e/ou na recuperação de outros processos celulares prejudicados pelo mesotrione.

A raiz do milho foi o tecido que, provavelmente, recebeu a menor quantidade do herbicida no momento da aplicação. Mesmo assim, as raízes podem ter absorvido pequena quantidade do herbicida, pois o vaso onde a planta cresceu não foi protegido no momento da aplicação, e conseqüentemente, o solo foi contaminado com o mesotrione. Logo, as raízes das plantas provavelmente absorveram moléculas de herbicida com o transcorrer dos dias após aplicação.

A atividade da H⁺-ATPase do tipo P de raiz de milho, no tratamento com mesotrione, apresentou atividade idêntica ao controle aos três e sete DAA, e estimulação em torno de 32% aos 12 DAA (Figura 39).

A H⁺-PPase de raiz foi estimulada em 114% e 67% aos três e sete DAA respectivamente (Figura 27), indicando a participação desta enzima na desintoxicação do mesotrione. Por outro lado, a atividade hidrolítica da V-ATPase no tratamento com mesotrione foi praticamente idêntica ao controle aos três DAA (Figura 32). Logo, aos sete DAA apresentou estimulação de 67% no tratamento com mesotrione, em relação ao controle (Figura 32), com possível contribuição na desintoxicação do mesotrione.

As plantas de milho no período aos 12 DAA, no tratamento com mesotrione, não apresentaram praticamente sintomas de intoxicação e o crescimento foi semelhante ao controle (Figura 43). Assim, a atividade PPásica da folha nesta época apresentou leve inibição com mesotrione (Figura 27). Por outro lado, a V-ATPase e H⁺-ATPase não apresentaram praticamente nenhuma diferença na atividade entre os tratamentos, com e sem herbicida (Figura 32 e 39). Isto demonstra a grande capacidade das plantas de milho em promover a desintoxicação do mesotrione, sem praticamente interferir aparentemente no crescimento das plantas (Tabelas 11), e no teor de macro e micronutrientes das folhas (Tabelas 12) em relação ao controle.

Em relação ao perfil do gel unidimensional de proteínas no citoplasma, esta apresentou maior síntese no tratamento com mesotrione nas duas épocas analisadas (três e sete DAA), nos tecidos de folhas e caule (Figura 17 e 22 A e B), principalmente na faixa de peso molecular compreendida entre 20 a 62 kDa. Muitas proteínas ou polipeptídios nessa faixa de peso molecular participam da primeira e segunda Fase de desintoxicação da molécula de herbicida no citoplasma. Na Fase I há envolvimento de enzima importante como a *monooxigenases dependentes de citocromo P450* (P450), que participa nas reações de hidrólise, redução e oxidação nas moléculas de herbicida, com peso molecular variando entre 45 a 62 kDa (Schuler, 1996). Também nessa Fase I, encontra-se a enzima *esterase* com peso molecular que varia de 30 a 40 kDa (Cummins e Edwards, 2004). Já na Fase II, têm-se as enzimas *glutathione S-transferases* com peso molecular em torno de 24 a 30 kDa (Reinemer et al., 1996) e a *UDP-glicosiltransferases* com peso molecular que

varia de 40 a 62 kDa (Lamoureux et al., 1991; Leah et al., 1992). Mas para identificar a possibilidade de participação de algumas destas enzimas na desintoxicação de herbicidas, deve-se utilizar a eletroforese em gel de poliacrilamida bidimensional e espectrometria de massa, onde esta última permite determinar a massa precisa da enzima específica. Essa informação pode então ser utilizada para analisar os bancos de dados genômicos, onde as massas de todas as enzimas ou proteínas já foram tabuladas.

Quanto ao resultado do perfil eletroforético em gel nas raízes aos três e sete DAA, o tratamento com mesotrione reduziu a concentração de proteínas no citoplasma (Figura 26 A e B). Esta redução poderá ter ocorrido possivelmente, por danos iniciais da fotossíntese (Figura 40 e 41), em que o mesotrione danificou até aos cinco DAA a produção de açúcares e outros compostos orgânicos. Segundo Rajcan e Tollenaar (1999), qualquer dano na atividade fotossintética foliar reduz o suprimento de carboidratos para as raízes, o qual é de fundamental importância para a absorção de nitrogênio e outros nutrientes que fazem parte da constituição das proteínas ou polipeptídios. Nesse sentido, o mesotrione provavelmente prejudicou a produção de proteínas no citoplasma no tecido de raiz de milho.

Futuros estudos são requeridos para determinar realmente quais são as possíveis enzimas (*P450*, *glutathione S-transferase*, *glicosiltransferase*, *peroxidases*, *superóxido dismutase*, *catalase*) e/ou polipeptídios e outras moléculas orgânicas (glutathione, açúcares, aminoácidos) que se conjugam ao mesotrione. Por isso, os padrões eletroforéticos de proteínas no citoplasma podem fornecer informações relevantes nos estudos de caracterização de proteínas de baixo peso molecular, que participam na desintoxicação de moléculas de herbicida nas plantas. Este método torna possível identificar proteínas e/ou polipeptídios que podem ser importantes na tolerância das plantas a herbicidas e outras perturbações ambientais, sendo considerado uma ferramenta útil para este tipo de estudo. No entanto, poucos trabalhos são encontrados na literatura utilizando esta técnica para caracterização de proteínas associadas na conjugação e desintoxicação de herbicidas.

Sintetizando os resultados apresentados, no gel eletroforético unidimensional de folha, caule e raiz de milho pode-se indicar que os perfis de proteínas foram alterados no tratamento com mesotrione, no qual este herbicida atua modificando a

concentração das enzimas ou polipeptídios nos tecidos estudados. Esta possibilidade de alteração das proteínas carece de estudos posteriores. Para Edwards et al. (2000), a proteção das células de plantas contra herbicidas é altamente governada pelo incremento de algum modo da transcrição de genes que levam a síntese de enzima específica para o desencadeamento da desintoxicação de herbicidas.

Por outro lado, o conhecimento detalhado das enzimas capazes de promover a desintoxicação de herbicidas em plantas é importante, na realidade, em possíveis manipulações com a biotecnologia, visando desenvolver plantas resistentes a herbicidas ou entender melhor como determinadas plantas daninhas adquire resistência a determinados produtos.

7. CONCLUSÕES

O sistema de transporte de membrana celular tem papel importante na tolerância do mesotrione em plantas de milho. De acordo com a hipótese proposta inicialmente, as bombas H^+ participam na desintoxicação do herbicida mesotrione em plantas de milho.

- Dentre as três bombas primárias de prótons (H^+ -ATPase tipo P, V-ATPase e H^+ -PPase) estudadas, a que apresentou maior atividade hidrolítica foi a H^+ -PPase de folha em 568% e 290%, e das raízes em 114% e 123%, aos três e sete DAA, respectivamente, e do caule em 191%, 144% e 110% aos três, sete e 12 DAA em relação ao controle. Enquanto que a H^+ -ATPase tipo P de caule sofreu uma modulação com estimulação de 64% aos três DAA e inibição de 40% e 76% aos sete e 12 DAA;
- A atividade hidrolítica *in vitro* das H^+ -ATPases de membrana plasmática de raiz e folha tratada com mesotrione foi inibida, porém, a V-ATPase e H^+ -PPase de caule não foram afetadas pelo herbicida;
- A intoxicação provocada pelo herbicida mesotrione não afetou o crescimento do milho nos parâmetros altura das plantas e peso de biomassa seca aos sete DAA;
- A eficiência fotossintética avaliada pela taxa fotossintética, condutância estomática, fluorescência da clorofila *a*, foram prejudicados pelo mesotrione até cinco DAA, sendo recuperados possivelmente a partir dos sete DAA;
- Não houve diferença nos teores de nutrientes nas folhas entre os tratamentos de milho aos sete DAA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandersson, E., Saalbach, G., Larsson, C., Kjellbom, P. (2004) Arabidopsis plasma membrane proteomics identifies components of transport, signal transduction and membrane trafficking. *Plant Cell Physiol.* n. 45, p.1543-1556.
- Alfenas, A. C. (1998) Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentais e Aplicações em Plantas e Microrganismos. VIÇOSA: EDITORA - UFV, v. 1. 574p.
- Bacarin, M. A., Mosquim, P. R. (1998) Relação entre a fixação de dinitrogênio e a fotossíntese líquida de dois genótipos de *Phaseolus vulgaris* L. de produtividade contrastante. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Brasília, n. 2, p.157-160.
- Baligar, V. C., Pitta, G. V. E., Gama, E. E. G., Schaffert, R. E., Bahia, Filho, A. F. C., Clark, R. B. (1997) Soil acidity effects on nutrient use efficiency in exotic maize penotypes. *Plant and Soil*, n. 192. p.9-13.
- Ball, J. H., Williams, L., Hall, J. L. (1987) Effect of SW26 and erythrosin B on ATPase activity and related processes in *Ricinus* cotyledons and cucumber hypocotyls. *Plant Science.* n. 52, p.1-5.

- Barnwell, P., Cobb, A. (1993) An Investigation of Aryloxyphenoxypropionate Antagonism of Auxin-Type Herbicide Action on Proton-Efflux. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. n. 47, p.87-97.
- Barrett, M. (1995) Metabolism of herbicides by cytochrome P450 in corn. *Drug Metab Drug Interact*. n.12, p.299-315.
- Bartholomew, D. M., Van Dyk, D. E., Lau, S-M. C., O'Keefe, D. P. O., Rea, P. A., Viitanen, P. V. (2002) Alternate Energy-Dependent Pathways for the Vacuolar Uptake of Glucose and Glutathione Conjugates. *Plant Physiology*, n.130, p.1562-1572.
- Bartlett, D. W. e Hall, G. J. (2000) Mesotrione: uptake, translocation, and metabolism in corn compared to weeds. *Proc. N. Cent. Weed Sci. Soc*. n. 55, p.65-66.
- Basu, C., Halfhill, M. D.; Mueller, T. C., Neal Jr, C. (2004) Weed genomics: new tools to understand weed biology. *Trends Plant Sci*. n.9, p.391-398.
- Bayer, D. E. (1987) Temperature as a modifying environmental factor of herbicidal response. *Calif. Weed Conf*. n. 39, p.114-116.
- Blanco, H. G. (1982) Ecologia das plantas daninhas. Competição de plantas daninhas em culturas brasileiras. In: Controle de plantas daninhas. Campinas: *Instituto Biológico*, p.43-75.
- Böger, P., Sandmann, G. (1998) Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides – mode of action and resistance mechanisms. *Pestic Outlook*. n.9, p.29-35.
- Bohnert, H. J.; Nelson, D. E.; Jensen, R. G. (1995) Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell*, n.7, p.1099-1111.
- Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Oquist, G. (1993) In: Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual. (eds.) Hall, D.O.; Scurlock, J.M.O.; Bolhàr-Nordenkamp, H.R.; Leegood, R.C.; Long, S.P. Chapman & Hall, London. 193.

- Bolhàr-Nordenkamp, H. R., Long, S. P., Baker, N. R., Öquist, G.; Schreiber, U., Lechner, E. G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology*. n.3, p.497-514.
- Bolwell, G. P., Bozak, K., Zimmerlin, A. (1994) Plant cytochrome P450. *Phytochemistry*, n.37, p.1491-1506.
- Bozzo, S., Retamal, C. (1991) Gel-perfect: Geles unidimensionales, un nuevo método densitométrico para computadores personales. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales*, n.24, p.181-184.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, n.72, p.248-254.
- Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Pardo, J. M. (1998) Plants use calcium to resolve salt stress. *Trends in Plant Sci.* n.3, p.411-412.
- Brighenti, A. M. (2001) Biología de plantas daninhas. In: Oliveira Júnior, R. S., Constantin, J. *Plantas Daninhas e seu Controle*, Ed. Guaíba: Agropecuária, Cap. 3, p.15-57.
- Briskin, D. P. (1994) Membrane and Transport systems in plants: An Overview. *Weed science*, n. 42. p.255-262.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 1044p.
- Caboni, P., Sammelson, R, E., Casida, J. E. (2003) Phenylpyrazole insecticide photochemistry, metabolism, and Gabaergic action: Ethiprole compared with Fipronil. *Journal of agricultural and food chemistry*, n. 24, p.7055-7061.

- Cabral, M. G., Sá-Correia, I., Viegas, C. A. (2004) Adaptative responses in yeast to the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid at the level of intracellular pH homeostasis. *Journal of Applied Microbiology*, n.96, p.603-612.
- Cardenas, J., Reyes, C. E., Doll, J. D. (1972) Malezas tropicales. Bogotá, Colombia: Instituto Colombiano Agropecuario, v.1: 341p.
- Carystinos, G. D., MacDonald, H. R., Monroy, A. F., Dhindsa, R. S., Poole, R. J. (1995) *Plant Physiol.* n.108, p.641-649.
- Chollet, J. F., Dele´tage, C., Faucher, M., Miginiac, L., Bonnemain, J. L. (1997) Synthesis and structure-activity relationship of some pesticides with an amino acid function. *Biochem Biophys Acta*, n.1336, p.331-341.
- Clark, R. B. (1975) Characterization of phosphatase of intact maize roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n.23, p.458-460.
- Cole, D. J., Edwards, R. (2000) Secondary metabolism of agrochemicals in plant. In: Roberts, T. R. (Ed.), *Agrochemical and plant Protection*. John Wiley & Sons, Chichester, p.107-154.
- Cole, D. J. (1994) Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pestic Sci* n.42, p.209-222.
- Coleman, J. O., Blake-Kalff, M. M., Davies, T. E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Reviews: Trends in plant science*. n.4, p.144-151.
- Couderchet, M., Retzlaff, G. (1991) The role of the plasma membrane ATPase in bentazone-sethoxydim antagonism. *Pesticide Science*, n.32, p.295-306.
- Cudney, D. W. (1987) Herbicide interactions with soil moisture, rain, and humidity. *Proc. Calif. Weed Conf.* n.39, p.117-119.

- Cummins, I., Edwards, R. (2004) Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. *The Plant Journal*. n.39, p.894-904.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., Thomas, H. (2000) Senescence and programmed cell death. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: *American Society of Plant Physiologists*, p.1044-1100.
- Davies J. M, Hunt, I. Sanders D. (1994) Vacuolar H⁺-pumping ATPase variable transport coupling ratio controlled by pH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. n.91, p.8547-51.
- Davies, J. M., Poole, R. J., Rea, P. A., Sanders, D. (1992) Potassium transport into plant vacuoles energized directly by a proton-pumping inorganic pyrophosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. v.89, p.11701-11705.
- Delétage-Grandon, C., Chollet, J-F., Faucher, M., Rocher, F., Komor, E., Bonnemain, J-L. (2001) Carrier-Mediated Uptake and Phloem Systemy of a 350-Dalton Chlorinated Xenobiotic with an α -Amino Acid Function. *Plant Physiol.*; n.125, p.1620-1632.
- Denis, M. H., Delrot, S. (1993) Carrier-mediated uptake of glyphosate in broad bean (*Vicia faba*) via a phosphate transporter. *Physiol Plant*. n.87, p.569-575.
- De Prado, R. A., Franco, A. R. (2004) Cross-resistance and herbicide metabolism in grass weeds in Europe: biochemical and physiological aspects. *Weed Science*, n.52, p.441-447.
- Deubert, R. (1992) Ciência das plantas daninhas: fundamentos. Jaboticabal: FUNESP, v.1, 431p.
- Devine, M. D., Duke, S. O., Fedtke, C. (1993) Leaves absorption of herbicide. In: Devine, M. D., Duke, S. O., Fedtke, C. (Ed.). Physiology of herbicide action. New Jersey: Englewood Cliffs, cap. 11, p.29-52.

- Dey, P. M., Harborne, J. B. (1997) *Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA, 554p.
- Diário oficial da união (2003) Coordenação de Fiscalização de Agrotóxico, Ministério da agricultura www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/LEGISLACAO/PUBLICACOES_DOU/PUBLICACOES_DOU_2003/PUBLICACOES_DOU_JUNHO_2003/AGRICULTURA_SECAO%201%20DE%2013.06.2003
- DiTomaso, J. M., Stowe, A. E., Brown, P. H. (1993) Inhibition of lipid synthesis by diclofop-methyl is age dependent in roots of oat and maize. *Pestic Biochem Physiol* n.45, p.210-219.
- Droog, F. (1997) Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation*, n.16, p.95-107.
- Durst, F., O'Keefe, D. P. (1995) Plant cytochromes P450: an overview. *Drug Metab Drug Interact.* n.12, p.171-186.
- Edwards, R., Dixon, D., Walbot, V. (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* n.5, p.193-198.
- Eerd, L. L., Hoagland, R. E., Zablotowick, R. M., Hall, J. C. (2003) Pesticide metabolism in plant and microorganisms. *Weed science*, n.51, p.472-495.
- European Commission (2003) Commission working document. Health e consumer protection directorate-general Review report for the active substance mesotrione. p.22.
- Façanha, A. R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiol.*, n.116, p.1487-1495.
- Fageria, N. K. (1989) Solos tropicais a aspectos fisiológicos das culturas. Brasília – DF: Departamento de Publicações, 425p.
- Fancelli, A. L., Neto, D. (2000) Produção de Milho. Guaíba: Agropecuária, 360p.

- Fisher, W. N., Andre, B., Rentsch, D., Krolkiewicz, S., Tegeder, M., Breitkreuz, K., Frommer, W. B. (1998) Amino acid transport in plants. *Trends Plant Sci.*, n.3, p.188-195.
- Fiske, C. F., Subbarow, Y. (1925) The colorometric determination of phosphorus. *J Biol Chem.*, n.66, p.1-26.
- Ford, G. T., Pleasant, J. M. (1994) Competitive abilities of six corn (*Zea mays*) hybrids with four weed control practices. *Weed Technology*, Champaign, n.1, p.124-128.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. (1994) Photooxidative stress in plants, *Physiol. Plant.* n.92, p.616-717.
- Frear, D. S. (1995) Wheat microsomal cytochrome P450 monooxygenases: characterization and importance in the metabolic detoxification and selectivity of wheat herbicides. *Drug Metab Drug Interact.* n.12, p.329-357.
- Fritze, I. M., Linden, L., Freigang, J., Auerbach, G., Huber, R., Steinbacher, S. (2004) The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant physiology*, n.4, p.1388-1400.
- Fuerst, E.P., Norman, M.A. (1991) Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. *Weed Science*, Champaign, n.3, p.458-464.
- Gaillard, C., Dufaud, A., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N., Martinoia, E. (1994) A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett.* n.352, p.219-21.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps. *FEBS Letters*, n. 581, p.2204-2214.

- Giannini, J. L., Briskin, D. P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiol.* n.84, p.613-618.
- Gordon-Weeks, R., Steele, S. H., Leigh, R. A. (1996) The role of magnesium, pyrophosphate, and their complexes as substrates and activators of the vacuolar H⁺-pumping inorganic pyrophosphatase, *Plant Physiol.* n.111, p.195-202.
- Green, M. J., McLeod, J. K., Misra, S. (1991) Characterization of Douglas fir protein body composition by SDS-PAGE and electron microscopy. *Plant Physiol. Biochem.* n.29, p.49-55.
- Gronwald, J.W. (1994) Resistance to photosystem II inhibiting herbicides. In: Powles, S.; Holtum, J. (eds.). *Herbicide resistance in plants: biology and biochemistry.* Boca Raton: p.27-60.
- Gronwald, J. W., Jourdan, S. W., Wyse, D. L., Somers, D. A., Magnusson, M. U. (1993) Effect of ammonium sulfate on absorption of imazethapyr by quackgrass (*Elytrigia repens*) and maize (*Zea mays*) cell suspension cultures. *Weed Sci.*, n. 41, p.325-34.
- Haehnel, W., Nairn, J. A., Reisberg, P., Sauer, K. (1982) Picosecond fluorescence kinetics and transfer in chloroplast and algae. *Biochemistry and Biophysical Acta*, Amsterdam, n. 1, p.161-173.
- Hall, M. G., Wilks, M. F., Provan, W. M., Eksborg, S., Lumholtz, B. (2001) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology.* n. 2, p.169-177.
- Harper, J. F., Manney, L., Sussman, M. R. (1994) The plasma membrane H⁺-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of *MA20* which is expressed primarily in developing seeds *Mol. Gen. Genet.* n.244, p.572-587.

- Haslam, R., Raveton, M., Cole, D. J., Pallett, K. E., Coleman, J. O. D. (2001) The identification and properties of apoplastic carboxylesterases from wheat that catalyse deesterification of herbicides. *Pestic. Biochem. Physiol.* n. 71, p.178-189.
- Hatzios, K. K. (1997) Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants: A Brief Overview and Directions for Future Research. In: Hatzios KK (eds) Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.1-5.
- Hatzio, K. K., Penner, D. (1982) Metabolism of herbicides in higher plants. Minneapolis: Burgess Pub. 142p.
- Haynes, P. A., Gyni, S. P., Fijéis, D. (1998) Proteome analysis: biological assay or data archive? *Electrophoresis.* n.19, p.1862-1871.
- Hess, D. F. (2000) Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* n.48, p.160-170.
- Hess, F. D. (1995) Mechanism of Action of Inhibitors of Amino acid Biosynthesis. In: In: Herbicide action Course. West Lafayette, Purdue University: Indiana, USA. p.368-391.
- Higgins, C. F. (1995) The ABC of channel regulation. *Cell*, n.82, p.693-696.
- Hirsch, R. E., Lewis, B. D., Spalding, E. P., Sussman, M. R. (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science*, n. 280, p.918-921.
- Hörtensteiner, S., Vogt, E., Hagenbuch, B., Meier, P. J., Amrhein, N., Martinoia, E. (1993) Direct energization of bile acid transport into plant vacuoles, *J. Biol. Chem.* n.268, p.18446-18449.
- Hsieh, Y. N., Liu, L. F., Wang, Y. S. (1998) Uptake, Translocation and Metabolism of the herbicide Molinate in Tobacco and Rice. *Pestic. Sic*, n.53, p.149-159.

- Hull, M. R., Cobb, A. H. (1998) An investigation of herbicide interaction with the H⁺-ATPase activity of plant plasma membranes. *Pesticide Science*, n.53, p.155-164.
- Irzyk, G. P., Fuerst, E. P. (1993) Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol*, n.102, p.803-810.
- Ishikawa, T. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci*, n.17, p.463-468.
- Jackson, M. L. (1958) Soil Chemical Analysis. New Jersey: Prentice Hall, 498p.
- Jacobson, A., Shimamabukuro, R. H. (1984) Metabolism of diclofop-methyl in root treated wheat and oat seedlings. *J. Agric. Food Chem.* n.32, p.742-746.
- Jahn, T., Johansson, F., Luthen, H., Volkmann, D., Larrson, C. (1996) Reinvestigation of auxin and fusicoccin stimulation of the plasma membrane H⁺-ATPase activity. *Planta*, n.199, p.359-65.
- Jepson, I., Lay, V. J., Holt, D. C., Bright, S. W. J., Greenland, A. J. (1994) Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. *Plant Mol Biol* n. 26, p.1855-1866.
- Jiang, L., Rogers, J.C. (1998) Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways. *J. Cell Biol.* n.143, p.1183-1199.
- Johnson, C. B., Young, B. G. (2002) Influence of temperature and relative humidity on the foliar activity of mesotrione. *Weed Science*, n.50, p.157-161.
- Kafiz, B., Caussanel, J. P., Scalla, R., Gaillardon, P. (1989) Interaction between diclofop-methyl and 2,4-D in wild oat (*Avena fatua* L.) and cultivated oat (*Avena sativa* L.) and fate of diclofop-methyl in cultivated oat, *Weed Res.* n.29, p.299-305

- Karan, D., Lara, F. R., Cruz, M. B., Pereira Filho, I. A., Pereira, F. T. (2003) Características do Herbicida S-Metolachlor nas Culturas de Milho e Sorgo. Circular Técnico 36. p.3, Embrapa. Sete Lagoas, MG.
- Karlsson, J. (1975) Membrane-bound potassium and magnesium ion stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*beta vulgaris* L.) *Biochim Biophys Acta*, n.399, p.356-363.
- Keeley, P. E., Thullen, R. J. (1978) Light requirements of yellow nutseage and light inteception by crops. *Weed Science*. Champaign, n.1, p.10-16.
- Krause, G. H., Weiss, E. (1991) Chlorophyll fluorecence and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology*, n.42, p.313-359.
- Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E. (1996) Old enzymes for a new job: herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.* n.111, p.349-53.
- Kreuz, K. (1993) Herbicides safeners: recent advances and biochemical aspects of their mode of action. In *Proc. Brighton Crop Prot. Conf., Weeds*. p. 1249-1258.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, n.227, p.680-685.
- Lamoureux, G. L., Shimabukuro, R. H., Frear, D. S. (1991) Glutathione and glucoside conjugation in herbicide selectivity, in *Herbicide Resistance in Weeds and Crops* (Casely, J.C., Cussans, G.W.and Atkin, R.K., eds), p.227-261.
- Lamoureux, G. L., Rusness, D. G. (1986) Tridiphane [2-(3,5-dichlorophenyl)-2- (2,2,2-trichloroethyl)oxirane] an atrazine synergist: Enzymatic conversion to a potent glutathione S-transferase inhibitor. *Pestic. Biochem. Physiol.* n.26, p.323-342.
- Lamoureux, G. L., Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R., Frear, D. S. (1970) Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6 isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J. Agric Food Chem*, n.18, p.81-86.

- Laura, L. M. S., Almeida, R. F. M. (2004) Tópicos de Biofísica de Membranas. Ed. Líder – Portugal, 167p.
- Leah, J. M., Worrall, T. L., Cobb, A. H. (1992) Isolation and characterization of two glucosyltransferases from *Glycine max* associated with bentazone metabolism. *Pestic Sci.*, n.34, p.81-87.
- Lee, D. L., Prisbylla, M. P., Cromartie, T. H.; Dagarin, D. P.; Howard, S. W.; Provan, W. M.; Ellis, M. K.; Fraser, T., Mutter. L. C. (1997) The discovery and structural requirements of inhibitors of p -hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Weed Sci.* n.45, p.601-609.
- Logan, H., Basset, M., Véry, A. A., Setenac, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. *Physiologia Plantarum*, n.100, p.1-15.
- Maeshima, M. (2001) Tonoplast Transporters: Organization and Function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n.52, p.469-97.
- Maeshima, M. (2000) Vacuolar H^+ -pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1465, p.37-51.
- Maeshima, M., Nakanishi, Y. (1998)** Molecular Cloning of Vacuolar H^+ -Pyrophosphatase and Its Developmental Expression in Growing Hypocotyl of Mung Bean. *Plant Physiol.* n. 116, p.589-597.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. (1989) Avaliação do estado nutricional das plantas. Piracicaba: Associação Brasileira para pesquisa da Potassa e do Fósforo. 201p.
- Mannervik, B., Danielson, U. H. (1988) Glutathione transferases: structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* n.23, p.283-337.

- Margolles-Clark, E., Tenney, K., Bowman, E. J., Bowman, B. J. (2000) The structure of the vacuolar ATPase in *Neurospora crassa*. *J. Bioenerg. Biomemb.*, n.31, p.29-37.
- Marrs, K. A. (1996) The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n.47, p.127-57.
- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Müller-Röber, B., Burkhard Schulz, B. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers, *Planta*, n. 214, p.345-355.
- Martinoia, M., Ratajczak, R. (1997) Transport of organic molecules across the tonoplast. *Adv. Bot. Res.* n.25, p.365-400.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N. (1993) An ATP-dependent glutathione S-conjugate "export" pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*. n. 364, p.247-49.
- Martinoia, E. (1992) Transport processes in vacuoles of higher plants. *Bot Acta*. n.105, p.232-245.
- Martinez, H. E. P., Carvalho, J. G.; Souza, R. B. (1999) Diagnose foliar. In: Ribeiro, A. C., Guimarães, P. T. G., Alvarez, V. V. H. (Ed.) *Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5 Aproximação*. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p.143-168.
- Marty, F. (1999) Plant vacuoles. *The plant cell*, n. 11, p.587-599.
- Masiunas, J., Pataky, J., Sprague, C., Williams, M., Wax, L. (2004) Sweet Corn Cultivar Tolerance to Mesotrione. *Weed Science Society Of America Meeting Abstracts*.18.

- Mayer, M. P., Nievelstein, V., Beyer, P. (1992) Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplast of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. *Plant Physiol Biochem.* n.30, p. 389-398.
- Mayonado, D. J., Hatzios, K. K., Orcutt, D. M., Wilson, H. P. (1989) Evaluation of the mechanism of action of the bleaching herbicide SC-0051 by HPLC analysis. *Pestic. Biochem. Physiol.* n.35, p.138-145.
- Merotto Jn, A. e Fischer, A. J. (2004) Absorção e Translocação de herbicidas nas plantas. IN: Vargas, L. e Roman, E. S. (eds.) Manual de manejo e controle de plantas daninhas. Embrapa, p.89-104.
- Mimura, H., Nakanishi, Y., Hirono, M. e Maeshima, M. (2004) Membrane topology of the H⁺-pyrophosphatase of *Streptomyces coelicolor* determined by cysteine-scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* n.279, p.35106-35112.
- Mitchell, G., Bartlett, D. W., Fraser, T. E. M., Hawkes, T. R., Holt, D. C., Townson, J. K., Wichert, R. A. (2001) Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. ***Pest Management Science.* v. 57, p.120-128.**
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science.* v. 7, p.405-410.
- Mornet, C., Mondory, C., Gaillard, C., Martinoia, E. (1997) Transport of paraquat and polyamines across the vacuolar membrane of barley mesophyll cells *Plant Physiol. Biochem.* n.35, p.589-594.
- Morsomme, P. E., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta.* n.1465, p.1-16.
- Müntz, K. (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.* n.38, p.77-99.

- Murata, N., Fork, D. C. (1975) Temperature dependence of chlorophyll a fluorescence in relation to the physical phase of membrane lipids in algae and higher plants. *Plant Physiol.* n.56, p.791-796.
- Nakanishi, Y., Maeshima, M. (1998)** Molecular Cloning of Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase and Its Developmental Expression in Growing Hypocotyl of Mung Bean. *Plant Physiol.* n.116, p.589-597.
- Norris, S. R., Shen, X., DellaPenna, D. (1998) Complementation of the arabidopsis *pds1* mutant with the gene encoding p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiol.* n.117, p.1317-1323.
- Norris, S. R., Barrette, T. E., DellaPenna, D. (1995) Genetic dissection of carotenoid synthesis in Arabidopsis define plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. *Plant cell.* n.7, p.2139-2149.
- Oufattole, M., Arango, M., Boutry, M. (2000) Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane H⁺-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta.* n.210, p.715-722.
- Pallett, K. E. (2000) Mode of action of isoxaflutole – a case study of an emerging target site. In: *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (Eds. A. H. Cobb and R. C. Kirkwood) Sheffield Academic Press, Sheffield, p.215-238.
- Palmgren, M. G. (2001) Plant Plasma Membrane H⁺-ATPase: Powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* n.52, p.817-845.
- Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R., Larsson, C. (1991)** Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p.20470-20475.
- Pflugmacher, S., Sandermann, H., (1998) Taxonomic distribution of plant *glucosyltransferases* acting on xenobiotics. *Phytochemistry*, n.49, p.507-511.

- Pinazza, L. A. (1993) Perspectivas da cultura do milho e do sorgo no Brasil. IN: Cultura do milho no Brasil – fatores que afetam a produtividade-, Ed. I. Leonardo Theodoro Bull. II. Heitor Cantarella. Piracicaba - SP: POTAFOS, p.1-10.
- Pitelli, R. A. (1985) Interferência de plantas daninhas em culturas agrícolas. Inf. Agropec., n.129, p.16-27.
- Plaisance, K. L., Gronwald, J. W. (1999) Enhanced catalytic constant for glutathione S-transferase (atrazine) activity in an atrazine-resistant *Abutilon theophrasti* biotype. *Pest Biochem Physiol.* n. 63, p.34-49.
- Plaxton, W. C. (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n.47, p.185-214.
- Prysbilla, M. P., Onisjo BCShribbs, J. M., Rllis, M. K., Hawkes, T. R., Mutter, L. C. (1993) The novel mechanism of action of the herbicidal triketones, Proc. Brighton Crop Prot. Conf, Weeds, BCPC, Farnham, Surrey, UK, p.731-738.
- Raghothama, K. G. (1999) Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, n.50, p.665-693.
- Rajcan, I., Tollenaar, M. (1999) Source: sink ratio and leaf senescence in maize: II. Nitrogen metabolism during grain filling. *Field Crops Research*, Amsterdam, n.2, p.255-265.
- Ramos, L. R. M., Pitelli, R. A. (1994) Efeito de diferentes períodos de controle da comunidade infestante sobre a produtividade da cultura do milho. *Pesq. Agropec. Bras.*, n.10, p.1523-1531.
- Ramos, L. R. M. (1992) Efeitos de períodos de convivência da comunidade infestante, sobre o crescimento, nutrição mineral e produtividade da cultura do milho (*Zea mayz*). 100p. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

- Ratterman, D. M., Balke, N. E. (1989) Diclofop-Methyl Increases the Proton Permeability of Isolated Oat-Root Tonoplast. *Plant Physiol.* n.91, p.756-765.
- Rayle, D. L., Cleland, R. E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, n. 99, p.1271-1274.
- Rea, P. A., Li, Z. S., Lu, Y. P., Drozdowicz, Y. M. (1998) From Vacuolar GS-X Pumps to Multispecific ABC Transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n. 49, p.727-60.
- Rea, P. A.; Poole, R. J. (1993) Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu. Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n. 44, p.157-80.
- Rea, P. A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: two H⁺ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.* n.71, p.131-41.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neufeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Keolln, I., Bartunik, H. D., Bieseler, B. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J. Mol. Biol.* n. 255, p.289-309.
- Rennenberg, H., Brunold, C. (1994) Significance of glutathione metabolism in plants under stress, *Prog. Bot.* n. 55, p.142-155.
- Riechers, D. E., Kleinhofs, A., Irzyk, G., Jones, S. (1998) Chromosomal location and expression of a herbicide safener-regulated glutathione S-transferase gene in *Triticum aestivum* and linkage relations in *Hordeum vulgare* *Genoma*, n. 41, p.368-372.
- Rodrigues, B. N., Almeida, F. S. (2005) *Guia de herbicidas*. 5.º edição. IAPAR, Londrina, 696p.

- Ros, R., Cooke, D. T., Burden, R. S., James, C. S. (1990) Effects of the herbicide MCPA, and the heavy metals, cadmium and nickel on the lipid composition, Mg²⁺-ATPase activity and fluidity of plasma membranes from rice, *Oryza sativa* shoots. *J. Exp. Bot.* N.41, p.457-462.
- Ruedell, J. A. (1995) Plantio Direto na Região de Cruz Alta. Cruz Alta, Rs: Fundação centro de Experimentação e Pesquisa Fecotrigo – FUNDACEP, 133p.
- Rus, A., Lee, B.-H., Muñoz-Mayor, A., Sharkhuu, A., Miura, K., Zhu, J.-K., Bressan, R.A., Hasegawa, P. M. (2004) AtHKT1 facilitates Na⁺ homeostasis and controls K⁺ nutrition in planta. *Plant Physiol.* n.136, p.2500-2511.
- Salt, D. E., Smith, R. D., Raskin, I (1998) Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology*, Pato Alto, n. 49, p.643-668.
- Sandmann, G., Böger, P. (1997) Phytoene desaturase as target for bleaching herbicides. In: *Herbicide Activity: Toxicology, Biochemistry and Molecular Biology*, ed by Roe, R. M., Burton, J, D. and Kuhr, R. J., IOS Press, Amsterdam, p.1-10.
- Sandermann, H. (1992) Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* n.17, p.82-84.
- Sarafian, V., Kim, Y., Poole, R. J., Rea, P. A. (1992) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* n. 89, p.1775-1779.
- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiology*, n.101, p.7-12.
- Schmitt, R., Sandemann, H. (1982) Specific localization of glucoside conjugates of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soybean vacuoles, *Z. Naturforsch.* n.37, p.772-777.
- Schuler, M. A. (1996) The Role of Cytochrome P450 Monooxygenases in Plant-Insect Interactions. *Plant Physiol.* n.112, p.1411-1419.

- Schumacher, K. (2006) Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Cell Biology*, n.9, p.595-600.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants 38 microorganism toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol.* n.165, p.1-52.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant physiology*, n.40, p.61-94.
- Shimabukuro, R. H., Hoffer, B. L. (1992) Effect of diclofop on the membrane potentials of resistant and susceptible annual ryegrass root tips. *Plant Physiol.* n.98, p.1415-1422.
- Shimabukuro, M. A., Shimabukuro, R. H., Walsh, W. C (1982) The antagonism of IAA-induced hydrogen ion extrusion and coleoptile growth 20, J by diclofop-methyl, *Physiol. Plant.* n.56, p.444-452.
- Shiratake, K., Kanayama, Y., Maeshima, M., Yamaki, S. (1997) Changes in H⁺-Pumps and a Tonoplast Intrinsic Protein of Vacuolar Membranes during the Development of Pear Fruit. *Plant Cell Physiol.* n.38, p.1039-1045.
- Silva, A. A., Freitas, F. M., Ferreira, L. R., Jakelaitis, A. (2005) Efeitos de mistura de herbicida com inseticida sobre a cultura do milho, as plantas daninhas e a lagarta-do-cartucho. *Planta Daninha.* n.3, p.517-525.
- Silva, A. A., Silva, J. F., Ferreira, F. A., Ferreira, L. F., Silva, J. F. (2000) *Curso de Especialização por Tutoria à Distância*. Módulo 3.1. – Controle de Plantas Daninhas. ABEAS. Brasília – DF.
- Silva, F. C. (1997) Manual de interpretação de análises de solo, plantas e fertilizantes. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, 370p.
- Singer, S. R., McDaniel, C. N. (1982) Transport of the Herbicide 3-Amino-1,2,4-Triazole by Cultured Tobacco Cells and Leaf Protoplasts. *Plant Physiol.* n.69, p.1382-1386.

- Soeda, T., Uchida, T. (1987) Inhibition of pigment synthesis by 1,3-dimethyl-4-(2,4-dichlorobenzoyl)-5-hydroxypyrazole, norflurazon and new herbicidal compounds in radish and flax plants. *Pestic. Biochem. Physiol.* n.29, p.35-42.
- Sprague, C. L., Maxwell, D. J., Wax, L. M. (1999) Comparisons of ZN. 1296 and RPA 201772 for weed control in corn. North Cent. *Weed Sci. Soc., Res. Rep.* n.56, p.223-224.
- Staswick, P. E. (1994) Storage proteins of vegetative plant tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* n.45, p.303-322.
- Sterling, T. M. (1994) Mechanisms of herbicide absorption across plant membranes and accumulation in plant cells. *Weed Sci.*, n.42, p.263-276.
- Stitt, M. (1998) Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. *Botanica acta.*, n.3, p.167-175.
- Sze, H., Li, X., Palmgren, M. G. (1999) Energization of plant cell membrane by H⁺-pumping ATPase: Regulation and biosynthesis. *Plant Cell.* n.1, p.677-689.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2004) *Fisiologia Vegetal*. Ed. ARTEMED. Porto Alegre, Brasil, 559p.
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D. (2005) Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS Journal.* n. 272. p.390-403.
- Terrier, T., Deguilloux, C., Sauvage, F-X., Martinoia, E., Romieu, C. (1998) Proton pumps and anion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. *Plant Physiol. Biochem.* n.36 (5), 367-377.
- Theodoulou, F. L. (2000) Plant ABC transporters. *Biochim Biophys Acta.* n.1465, p.79-103.

- Tomlin, C.D.S. (1997) *The Pesticide Manual*. 11th edn. p.323-327. London: British Crop Protection Council.
- Van Kooten, O., Snel, J. F. H. (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, Hague, n. 1, p.47-150.
- Vidal, R. A., Spader, V., Fleck, N. G., Merotto Jr, A. (2002) Dose de injúria econômica do herbicida cyanazine na cultura do milho. *Revista Brasileira de Herbicidas*. n. 3, p.127-132.
- Zagonel, J. (2002) Eficácia do Equip Plus no controle de plantas daninhas na cultura do milho em plantio direto. *Boletim Informativo, SBCPD*, n.2, p.27-32.
- Zagonel, J., Venâncio, W. S., Kunz, R. P. (2000) Efeitos de métodos e épocas de controle das plantas daninhas na cultura do milho. *Planta Daninha*, v. 18, p.143-150.
- Zagonel, J., Carvalho, O. A., Kunz, R. P. (1998) Interferência das plantas daninhas na produtividade e características agronômicas do milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 22. Recife – PE. Resumos expandidos. Recife, ABMS, EMBRAPA, p.220.
- Weber, F. J., De Bont, J. A. M. (1996) Adaptation mechanisms of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1286, p.225-245.
- Wichert, R. A., Bardett, D. W., Townson, J. K. (1999) Mode of action, absorption, translocation and metabolism of mesotrione in weeds and corn. *Proc. North Cent. Weed Sci. Soc.* n. 54, p.94-95.
- Wolf, A. E., Dietz, K. J., Schroder, P. (1996) Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS Lett.* n.384, p.31-34.

- Wright, J. P. (1994) Use of membrane potential measurements to study mode of action of Diclofop-methyl. *Weed science*. n.42, p.285-292.
- Wright, J. P., Shimabukuro, R. H. (1987) Effects of diclofop and diclofop-methyl on the membrane potentials of wheat and oat coleoptiles. *Plant. Physiol.* n.22, p.185-188.
- Yadava, U. L. (1986) A rapid and nondestructive method to determine chlorophyll in intact leaves. *HortScience*, n. 6, p.1449-1450.
- Young, B. G., Johnson, B. C., Matthews, J. L. (1999) Preemergence and sequential weed control with mesotrione in conventional corn. *N. Cent. Weed Sci. Soc., Res. Rep.* n.56, p.226-227.
- Yuan, J. S., Tranel, P. J., Stewart Jr., N. (2006) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in plant science*. n. 1, p.6-13.