



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



Tese de Doutorado em Química

AVALIAÇÃO DO USO DE PLANTAS COMO BIOINDICADORES PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA

Amanda Martins Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira

Campo Grande – 2018

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – Mestrado e Doutorado



AVALIAÇÃO DO USO DE PLANTAS COMO BIOINDICADORES PARA DETECÇÃO DE PESTICIDAS EM ÁGUA

Amanda Martins Queiroz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutora em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Samuel Leite de Oliveira

Campo Grande – 2018

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS

Cidade Universitária, s/n * Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
<http://www.ufms.br> e-mail: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO E DOUTORADO

TERMO DE DEFESA

() – Dissertação (X) – Tese () – Qualificação

ALUNA
AMANDA MARTINS QUEIROZ

TÍTULO DO TRABALHO
Avaliação do Uso de Plantas como Bioindicadores para Detecção de Pesticidas em Água.

Defesa de Tese de Doutorado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 34/2018) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessários para titulação no curso.

COMISSÃO EXAMINADORA		
NOME	INSTITUIÇÃO DE ENSINO	ASSINATURA
Samuel Leite de Oliveira	UFMS	
Heberth Juliano Vieira	UFGD	
Giuseppe Abiôla Câmara da Silva	UFMS	
Anderson Rodrigues Lima Caires	UFMS	
Nidia Cristiane Yoshida	UFMS	

Campo Grande, 28 de março de 2018.



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Química
Doutorado

Aos vinte e oito dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, às oito horas, no Anfiteatro do Instituto de Química - Unidade XI, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Samuel Leite de Oliveira (UFMS), Anderson Rodrigues Lima Caires (UFMS), Giuseppe Abiola Camara da Silva (UFMS), Heberth Juliano Vieira (UFGD) e Nidia Cristiane Yoshida (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **AMANDA MARTINS QUEIROZ**, CPF 72861070110, do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Avaliação do Uso de Plantas como Bioindicadores para Detecção de Pesticidas em Água**" e orientação de Samuel Leite de Oliveira. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Samuel Leite de Oliveira (Interno)

Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires (Interno)

Dr. Giuseppe Abiola Camara da Silva (Interno)

Dr. Heberth Juliano Vieira (Interno)

Dra. Nidia Cristiane Yoshida (Interno)

ASSINATURA

Samuel Leite de Oliveira
Anderson R. Lima Caires
Giuseppe Abiola Camara da Silva
Heberth Juliano Vieira
Nidia C. Yoshida

AValiação

APROVADA

APROVADA

APROVADA

APROVADA

Aprovada

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

[Linha decorativa decorando o espaço de observações]

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Samuel Leite de Oliveira
Presidente da Banca Examinadora

Amanda M. Queiroz
Aluna

DEDICATÓRIA

Dedico meu trabalho à minha mãe Adalgiza, à minha irmã Ariana, ao meu sobrinho Arthur, à minha tia Eurides, ao meu tio José Ramos e toda minha família pelo apoio e presença em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

- A Deus;
- À minha mãe Adalgiza, minha irmã Arianne e meu cunhado Cleberson por todo apoio durante meu trajeto;
- A FUNDECT pela bolsa de doutorado concedida (Processo: 23/200.710/2014);
- Ao CNPq, FUNDECT e CAPES pelo apoio financeiro;
- Ao Prof. Samuel Leite de Oliveira pelo apoio e orientação;
- Ao Prof. Anderson Rodrigues Lima Caires pelo apoio e sugestões;
- Ao Grupo de óptica aplicada (GOA/UFMG) por disponibilizar o laboratório para desenvolvimento da pesquisa;
- Às Profs. Silvia Correa Santos e Silvana de Paula Quintão Scalon da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA/UFMG) por disponibilizarem a casa de vegetação onde os experimentos foram realizados;
- Ao Prof. Rodrigo Garófalo Garcia da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA/UFMG) por disponibilizar a câmera de imagem térmica;
- À Daniela Espangher Graciano pela coleta das sementes de sesbania utilizadas nesse trabalho;
- Ao meu tio Aurélio, minha tia Nilza e meu primo Diego por me receberem em sua casa durante esse período;
- Aos meus amigos de laboratório Cícera, Alessandra, Juliete, Cristiane, Silvano, Eliene, Daniela, William e Marisa por toda ajuda e companheirismo;
- Aos companheiros de doutorado Adalberto, Chirley e Erico;
- Aos meus amigos Wiliam Moreno, Camila, Cristiane Schroer, Bruna Saltareli, Adriano, Raquel, Edimara, Maria Bruna e Bruna Ferreira por todo apoio;
- Aos professores, à secretaria e à coordenação do programa de Pós-Graduação em Química da UFMS.

RESUMO

Com a crescente utilização dos pesticidas em lavouras para controle de doenças e aumento na produtividade, faz-se necessário uma avaliação do impacto ocasionado por esses produtos no ambiente. A qualidade da água e do solo pode ser monitorada a partir de bioindicadores, que são organismos vivos que sofrem mudanças em seu metabolismo a partir das alterações ambientais. As plantas são bastante utilizadas como bioindicadores de contaminação por sua nutrição mineral depender das características do solo. Diante desse cenário, a fluorescência da clorofila é uma técnica que tem sido utilizada para detectar, monitorar e avaliar diferentes processos de estresse sofridos por plantas. Neste estudo avaliou-se o potencial bioindicador de plantas de soja e de sesbania para identificar a presença de fungicida, herbicida e inseticida em água de irrigação por meio de análises de fluorescência. Técnicas complementares foram também avaliadas, como condutância estomática e comprimento da raiz. O monitoramento da condutância estomática foi eficiente para assinalar a presença de pesticidas na irrigação de plantas de soja e sesbania. Uma redução no comprimento da raiz foi observada tanto para plantas de soja como para as de sesbania, com maior redução provocada pelo uso do glifosato. Houve alterações na razão de fluorescência F685/F735 para ambas as plantas irrigadas com fungicida, herbicida e inseticida em relação as plantas do grupo controle. A partir das imagens de *QY máximo* e *Rfd* foi possível verificar diferenças significativas entre as plantas irrigadas com diferentes concentrações de pesticidas e aquelas dos respectivos grupos-controle. Os resultados obtidos indicam que plantas de soja e sesbania, avaliadas em termos de parâmetros de fluorescência, apresentam potencial para atuar como bioindicadoras da presença de pesticidas em água.

Palavras-chave: Plantas; Fluorescência; Herbicida; Fungicida; Inseticida; Bioindicador.

ABSTRACT

With the increasing use of pesticides in crops to control disease and rise productivity, it is necessary to evaluate the impact of these compounds on the environment. The quality of water and soil can be monitored using bioindicators, which are living organisms that undergo changes in their metabolism caused by environmental changes. Plants are widely used as bioindicators of contamination because their mineral nutrition depends on soil characteristics. Facing this scenario, chlorophyll fluorescence is a technique that has been used to detect, monitor and evaluate different stress processes suffered by plants. This study evaluated the potential bioindicator of soybean and sesbania plants in order to identify the presence of fungicide, herbicide and insecticide in irrigation water by means of fluorescence analysis. Complementary techniques were evaluated, such as stomatal conductance and root length. The monitoring of stomatal conductance was efficient to indicate the presence of pesticides in the irrigation of soybean and sesbania plants. A reduction in root length was observed for both soybean and sesbania plants, with the greatest reduction caused by the use of glyphosate. There were changes in the F685/F735 fluorescence ratio for both plants irrigated with fungicide, herbicide and insecticide in relation to the plants of the control group. From the images of *maximum QY* and *Rfd*, it was possible to verify differences between the plants irrigated with different concentrations of pesticides and ones of the respective control groups. The results indicate that soybean and sesbania plants evaluated in terms of fluorescence parameters have the potential to function as bioindicators of the presence of pesticides in water.

Keywords: Plants; Fluorescence; Herbicide; Fungicide; Insecticide; Bioindicator.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expansão da fronteira agrícola no Brasil ao longo do tempo.....	25
Figura 2 – (a) Área, produtividade, produção total de grãos e (b) produção total de alguns estados brasileiros.....	25
Figura 3 – Projeção da produtividade e área plantada de grãos.....	26
Figura 4 – Porcentagem de produção total por produto referente ao ano de 2016.....	26
Figura 5 – Plântulas de soja em estágio VE (estádio vegetativo de emergência).....	27
Figura 6 – Plântulas de soja com suas estruturas de crescimento.....	28
Figura 7 – (a) Plântula de sesbania jovem e (b) planta de sesbania adulta.....	30
Figura 8 – O transporte de prótons e elétrons nas membranas dos tilacóides.....	32
Figura 9 – Representação do ciclo de Calvin.....	33
Figura 10 – Estrutura química do glifosato.....	34
Figura 11 – A via do chiquimiato para síntese dos aminoácidos essenciais.....	35
Figura 12 – Estrutura química do difenoconazol.....	36
Figura 13 – Estrutura química do metomil.....	37
Figura 14 – Representação do estômato.....	39
Figura 15 – Diagrama de um corte transversal de uma raiz típica.....	41
Figura 16 – Diagrama de Jablonski simplificado. S são os níveis de energia no estado singleto e T no estado triplete; h é a constante de Planck e ν_A , ν_F e ν_P são as frequências das radiações da absorção, fluorescência e fosforescência, respectivamente.....	43
Figura 17 – Ilustração da disposição dos vasos e de plantas de soja na bandeja.....	48
Figura 18 – Casa de vegetação onde as plantas foram cultivadas durante os experimentos....	49
Figura 19 – Representação da região onde as sementes de sesbania foram lixadas para quebra da dormência.....	50
Figura 20 – Folhas de uma planta de soja mostrando o cotilédone, unifólio e trifólio.....	52
Figura 21 – Planta de sesbania mostrando o primeiro, segundo e terceiro protófilo.....	52
Figura 22 – Câmera de infravermelho usada nos experimentos de imagem térmica.....	53
Figura 23 – Face adaxial e abaxial da folha.....	54
Figura 24 – (a) Determinação da condutância estomática e (b) Ilustração da posição da folha para determinação da condutância estomática.....	54
Figura 25 – Fluorímetro portátil.....	55

Figura 26 – Espectrofotômetro de absorção molecular utilizado no ajuste da concentração de clorofila nos extratos.....	56
Figura 27 – Aparato experimental utilizado nos experimentos de fluorescência dos extratos de clorofila utilizando fluorímetro portátil.....	57
Figura 28 – (a) Fluorímetro por imagem e (b) interface do <i>software</i> usado na obtenção e análise das medidas das folhas do trifólio de uma planta de soja.....	57
Figura 29 – Cinética característica da emissão de fluorescência. F_0 : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro. <i>PS</i> : pulso saturante. F_m : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro. F_p : pico de fluorescência no início da iluminação. F' : fluorescência da planta adaptada à luz. F_m' : fluorescência máxima da planta adaptada à luz. F_0' : fluorescência mínima no término da cinética.....	58
Figura 30 – Ilustração da medida das raízes.....	59
Figura 31 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de soja; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	62
Figura 32 – Razão F685/F735 com excitação em (a) 405 nm e (b) 532 nm para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).....	64
Figura 33 – <i>QY</i> máximo para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).....	65
Figura 34 – <i>Rfd</i> para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).....	65
Figura 35 – Fotos da raiz de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	66

Figura 36 – Comprimento da raiz de plantas de soja irrigadas com soluções contendo diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=5); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; N destaca grupos que apresentaram plantas totalmente necrosadas.....	67
Figura 37 – Condutância estomática de plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=5); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	70
Figura 38 – Fotos e imagens térmicas das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação, sendo as imagens da esquerda referente ao unifólio e as da direita referente ao trifólio.....	71
Figura 39 – Temperatura das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	72
Figura 40 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 405 nm, irrigadas diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	73
Figura 41 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 532 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	74
Figura 42 – Razão F685/F735, com excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq$	

0,05; barras de erro indicam $\pm$ SE (n=10); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	76
Figura 43 – Razão F685/F735, com excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm$ SE (n=10); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	77
Figura 44 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.....	79
Figura 45 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm.....	80
Figura 46 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 1075 ppm.....	81
Figura 47 – <i>QY máximo</i> das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm$ SE (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio). c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	83
Figura 48 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.....	85
Figura 49 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol. c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm.....	86

Figura 50 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil. c é a concentração indicada pelo fabricante, 1075 ppm.....	87
Figura 51 – <i>Rfd</i> das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio). c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	88
Figura 52 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	90
Figura 53 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de soja, com excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	92
Figura 54 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de sesbania; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	94
Figura 55 – Fotos da raiz de plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	95
Figura 56 – Comprimento da raiz de plantas de sesbania irrigadas com (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. N indica grupos com plantas totalmente necrosadas.....	96

Figura 57 – Condutância estomática de plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.....	97
Figura 58 – Fotos e imagens térmicas das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação.....	98
Figura 59 – Temperatura das folhas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	98
Figura 60 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de sesbania, sob excitação em 405 nm, irrigadas com soluções de (a) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	99
Figura 61 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de sesbania, sob excitação em 532 nm, irrigadas com soluções de (a) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	99
Figura 62 – Razão F685/F735, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de sesbania. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.....	100
Figura 63 – Razão F685/F735, sob excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de sesbania. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante,	

500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.....	100
Figura 64 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	101
Figura 65 – <i>QY máximo</i> das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10); c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	102
Figura 66 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil; c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	103
Figura 67 – <i>Rfd</i> das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10); c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	104
Figura 68 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de sesbania irrigadas com soluções de contendo diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	105
Figura 69 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de sesbania, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e plantas que não se desenvolveram, respectivamente.....	105
Figura 70 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de soja; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	107

Figura 71 – Fotos da raiz de plantas de soja irrigadas diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	108
Figura 72 – Comprimento da raiz de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=5); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. N destaca grupos que apresentaram plantas totalmente necrosadas.....	109
Figura 73 – Condutância estomática de plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=5); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	110
Figura 74 – Fotos e imagens térmicas das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação.....	111
Figura 75 – Temperatura das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	112
Figura 76 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 405 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	114
Figura 77 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 532 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	115

Figura 78 – Razão F685/F735, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	116
Figura 79 – Razão F685/F735, sob excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	117
Figura 80 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.....	119
Figura 81 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm.....	120
Figura 82 – Imagens associadas ao <i>QY máximo</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 1075 ppm.....	121
Figura 83 – <i>QY máximo</i> das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	123
Figura 84 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.....	125

Figura 85 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol; c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm.....	126
Figura 86 – Imagens associadas ao <i>Rfd</i> para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil; c é a concentração indicada pelo fabricante, 1075 ppm.....	127
Figura 87 – <i>Rfd</i> das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10 para unifólio e n=15 para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.....	128
Figura 88 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	129
Figura 89 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de soja, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN e N destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, respectivamente.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações utilizadas; c representa a concentração indicada pelos fabricantes do Score [®] , do Roundup [®] e Lannate [®] : 500, 3600 e 1075 ppm, respectivamente.....	51
Tabela 2 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido a partir da combinação bioindicador (soja)-parâmetro avaliado. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	93
Tabela 3 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido a partir da combinação bioindicador (sesbania)-parâmetro avaliado. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	106
Tabela 4 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido pela combinação bioindicador (soja)-parâmetro avaliado nas concentrações intermediárias. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.....	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido Abscísico
ACCase	Acetilcoenzima – A Carboxilase
ALS	Acetolactato Sintase
AMPA	Aminomethylphosphonic Acid
ANOVA	Analysis of Variance
<i>au</i>	Mutante Aurea
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina tri-fosfato
c	Concentração Indicada Pelo Fabricante
CCD	Charge-Coupled Device
<i>Chl a + b</i>	Clorofila Total
Cit bf	Citocromo b ₆ f
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DT ₅₀	Disappearance Time
EPSPS	5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F685/F735	Razão de Fluorescência nos Comprimentos de Onda 685 e 735 nm
F ₀	Fluorescência Inicial
F ₀ '	Fluorescência Mínima no Término da Cinética
F'	Fluorescência da Planta Adaptada à Luz
Fd	Ferredoxina
F _m	Fluorescência Máxima
F _m '	Fluorescência Máxima da Planta Adaptada à Luz
F _p	Pico de fluorescência no início da iluminação
FSI	Fotossistema I
FSII	Fotossistema II
i.a.	Ingrediente ativo
IAA	Auxina Ácido Indolilacético
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
K _{ow}	Coeficiente de partição octanol-água
LED	Light Emitting Diode
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato na forma reduzida
NETD	Noise Equivalent Temperatura Difference
PC	Plastocianina
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PQ	Plastoquinona
PS	Pico Saturante
Phy A e B	Fitocromos A e B
QY	Quantum Yield
Rfd	Diminuição Relative da Fluorescência
RR	Resistente ao Roundup
SE	Standard error
UV-Vis	Luz Ultravioleta e Visível
VE	Estádio Vegetativo de Emergência
Yg-2	Mutante Yellow Green-2

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	22
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
2.1 Agricultura.....	24
2.1.1 Soja.....	27
2.2 Sesbania.....	29
2.3 Fotossíntese.....	30
2.4 Pesticidas.....	33
2.4.1 Herbicida.....	34
2.4.2 Fungicida.....	36
2.4.3 Inseticida.....	37
2.5 Plantas como bioindicador.....	38
2.5.1 Condutância estomática.....	39
2.5.2 Temperatura foliar.....	40
2.5.3 Raiz.....	41
2.5.4 Fluorescência.....	42
2.5.4.1 Fluorescência da clorofila.....	43
3 - OBJETIVOS.....	47
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos.....	47
4 - METODOLOGIA.....	48
4.1 Cultivo das plantas.....	48
4.1.1 Soja.....	48
4.1.2 Sesbania.....	50
4.1.3 Concentrações usadas nos experimentos.....	51
4.2 Folhas utilizadas nas medições.....	51
4.3 Extração da clorofila.....	53
4.4 Técnicas.....	53
4.4.1 Imagem térmica.....	53
4.4.2 Condutância estomática.....	54
4.4.3 Fluorescência utilizando o fluorímetro portátil.....	55
4.4.3.1 Análises <i>in vivo</i>	55
4.4.3.2 Análises no extrato.....	56

4.4.4 Imagem de fluorescência.....	57
4.4.5 Comprimento de raiz.....	59
4.5 Análise estatística.....	59
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 SOJA.....	61
5.1.1 Sintomas visuais.....	61
5.1.2 Métodos analíticos.....	63
5.2 SESBANIA.....	94
5.2.1 Sintomas visuais.....	94
5.2.2 Métodos analíticos.....	95
5.3 SOJA EM CONCENTRAÇÕES INTERMEDIÁRIAS.....	107
5.3.1 Sintomas visuais.....	107
5.3.2 Métodos analíticos.....	108
6 - CONCLUSÕES.....	133
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	135

1 - INTRODUÇÃO

A importância da água para a existência da vida na Terra é indiscutível. Esse recurso natural é fundamental para o desenvolvimento de diversas atividades antrópicas tais como, produção de alimentos, de energia, de bens de consumo, de transporte e de lazer, assim como para a manutenção e o equilíbrio ambiental dos ecossistemas terrestres, além da manutenção dos sistemas biológicos.¹

Contudo, os recursos hídricos têm uma capacidade de regeneração limitada. Quando os limites da quantidade ou da qualidade são ultrapassados pela intervenção humana, pode se caracterizar uma situação de desequilíbrio, escassez ou degradação da qualidade da água disponível, tal como ocorre hoje no Brasil.²

A qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido alterada em diferentes escalas nas últimas décadas, processo desencadeado pela complexidade dos usos múltiplos da água pelo homem, acarretando degradação ambiental significativa e diminuição considerável na disponibilidade de água de qualidade.³

A saúde de um corpo d'água é afetada pelas atividades humanas desenvolvidas nas bacias hidrográficas, incluindo: (1) lançamento de esgotos domésticos; (2) recepção da água de chuva, que escoar por áreas agrícolas e sobre solos sujeitos à erosão; (3) recepção de água de chuva proveniente de regiões com poluição atmosférica como, por exemplo, chuvas ácidas; (4) percolação do chorume de lixões próximos aos corpos de água; e (5) águas contaminadas por xenobióticos, compostos orgânicos resistentes e traços de produtos farmacêuticos.⁴

Os principais poluentes decorrentes da atividade agrícola são os pesticidas. Os produtos empregados no controle de pragas atuam de maneira pouco seletiva, destruindo indiferentemente espécies nocivas e úteis. Existem pesticidas extremamente tóxicos, mas instáveis, de forma que podem provocar danos imediatos, mas podem não causar poluição em longo prazo. Um dos problemas do uso dos pesticidas é o acúmulo ao longo das cadeias alimentares. Os inseticidas quando usados de forma indevida, acumulam-se no solo, e os animais se alimentam da vegetação prosseguindo o ciclo de contaminação. Com as chuvas, os produtos químicos usados na composição dos pesticidas se infiltram no solo, contaminando lençóis freáticos, bem como escorrem para os rios, contaminando-os.⁵ Portanto, o desenvolvimento da agricultura pode também contribuir para a poluição do solo e das águas. Fertilizantes sintéticos e pesticidas (inseticidas, fungicidas e herbicidas), usados em quantidades abusivas nas lavouras, poluem o solo e as águas dos rios, onde intoxicam e matam diversos seres vivos dos ecossistemas.⁵

Considerando a possibilidade de que os agrotóxicos utilizados nas principais culturas, como soja, algodão e milho, podem gerar resíduos que contaminam o meio ambiente, faz-se necessária uma análise preliminar sobre a possibilidade de contaminação das águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos utilizados nas principais regiões agrícolas do país.⁶

Atualmente já está bem consolidado junto à comunidade científica e agências de controle que as plantas podem ser eficazmente utilizadas como bioindicadores da poluição ambiental. A análise de plantas tem por muitos anos sido uma alternativa eficaz de realização de pesquisa ecológica em áreas urbanas.^{7, 8}

Plantas de soja e sesbania foram utilizadas nesse trabalho, aliadas a técnicas de espectroscopia de fluorescência, como possíveis bioindicadores da presença de herbicida, fungicida e inseticida contidos na água de irrigação. Os trabalhos relatados na literatura normalmente são realizados a fim de avaliar efeitos dos pesticidas na germinação e estados de emergência das plantas. Para isso, os autores utilizam como modo de aplicação dos pesticidas, a aspersão, injeção nas folhas ou tratamento nas sementes, sendo esta realizada apenas uma vez. Nosso trabalho propõe utilizar técnicas de fluorescência para avaliar possíveis efeitos de pesticidas em plantas em estágio desenvolvido, irrigando-as com tais produtos, o que o torna mais desafiador que os outros métodos de aplicação, pois para causar possíveis alterações, a planta precisa absorvê-los pela raiz. Além do mais, a forma de irrigação utilizada, duas vezes por semana no período de quatro semanas, nos dá um indicativo dos efeitos de bioacumulação dos pesticidas investigados.

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

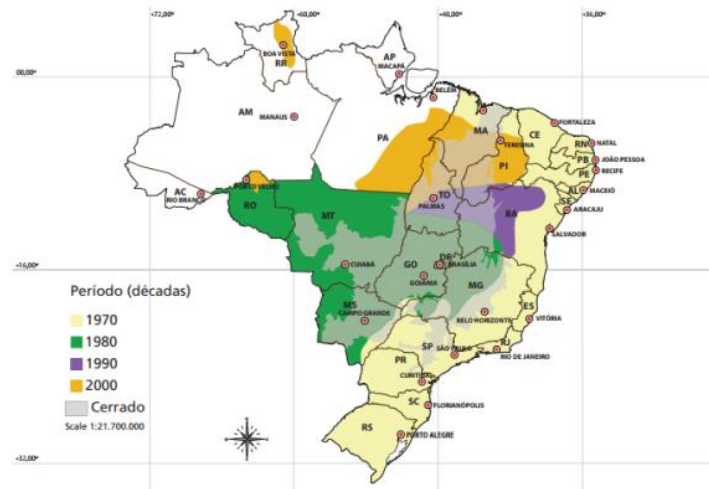
2.1 Agricultura

No Brasil, os projetos políticos voltados para o desenvolvimento econômico por meio de uma industrialização capitalista planejada originaram-se na década de 1930, tornando-se hegemônicos nos anos 1950. Para alcançar os objetivos de um desenvolvimento industrial acelerado e autossustentado, o Estado priorizou políticas públicas e investimentos maciços em programas de infraestrutura, energia, transportes e indústrias. Na agricultura, o desenvolvimento deveria estar em consonância com a modernização do território.⁹

Somente a partir de meados da década de 1960, a agricultura brasileira inicia o processo de modernização, com a chamada Revolução Verde. Emergem, nessa década, com o processo de modernização da agricultura, novos objetivos e formas de exploração agrícola, proporcionando transformações tanto na pecuária, quanto na agricultura. Como consequência do processo ocorre a acirrada concorrência no que diz respeito à produção.¹⁰

Durante os anos 1960, havia menos diversidade produtiva (agrícola e pecuária), bem como elevado risco de desabastecimento interno. Desde os anos 1990, a produção mundial apresentou uma dinâmica estável, mas a agricultura brasileira experimentou uma enorme expansão em seus indicadores econômicos. De importador líquido de alimentos para autossuficiente nos mercados interno e externo, mudanças institucionais foram essenciais para promover processos de pesquisa e desenvolvimento (P&D) voltados à compreensão da agricultura tropical. Tecnologias originadas em outros países não poderiam ser prontamente adaptadas ao cenário nacional. Nos últimos cinquenta anos, a produção agrícola se transformou significativamente, expandindo a fronteira agrícola no Brasil (Figura 1).¹¹

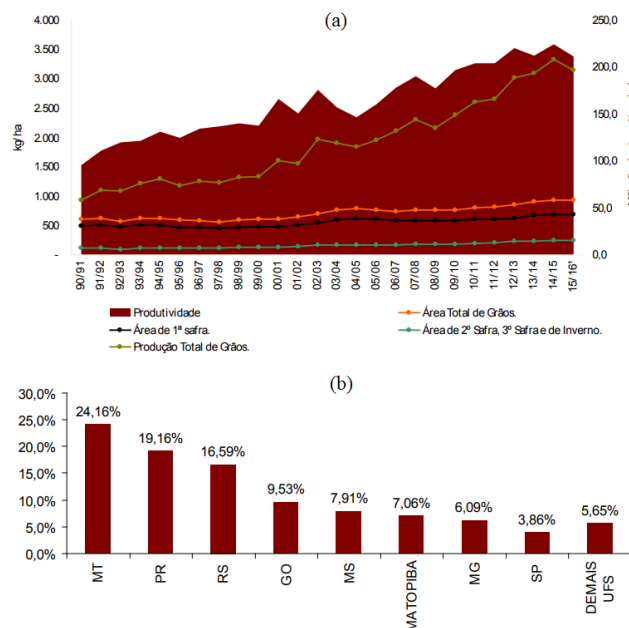
Figura 1 – Expansão da fronteira agrícola no Brasil ao longo do tempo.



Fonte: Ibama e Vieira.^{12, 13}

Um levantamento da safra brasileira de grãos aponta que a área plantada em 2016, chegou a 58,17 milhões de hectares, o que representou um aumento de 0,4% em relação à safra anterior.¹⁴ De 1990 a 2016 houve um aumento na produtividade em aproximadamente 2000 kg.ha⁻¹, como apresentado na figura 2a, sendo que Mato Grosso se destaca como o maior produtor de grãos do país (Figura 2b).

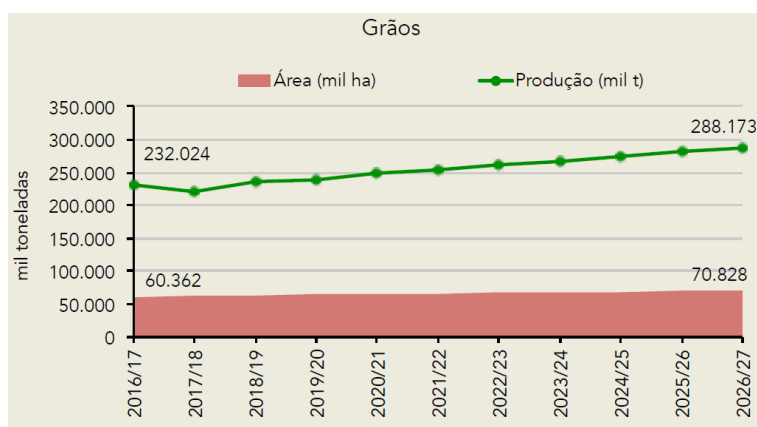
Figura 2 – (a) Área, produtividade, produção total de grãos e (b) produção total de alguns estados brasileiros.



Fonte: Conab.¹⁴

Utilizando modelos econométricos específicos (conjunto de ferramentas estatísticas com o objetivo de entender a relação entre variáveis econômicas através da aplicação de um modelo matemático), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realizou uma projeção de longo prazo, referente aos anos 2016/17 a 2026/27, da produtividade de grãos e da área plantada no Brasil, mostrando que ambos tendem a aumentar ainda mais nesse período (Figura 3).¹⁵

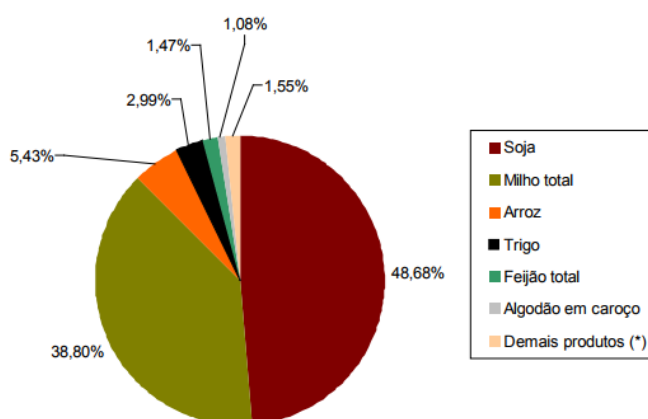
Figura 3 – Projeção da produtividade e área plantada de grãos.



Fonte: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.¹⁵

A cultura da soja, responsável por 57% da área cultivada do país em 2016, permanece como principal responsável pelo aumento de área (Figura 4).¹⁴

Figura 4 – Porcentagem de produção total por produto referente ao ano de 2016.



Fonte: Conab.¹⁴

2.1.1 Soja

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma planta da família das leguminosas originária da Ásia. A planta de soja é uma dicotiledônea, cuja estrutura é formada pelo conjunto de raízes e parte aérea. O desenvolvimento pode ser dividido em dois períodos: o vegetativo, da semeadura até o florescimento, e o reprodutivo, do florescimento à colheita.¹⁶

Os primórdios das raízes e da parte aérea já se encontram presentes na semente. Durante a germinação e logo após a emergência da plântula (Figura 5) ocorre o desenvolvimento do sistema radicular seminal, o desenrolamento das folhas primárias (seminais) e o desenvolvimento do meristema apical que dará origem à parte aérea. Este conjunto faz com que a plântula passe a absorver nutrientes do solo e a produzir fotoassimilados para seu crescimento e desenvolvimento. A emergência ocorre de 7 a 10 dias após a semeadura.¹⁶

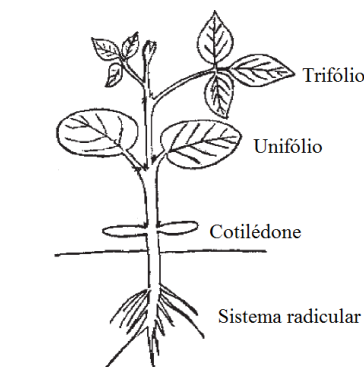
Figura 5 – Plântulas de soja em estágio VE (estádio vegetativo de emergência).



Fonte: Farias et al.¹⁷

O nó é a parte do caule onde a folha se desenvolve e é usado para determinação dos estádios vegetativos. Os nós cotiledonares (cotilédones) são opostos no caule e cada um deles possui um cotilédone (Figura 6). Os nós imediatamente acima são os nós das folhas unifoliadas (unifólios) e são, também, opostos no caule e cada um deles possui uma folha unifoliada. Todos os nós acima dos unifoliados são alternados e possuem folhas trifoliadas (trifólios) como apresentado na figura 6.¹⁷

Figura 6 – Plântulas de soja com suas estruturas de crescimento.



Fonte: Adaptada pelo autor.¹⁶

A soja se adapta melhor às regiões onde as temperaturas oscilam entre 20 e 30°C, sendo 30 °C a temperatura ideal para o seu desenvolvimento.¹⁸

A temperatura exerce influência sobre todas as fases fenológicas da planta. Temperaturas do ambiente inferiores a 15 °C provocam atraso na fase vegetativa, causando problemas relacionados à absorção de nutrientes, à translocação (movimento de soluto dentro da planta), à atividade fotossintética e à fixação simbiótica do N₂, diminuindo assim, a taxa de crescimento de plantas, que se apresentam menores, menos vigorosas e menos produtivas. Por outro lado, temperaturas superiores a 35°C acarretam redução da fotossíntese, aumento da fotorrespiração, aumento da respiração, visualizando-se reduções quantitativas como: encurtamento dos entrenós, menor formação de nós, menor atividade fotossintética, inibição da nodulação e redução da produtividade.¹⁹

Plantas daninhas dos biótipos *Bidens spp*, *Euphorbia heterophylla* e *Brachiaria plantaginea* são frequentes em áreas de produção de soja. Os herbicidas utilizados para eliminá-las deveriam ser inibidores da enzima acetolactato sintase (ALS) e da acetilcoenzima – A Carboxilase (ACCCase). Porém, estas plantas daninhas tornaram-se resistentes a tais produtos, o que inviabilizou o cultivo da soja convencional, pois nesse tipo de cultivo não é possível utilizar o glifosato, que se trata de um herbicida não seletivo e acabaria por destruir a cultura de soja. Despertou-se então o interesse pela soja transgênica, por essa ser resistente ao herbicida glifosato que passou a ser utilizado para acabar com as plantas daninhas.²⁰

O glifosato inibe especificamente a EPSPS (do inglês, *5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate*) que catalisa a condensação do ácido chiquimico e do fosfato piruvato, evitando assim, a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina.²¹

A enzima EPSPS de todas as plantas, fungos e da maioria das bactérias isoladas e caracterizadas até hoje é inibida pelo glifosato. O glifosato é um potente inibidor

submicromolar dessa enzima. Por sua vez, existem bactérias que podem superproduzir a EPSPS e se desenvolver na presença de concentrações de glifosato que seriam tóxicas para outros organismos. Assim, a transferência do gene que confere tolerância ao glifosato a uma planta suscetível faz com que ela se torne resistente ao glifosato.²²

A principal razão para adoção da soja resistente a herbicida seria a redução dos custos de produção, oriunda da facilidade de manejo da cultura, em razão de melhor controle de ervas daninhas.²³

Embora muitas mudanças e inovações surjam conforme as necessidades do mercado, entre elas o advento das culturas transgênicas, resistentes a algumas pragas, o uso de herbicidas se destaca, visto que a maioria destas inovações não impede o florescimento de ervas daninhas.²⁴ Por esta razão, o comércio mundial de pesticidas cresce a cada ano.²⁴ Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da UFPR, divulgados durante o 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília (DF), em abril de 2012, enquanto, nos últimos dez anos, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de pesticidas.²⁵

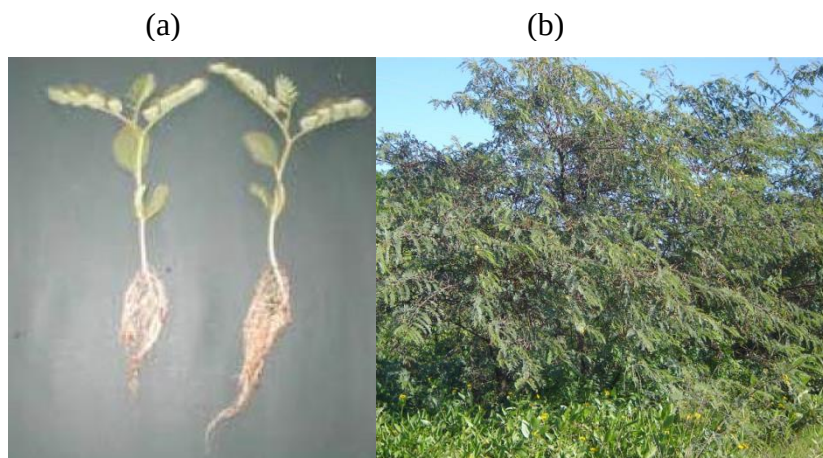
Por sua vez, existe uma concentração do mercado de pesticidas em determinadas categorias de produtos. Os herbicidas, por exemplo, representaram 45% do total de agrotóxicos comercializados. Os fungicidas respondem por 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos 29%.²⁶

2.2 Sesbania

A sesbania (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers) é uma espécie arbórea de ocorrência natural no Brasil; ela é encontrada em margens de estradas, terrenos baldios, cavas de extração de argila e em locais próximos ao mar e rios. A sesbania tem cerca de 6 m de altura, 25 cm de diâmetro a altura do peito e 5 m de diâmetro de copa, com tempo de vida de 8 a 9 anos desenvolvendo-se naturalmente em terrenos úmidos.²⁷

O nó é a parte do caule onde a folha se desenvolve. Os nós cotiledonares (cotilédones) são opostos no caule e cada um deles possui um cotilédone,¹⁷ os nós imediatamente acima são os chamados protófilos. No primeiro par de protófilo, um deles é constituído de uma folha arredondada e bordo contínuo e o outro protófilo composto com 4 a 9 pares de folíolos opostos (Figura 7a).²⁸

Figura 7 – (a) Plântula de sesbania jovem e (b) planta de sesbania adulta.



Fonte: Araujo et al.^{28, 29}

A sesbania é capaz de germinar em solos enriquecidos com cobre, zinco e cromo. Esta espécie tem sido usada para revegetação de florestas ripícolas (próxima a rios), controle de erosão do solo e reabilitação de áreas degradadas. Além disso, o gênero sesbania foi descrito como um acumulador e tolerante a metais pesados com alta resistência a estresses bióticos e abióticos. Estudos anteriores com espécies sesbania em diferentes áreas apresentaram bons resultados para fitorremediação, acumulando quantidades significativamente maiores de metais pesados nas raízes do que nos brotos, ou seja, essa planta é capaz de acumular metais pesados, promovendo a purificação do solo.³⁰

A sesbania foi utilizada nesse trabalho por ser uma planta nativa e encontrada em margens de rios, vislumbrando a sua potencial utilização enquanto bioindicador presente em regiões irrigadas por água contaminada com pesticidas.

2.3 Fotossíntese

O termo fotossíntese significa, literalmente, “síntese usando a luz”. Os organismos fotossintéticos captam e utilizam a energia solar para oxidar H_2O , liberando O_2 , e para reduzir CO_2 , produzindo compostos orgânicos, primariamente açúcares (Equação 1). Esta energia estocada nas moléculas orgânicas é utilizada nos processos celulares da planta e serve como fonte de energia para todas as formas de vida.³¹



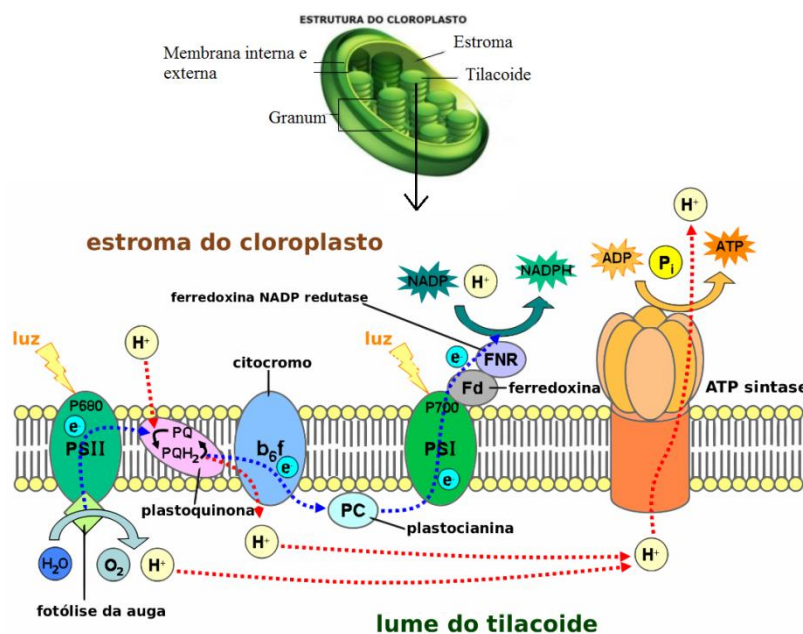
A fotossíntese acontece na organela subcelular conhecida como cloroplasto. O aspecto mais marcante da estrutura do cloroplasto é seu extenso sistema de membranas internas conhecidas como tilacóides. Toda a clorofila está contida nesse sistema de membranas, que é o local das reações luminosas da fotossíntese.³² As clorofilas e os pigmentos acessórios de captação de luz localizados na membrana dos tilacóides estão sempre associados em ligações não-covalentes, porém de forma altamente específica com as proteínas. Ambas as clorofilas do centro de reação e da antena associam-se às proteínas que estão organizadas no interior das membranas, de modo a otimizar a transferência de energia nos complexos antena e a transferência de elétrons nos centros de reação.³²

A sequência de pigmentos dentro da antena canaliza a energia absorvida em direção ao centro de reação. Todas as células fotossintetizantes, exceto as bacterianas, contêm dois tipos de clorofila, a clorofila *a* e a clorofila *b*, além dos carotenoides que são pigmentos acessórios na fotossíntese. A luz absorvida por carotenoides ou clorofila *b* é rapidamente transferida para a clorofila *a* e outros pigmentos antena intimamente associados ao centro de reação.³²

Nos cloroplastos, a luz é absorvida pelas moléculas de clorofila e a energia é colhida por duas diferentes unidades funcionais, conhecidas como fotossistemas (FS). A energia da luz absorvida impulsiona a transferência de elétrons (Figura 8) através de uma série de compostos que agem como doadores e aceptadores de elétrons.³¹

A fotossíntese é um processo que se dá em duas etapas interdependentes: a etapa fotoquímica, onde a energia luminosa absorvida pelos pigmentos fotossintéticos é convertida em adenosina tri-fosfato (ATP) e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH), e a etapa bioquímica, onde ocorre a assimilação de CO₂.³¹

Figura 8 – O transporte de prótons e elétrons nas membranas dos tilacóides.



Fonte: Adaptada pelo autor.^{33, 34}

Moléculas de clorofila são excitadas por fótons e, no estado singlete excitado, a clorofila atua como um eficiente redutor. Assim, moléculas excitadas transferem elétrons para uma molécula receptora, resultando num processo de separação de cargas. A partir da molécula receptora reduzida, tem início um fluxo de elétrons, envolvendo diversos carreadores. Em última instância, esses elétrons participam da redução de $NADP^+$ a NADPH. O estado oxidado da clorofila do centro de reação promove a foto-oxidação da água e libera O_2 . Acoplado ao fluxo de elétrons dos cloroplastos, ATP é formado por meio do processo conhecido como fotofosforilação.³⁵

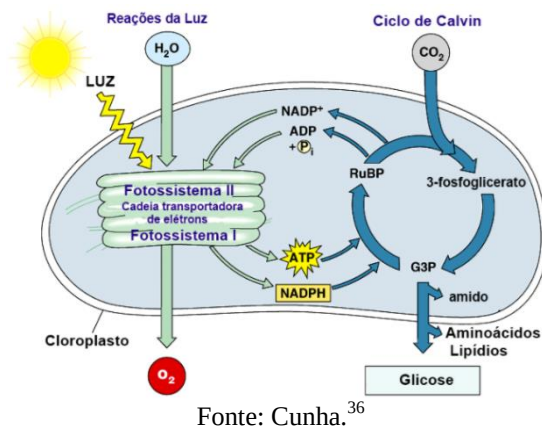
O processo de armazenamento fotossintético de energia se dá com a participação de quatro complexos proteicos diferentes e que atuam de modo integrado. Esses complexos que participam da fotossíntese são o fotossistema I (FS I), fotossistema II (FS II), o complexo citocromo b_6f (Cit b_f) e o complexo ATP sintase. A interligação entre os complexos fotossintéticos envolvidos no fluxo de elétrons é mediada pelo citocromo b_6f e por carreadores móveis como a plastoquinona (PQ), a plastocianina (PC) e a ferredoxina (Fd). O fluxo fotossintético de elétrons entre os fotossistemas gera um gradiente de prótons (H^+) que impulsiona a síntese de ATP.³⁵

Os FSI e FSII são grandes complexos supramoleculares constituídos por múltiplas subunidades de proteínas/pigmentos. Cada um dos fotossistemas tem um centro de reação e se liga a um complexo de captação de luz (complexo antena). O centro de reação do FSII é

denominado P680 (absorção máxima em 680 nm) e o do FSI é chamado P700 (pico de absorção em 700 nm).³⁵

Na fase bioquímica, a fixação de CO₂ é catalisada por uma enzima denominada *ribulose bifsosfato carboxilase/oxigenase* (rubisco). Ao catalisar a fixação de CO₂ atmosférico, a rubisco desencadeia uma rede de reações bioquímicas que geram os carboidratos, as proteínas e os lipídios que sustentam as plantas (Figura 9).³⁵

Figura 9 – Representação do ciclo de Calvin.



O ciclo de Calvin acontece em três estágios³²:

- Carboxilação do aceptor de CO₂, ribulose-1,5bifosfato, formando duas moléculas de 3-fosfoglicerato, o primeiro intermediário estável do ciclo de Calvin;
- Redução do 3-fosfoglicerato, formando gliceraldeído-3-fosfato (G3P), um carboidrato;
- Regeneração do aceptor de CO₂, ribulose-1,5bifosfato, a partir do gliceraldeído-3-fosfato.

2.4 Pesticidas

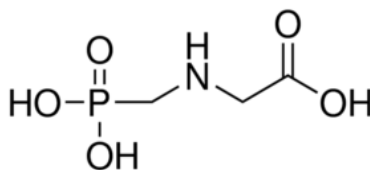
A produção de soja está entre as atividades que apresentaram elevadas taxas de crescimento.³⁷ Entre os principais fatores que limitam a produtividade da soja estão as plantas daninhas, e um grande número de doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus. Para resolver tais problemas, o controle químico com pesticidas tem sido o principal método de controle.³⁸

Pesticidas são quaisquer compostos destinados à agricultura e que tem como ação a prevenção ou redução dos efeitos causados por pragas, doenças, ervas daninhas, entre outros. Esses compostos incluem todos os inseticidas, fungicidas, herbicidas e outras substâncias utilizadas como reguladores de crescimento, desfolhantes ou dissecantes.⁶

2.4.1 Herbicida

O glifosato (princípio ativo do Roundup®) é o mais comum herbicida em sistemas de cultivo; trata-se de um herbicida não seletivo e de ação sistêmica (Figura 10).³⁹ Em condição ambiente, o glifosato é muito solúvel em água (12 g.L^{-1} a 25°C) e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol.⁴⁰ A solubilidade em água é muito importante, pois influencia no comportamento, transporte e destino desse composto no ambiente. Esse parâmetro indica a tendência do agrotóxico ao carreamento superficial no solo, fazendo com que o mesmo possa atingir as águas superficiais.⁴¹

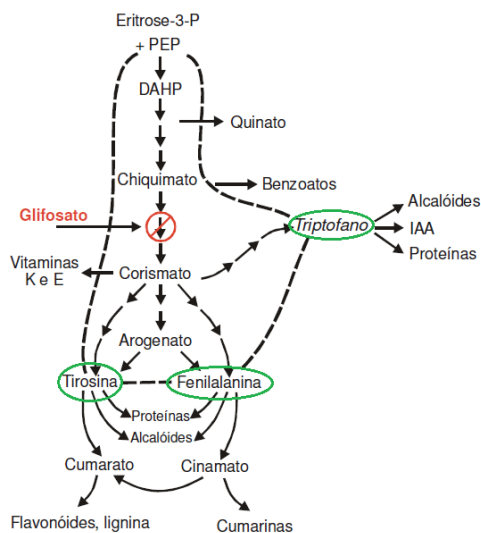
Figura 10 – Estrutura química do glifosato.



O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) indica a tendência dos compostos em se distribuir em regiões ambientalmente hidrofóbicas. Essa propriedade demonstra a tendência dos pesticidas à bioconcentração e traz indicativos sobre a acumulação em tecidos vivos e matéria orgânica, ou seja, a capacidade de transporte na cadeia alimentar.⁴¹ O K_{ow} do glifosato é de 0,0017, ou seja, esse herbicida não tende a se acumular em tecidos vivos.⁴⁰ O tempo de meia vida (DT_{50} , do inglês, disappearance time) também é um critério usado para determinar os efeitos ambientais relacionados ao potencial de lixiviação e características de degradação,⁴¹ sendo o DT_{50} no solo do glifosato de 32 dias e em água de 12 dias.⁴⁰

Como citado anteriormente, o glifosato impede a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (Figura 11). Ele também causa efeitos adversos sobre a fotossíntese, o metabolismo de carbono e a translocação de sacarose nas plantas.²¹

Figura 11 – A via do chiquimiato para síntese dos aminoácidos essenciais.



Fonte: Adaptada pelo autor.²¹

A interrupção da biossíntese dos aminoácidos aromáticos em plantas é uma estratégia atrativa para o desenvolvimento de herbicidas com características ambientais favoráveis. Isto porque, apesar da rota do chiquimato estar presente em plantas e em muitos microrganismos, ela é completamente ausente em mamíferos, peixes, pássaros, répteis e insetos. Estas formas de vida não dependem da rota do chiquimato porque retiram da dieta os produtos aromáticos que necessitam. Já as plantas são obrigadas a produzir estes aminoácidos essenciais para sobreviver e multiplicar.²²

Porém, a utilização ampla de tal produto, afeta principalmente o ecossistema, atingindo e prejudicando organismos não alvos, já que se trata de um herbicida não seletivo. Em mudas de Pequi (*Caryocar brasiliense*), árvore nativa do cerrado brasileiro, submetidas a seis doses crescentes de glifosato, as taxas fotossintéticas, transpiratórias e a condutância estomática reduziram-se em mais de 50% em relação à testemunha, na maior dose aplicada (1500 g i.a. ha⁻¹).⁴²

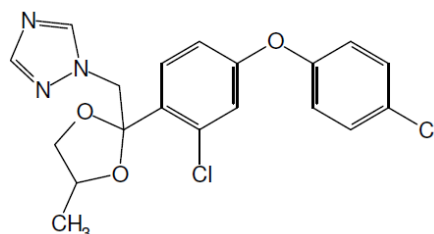
Devido ao fato das plantas transgênicas possuírem materiais genéticos de outros organismos vivos introduzidos de forma artificial, ampliaram-se, também, as discussões a respeito dos potenciais riscos e benefícios decorrentes dessa moderna tecnologia empregada na agricultura.⁴³ Dentre os produtos, destaca-se a soja com resistência ao herbicida glifosato, cultura transgênica de maior exploração no mundo, beneficiária de significativos avanços na pesquisa em biotecnologia que resultaram na criação de variedades de soja resistente, conhecidas como soja RR (Resistente ao Roundup). Tal inovação proporcionou o uso deste herbicida na cultura com maior eficácia e amplo espectro de controle de plantas daninhas.³⁹

2.4.2. Fungicida

A ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow foi relatada pela primeira vez no Brasil no final da safra de 2000/01, representando uma grande ameaça para os países do continente americano. O controle da ferrugem da soja compreende diversas medidas conjuntas. Quando a doença já está ocorrendo, o controle químico com fungicidas é, até o momento, o principal método de controle.⁴⁴

O difenoconazol (princípio ativo do fungicida Score[®]) é um fungicida sistêmico de amplo espectro utilizado para controle de doenças, como antracnose e cancro da haste, em muitas frutas, vegetais, cereais e outras colheitas de campo. Tem ação preventiva e curativa. O difenoconazol age na inibição da biossíntese de ergosterol e tem como sítio primário de ação a demetilação (remoção de um grupo metil) de alguns esteróis.⁴⁵ Em condição ambiente, ele é pouco solúvel em água (15 mg L⁻¹ a 25 °C).⁴⁶ O difenoconazol é persistente, tendo o DT₅₀ no solo de 120 dias e 1053 dias em água e o K_{ow} é de 4,2, apresentando assim alta tendência de se acumular em tecidos vivos.⁴¹

Figura 12 – Estrutura química do difenoconazol.



Fungicidas sistêmicos são aqueles em que o princípio ativo é absorvido pela planta e translocado para partes distantes da mesma do local de aplicação e tem a capacidade de inibir a infecção do patógeno. Ao ser aplicado na concentração recomendada, o fungicida, é prontamente assimilado pela planta e translocado, inibindo o desenvolvimento das lesões locais ou à distância do local de aplicação sem, contudo, afetar os tecidos do hospedeiro, em tese, matando o patógeno onde ele estiver instalado na planta. Ademais, este fungicida não deve sofrer rápida degradação e, ao se degradar, seus subprodutos deverão ser também tóxicos ao patógeno.⁴⁷

Godoy e Canteri mostraram que o difenoconazol apresenta efeito protetor contra a ferrugem asiática em plantas de soja. Houve sintomas de fitotoxicidade do tipo engrossamento e escurecimento das folhas, no entanto, as plantas recuperaram seu desenvolvimento dez dias

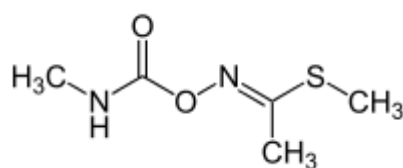
após o final do tratamento. Esta substância também se mostrou eficiente na redução dos sintomas, quando aplicados no período de incubação da doença.⁴⁸

Em relação ao meio ambiente, deve-se atentar para o fato de que alguns fungicidas não são biodegradáveis, outros se decompõem somente em longo prazo. Assim, fungicidas podem poluir o meio ambiente, colocando em risco a vida da fauna, rios, riachos, lagos e a população.⁴⁷

2.4.3 Inseticida

O metomil (princípio ativo do Lannate[®]) é um inseticida do grupo dos carbamatos utilizado no combate às pragas em diversos tipos de lavoura.⁴⁹ É bastante solúvel em água (500 g L⁻¹ à 25 °C) e insolúvel em solventes orgânicos. O DT₅₀ do metomil no solo é de 7 dias e na água de 6 dias e seu K_{ow} é de 1,24 indicando baixo potencial de se acumular em tecidos vivos.⁴⁰

Figura 13 – Estrutura química do metomil.



O metomil é muito utilizado para o controle químico do inseto-praga *Helicoverpa* (*Helicoverpa armigera*). Esta espécie se alimenta de folhas, caules e partes reprodutivas das plantas, causando danos diretos e indiretos em mais de 100 espécies de plantas cultivadas e silvestres.⁵⁰

Os inseticidas do grupo dos carbamatos são inibidores diretos da enzima acetilcolinesterase nas sinapses nervosas, causando um acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas provocando a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando então o inseto à fadiga e posteriormente, à morte.⁵¹

O metomil é efetivo de duas formas: como inseticida de contato, pois mata quando entra diretamente em contato com as espécies alvo, e como inseticida sistêmico, quando aplicado nas folhas, ramos, raízes e solos é absorvido e transportado para várias regiões das plantas, via xilema ou floema, atuando principalmente sobre insetos sugadores. De acordo com a

ANVISA, no Brasil, o metomil é usado em culturas de algodão, batata, brócolis, couve, milho, repolho, soja, tomate e trigo.⁴⁹

2.5 Plantas como bioindicadores

A qualidade da água e do solo pode ser monitorada a partir de bioindicadores, que são organismos vivos que sofrem mudanças em seu metabolismo a partir das alterações ambientais.^{52, 8} Nesse contexto as plantas vêm sendo utilizadas tanto para reduzir os impactos ambientais como para atuar como bioindicadores de contaminantes.⁵²

A utilização de plantas como indicadores de acumulação de contaminantes é um conceito bastante antigo. De fato, quando comparado com animais bioindicadores, as plantas possuem uma série de vantagens. Sua nutrição mineral é estreitamente dependente das características do solo, são organismos que estão presentes em praticamente todos os ambientes terrestres, mesmo aqueles que são altamente contaminados. Por fim, as plantas são fáceis de coletar e geralmente produzem biomassa suficiente para permitir análises químicas.⁸

A avaliação do impacto da poluição nessas plantas bioindicadoras, geralmente é feita por análises químicas, dessa forma, na maioria dos casos, elas precisam ser destruídas. Outra forma de avaliar os impactos dos contaminantes é realizar uma avaliação dos sintomas de lesões visíveis, porém, em baixas concentrações eles nem sempre são detectados.⁵³

Na Europa Central e Oriental o ozônio tornou-se um poluente fitotóxico comum, por esse motivo, Manning e Godzik utilizaram sementes de *Impatiens parviflora* e *Pathenocissus quinquefolia* como bioindicadoras de ozônio ambiente. As plantas apresentaram sintomas visuais como lesões brancas e clorose. Algumas plantas, ao longo do tempo, apresentaram manchas de necrose.⁵⁴

Já Remon et al. utilizaram folhas de tabaco orientais, e atestaram que tais plantas são eficientes quando utilizadas como bioindicadores de acumulação de metais como Zn, Cd, Cr, Cu, Pb e Ni.⁵⁵ A extração dos metais foi efetuada por digestão usando calor e HNO₃. As concentrações de metal nos extratos foram medidas pela técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (do inglês, Inductively coupled plasma optical emission spectrometry - ICP-OES).

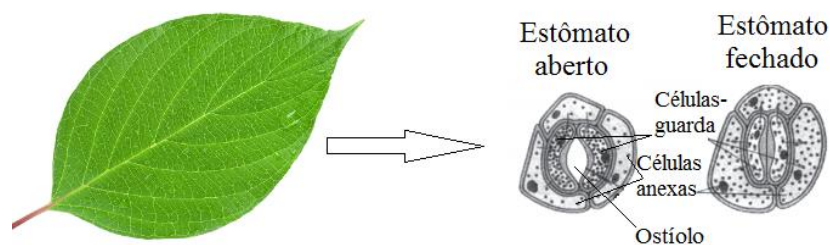
Plantas de Brahmi (*Bacopa monnieri*) foram utilizadas como bioindicadoras no desenvolvimento de um procedimento para avaliação de compostos químicos que apresentam efeitos citotóxicos (compostos que têm a capacidade de destruir células).⁵⁶ Essas plantas foram pulverizadas com óleo de hortelã (rico em mentol, mentona e cineol) e apresentaram

clorose (folhas amarelas) nas folhas mais velhas, que se espalhou para todo o galho dentro de uma semana.

2.5.1 Condutância estomática

A condutância estomática indica a taxa do fluxo de CO₂ ou de vapor de água através dos estômatos de uma folha. Os estômatos são pequenos poros localizados na parte superior e inferior das folhas, que controlam a assimilação do CO₂ e a liberação de umidade do interior da folha para a atmosfera, por meio de mecanismos que permitem a sua abertura ou fechamento (Figura 14).⁵⁷

Figura 14 – Representação do estômato.



Fonte: Adaptado pelo autor.⁵⁸

Oliveira et al. avaliaram o uso de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), cultivar Carioca, como bioindicador de estresse hídrico, utilizando como um dos parâmetros a condutância estomática.⁵⁹ Eles observaram que os menores valores de condutância foram obtidos nas plantas não irrigadas. Já para plantas tratadas com T1, T2 e T3, que representam a ordem crescente de volume de irrigação, os maiores valores encontrados foram para T1 e os menores valores para T3.

Por sua vez, laranjeiras ‘Valência’ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) foram deixadas por 10 dias sem irrigação e o efeito do estresse hídrico foi avaliado por meio de medições de condutância estomática.⁶⁰ Observou-se um decréscimo na condutância e em nenhum momento do dia as plantas chegaram a se recuperar dos efeitos causados pelo estresse hídrico.

A condutância estomática também foi avaliada por Silva et al. com objetivo de investigar o desempenho fisiológico de variedades comerciais de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) no sentido de selecionar genótipos mais tolerantes ao déficit hídrico e responsivos à irrigação.⁶¹ Verificou-se que a variedade RB 962962 apresentou desempenho fisiológico superior às demais variedades, quando submetida ao regime de deficiência hídrica.

Por sua vez, em condições de irrigação plena e excedente hídrico, as variedades RB 962962 e RB 98710 exibiram as maiores condutâncias estomáticas. Além disso, constataram que a variedade SP 791011 apresentou maior sensibilidade estomática, com redução da condutância estomática e transpiração, quando cultivada tanto sob regime de deficiência quanto de excedente hídrico.

2.5.2 Temperatura foliar

A temperatura é um fator de grande influência na respiração e, consequentemente na assimilação de CO_2 e fotossíntese, principalmente durante os estágios iniciais de desenvolvimento da planta. A parte aérea, em qualquer estágio de desenvolvimento, num período de 24 h, está sujeita a intensas e rápidas mudanças de temperatura, o que não acontece na mesma proporção com as raízes.³⁵

As temperaturas consideradas moderadamente altas (35 a 42°C) podem causar danos diretos ao aparato fotossintético, pois provocam mudanças na membrana do tilacóide e nas propriedades físico-químicas, e também na organização funcional dessas estruturas celulares. Em elevadas temperaturas, a taxa máxima de assimilação de carbono pode ser inibida em virtude da diminuição da condutância estomática. Além disso, altas temperaturas podem levar ao aumento da respiração mitocondrial e da fotorrespiração.⁶²

Oliveira et al. avaliaram o uso de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), cultivar Carioca, como bioindicador para estresse hídrico, utilizando como um dos parâmetros a temperatura foliar.⁵⁹ Eles observaram que a temperatura da folha apresentou valores que variaram de 29 a 42 °C, ao longo do ciclo da cultura, em virtude do estresse hídrico, sendo observado que os tratamentos mais estressantes produziram as maiores temperaturas foliares.

Ribeiro submeteu mudas pé-franco (método de produção de mudas quando corta-se um ramo e finca-o no solo) de laranjeira 'Pêra' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) a dois regimes de temperatura - 25/20 °C e 35/20 °C (dia/noite) - para analisar se as temperaturas de cultivo interfeririam na assimilação de CO_2 .⁶³ Também foram realizadas medições de trocas gasosas a 25, 30, 35 e 40 °C. Por meio de um analisador portátil de parâmetros associados à fotossíntese analisou-se a assimilação de CO_2 e condutância estomática. O autor observou que a assimilação de CO_2 foi afetada pelo aumento da temperatura foliar e que as maiores atividades fotossintéticas ocorreram a 25 °C, atingindo um mínimo a 40 °C. O aumento médio de assimilação de CO_2 , quando o regime de temperatura de cultivo mudou de 25/20 °C

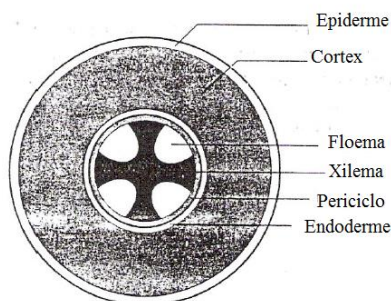
(dia/noite) para 35/20 °C (dia/noite), foi em torno de 65,4%. Os maiores valores de condutância estomática também foram encontrados a 25 °C e os menores a 40 °C.

Dias e Marengo investigaram o efeito da luminosidade e da temperatura na fotossíntese, sob baixa irradiância, em mogno (*Swietenia macrophylla* King) e acariquara (*Minquartia guianensis* Aubl).⁶⁴ A fotossíntese foi obtida por meio de um sistema portátil de medição de trocas gasosas. O aumento da irradiância de 1000 para 1700 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ causou pouco efeito na fotossíntese, independente da espécie. Eles perceberam que, quando o mogno foi exposto a uma temperatura de 38 °C, houve uma redução de 50% na fotossíntese, com relação aos valores obtidos para as plantas expostas a 32 °C. Na acariquara, o aumento da temperatura causou redução de 18%. O aumento da temperatura da folha também causou redução na condutância estomática, e este efeito foi mais acentuado em mogno.

2.5.3 Raiz

As raízes fixam a planta no solo, absorvem e transportam água e minerais do solo, além de armazenar reservas. Nas raízes de dicotiledôneas (plantas que apresentam dois ou mais cotilédones) podemos distinguir a raiz principal das inúmeras raízes laterais. Na raiz, há as seguintes camadas de células: epiderme, córtex, endoderme e cilindro central (estelo). No cilindro central estão os feixes vasculares, sendo que o xilema, onde ocorre o transporte de pesticidas, se localiza mais internamente e o floema mais externamente. Também se observa uma camada de células abaixo da endoderme, conhecida como periciclo, a partir da qual se desenvolvem as raízes laterais (Figura 15).³¹

Figura 15 – Diagrama de um corte transversal de uma raiz típica.



Fonte: Adaptada pelo autor.³¹

As raízes são os primeiros pontos de exposição das plantas aos estresses abióticos transmitidos pelo solo, como concentrações tóxicas de íons essenciais e não essenciais,

alumínio e pesticidas, os quais se constituem enquanto fatores limitantes ao crescimento das plantas. Esses compostos uma vez absorvidos, tendem a acumular-se nas raízes, provocando escurecimento, engrossamento e inibição do crescimento radicular. Por este motivo, a avaliação do desenvolvimento radicular tem sido uma análise utilizada para investigar os efeitos dos agentes químicos como pesticidas no desenvolvimento de plantas.⁶⁵

Plantas de capim-elefante (*Pennisetum purpureum* cv. Cameroon) foram submetidas a diferentes doses de nitrogênio (50, 100 e 150 kg ha⁻¹).⁶⁶ Após 60 dias de cultivo, as plantas foram cortadas e analisadas quanto à produção de massa seca de raiz. A adubação nitrogenada promoveu maior produção de massa seca do sistema radicular. À medida que se aumentou as doses de nitrogênio, observou-se maior acúmulo de raízes.

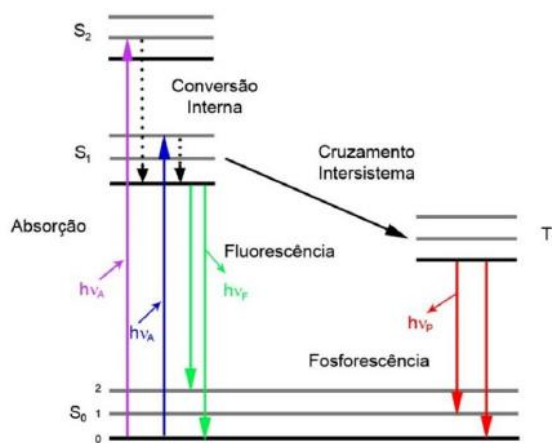
Sementes de soja, dos cultivares CD 233 RR e BMX Potencia RR foram tratadas com fungicidas e inseticidas, isoladamente.⁶⁷ Os fungicidas foram carbendazim + tiram (dose 2 mL kg⁻¹ de semente), fludioxinil + metalaxil-M (dose 1 mL kg⁻¹ de semente) e difenoconazol (dose 0,334 mL kg⁻¹ de semente) e os inseticidas testados foram fipronil, tiametoxam e imidacloprid na dose de 2 mL kg⁻¹ de semente. O comprimento da raiz foi medido após 5 dias de semeadura. Observou-se que os tratamentos nas sementes da cultivar de soja CD 233 RR não induziram variação no comprimento de raiz. Entretanto, na cultivar BMX POTENCIA RR, verificou-se que o comprimento de raiz associado ao tratamento com o princípio ativo do fungicida fludioxinil + metalaxil-M foi superior ao do inseticida difeconazol.

2.5.4 Fluorescência

A fluorescência é um fenômeno que ocorre em uma molécula responsável pela geração de luz (fótons). Os fótons absorvidos pela molécula promovem determinados elétrons para estados eletrônicos excitados. A figura 16 mostra o diagrama de Jablonski simplificado, que ilustra os estados de energia de uma molécula e as possíveis transições envolvendo diferentes estados. Após a absorção de luz, a molécula dissipa a energia absorvida por processos de decaimento radiativo e/ou não-radiativo. Os processos de decaimento radiativo envolvem a emissão de fótons, sendo que essa emissão pode ocorrer por fluorescência ou fosforescência. Na fluorescência o processo de decaimento possui tempo de vida da ordem de nanossegundos e a multiplicidade não é alterada, enquanto que na fosforescência o tempo de vida é da ordem de segundos e a multiplicidade sofre alteração em um processo denominado cruzamento intersistema. Os processos não-radiativos ocorrem por conversão interna, abrangendo

vibrações, rotações e translações da molécula ou ainda transferência de energia para as moléculas vizinhas através de colisões e mecanismos de transferência de energia.⁶⁸

Figura 16 – Diagrama de Jablonski simplificado. S são os níveis de energia no estado singlete e T no estado tripleto; h é a constante de Planck e ν_A , ν_F e ν_P são as frequências das radiações da absorção, fluorescência e fosforescência, respectivamente.



Fonte: Adaptada pelo autor.⁶⁹

2.5.4.1 Fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila tem sido utilizada para detectar, monitorar e avaliar diferentes estresse sofridos por plantas. A técnica de análise é não invasiva e não destrutiva e tem sido empregada para acompanhar a evolução temporal das alterações no teor de clorofila e no status fisiológico de plantas. A detecção de estresse em plantas tem por base a avaliação de alterações na intensidade e no perfil espectral da fluorescência da clorofila. Ainda, dadas as características dos sistemas experimentais envolvidos na construção dos fluorímetros, essas análises podem ser realizadas utilizando dispositivos portáteis, possibilitando o estudo diretamente no campo.⁷⁰

Alterações na fluorescência da clorofila em plantas estão principalmente vinculadas ao fotossistema II (FS II), porque este fotossistema normalmente é mais sensível a estresses ambientais. Um dos parâmetros utilizados nesta análise é a relação entre as intensidades de fluorescência emitidas em aproximadamente, 685 e 735 nm. A fluorescência em 685 nm corresponde à emissões da clorofila presente no FS II, enquanto que em 735 nm corresponde à emissão dos fotossistemas II e I.⁷¹

A intensidade das bandas de emissão de fluorescência F685 e F735 depende do teor de clorofila das folhas. Em concentrações muito baixas de clorofila a banda F685 é muito maior do que a banda F735, que só existe como um ombro. Com o aumento do conteúdo de clorofila

a banda F685 diminui enquanto a banda F735 aumenta. Esta mudança nas emissões F685 e F735 são causadas pela sobreposição entre a banda de fluorescência F685 emitida e bandas de absorção *in vivo* de clorofila *a*, causando uma reabsorção da banda F685.⁷² Como consequência, a razão F685/F735 é um método não-invasivo que fornece informações sobre o status fisiológico e conteúdo de clorofila em plantas.⁷¹ Além disso, esta relação é utilizada para quantificar a eficiência máxima do FS II, relacionada aos níveis de clorofila nas folhas.⁷³

Como destacado, diversos trabalhos reportam o uso da fluorescência da clorofila para avaliar condições de estresse em plantas. Com o objetivo de detectar a toxicidade de Cádmio em plantas de milho via análise espectral da fluorescência da clorofila, Silva et al. utilizaram plantas de milho (*Zea mays L.*), variedade São José, cultivadas com diferentes concentrações de Cd (CdCl_2) 0; 0,5; 1,5; 3,0 e 6,0 mg L⁻¹.⁷⁰ A partir da razão F685/F735, os autores observaram que as plantas sob estresse induzido por Cd, mesmo não apresentando sintomas visuais, apresentaram decréscimo no teor de clorofila.

Por sua vez, alterações na fluorescência de clorofila *a* em plantas de soja *in vivo* (resistentes a glifosato) induzidas por glifosato foram avaliadas por Fernandes et al. utilizando um fluorímetro portátil.⁷⁴ Observou-se forte supressão da fluorescência de clorofila *a* para todas as plantas tratadas com o herbicida. Além disso, F685/F735 mostra que a aplicação de glifosato levou à redução do teor da clorofila. Dessa forma, os autores concluíram que a espectroscopia de fluorescência pode detectar, em plantas *in vivo*, mudanças precoces no estado fotossintético da soja transgênica tratada com glifosato.

Não obstante, Falco et al. avaliaram o efeito de nanopartículas de prata sobre as características fluorescentes do extrato da clorofila extraída de plantas de soja, cultivar BRS 245RR.⁷⁵ Eles observaram que houve supressão da fluorescência do extrato de clorofila em virtude da presença das nanopartículas de prata.

A interação entre o extrato da clorofila retirada da fava (*Vicia faba L.*) e nanopartículas de prata de diferentes diâmetros (10, 60 e 100 nm) também foi avaliada por meio da espectroscopia de fluorescência.⁷⁶ Os autores observaram uma supressão quase linear da intensidade de fluorescência em função da diminuição do diâmetro das nanopartículas e atribuíram tal efeito ao aumento da área superficial disponível para adsorção de clorofila, possibilitando transferência de elétrons excitados das moléculas de clorofila para as nanopartículas metálicas.

A fluorescência por imagem ou fluorescência cinética de folhas tem sido empregada no estudo de plantas, pois esta é capaz de determinar a emissão de toda a folha, permitindo identificar com precisão a contribuição de cada região da folha no processo de fluorescência,

fornecendo parâmetros tais como F_0 (fluorescência inicial) e F_m (fluorescência máxima). Nesses casos a planta é inicialmente adaptada ao escuro e posteriormente são realizadas as medições com pulsos de luz^{77, 78}

O parâmetro mais utilizado no estudo do estresse em plantas por meio da fluorescência cinética é a razão $\frac{F_v}{F_m}$, também chamado de *QY máximo* (Equação 2).

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_0}{F_m} \quad (2)$$

F_v , F_m e F_0 são as intensidades de fluorescências variável, máxima e mínima no estado adaptado ao escuro.

Em baixas intensidades de luz é bem estabelecido que a taxa de transferência de elétrons do centro de reação FS II de cloroplastos isolados é inversamente relacionado com a magnitude da emissão da fluorescência variável, e assim há uma relação linear entre a supressão fotoquímica (formação de ATP e NADPH) e o rendimento quântico do transporte de elétrons não cíclicos. Então o rendimento quântico do transporte de elétrons não cíclicos deve ser proporcional ao produto da supressão fotoquímica e a eficiência de captura de excitação pelo centro FS II aberto (geralmente designado como F_v/F_m).⁷⁹

O parâmetro *QY máximo* quantifica a eficiência máxima do FSII na fase em que a planta está adaptada ao escuro, revelando a capacidade fotossintética da planta de maneira muito sensível. Quando em condições de estresse, esse parâmetro pode sofrer drásticas alterações.^{80, 81}

O coeficiente de diminuição relativa da fluorescência (*Rfd*), também denominado índice de vitalidade do FSII, é outro parâmetro que auxilia nas interpretações dos processos fotossintéticos (Equação 3). O parâmetro *Rfd* caracteriza a interação das reações dependentes da luz com as reações da fase escura e é usado para avaliar a atividade do Ciclo de Calvin, que é a fase não luminosa da fotossíntese. Assim, valores de *Rfd* trazem informações adicionais sobre a atividade fotossintética, estando diretamente ligados à taxa de assimilação de CO₂ pelas folhas nos casos em que os estômatos permanecem abertos.^{82, 78}

$$Rfd_{-LSS} = \frac{F_p - F_{t_LSS}}{F_{t_LSS}} \quad (3)$$

Sendo F_p o pico de fluorescência no início da fase em que a planta é exposta à luz, e F_{t_LSS} é a intensidade de fluorescência quando a planta já está adaptada à luz.

Depois de adaptada ao escuro a planta recebe um pulso de luz, quando é obtido o F_p , e o pool de plastoquinona é amplamente congestionado pelo fluxo de elétrons, mas os mecanismos de supressão fotoquímica e a assimilação de CO_2 não estão totalmente ativados (Figura 8). Após a planta estar adaptada à luz há um equilíbrio entre os mecanismos de supressão fotoquímica e assimilação de CO_2 , momento que é obtido o $F_t\text{-}Lss$. Existe uma grande diferença entre F_p e $F_t\text{-}Lss$ em plantas saudáveis, porém a diferença é muito menor em plantas estressadas e por esse motivo esse parâmetro é usado para indicar a vitalidade da folha.⁷²

Synowiec et al. examinaram os efeitos do uso de óleo de cravo, que apresenta ação herbicida, no status fisiológico de folhas de brócolis por meio de fluorescência por imagem, durante os primeiros 60 minutos após a aplicação.⁷⁸ Os autores observaram um decréscimo nos valores de $QY\text{ máximo}$ como resultado do estresse, levando a danos no PSII e diminuição da eficácia do transporte de elétrons. Após o tratamento com óleo de cravo foi observado também proeminente dano ao fotossistema, expresso pelo valor Rfd , que apresentou valores próximos à zero sugerindo uma redução na assimilação de CO_2 .

Możdżeń et al. determinaram a influência de estresse por seca induzido pelo manitol (-0,5 e -1,5 MPa) em processos fisiológicos selecionados em milho (*Z. mays* L.) utilizando um fluorímetro (*FMS Fluorescence Monitoring System Hansatech*). Os autores concluíram que a análise fluorimétrica de parâmetros de fluorescência da clorofila confirmou o importante efeito do manitol na atividade do FS II nas plantas de milho. Segundo eles, a imagem de fluorescência de clorofila permitiu distinguir as áreas de folhas de milho expostas ao estresse da seca através do uso de diferentes concentrações de manitol, pois diferenças no Rfd foram observadas entre as plantas tratadas com manitol em baixas e altas concentrações.⁷⁷

Plantas de bétula prateada (*Betula pendula* Roth.), linden de folhas pequenas (*Tilia cordata* Mill.) e cedro branco do norte (*Thuja occidentalis* L.) crescendo sob condição de poluição, próximo a uma parada de ônibus, foram utilizadas para o estudo.⁸² As medições de $QY\text{ máximo}$ foram utilizadas para monitorar a eficiência quântica do FS II nessas plantas. Os autores observaram valores menores de $QY\text{ máximo}$ em relação ao grupo controle (plantas crescendo em ambiente sem poluição) e concluíram que houve uma redução na eficiência quântica das plantas que cresceram em ambiente poluído.

Kalmatskaya e Karavaev injetaram fluoreto de sódio na concentração $0,02\text{ mol L}^{-1}$, um potente inibidor da fosfatase, em folhas de feijão (*Visia Faba* L.) e observaram que o $QY\text{ máximo}$ permaneceu inalterado.⁸³

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial bioindicador de plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e de sesbania (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers) por meio de análises de fluorescência para identificar a presença de pesticidas em água de irrigação.

3.2 Objetivos Específicos

- Empregar técnicas como temperatura foliar, condutância estomática e medições de comprimento de raiz para avaliar possíveis alterações sofridas nas plantas cultivadas na presença dos pesticidas;
- Avaliar a fluorescência da clorofila presente nas folhas como sonda para monitorar alterações sofridas em parâmetros associados ao estado fisiológico das plantas cultivadas com água contendo diferentes concentrações dos pesticidas;
- Averiguar correlações entre imagens de fluorescência das folhas e as condições de cultivo das plantas;
- Investigar se as alterações fisiológicas detectadas pelos métodos experimentais dependem da espécie da planta, do tipo e da concentração de pesticida.

4 - METODOLOGIA

4.1 Cultivo das plantas

4.1.1 Soja

Uma mistura de sementes de diferentes cultivares de soja RR (resistente ao glifosato) foi usado. As sementes foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de aproximadamente 180 g, utilizando substrato da marca Tropstrato HT. Este substrato é composto por casca de pinus, turfa, vermiculita, superfosfato simples, nitrato de potássio e produtos formulados por terceiros.

Os vasos plásticos foram colocados em bandejas onde foram realizadas as irrigações, sendo que as soluções de pesticidas foram despejadas na bandeja e estas foram absorvidas pelo substrato. A quantidade de vasos por bandeja foi mantida a mesma para que a absorção do líquido fosse uniforme em todos os grupos (Figura 17).

Figura 17 – Ilustração da disposição dos vasos e de plantas de soja na bandeja.



Fonte: Próprio autor.

Plantou-se 25 sementes para cada grupo investigado para garantir que haveria cinco plantas para medições, pois nem todas germinaram e algumas que germinaram, não se desenvolveram. No primeiro experimento, as plantas foram divididas em quatro grupos: um grupo irrigado somente com água (controle) e três grupos irrigados, separadamente, com 500, 3600 e 1075 ppm do fungicida Score[®], do herbicida Roundup[®] e do inseticida Lannate[®], respectivamente.

Essas concentrações são aquelas indicadas para uso pelos fabricantes. O fabricante do Score[®] descreve na bula a composição do produto como 25% m/v de difenoconazol (princípio ativo) e 76% m/v de outros ingredientes. No caso do Roundup[®] há 48,0% m/v de sal de isopropilamina de N – (fosfometil) glicina, 36,0% m/v de glifosato (princípio ativo) e 68,4% m/v de ingredientes inertes. Já no Lannate[®] a composição é de 21,5% m/v de metomil (princípio ativo) e 78,5% de ingredientes inertes. Todos os cálculos para as concentrações utilizadas foram baseados na concentração do princípio ativo.

As soluções dos pesticidas foram preparadas diluindo-se os volumes necessários para o preparo de cada concentração em 1 L de água.

As plantas foram cultivadas em uma casa de vegetação da Faculdade de Ciências Agrárias na UFGD, por período de quatro semanas, sendo irrigadas duas vezes por semana com 1 L da solução de pesticida por bandeja e nos dias restantes, irrigadas com 1 L de água/dia. Utilizou-se uma casa de vegetação coberta, para evitar água da chuva, possibilitando o controle da irrigação (Figura 18).

Figura 18 – Casa de vegetação onde as plantas foram cultivadas durante os experimentos.



Fonte: Próprio autor.

Posteriormente, foram realizados experimentos variando as concentrações de Roundup[®] (0c, 0,25c, 0,50c, c, 1,20c, 1,50c), Score[®] (0c, 0,25c, 0,50c, c, 2,00c, 2,50c) e Lannate[®] (0c, 0,25c, 0,50c, c, 1,50c e 2,00c) utilizadas na irrigação, onde c é a concentração recomendada pelos respectivos fabricantes. As concentrações foram determinadas a partir do primeiro experimento, no qual as plantas foram irrigadas com as concentrações recomendadas pelos fabricantes.

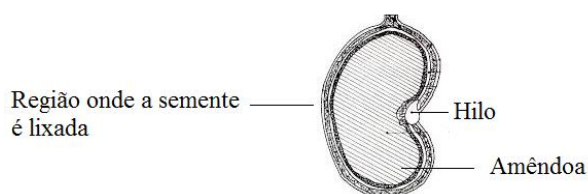
Um terceiro experimento foi realizado utilizando frações de concentrações intermediárias dos pesticidas, sendo que as de Roundup[®] foram 0c, 0,12c, 0,14c, 0,17c, 0,33c, as de Score[®] foram 0c, 0,70c, 0,90c, 1,50c, 3,00c, 3,50c e as de Lannate[®] foram 0c, 0,12c, 0,14c, 0,17c, 0,33c e 1,20c.

Após o cultivo, as plantas foram deixadas no laboratório por 24 h para adaptação antes de serem realizadas as medições.

4.1.2 Sesbania

Com vistas ao plantio da sesbania, as sementes foram lixadas na região oposta ao hilo até o aparecimento da amêndoa, para quebra da dormência (Figura 19). As sementes foram plantadas em vasos plásticos com capacidade de aproximadamente 180 g. O substrato utilizado foi o mesmo do item 4.1.1. Os vasos plásticos contendo substrato e sementes foram colocados em bandejas onde foram realizadas as irrigações, mantendo a mesma quantidade de vasos para cada bandeja, conforme discutido na seção 4.1.1.

Figura 19 – Representação da região onde as sementes de sesbania foram lixadas para quebra da dormência.



Fonte: Adaptada pelo autor.⁸⁴

Plantou-se 20 sementes para cada grupo para garantir que haveria dez plantas para realização dos experimentos, pois, a exemplo do caso anterior, nem todas germinam e algumas germinam, mas não evoluem.

As plantas foram cultivadas em uma casa de vegetação coberta (Figura 18) por um período de quatro semanas, sendo irrigadas duas vezes por semana com 1L das respectivas soluções de pesticida e nos dias restantes, irrigadas com 1L de água/dia. As concentrações de Score[®] utilizadas na irrigação foram 0c, 0,25c, 0,50c, c, 2,00c, 2,50c enquanto que as concentrações de Roundup[®] foram 0c, 0,12c, 0,14c, 0,17c, 0,33c e as de Lannate[®] foram 0c, 0,25c, 0,50c, c, 1,50c e 2,00c, onde c é a concentração indicada pelos respectivos fabricantes, 500, 3600 e 1075 ppm, respectivamente. As concentrações para o experimento com Score[®] e com Lannate[®] foram as mesmas utilizadas para soja, já no experimento com Roundup[®] optou-se por concentrações menores, pois a sesbania não apresenta tolerância a esse herbicida.

Após o cultivo, as plantas foram deixadas no laboratório por 24 h para adaptação antes de serem realizadas as medições.

4.1.3 Concentrações usadas nos experimentos

As concentrações usadas em cada experimento estão exibidas na tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações utilizadas; c representa a concentração indicada pelos fabricantes do Score[®], do Roundup[®] e Lannate[®]: 500, 3600 e 1075 ppm, respectivamente.

Experimentos							
Pesticidas	Roundup [®] , Score [®] e Lannate [®]	Roundup [®]		Score [®]		Lannate [®]	
Plantas	Soja	Soja	Sesbania	Soja	Sesbania	Soja	Sesbania
Concentrações							
Parte I	c	0,25c	0,12c	0,25c	0,25c	0,25c	0,25c
		0,50c	0,14c	0,50c	0,50c	0,50c	0,50c
		c	0,17c	c	c	c	c
		1,20c	0,33c	2,00c	2,00c	1,50c	1,50c
		1,50c		2,50c	2,50c	2,00c	2,00c
Parte II		0,12c		0,70c		0,12c	
		0,14c		0,90c		0,14c	
		0,17c		1,50c		0,17c	
		0,33c		3,00c		0,33c	
				3,50c		1,20c	

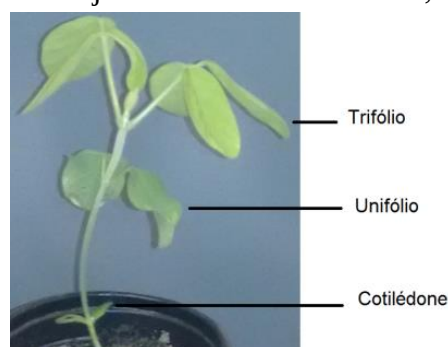
Fonte: Próprio autor.

Vale destacar que os experimentos envolvendo diferentes pesticidas e plantas foram realizados em diferentes períodos do ano.

4.2 Folhas utilizadas nas medições

Na soja, os experimentos foram realizados nas cinco plantas de cada conjunto experimental (controle e teste com diferentes concentrações de pesticidas). Em cada planta, as medições foram feitas nos dois unifólios e nas três folhas do trifólio, separadamente (figura 20), no caso dos experimentos de imagem térmica e imagem de fluorescência. Já nos experimentos de condutância estomática e fluorescência utilizando o fluorímetro portátil utilizou-se o unifólio direito e o folíolo central do trifólio.

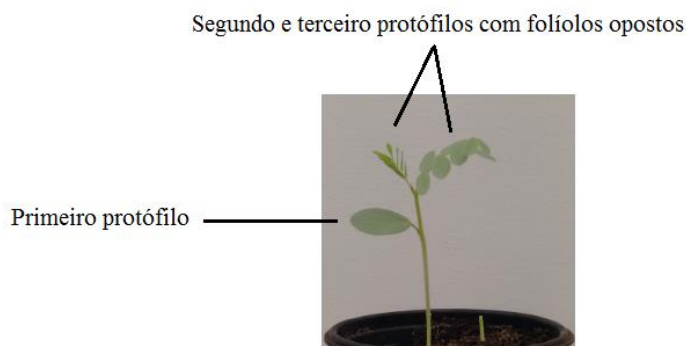
Figura 20 – Folhas de uma planta de soja mostrando o cotilédone, unifólio e trifólio.



Fonte: Próprio autor.

Na sesbania, todas as medições foram realizadas somente no primeiro protófilo, pois os folíolos opostos nos demais protófilos eram muito pequenos, dificultando a determinação, por exemplo, da condutância estomática e da fluorescência utilizando o fluorímetro portátil. A figura 21 mostra as folhas de uma planta de sesbania. Por esse motivo foram utilizadas 10 plantas, mantendo assim a mesma quantidade de medições que foram realizadas nas plantas de soja.

Figura 21 – Planta de sesbania mostrando o primeiro, segundo e terceiro protófilo.



Fonte: Próprio autor.

Os experimentos de imagem térmica nas plantas *in vivo* foram realizados no primeiro dia após o período de cultivo. Por sua vez, as medições de condutância estomática, fluorescência obtida com o fluorímetro portátil, fluorescência por imagem e comprimento de raiz foram realizadas no segundo, terceiro, quarto e quinto dia após o cultivo, respectivamente. Todas as medições foram realizadas no período matutino já que as plantas se comportam diferentemente ao longo do dia.³⁵

4.3 Extração da clorofila

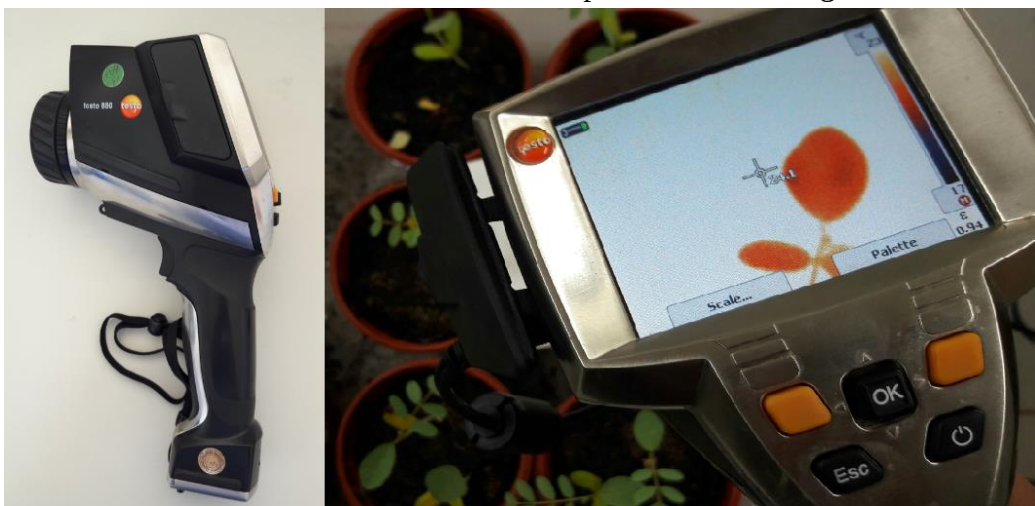
A extração da clorofila foi realizada a partir tanto das folhas de soja quanto das folhas de sesbania que foram utilizadas nas medições das plantas *in vivo*. As folhas foram picotadas e colocadas em metanol PA segundo uma metodologia adaptada.⁸⁵ Adicionou-se 1 g de folhas em 10 mL de metanol, deixando a mistura por um período de 72 h; posteriormente, separou-se o extrato obtido. Os extratos foram armazenados em frascos âmbar envoltos por papel alumínio e em ambiente refrigerado para que não houvesse degradação da clorofila até a realização dos experimentos.

4.4 Técnicas

4.4.1 Imagem térmica

As análises térmicas por imagem foram realizadas utilizando uma câmera térmica por infravermelho (Testo 880), disponibilizada pela Faculdade de Ciências Agrárias/UFGD (Figura 22).

Figura 22 – Câmera de infravermelho usada nos experimentos de imagem térmica.

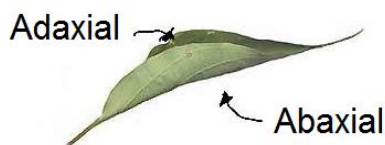


Fonte: Próprio autor.

A câmera possui uma sensibilidade térmica (NETD do inglês *Noise Equivalent Temperatura Difference*) <50 mK a 30°C , lentes com $32^{\circ} \times 23^{\circ}$, detector de $16\text{ mm} \times 12\text{ mm}$ e foco manual. As imagens foram coletadas na face adaxial das folhas (Figura 23).

Posteriormente, o software Testo IRSoft 2.23 foi empregado para tratamento e análise das imagens.

Figura 23 – Face adaxial e abaxial da folha.



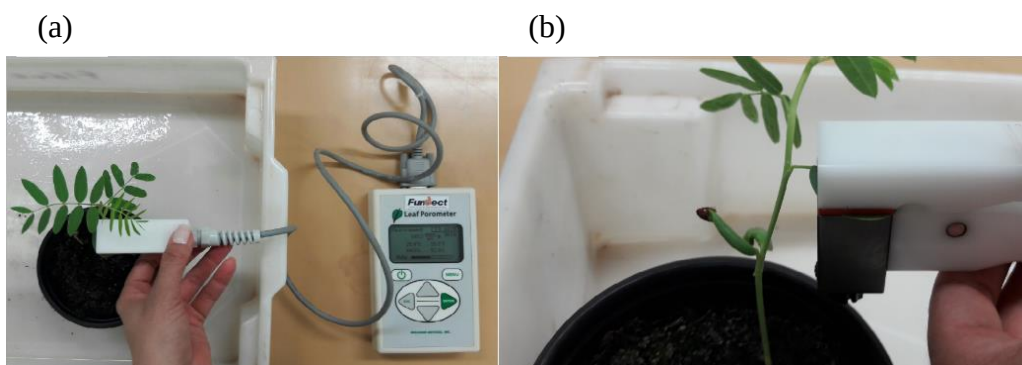
Fonte: Freitas.⁸⁶

As medições de temperatura foliar foram realizadas nos dois unifólios e nas três folhas do trifólio, para plantas de soja, e no primeiro protófilo para plantas de sesbania, totalizando duas medições de unifólio e três de trifólio em cada planta de soja e uma por planta de sesbania. Cada grupo de experimentos com soja era formado por cinco plantas, resultando em dez medições para os unifólios e 15 para os trifólios. Por sua vez, cada grupo de experimentos com sesbania foi constituído por dez plantas, logo dez medições para os protófilos.

4.4.2 Condutância estomática

O estudo da transpiração foliar por meio de medidas de condutância estomática foi realizado com um porômetro (Decagon Devices) conforme ilustrado na figura 24.

Figura 24 – (a) Determinação da condutância estomática e (b) Ilustração da posição da folha para determinação da condutância estomática.



Fonte: Próprio autor.

O equipamento é portátil e opera em condições ambientais de 5 a 40 °C e umidade relativa de 0 a 100%, com intervalo de medida entre 0 e 1000 mmol m⁻² s⁻¹. O equipamento possui dois sensores de umidade capazes de analisar uma área foliar com diâmetro de 6,35

mm. O instrumento foi calibrado usando água destilada em papel filtro como padrão e o dissecante trocado, garantindo um ambiente controlado e a acurácia das medidas.⁸⁷ A aquisição da condutância estomática foi realizada na face abaxial das folhas (Figura 23), onde se localizam um maior número de estômatos; além disso, evitou-se que medições fossem realizadas na nervura central das folhas, onde não há estômatos.³⁵

A determinação de condutância estomática foi realizada no unifólio direito e no folíolo central do trifólio, em cada planta de soja, e no primeiro protófilo por planta de sesbania. Cada grupo dos experimentos com soja era composto de cinco plantas, e com sesbania, dez plantas, resultando em cinco medições para os unifólios e trifólios (dez medições), no caso da soja, e dez medições para os protófilos, no caso da sesbania.

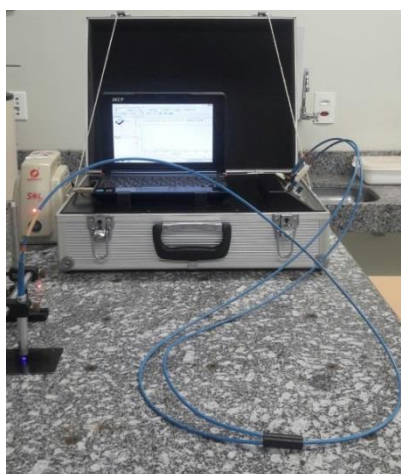
4.4.3 Fluorescência utilizando o fluorímetro portátil

4.4.3.1 Análises *in vivo*

A fluorescência da clorofila nas plantas *in vivo* foi obtida empregando um fluorímetro portátil (USB 2000 FL, Ocean Optics) e um laser de diodo como fonte de excitação capaz de operar em 405 ou 532 nm (Figura 25). As medições foram realizadas na face adaxial, do unifólio direito e do folíolo central do trifólio, no caso da soja, e no primeiro protófilo, na sesbania.

O tempo de integração utilizado no fluorímetro foi de 20 e 10 ms para 405 e 532 nm, respectivamente.

Figura 25 – Fluorímetro portátil.



Fonte: Próprio autor.

As medições foram realizadas em dois pontos, lado esquerdo e direito da nervura central, para o unifólio nas plantas de soja e do lado direito da nervura central para primeiro protófilo, nas plantas de sesbania, totalizando duas medições por plantas de soja e uma para plantas de sesbania. Para cada grupo dos experimentos com soja havia cinco plantas, já nos experimentos com sesbania, cada grupo era formado por dez plantas, totalizando dez medições para ambas as plantas.

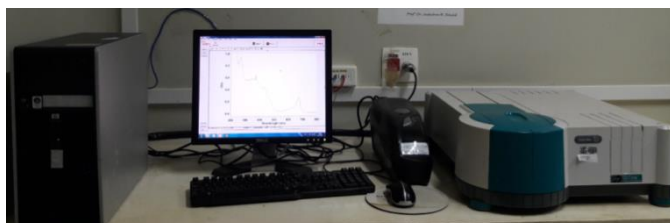
4.4.3.2 Análises no extrato

As concentrações de clorofila dos extratos foram ajustadas para $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para que todos os extratos apresentassem a mesma concentração; além do mais, essa concentração de clorofila foi escolhida por não produzir saturação nos espectros de fluorescência.⁸⁸

Por meio das medidas de absorção molecular, utilizando o espectrofotômetro Cary 50 UV-VIS (Varian), ajustou-se o teor da clorofila total $[Chl\ a + b]$ das amostras de extrato de clorofila. Uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico foi empregada. O ajuste foi realizado baseando-se no método de Arnon adaptado por Porra,⁸⁹ para extração metanólica, descrito pela Equação 4, onde $[Chl\ a + b]$ é a concentração das clorofilas *a* e *b*, A^{652} é a absorbância em 652 nm, A^{665} é a absorbância em 665 nm e as constantes 24,23 e 3,26 são os coeficientes de extinção específica da clorofila em 652 e em 665 nm, respectivamente.

$$[Chl\ a + b] = 24,23A^{652} + 3,26A^{665} \quad (4)$$

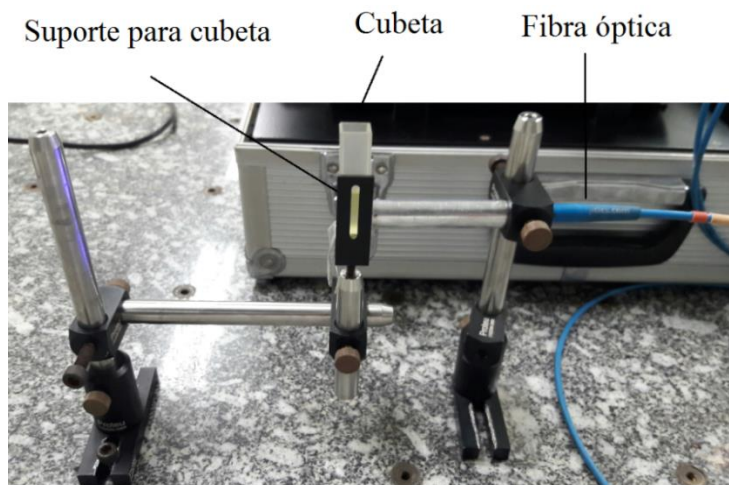
Figura 26 – Espectrofotômetro de absorção molecular utilizado no ajuste da concentração de clorofila nos extratos.



Fonte: Próprio autor.

O fluorímetro portátil (USB 2000 FL, Ocean Optics) e um laser de diodo operando em 405 nm foi utilizado na análise de fluorescência dos extratos de clorofila. As medições foram feitas na face frontal da cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, como apresentado na figura 27.

Figura 27 – Aparato experimental utilizado nos experimentos de fluorescência dos extratos de clorofila utilizando fluorímetro portátil.



Fonte: Próprio autor.

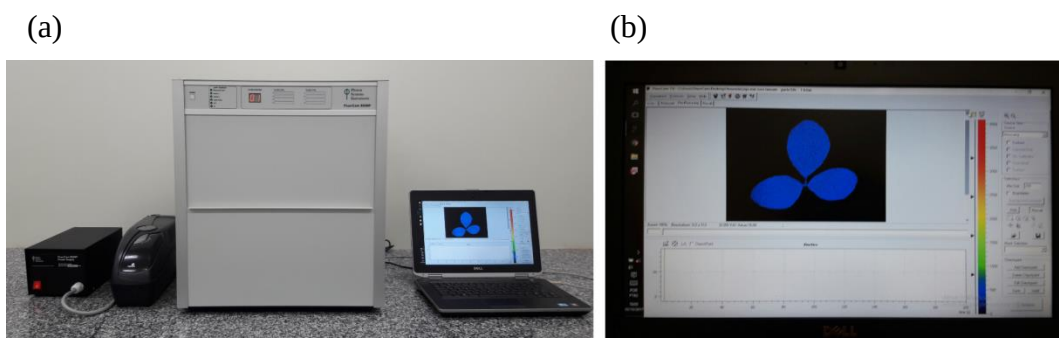
O aparato experimental consiste em suportes para o encaixe do laser e um suporte específico para a cubeta. A distância entre a cubeta e o laser foi mantida sempre a mesma, por esse motivo o aparato ficou montado até o término do último experimento.

O tempo de integração utilizado foi de 5 ms para os experimentos envolvendo o herbicida Roundup® e o inseticida Lannate®, e 3 ms para os experimentos relacionados ao fungicida Score®.

4.4.4 Imagem de fluorescência

A fluorescência da clorofila *a* também foi caracterizada por meio de um fluorímetro por imagem (Closed Fluorcam FC 800-C, Photon Systems Instruments) mostrado na figura 28. O sistema é fechado para isolar a planta de luminosidade externa.

Figura 28 – (a) Fluorímetro por imagem e (b) interface do *software* usado na obtenção e análise das medidas das folhas do trifólio de uma planta de soja.

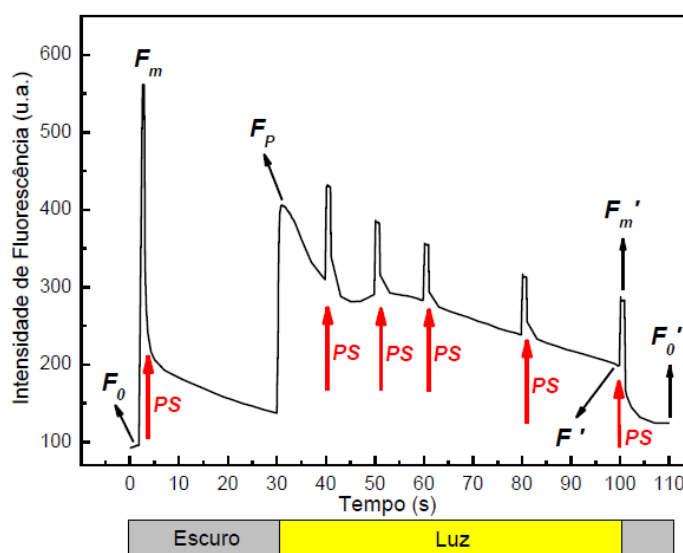


Fonte: Próprio autor.

O equipamento é composto basicamente por dois painéis de LED de luz branca e dois de luz vermelha (650 nm) usados como fonte de excitação com intensidade de luz actínica próxima de $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e pulso saturante de $4000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ele possui também uma câmera CCD (do inglês, *Charge-Coupled Device*) que coleta a fluorescência da folha na região entre 400 a 1000 nm, fornecendo imagens com resolução de 512×512 pixels a uma frequência máxima de 50 frames s^{-1} .

A coleta das imagens de fluorescência é realizada em função do tempo, gerando uma cinética característica apresentada na figura 29. Durante essa cinética, a fluorescência é medida várias vezes, tendo início na fase em que a planta ainda está adaptada ao escuro, sendo monitorada no tempo, após a incidência de pulsos saturantes e também na fase em que planta é exposta à luz. A medida dessas intensidades de emissão de fluorescência durante a cinética torna possível a determinação de parâmetros importantes no estudo do funcionamento do aparato fotossintético das plantas. Os parâmetros podem ser medidos em cada pulso saturante e a partir desses parâmetros é que são retiradas informações sobre eficiência quântica máxima do FS II (*QY máximo*) e da vitalidade da planta (*Rfd*).

Figura 29 – Cinética característica da emissão de fluorescência. F_0 : fluorescência mínima da planta adaptada ao escuro. PS: pulso saturante. F_m : fluorescência máxima da planta adaptada ao escuro. F_p : pico de fluorescência no início da iluminação. F' : fluorescência da planta adaptada à luz. F'_m : fluorescência máxima da planta adaptada à luz. F'_0 : fluorescência mínima no término da cinética.



Fonte: Falco.⁸⁷

Antes dos experimentos, as plantas foram mantidas em ambiente escuro por 30 min para garantir que todos os centros de reação nas folhas estivessem abertos. Foi utilizado um filtro

em 680 nm para selecionar somente a emissão da clorofila. As folhas foram removidas e, imediatamente após, as medições foram realizadas na face adaxial da planta (Figura 23).

As medições de imagem de fluorescência foram realizadas nos dois unifólios e nas três folhas do trifólio, para plantas de soja, e no primeiro protófilo para plantas de sesbania, totalizando duas medições de unifólio e três de trifólio por cada planta de soja, e uma para cada planta de sesbania. Cada grupo dos experimentos com soja tinha cinco plantas e com sesbania, dez plantas, resultando em dez medições para os unifólios e 15 para os trifólios, no caso da soja, e dez medições para os protófilos, no caso da sesbania.

4.4.5 Comprimento de raiz

As raízes foram separadas, após a conclusão dos experimentos citados anteriormente, lavadas com água corrente para, posteriormente, serem realizadas as medições, do comprimento do colo à coifa utilizando uma régua milimetrada (Figura 30).

Figura 30 – Ilustração da medida das raízes.



Fonte: Próprio autor.

As medições foram realizadas em cinco plantas de soja tanto para os experimentos com Roundup[®], Score[®] e Lannate[®]. Já na sesbania foram utilizadas cinco plantas para os experimentos com Roundup[®] e dez para o experimento com Score[®] e Lannate[®].

4.5 Análise estatística

Todos os dados exibidos correspondem aos valores médios associados a uma série de medições e diferentes amostras. As barras de erro utilizadas nos gráficos correspondem ao *SE* (do inglês, *Standard Error*), erro padrão da média descrito abaixo:

$$SE = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

onde SE é o erro padrão da média, s é o desvio padrão e n é o tamanho da amostra.⁹⁰

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk ($p \leq 0,05$). Um teste de normalidade é usado para determinar se os dados da amostra foram retirados de uma população normalmente distribuída (dentro de alguma tolerância). A normalidade é um pré-requisito de vários testes estatísticos, como o teste t de *student* e análise de variância (ANOVA do inglês, *analysis of variance*), que requerem uma população de amostra normalmente distribuída.⁹¹

A ANOVA requer homogeneidade das variâncias, por isso, os dados foram submetidos ao teste de homogeneidade de variância segundo o teste de Levene (absolutos, $p \leq 0,05$).

Para os dados de temperatura, condutância estomática, comprimento de raiz, as razões F685/F735 e *Rfd* (Equação 3, pag. 42), que apresentaram distribuição normal e a variância das populações não foram significativamente diferentes, aplicou-se ANOVA com teste post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$). Por sua vez os dados do comprimento de raiz das plantas de sesbania, que apresentaram distribuição normal, porém as variâncias das populações foram significativamente diferentes, usou-se também ANOVA com teste post-hoc de Tukey ($p \leq 0,05$) tendo por base o logarítmo dos dados originais a fim de obter variância não significativamente diferente.

Os dados de *QY máximo* (Equação 2, pag. 41) não apresentaram distribuição normal e as variâncias das populações foram significativamente diferentes de forma que adotou-se o teste não paramétrico Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). Ao contrário da ANOVA unidirecional (quando se tem apenas uma variável), o teste Kruskal-Wallis não exige a normalidade das populações.⁹²

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Soja

5.1.1 Sintomas visuais

As plantas de soja irrigadas com difenoconazol na concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm, não apresentaram sintomas visuais, enquanto que as plantas irrigadas com glifosato, com a concentração de referência do fabricante, 3600 ppm, apresentaram clorose (folhas amarelas) nos trifólios que se encontravam mais perto do ápice. Já as plantas irrigadas com metomil na concentração indicada pelo fabricante, 1075 ppm, apresentaram necrose parcial nos unifólios.

A seguir estão descritos os sintomas visuais das plantas de soja irrigadas com as demais concentrações de glifosato, difenoconazol e metomil utilizadas nesse trabalho.

As plantas de soja tratadas com glifosato apresentaram acentuado perfilhamento, ou seja, desenvolvimento de muitos galhos, e alongamento irregular do caule, exceto aquela submetida a concentração 1,50c que apresentou necrose parcial nos unifólios e necrose total nos trifólios (Figura 31a). Os trifólios mais próximos ao mesistema apical (ápice) apresentaram clorose proeminente (folhas amarelas).

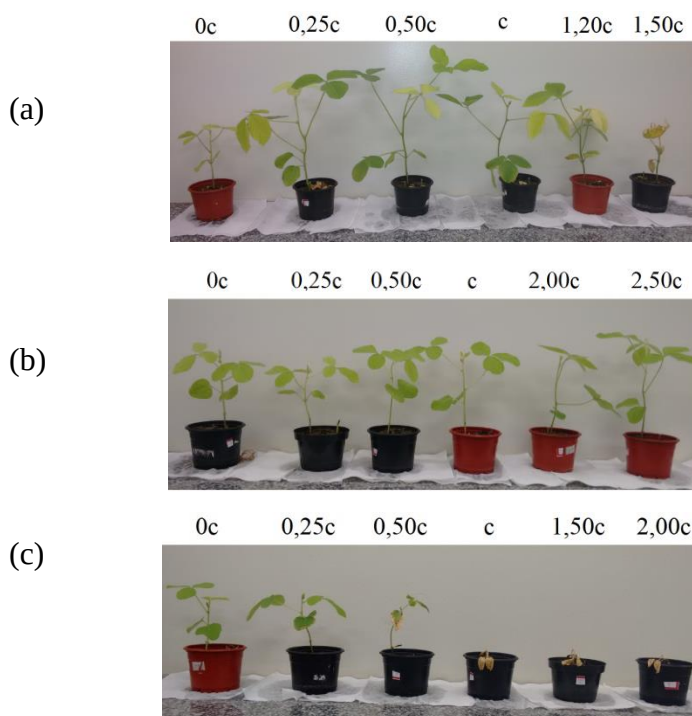
Segundo Zablotowicz e Reddy os sintomas comuns observados após a aplicação de glifosato são clorose foliar seguida de necrose.²² Outros sintomas foliares são: enrugamento ou malformações (especialmente nas áreas de rebrotamento) e necrose de meristema.²² Isso ocorre porque o glifosato inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPS) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosenolpiruvato piruvato, evitando, assim, a síntese dos aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina, como citado anteriormente (Figura 8).²¹ Os trifólios superiores são os mais afetados, provavelmente, pelo fato do glifosato se acumular nas regiões meristemáticas.²²

Os fitocromos estão mais concentrados nas regiões de crescimento, os meristemas,³⁵ onde também o glifosato tende a se acumular.²² Provavelmente, esse é o motivo do alongamento das plantas irrigadas com concentrações menores de glifosato, pois o herbicida, de alguma forma, inibe a síntese de cromóforos causando a deficiência de fitocromos.

Os fitocromos têm a função de absorver a luz e torná-la fotoquimicamente ativa. Em alguns casos, ocorre o efeito da mutação desses fitocromos, i.e., a expressão defeituosa ou alterada de um gene. Em tomateiro (*Lycopersicon esculentum*), mutantes com alterações na síntese ou expressão do fitocromo foram isolados. Os mutantes *yellow green-2* (*yg-2*) e *aurea*

(*au*) de tomateiro não respondem à luz branca do mesmo modo que as plantas selvagens. O hipocótilo desses mutantes se apresenta alongado e com pouco acúmulo de antocianinas, responsáveis pela proteção das plantas contra a luz UV. Tais características na planta, mesmo sob luz branca, indicam deficiência de fitocromo. Nesses dois mutantes, os fitocromos A e B (*phy A* e *phy B*) estão em baixas quantidades, indicando que a deficiência é na síntese do cromóforo, pois, embora existam diferentes tipos de apoproteínas, o cromóforo é o mesmo para todas. Desse modo, a deficiência na síntese do cromóforo acarreta limitação quantitativa em todos os tipos de fitocromos.³⁵

Figura 31 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de soja; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Em plantas de soja não foram observados efeitos visuais da irrigação com diferentes concentrações de difenoconazol (Figura 31b). Tavares et al. trataram sementes de soja, do cultivar BMX Potencia RR, com difenoconazol e não observaram alterações na massa seca da parte aérea das plantas tratadas em relação ao grupo controle, ou seja, eles também não observaram maior perfilhamento, pois não houve alteração na quantidade de folhas.⁶⁷

O metomil causou necrose parcial nos unifólios, na concentração 0,50c, já nas demais concentrações os unifólios apresentaram necrose total e não houve desenvolvimento do

trifólio (Figura 31c). Os inseticidas são transportados pelo floema e translocados através da planta da área de suprimento, conhecida como fonte, para a área de consumo, conhecida como dreno.³¹ As folhas mais maduras, nesse caso o unifólio, se comportam como fonte,³¹ acumulando o metomil, e por esse motivo sofrem o maior efeito desse inseticida.

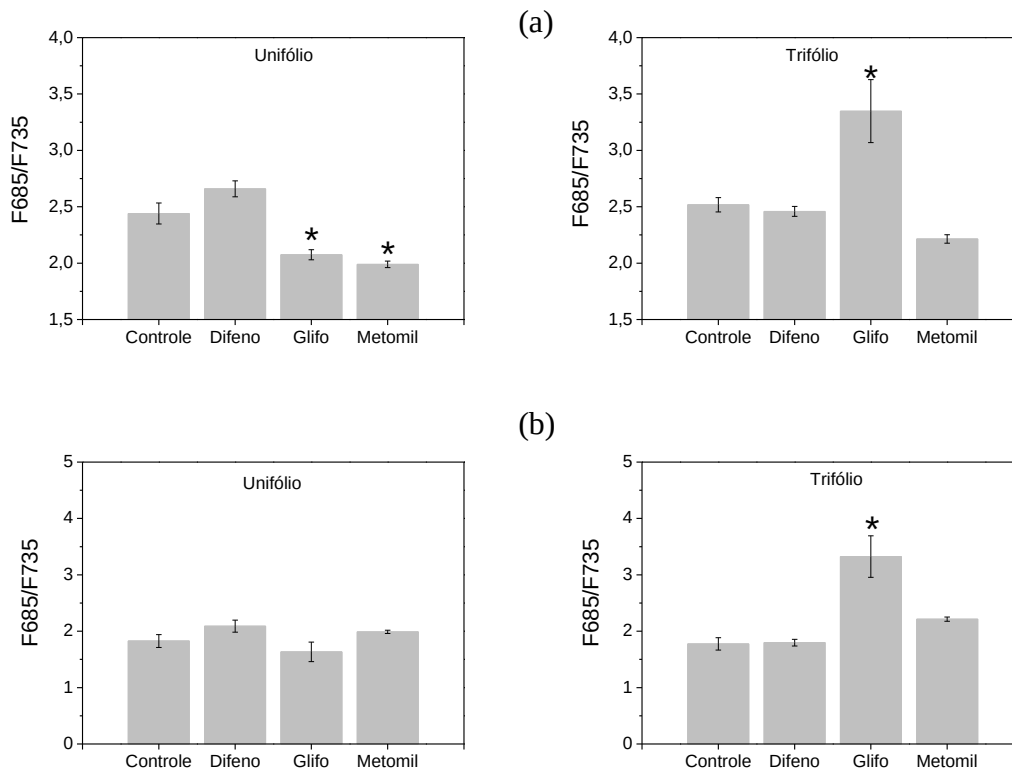
As espécies reativas de oxigênio, EROs, são importantes para regular muitos aspectos do ciclo de vida e mecanismos de resposta ambiental das plantas. As EROs, desempenham um importante papel de sinalização no processo de controle de plantas, como crescimento, desenvolvimento, resposta a estímulos ambientais bióticos e abióticos e morte celular programada.⁹³ Porém, as EROs também são subprodutos tóxicos do metabolismo aeróbico. Então, quando produzidas em excesso, nesse caso pelo fato das plantas estarem na presença do metomil, as EROs ocasionam necrose foliar em função do estresse oxidativo.⁹⁴

5.1.2 Métodos Analíticos

Foram realizados testes iniciais para plantas de soja irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil, princípios ativos do Roundup[®], Score[®] e Lannate[®], respectivamente. A concentração usada nesse experimento foi a indicada pelos respectivos fabricantes, para determinação das concentrações que seriam utilizadas em experimentos posteriores. Os parâmetros avaliados foram a razão F685/F735, *QY máximo* e *Rfd*.

Os valores obtidos para as razões de bandas de fluorescência (F685/F735), obtidas com excitação em 405 e 532 nm, estão apresentados na figura 32. Como é possível observar, o difenoconazol não causou alterações no unifólio e trifólio das plantas de soja na concentração indicada pelo fabricante, tomando como referência o grupo controle. Já o glifosato induziu alterações menos significativas no unifólio, porém as alterações no trifólio foram proeminentes, mostrando que ele, mesmo na concentração indicada pelo fabricante (c), causa mudanças no estado fisiológico das plantas. No caso do metomil, foi observada uma diferença significativa somente no unifólio, quando excitado em 405 nm.

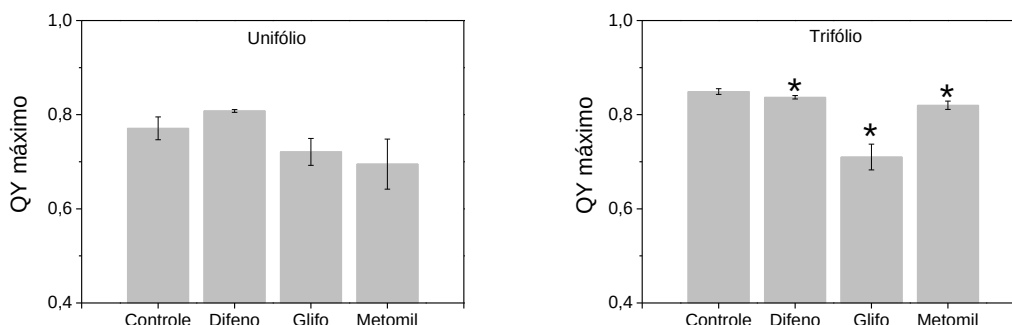
Figura 32 – Razão F685/F735 com excitação em (a) 405 nm e (b) 532 nm para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).



Fonte: Próprio autor.

No unifólio não foram observadas alterações em *QY máximo* para as plantas de soja irrigadas com difenoconazol, glifosato e metomil, porém no trifólio foram observadas diferenças significativas provocadas pelos três pesticidas (Figura 33). Este resultado mostra que a utilização da concentração de glifosato recomendada afeta de forma mais expressiva a eficiência do fotossistema II (FS II), uma vez que *QY máximo* está associado à eficácia desse fotossistema (Equação 2, pag. 41).

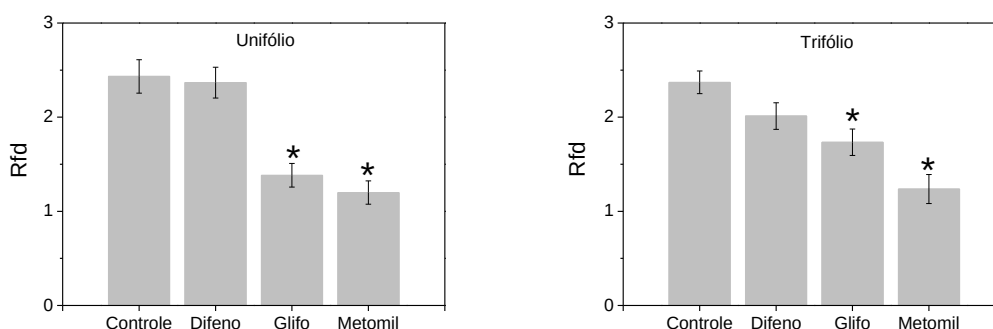
Figura 33 – *QY máximo* para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).



Fonte: Próprio autor.

O parâmetro *Rfd* (equação 3, pag. 42) é adotado para indicar a vitalidade de planta. Nota-se na figura 34 que o glifosato e o metomil afetaram a vitalidade tanto do unifólio quanto do trifólio, enquanto que o Score[®] não provocou alterações na vitalidade das plantas de soja.

Figura 34 – *Rfd* para plantas de soja irrigadas com soluções de difenoconazol (Difeno), glifosato (Glifo) e metomil nas concentrações recomendadas pelo fabricante. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ (n=10).



Fonte: Próprio autor.

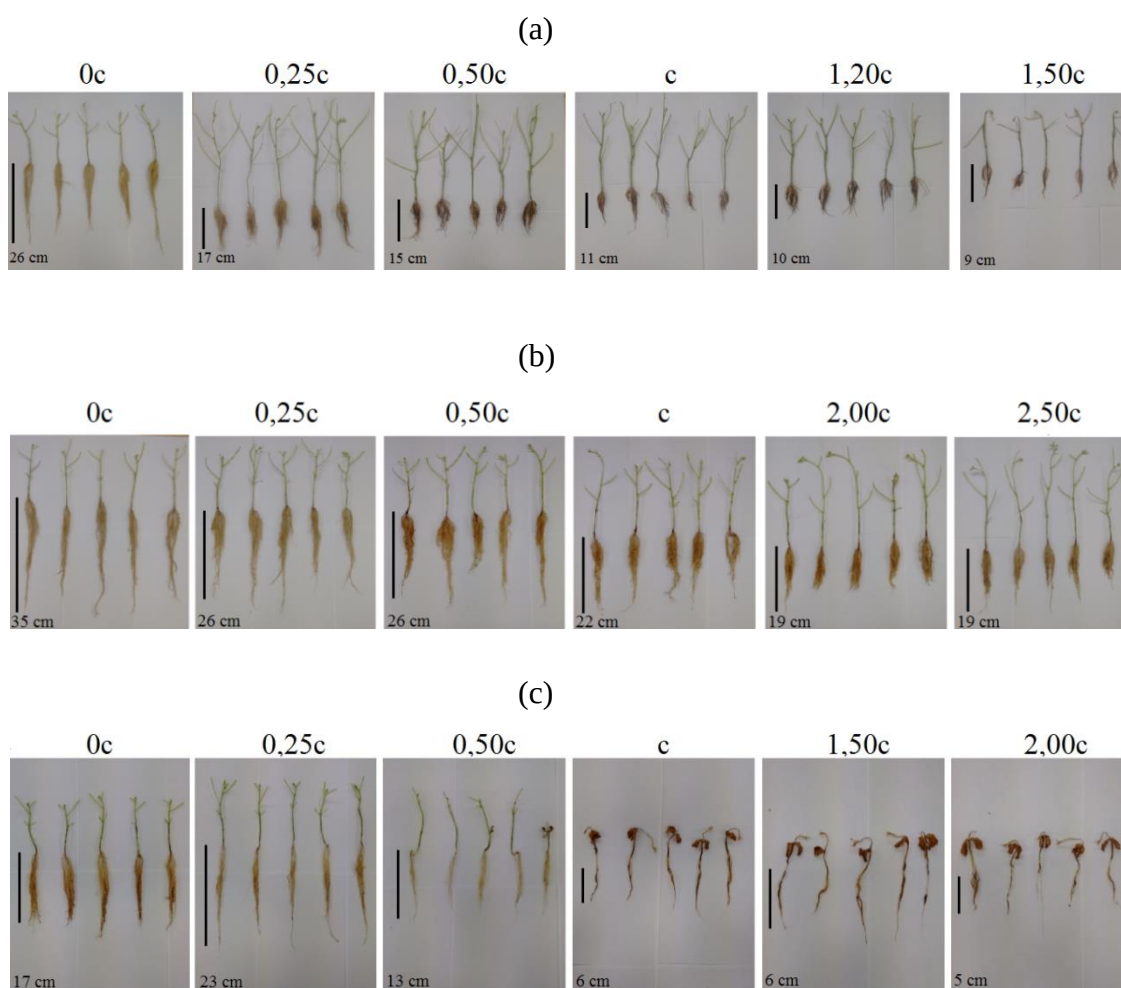
A partir da análise desses parâmetros, optou-se pelas frações de concentração 0c; 0,25c; 0,50c; c; 1,20c; 1,50c de glifosato, 0c; 0,25c; 0,50c; c; 2,00c; 2,50c de difenoconazol e 0c; 0,25c; 0,50c; c; 1,50c e 2,00c de metomil. Dessa forma, os três teriam as mesmas concentrações de referência, porém as duas últimas frações de concentração seriam menores para o glifosato e metomil, que já apresentaram alterações em plantas irrigadas com a

concentração c, e maiores para o difenoconazol, que não apresentou diferença significativa na concentração de referência, em relação ao grupo controle.

Com as frações de concentração definidas, realizou-se experimentos com glifosato, difenoconazol e metomil, avaliando o potencial de diferentes métodos experimentais e parâmetros para, em associação com plantas (bioindicadores), indicar os efeitos induzidos pelos pesticidas.

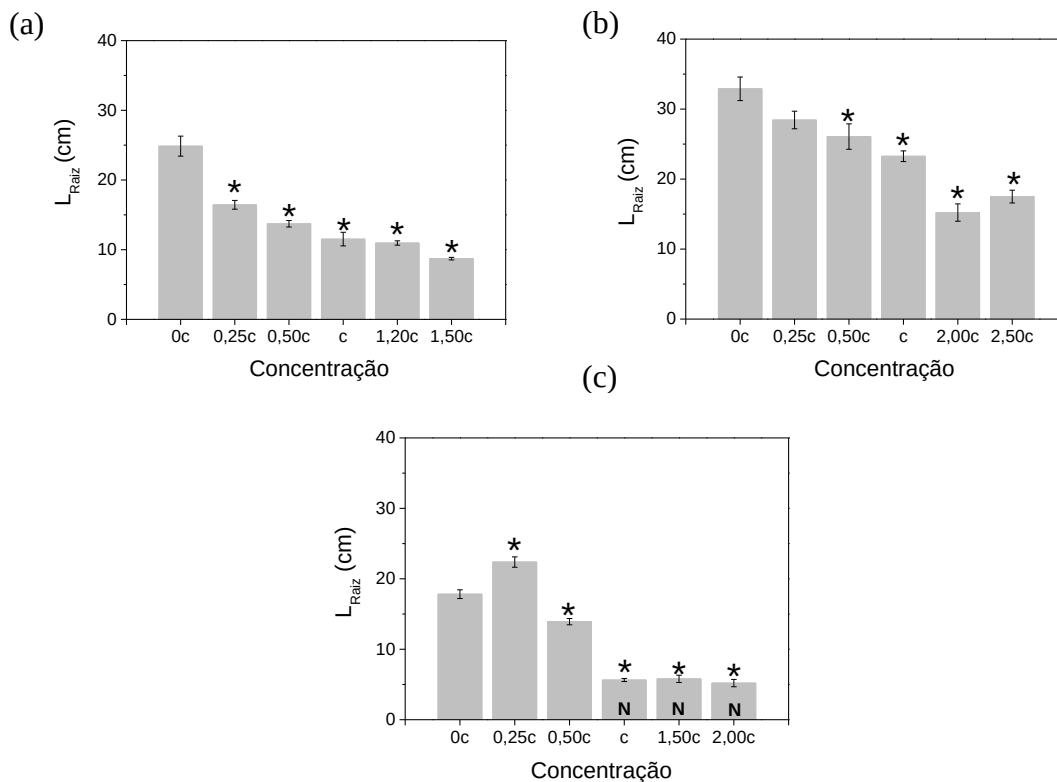
As figuras 35 e 36 mostram que, ao submeter às plantas de soja aos pesticidas, houve uma redução significativa do crescimento médio das raízes quando comparado ao grupo controle, independente do pesticida empregado.

Figura 35 – Fotos da raiz de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Figura 36 – Comprimento da raiz de plantas de soja irrigadas com soluções contendo diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; N destaca grupos que apresentaram plantas totalmente necrosadas.



Fonte: Próprio autor.

As plantas de soja mostraram-se mais sensíveis ao glifosato e ao metomil, pois na fração de concentração 0,25c já foi possível detectar os efeitos destes pesticidas, enquanto que, para as plantas irrigadas com difenoconazol, só foi possível detectar a presença deste na fração de concentração 0,50c (Figura 36).

Um dos promotores de crescimento radicular em plantas é a auxina ácido 3-indolilacético (IAA), que deriva do aminoácido triptofano por meio de várias etapas. Como o glifosato inibe a síntese de triptofano, consequentemente a síntese de IAA também está prejudicada, provocando o decréscimo radicular.⁹⁵

Por sua vez, o difenoconazol promoveu a inibição do comprimento da raiz. Esse fato ainda não foi mencionado na literatura, então o mecanismo para essa redução ainda não é conhecido.

O metomil pode induzir ao estresse oxidativo em virtude da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).⁹⁴ Essas EROs são subprodutos do metabolismo aeróbico e

fotossintético e compõem diversas vias de sinalização hormonais. Para evitar os danos oxidativos, a concentração das EROs é mantida em níveis não tóxicos por meio de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os mecanismos enzimáticos destaca-se a peroxidase de fenóis e a peroxidase do ascorbato que, em conjunto, representam componentes importantes do sistema de proteção oxidativa nas folhas e nas raízes, além da peroxidase de fenóis viabilizar o alongamento celular.⁹⁶ Portanto na fração de concentração 0,25c, o metomil causa um aumento no comprimento da raiz das plantas, possivelmente devido a um aumento na produção dessas enzimas na tentativa de minimizar o estresse oxidativo.

Nas frações de concentração acima de 0,25c de metomil, acredita-se que há um excesso de EROs, o que causa danos oxidativos às proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, caracterizando um estresse oxidativo secundário e,⁹⁶ por consequência, implicando na redução do comprimento radicular.

Os resultados encontrados neste estudo corroboram outros da literatura abordando diferentes plantas, como o de Reade e Cobb que concluíram que agentes químicos como o herbicida glifosato podem inibir o desenvolvimento radicular de *Brassica napus*.⁹⁷

As raízes das plantas são os primeiros pontos de exposição aos estresses abióticos transmitidos pelo solo, por este motivo, a avaliação do desenvolvimento radicular se torna essencial sendo uma análise rápida e emergente capaz de demonstrar os efeitos dos agentes químicos como pesticidas no desenvolvimento de plantas superiores.⁹⁸

As inibições das biossínteses de IAA, nas plantas irrigadas com glifosato, e formação de EROs em excesso nas plantas irrigadas com metomil provocam a inibição do índice mitótico, diretamente ligado ao crescimento radicular.^{90, 100} Este índice, segundo d'Aquino et al., está correlacionado com a frequência de divisão celular; assim, a redução do comprimento das raízes nos grupos submetidos aos pesticidas pode estar relacionada ao baixo índice mitótico.¹⁰¹

Ademais, a inibição do índice mitótico está ligada à indução de aberrações cromossômicas.¹⁰² A exposição constante do ácido desoxirribonucleico (DNA) ao estresse oxidativo celular e ambiental pode resultar em danos que podem interromper o crescimento e resultar em mutagênese ou em morte celular.¹⁰³

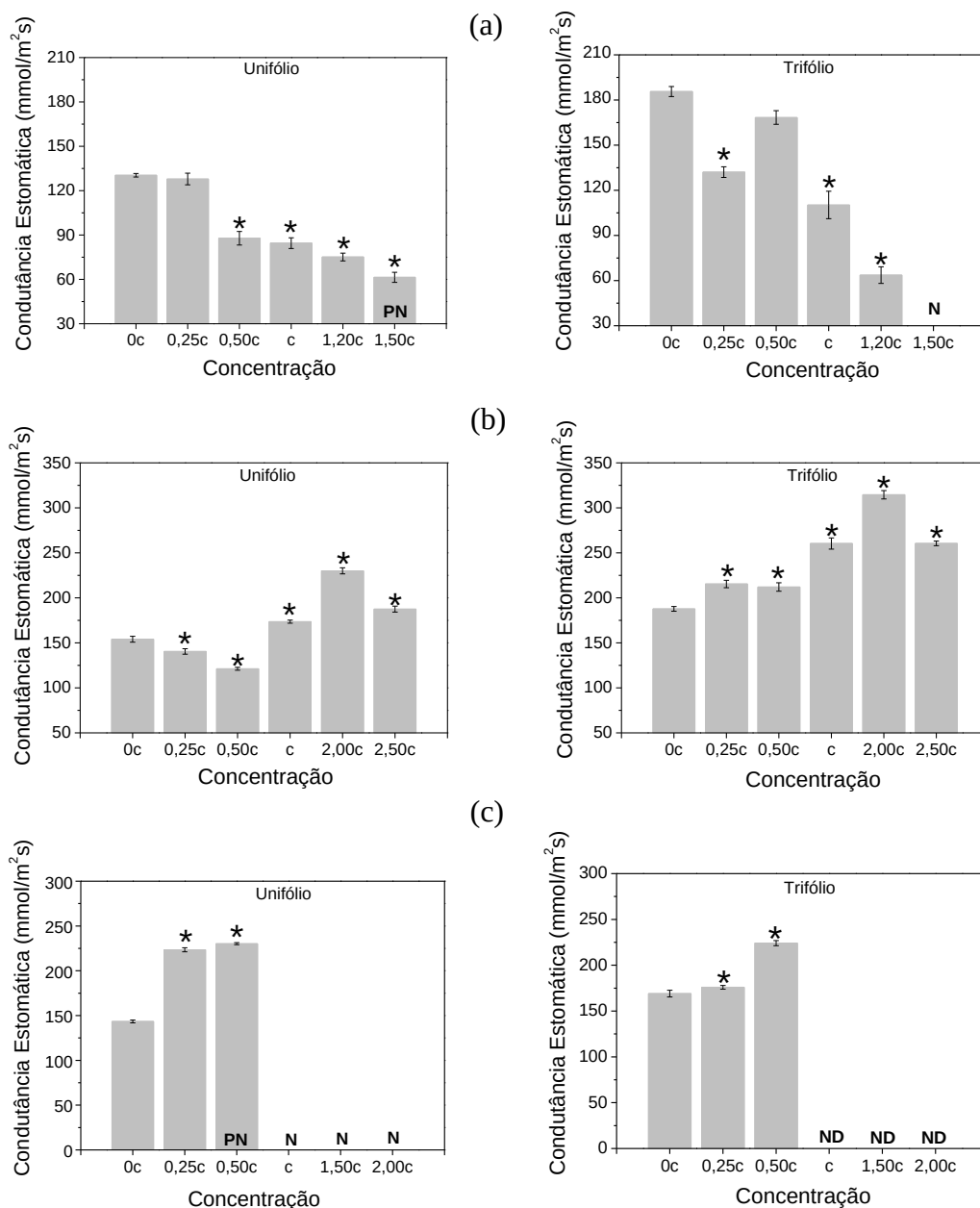
Outra metodologia utilizada neste trabalho a fim de avaliar os efeitos causados pelos pesticidas em plantas foi a condutância estomática. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 37.

Para as plantas irrigadas com glifosato observou-se um decréscimo na condutância estomática, tanto para o unifólio como para o trifólio. Abu-Irmaileh et al. observaram que a aplicação de solução com 20 mM de glifosato em plantas de feijoeiro aumentou a produção de etileno.¹⁰⁴ Assim, a redução da condutância estomática pode ter sido provocada pelo estímulo na produção do etileno nas plantas, que por sua vez estimula a síntese do ácido abscísico (ABA), que se acumula inicialmente nas folhas e depois é translocado pela planta, atuando no fechamento estomático, reduzindo a perda de água.¹⁰⁵ Esses dados corroboram os dados de Ding et al. que observaram uma redução da condutância estomática em plantas de soja tratadas com AMPA (do inglês, *Aminomethylphosphonic Acid*), produto formado em plantas resistentes ao glifosato quando tratadas com glifosato.¹⁰⁶

Não obstante, as plantas irrigadas com difenoconazol e metomil apresentaram condutância estomática maiores do que as plantas do grupo controle. Alguns fatores podem justificar tal comportamento. O movimento dos estômatos encontra-se acoplado ao metabolismo das células-guardas e qualquer fator, inclusive a presença de pesticidas, que afete o metabolismo, afetará também o movimento dos estômatos.³⁵

Vale também destacar que em folhas mais jovens, a taxa respiratória é maior que em folhas mais velhas. Provavelmente é por isso que nos unifólios, que são folhas mais antigas, a condutância estomática é sempre menor que nos trifólios, que são folhas mais novas.³⁵

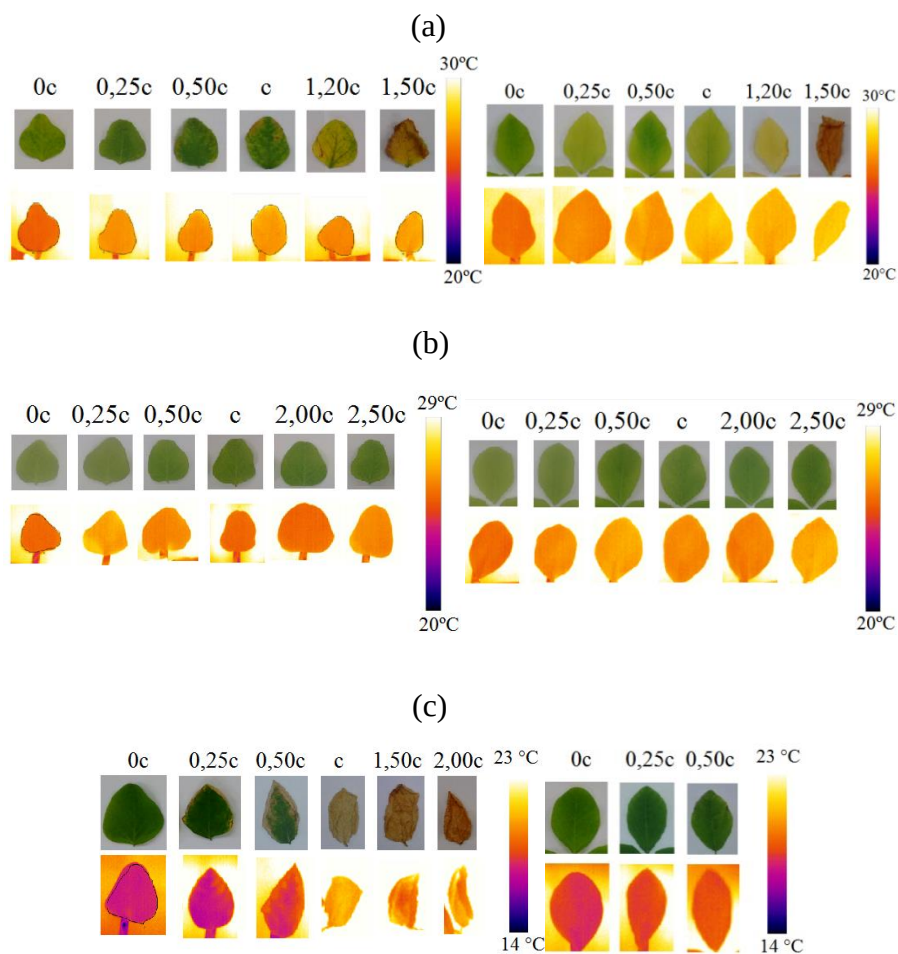
Figura 37 – Condutância estomática de plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

A figura 38 exibe as fotos e as imagens térmicas das plantas de soja submetidas a diferentes concentrações de pesticidas.

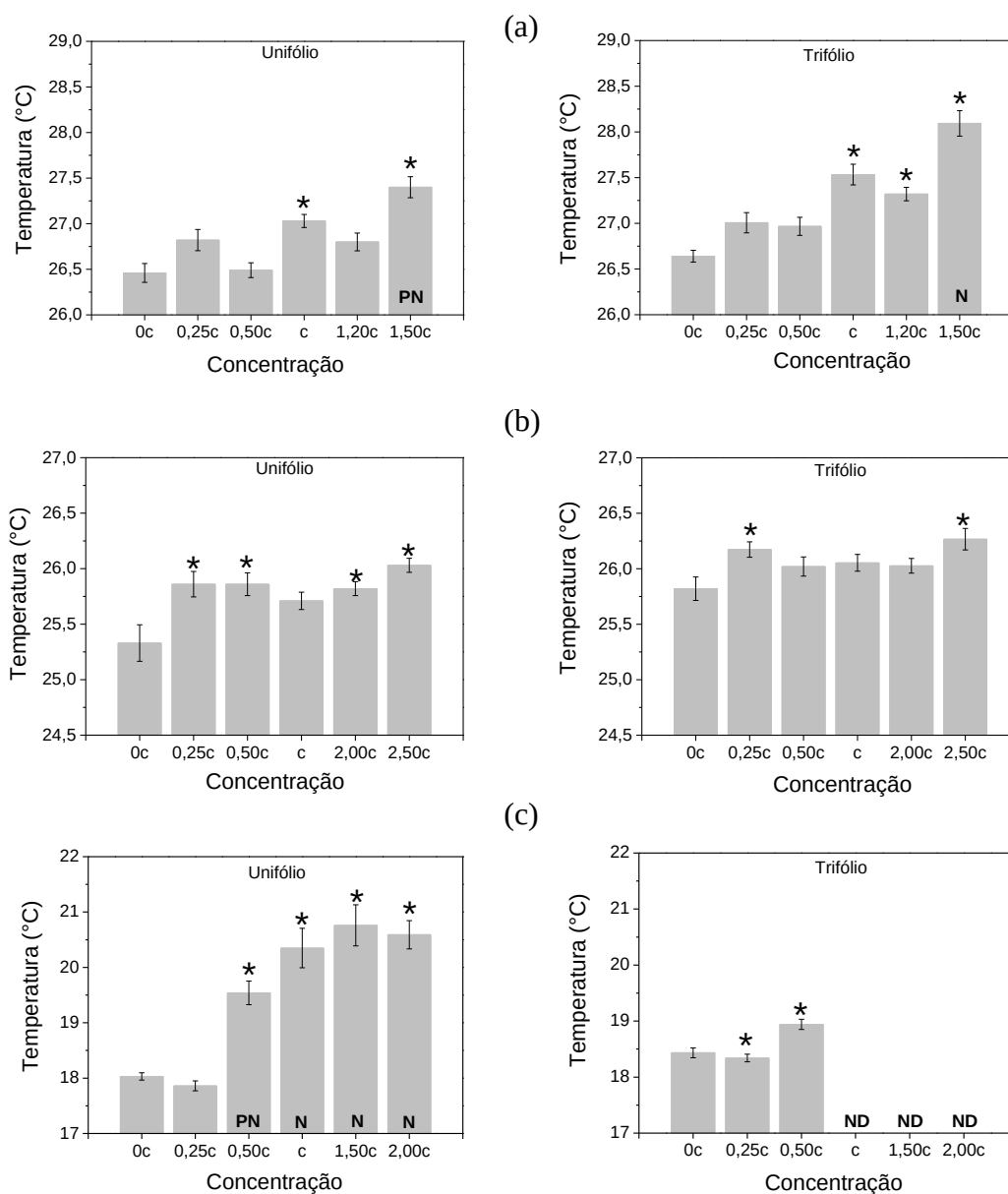
Figura 38 – Fotos e imagens térmicas das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação, sendo as imagens da esquerda referente ao unifólio e as da direita referente ao trifólio.



Fonte: Próprio autor.

A partir das imagens térmicas foram obtidas as médias das temperaturas foliares apresentadas na figura 39. Sabe-se que quando a condutância estomática diminui, a temperatura foliar tende a aumentar. No caso das plantas de soja irrigadas com glifosato, observou-se o fechamento dos estômatos de forma que a radiação absorvida pela folha pode ter sido a causa do aquecimento foliar.³² Nos experimentos envolvendo plantas irrigadas com difenoconazol, verificou-se um aumento da temperatura foliar para algumas concentrações utilizadas, porém com variações menores quando comparadas às plantas irrigadas com glifosato em relação ao grupo controle. Esse comportamento pode ser justificado pelo aumento da condutância estomática nas plantas submetidas ao difenoconazol, possibilitando um controle de temperatura foliar mais efetivo.

Figura 39 – Temperatura das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



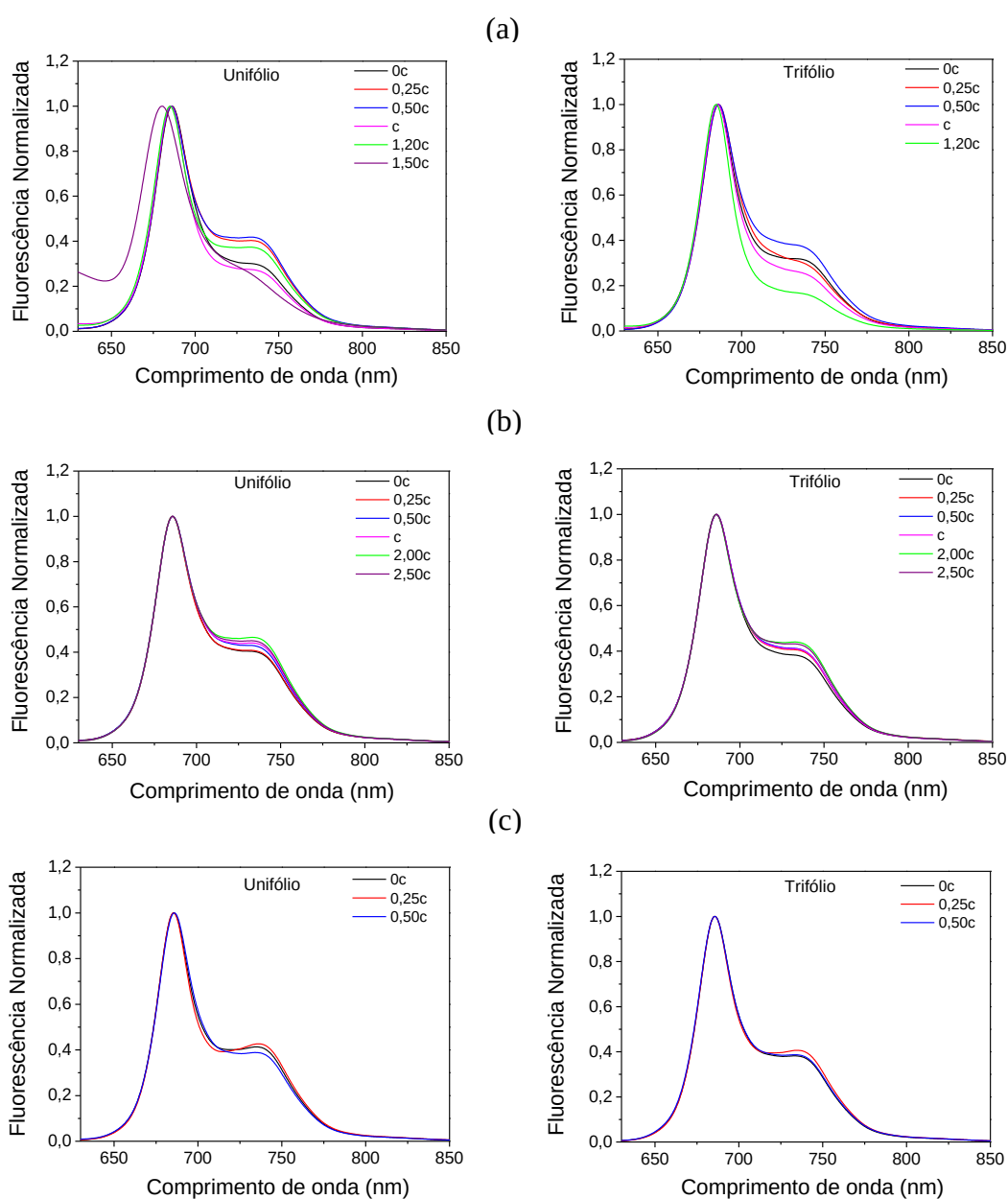
Fonte: Próprio autor.

Nas plantas parcialmente e totalmente necrosadas (plantas irrigadas com metomil), já era esperado um aumento na temperatura foliar uma vez que a temperatura da planta é controlada pela transpiração, que ocorre na abertura dos estômatos; porém, nesses estados

fisiológicos, os estômatos já não funcionam adequadamente, dificultando a refrigeração das plantas.¹⁰⁷

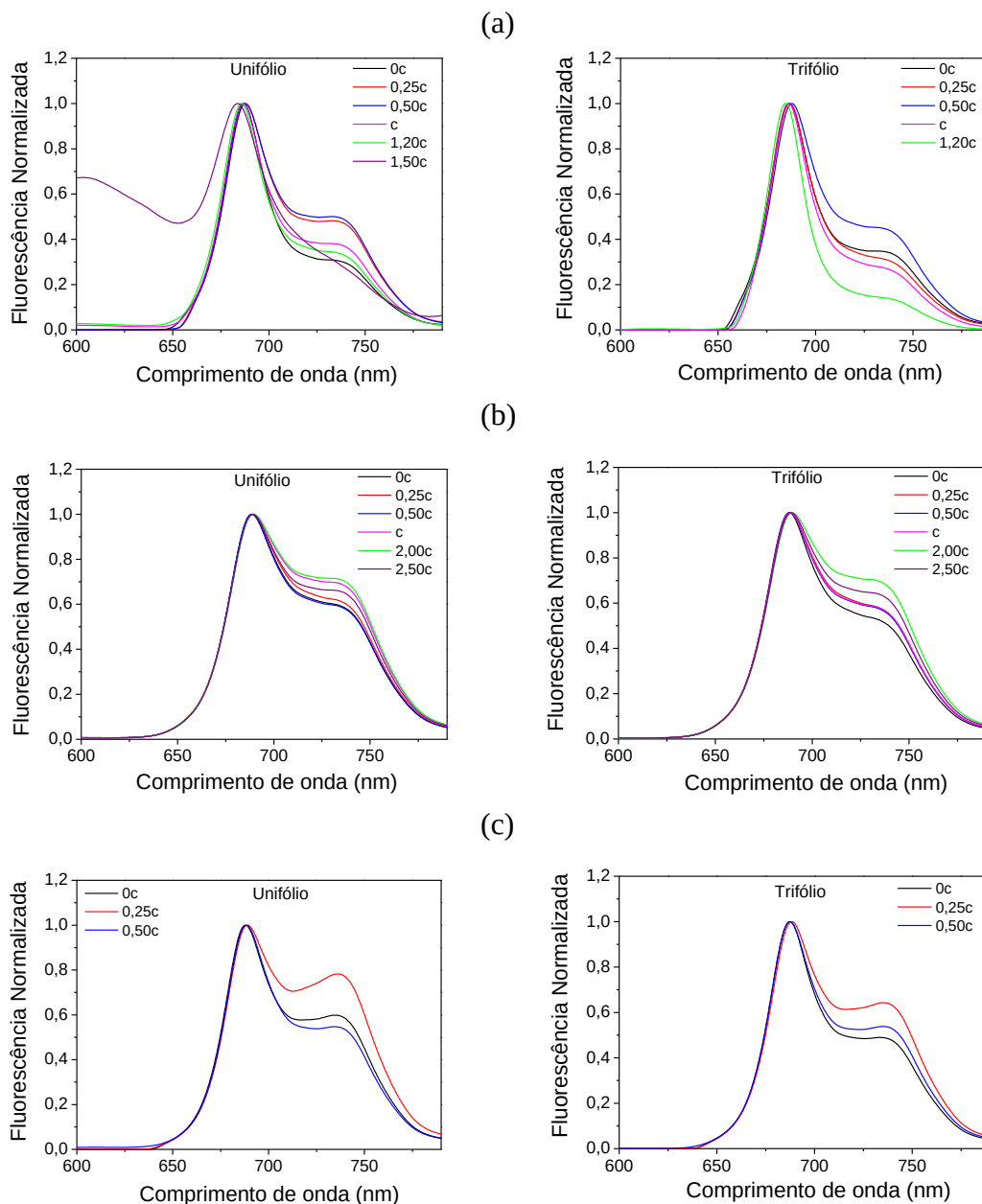
Para investigar os efeitos das diferentes concentrações de pesticidas na razão F685/F735 associadas às plantas, espectros de fluorescência das plantas *in vivo* irrigadas com soluções de pesticidas foram obtidos (Figuras 40 e 41).

Figura 40 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 405 nm, irrigadas diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Figura 41 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 532 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

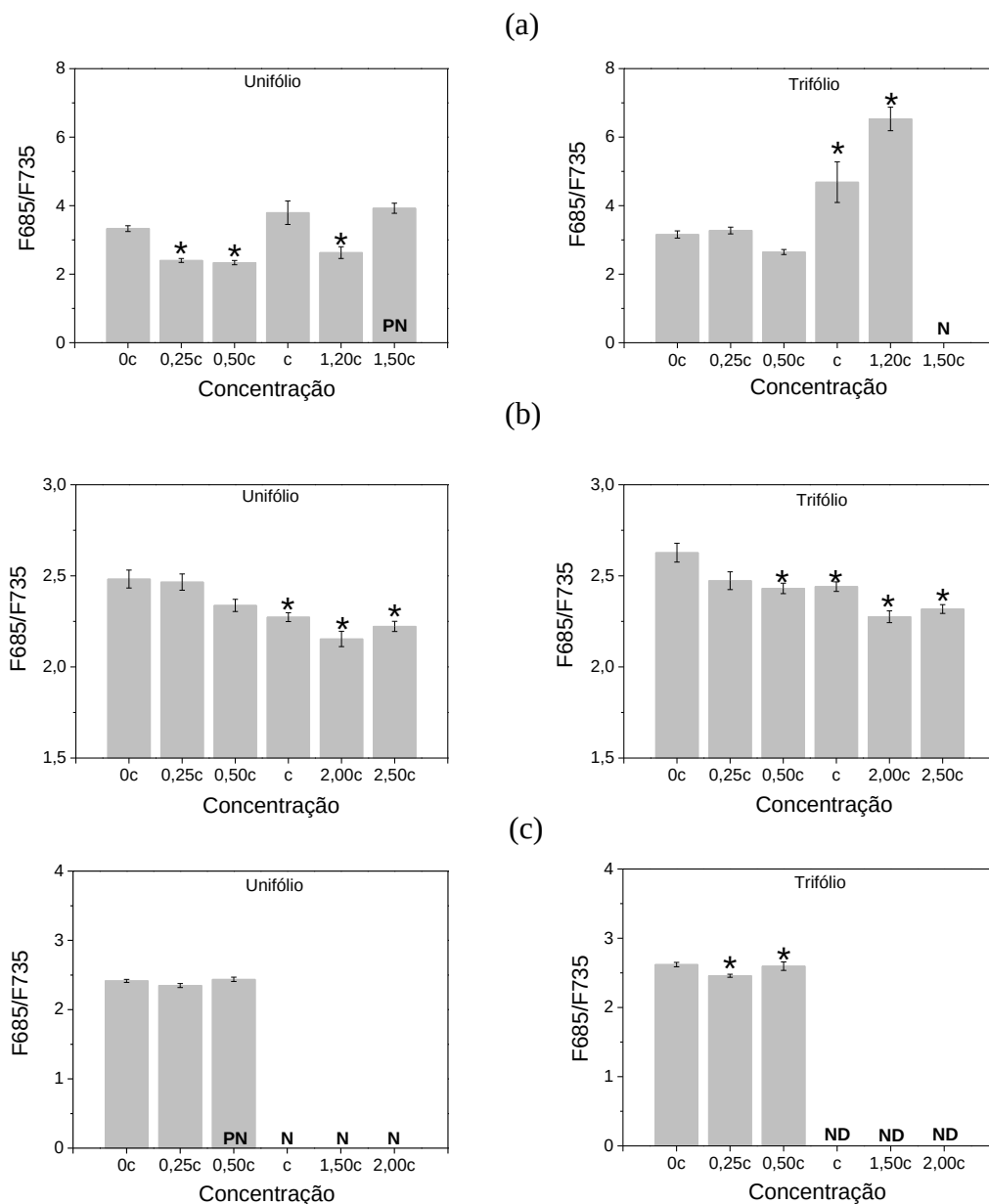
Radiação ultravioleta e visível (UV-Vis) absorvida por folhas verdes pode induzir duas regiões de fluorescência. A fluorescência no intervalo entre 200 e 600 nm tem sido associada a vários fluoróforos foliares tais como, ácidos hidroxicinâmicos, flavonóis, isoflavonas, flavanonas e ácidos fenólicos. Por sua vez, a emissão entre 600 e 800 nm tem sido atribuída apenas à clorofila.¹⁰⁸ Portanto, nota-se a fluorescência da clorofila nos espectros das folhas investigadas (Figuras 40 e 41). Não obstante, a emissão da clorofila nas folhas que estão

totalmente necrosadas, concentração 1,50c do glifosato (trifólio) e concentrações c, 1,50c e 2,00c de metomil, já não é observada, pois não existe clorofila nesses casos, por esse motivo esses dados não estão apresentados nas figuras 40 e 41.

O espectro da luz solar contém proporções quase iguais de fótons na região azul (400-499 nm), verde (500-599 nm) e vermelho (600-699 nm). Estes fótons, uma vez absorvidos pelos cloroplastos, são capazes de promover a fotossíntese com a mesma eficiência quântica. No entanto, devido às propriedades físicas e às estruturas complexas das folhas, cada comprimento de onda atinge uma determinada profundidade na folha, alcançando os cloroplastos localizados em diferentes partes do sistema foliar. Absorvendo principalmente nas regiões azul e vermelha do espectro, a clorofila não absorve de forma eficiente fótons na região verde, com até 80% de toda luz verde sendo transmitida através do cloroplasto, permitindo que mais fótons verdes atinjam o mesofilo (conjunto de tecidos localizado entre as epidermes superior e inferior da folha). Esta "janela verde", juntamente com as propriedades altamente refrativas de tecido foliar, revelam que os fótons na região espectral verde são capazes de atingir cloroplastos muito mais profundos no mesofilo do que os fótons vermelhos e azuis.¹⁰⁹ Por isso foram utilizados dois comprimentos de onda para excitação, 405 e 532 nm.

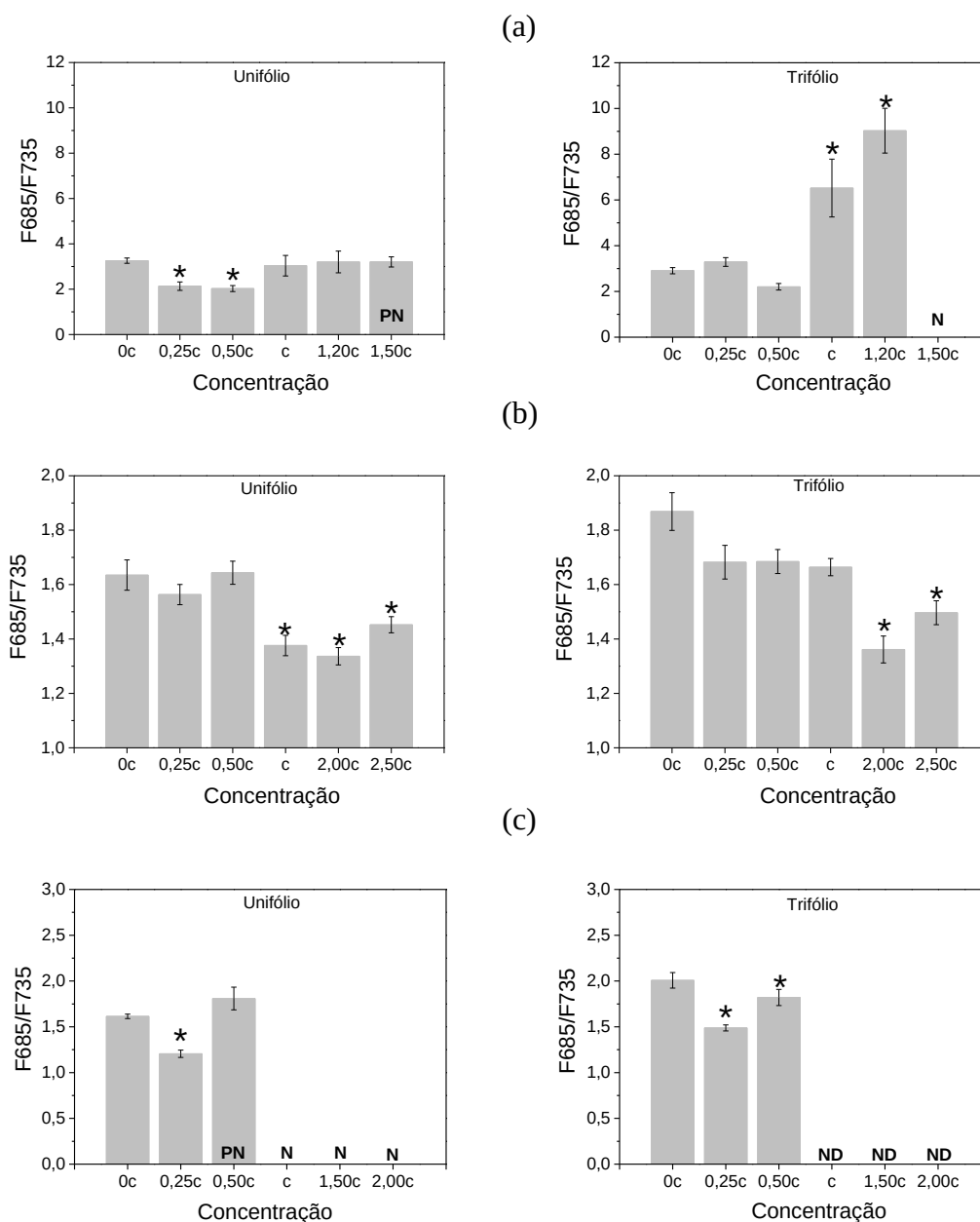
As razões F685/F735 foram determinadas para diferentes plantas e concentrações dos pesticidas a partir dos espectros de fluorescência das folhas sob excitação em 405 e 532 nm, figuras 42 e 43, respectivamente.

Figura 42 – Razão F685/F735, com excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Figura 43 – Razão F685/F735, com excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Segundo Buschmann, a razão F685/F735 diminui com o aumento do conteúdo de clorofila, pois quando há uma quantidade maior de clorofila ocorre um fenômeno chamado reabsorção. Esse parâmetro atua como um bom indicador do conteúdo de clorofila no tecido foliar, por exemplo, antes e depois de eventos de estresse.⁷¹

Para o unifólio das plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato, houve um decréscimo em F685/F735, para as menores concentrações utilizadas, quando excitadas em 405 nm, indicando um aumento na quantidade de clorofila. No caso da excitação em 532 nm verificou-se uma redução em F685/F735 para as frações de concentrações 0,25c e 0,50c. As frações de concentrações maiores não afetaram significativamente as plantas dos grupos-teste em relação ao grupo controle.

A razão F685/F735 no trifólio (parte da planta que apresentou maior clorose pela presença do glifosato) aumentou para as frações de concentrações maiores ou iguais a c, sinalizando uma redução na quantidade de clorofila nas folhas cultivadas nessas concentrações de glifosato.

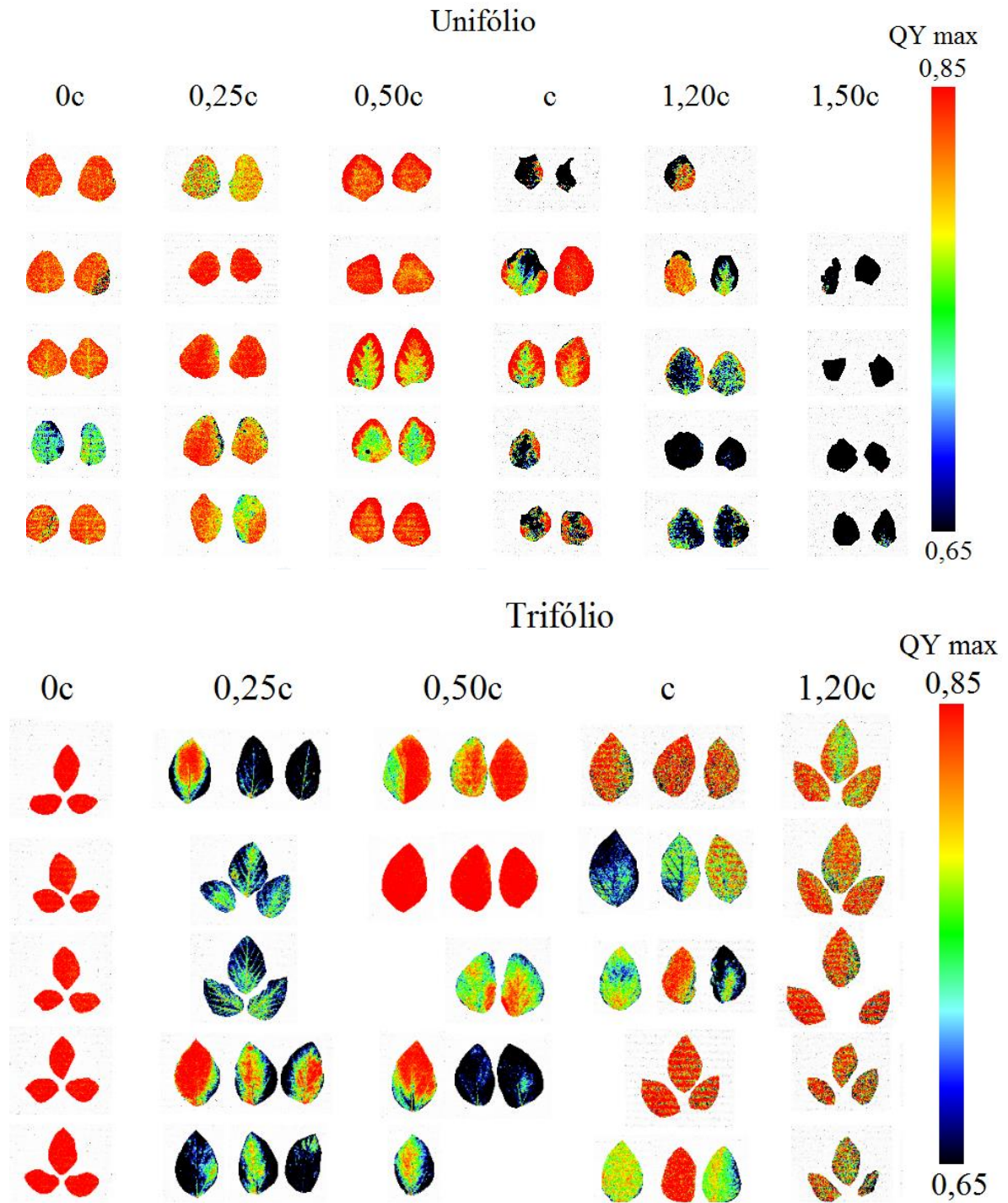
As plantas de soja irrigadas com difenoconazol exibiram um decréscimo em F685/F735 para ambas as excitações (405 e 532 nm), apontando uma elevação no teor de clorofila nessas plantas. A razão F685/F735 obtida por meio da excitação em 405 nm do trifólio se mostrou mais sensível à presença do difenoconazol na irrigação das plantas de soja, pois o efeito deste pesticida foi percebido a partir da fração de concentração de 0,50c, enquanto que para excitação em 532 nm, a diferença significativa só foi detectada no trifólio para a irrigação com a fração de concentração 2,00c. Uma possível explicação para maior sensibilidade em 405 nm pode ser o fato de o difenoconazol causar maior efeito nos cloroplastos superficiais na soja, já que esse comprimento de onda atinge principalmente esses cloroplastos.

Por sua vez, as razões F685/F735 para as folhas necrosadas não foram obtidas, já que nesses casos não há quantidade significativa de clorofila.

A eficiência do FS II foi caracterizada pelo parâmetro *QY máximo* (Equação 2, pag. 45). Para obtenção desse parâmetro, as folhas foram removidas, pois as plantas irrigadas com glifosato não couberam no equipamento, devido ao estiolamento. Mesmo as plantas menores tiveram suas folhas retiradas para realização dos experimentos para que não houvesse diferença de procedimento experimental. As medições foram realizadas imediatamente após a retirada das folhas.

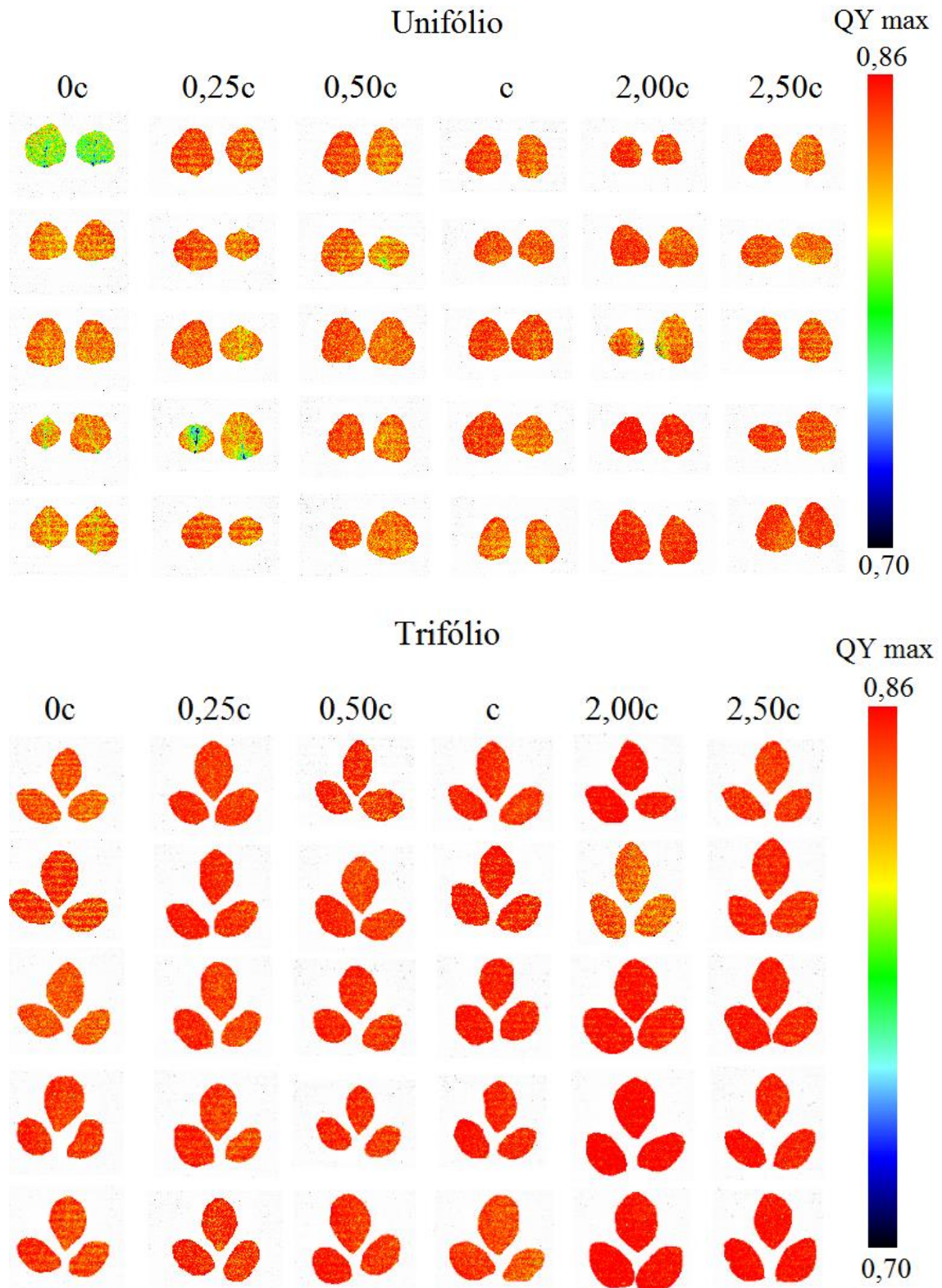
As figuras 44, 45 e 46 apresentam imagens associadas ao parâmetro *QY máximo* para as plantas de soja irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil, respectivamente. Não há imagens de algumas folhas porque caíram ou quebraram ao longo dos experimentos.

Figura 44 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato. *c* é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.



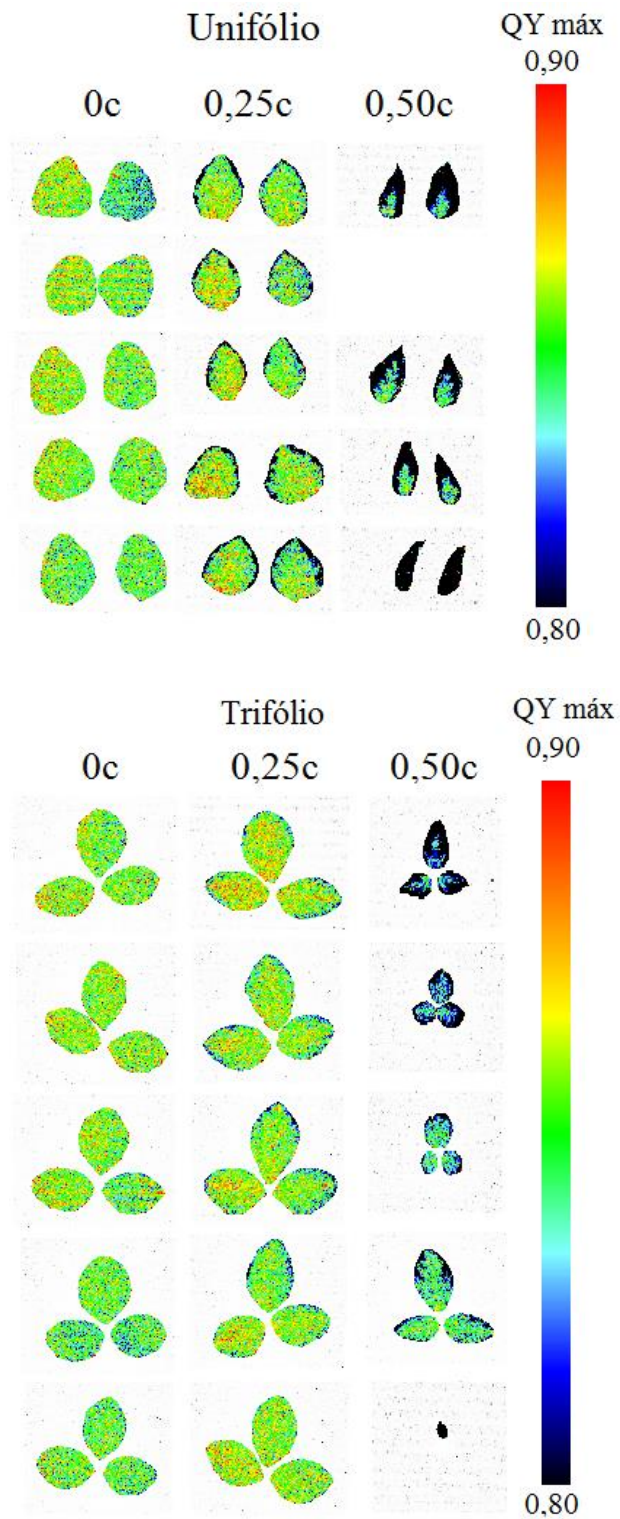
Fonte: Próprio autor.

Figura 45 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 46 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 1075 ppm.



Fonte: Próprio autor.

Por meio das imagens de *QY máximo* foi possível verificar uma diminuição em *QY máximo* para as plantas irrigadas com glifosato (Figura 44). No unifólio, uma diferença pode ser percebida a partir da fração de concentração c; enquanto que no trifólio, que é mais afetado pelo glifosato, as plantas submetidas à irrigação com a fração de concentração 0,25c já diferem do grupo controle.

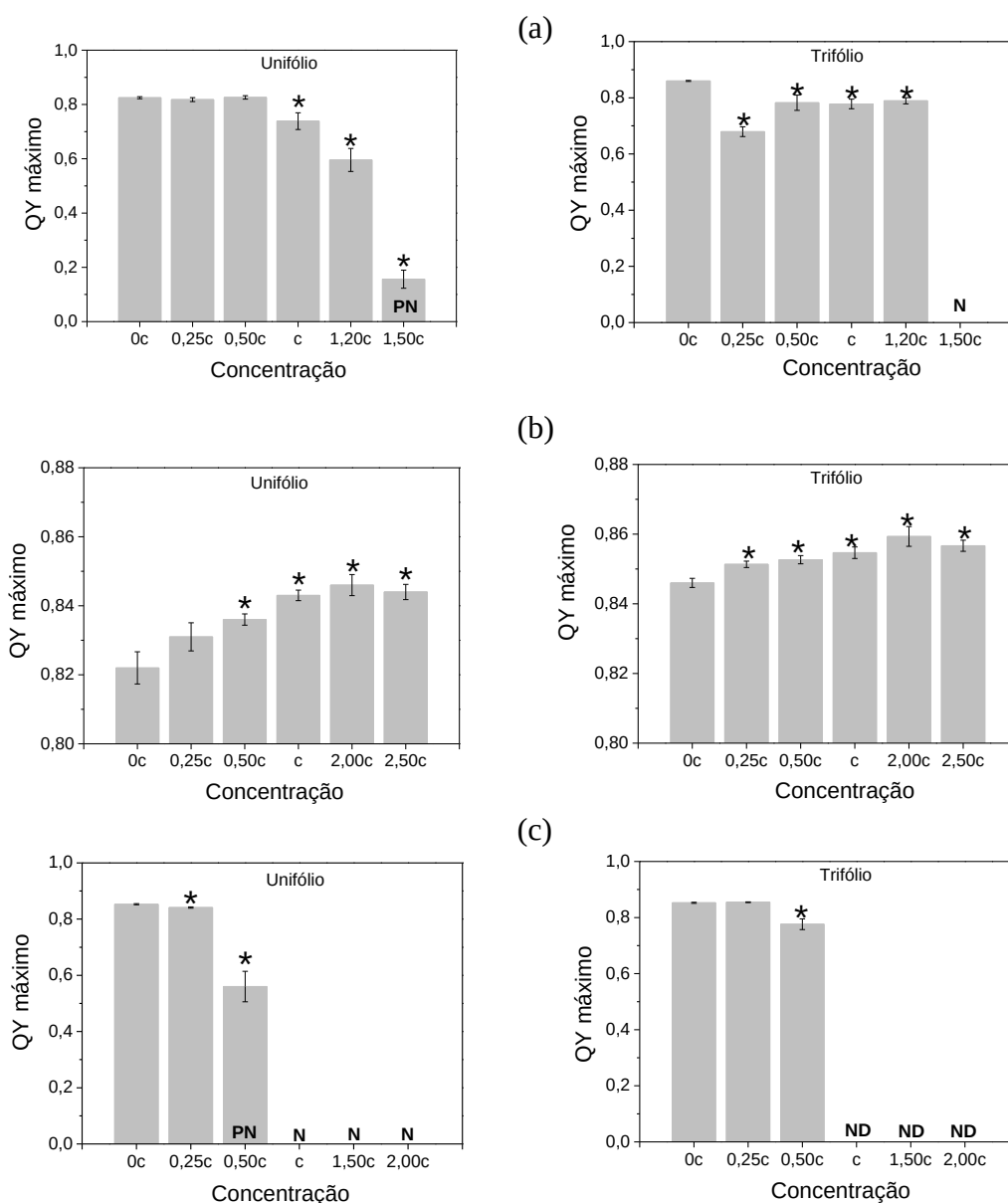
Por sua vez, não foi possível verificar diferença, em relação ao grupo controle, nas imagens de *QY máximo* para as plantas irrigadas com difenoconazol (Figura 45). Os unifólios e trifólios das plantas irrigadas com metomil exibiram alterações nas imagens de *QY máximo* a partir da fração de concentração 0,50c (Figura 46).

Os valores médios de *QY máximo* são exibidos na figura 47. *QY máximo* dos unifólios diminui nas plantas submetidas às frações de concentrações de glifosato a partir de c, enquanto percebeu-se decréscimo em *QY máximo* dos trifólios para fração de concentrações do pesticida a partir de 0,25c.

QY máximo quantifica a eficiência máxima do FS II, indicando a capacidade fotossintética da planta. Quando a planta está sob condições de estresse, este parâmetro sofre drásticas reduções, decorrentes, na maioria dos casos, de danos que desativam o FS II, impactando a fotossíntese.^{79,80}

A condutância estomática das plantas de soja irrigadas com glifosato diminuiu com o aumento da concentração desse herbicida, então a quantidade de CO₂ assimilado também diminuiu, reduzindo a fotossíntese realizada na fase escura (Figura 37). Verificou-se também que a razão F685/F735 aumentou para o trifólio, nas maiores concentrações de glifosato, indicando uma quantidade menor de clorofila (Figuras 42 e 43). Esses dados corroboram o decréscimo nos valores de *QY máximo*, pois com quantidade inferior de CO₂ disponível e menor quantidade de clorofila nos cloroplastos, menor será a capacidade fotossintética da planta. Concenço et al. concluíram que o decréscimo na condutância estomática foi o maior fator para a redução da taxa fotossintética de plantas da cultivar de crambe FMS Brilhante, as quais foram pulverizadas com solução de s-metolacoloro na concentração 0,38 L ha⁻¹.¹¹⁰

Figura 47 – QY máximo das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio). c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND indicam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

As plantas de soja irrigadas com difenoconazol apresentaram um aumento em *QY máximo*. Para o unifólio, a diferença significativa, em relação ao grupo controle, foi verificada na fração de concentração 0,50c, enquanto que para o trifólio, tal diferença foi detectada em 0,25c. Como houve maior fixação de CO₂, indicado pelo aumento na

condutância estomática (Figura 37), e maior teor de clorofila, sinalizada pela redução de F685/F735 (Figuras 42 e 43), em consequência, houve um aumento na eficiência do FS II.

Não obstante, as plantas irrigadas com metomil sofreram reduções em *QY máximo* tanto no unifólio quanto no trifólio, provavelmente devido às plantas estarem com capacidade fotossintética reduzida em face de estarem parcialmente necrosadas.

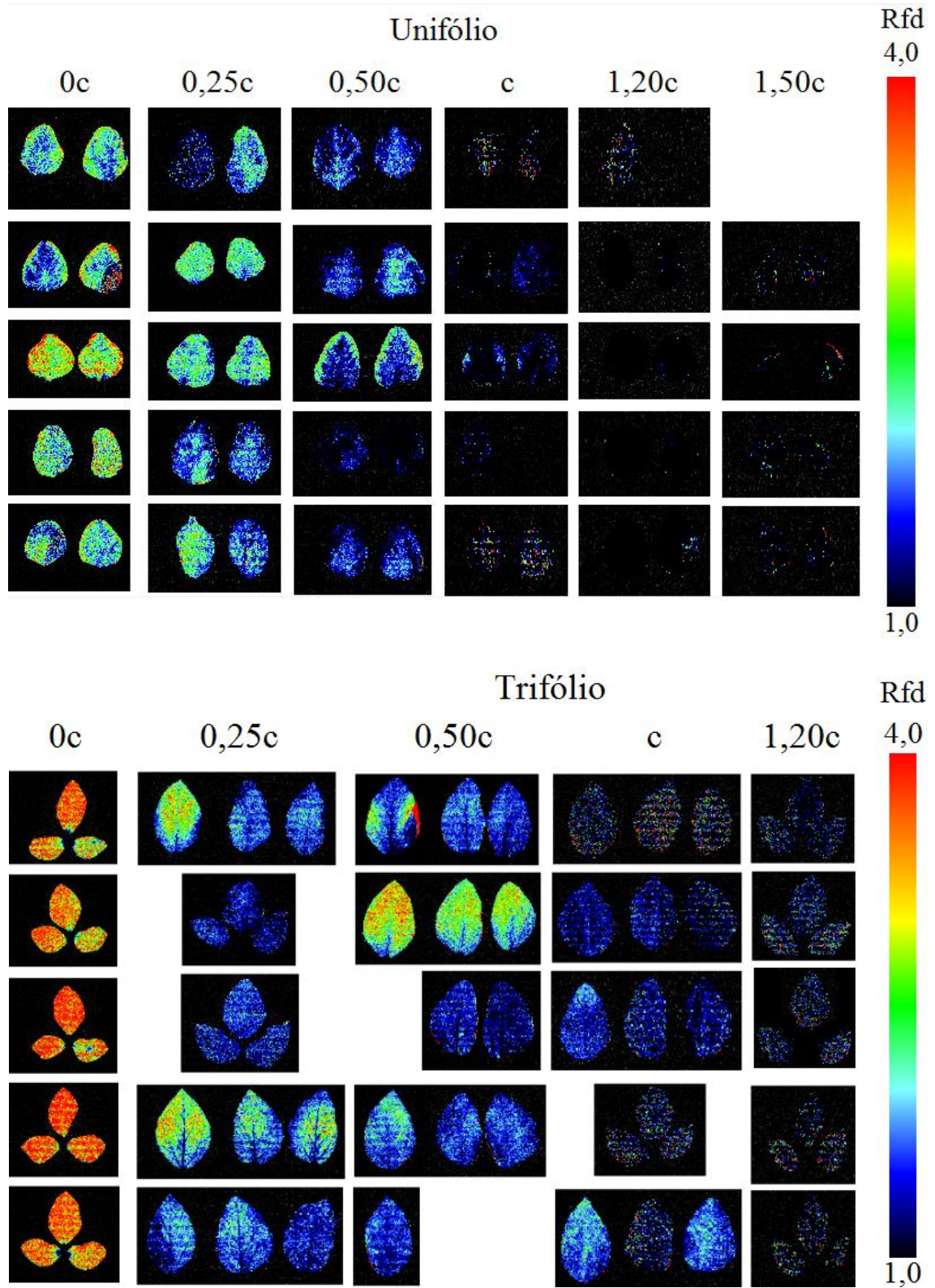
Não foram apresentados os resultados para as plantas que estavam totalmente necrosadas porque este parâmetro é obtido a partir da fluorescência da clorofila e, nesse caso, não há clorofila.

O parâmetro fotoquímico *Rfd* está associado à interação entre a fase clara e a fase escura da fotossíntese,¹¹¹ indicando a vitalidade da folha.⁷² O efeito dos pesticidas sobre a vitalidade das folhas também foi avaliado por meio do parâmetro *Rfd* (Equação 3, pag. 45). Esse parâmetro, obtido a partir da imagem de fluorescência, assim como o *QY máximo*, foi determinado por medições feitas nas folhas retiradas das plantas.

As imagens associadas ao parâmetro *Rfd* para as plantas de soja irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil são mostradas nas figuras 48, 49 e 50, respectivamente.

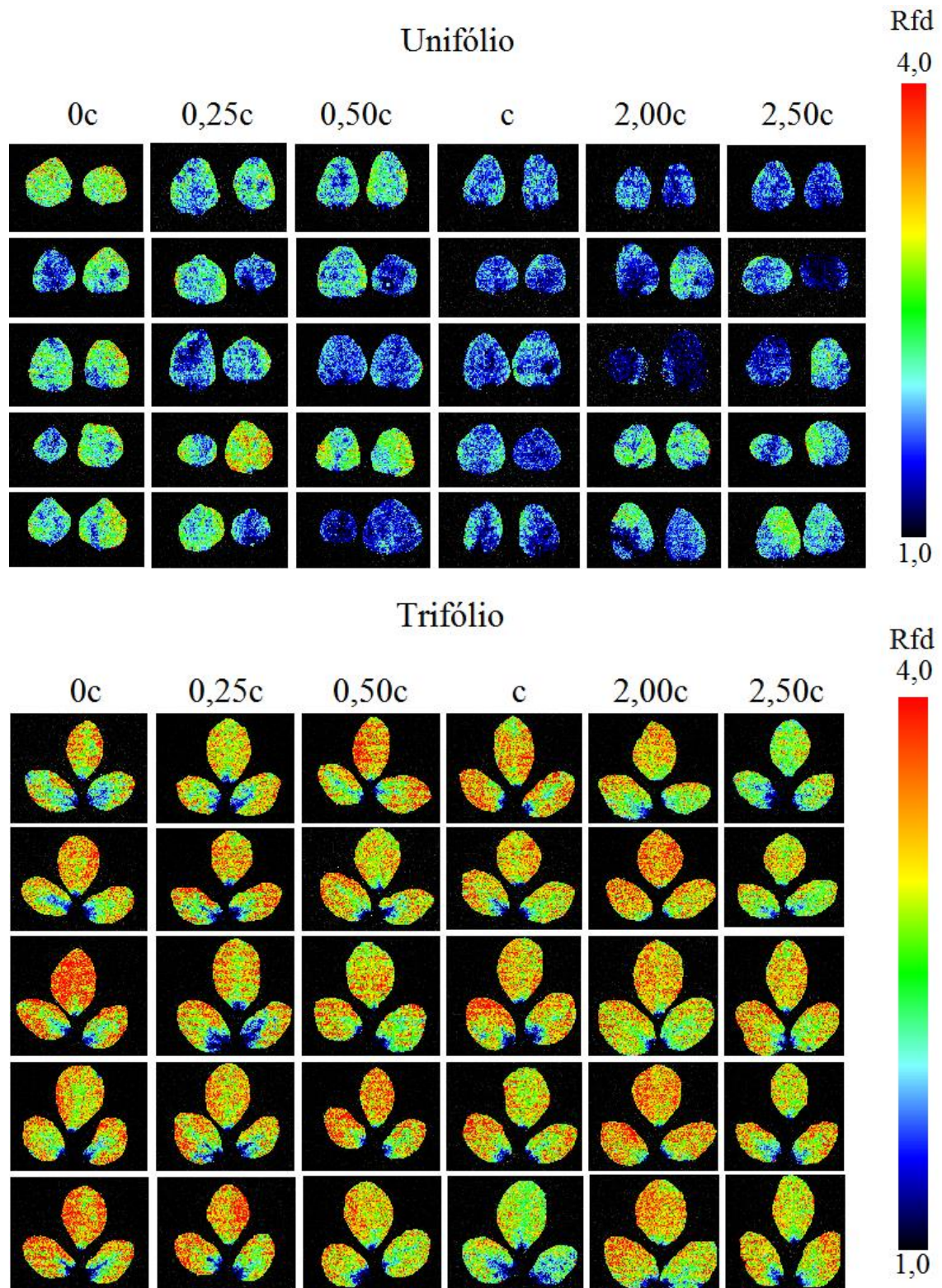
As imagens destacam uma relação entre esse parâmetro fotoquímico e a concentração de pesticida usada na irrigação. Para as plantas de soja irrigadas com glifosato nota-se um decréscimo de *Rfd* a partir da fração de concentração 0,50c, para o unifólio, e 0,25c, para o trifólio, em relação ao grupo controle. Nas plantas de soja irrigadas com difenoconazol, essa redução pôde ser percebida a partir da fração de concentração 0,50c para unifólio; contudo, para o trifólio, a análise das imagens de *Rfd* não foi eficaz para evidenciar o efeito do pesticida. Por sua vez, para as plantas irrigadas com metomil, alteração em *Rfd* foi percebida a partir da fração de concentração 0,25c tanto no unifólio quanto trifólio.

Figura 48 – Imagens associadas ao *Rfd* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.



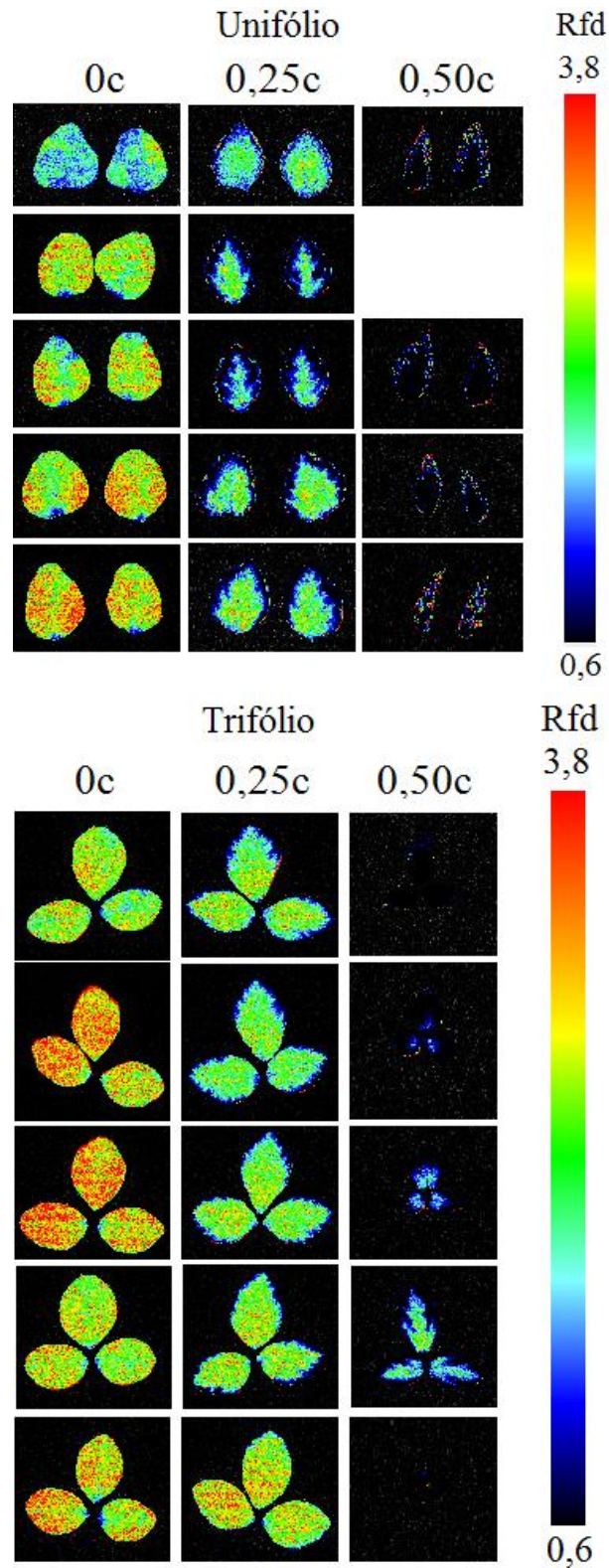
Fonte: Próprio autor.

Figura 49 – Imagens associadas ao *Rfd* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol. c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm.



Fonte: Próprio autor.

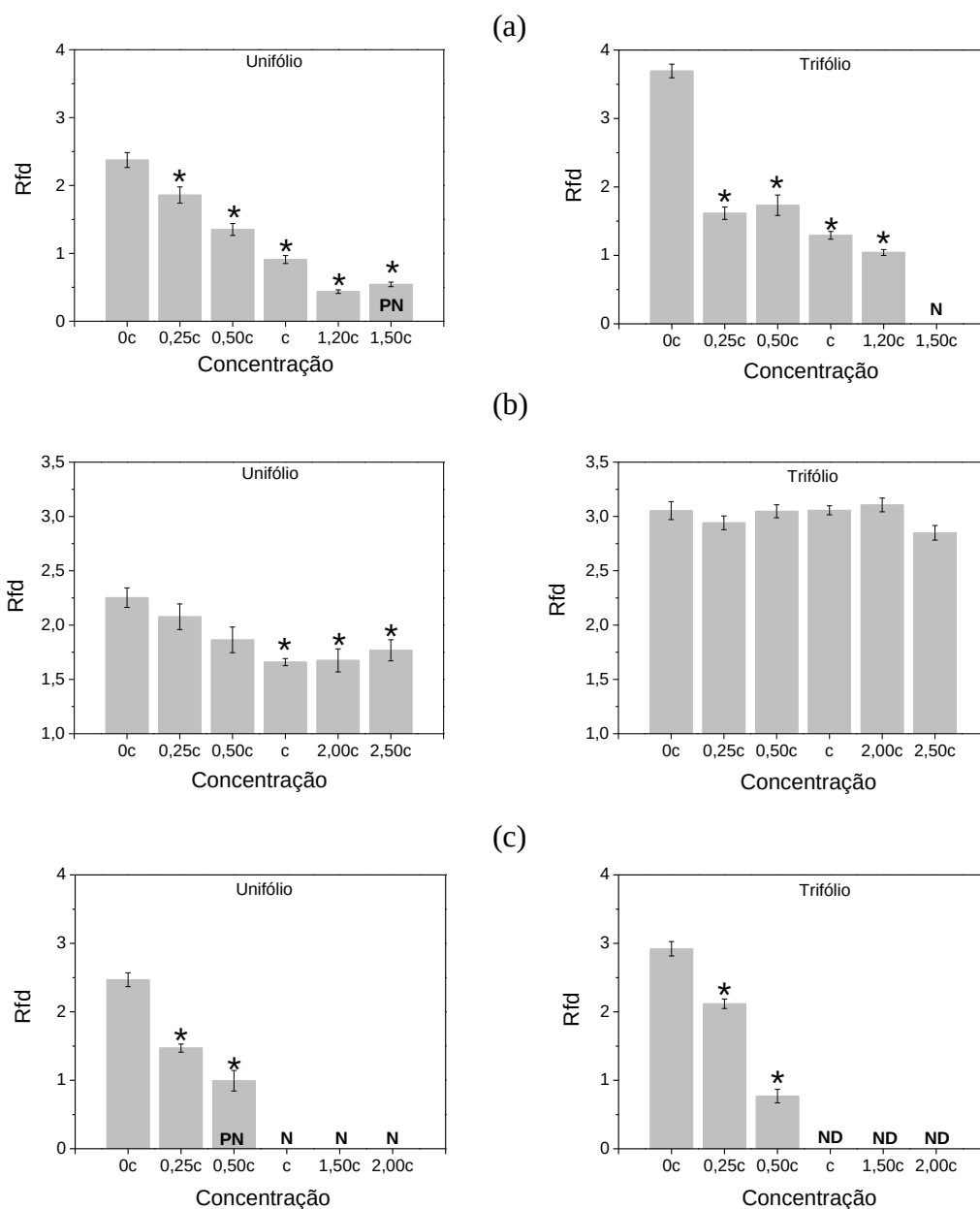
Figura 50 – Imagens associadas ao *Rfd* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil. c é a concentração indicada pelo fabricante, 1075 ppm.



Fonte: Próprio autor.

Os valores médios de *Rfd* estão apresentados na figura 51.

Figura 51 – *Rfd* das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio). c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

O valor de *Rfd* diminui tanto para unifólio quanto para trifólio em plantas de soja irrigadas com glifosato, em relação ao grupo controle, a partir da fração de concentração 0,25c.

Nas plantas de soja irrigadas com difenoconazol, a redução do *Rfd* é identificada a partir da fração de concentração c para o caso do unifólio, enquanto que no trifólio não foram observadas diferenças significativas desse parâmetro. A irrigação com metomil afetou as plantas, segundo *Rfd* do unifólio e trifólio, a partir da fração de concentração 0,25c.

A redução de *Rfd* revela que os pesticidas induziram alterações na vitalidade das plantas, com efeito mais acentuado nas plantas de soja irrigadas com glifosato e metomil.

Não foram apresentados os resultados para as plantas que estavam totalmente necrosadas porque este parâmetro, assim como *QY máximo*, é obtido a partir da fluorescência da clorofila e, nesse caso, não há clorofila.

Os resultados sugerem que com o decréscimo na condutância estomática das plantas de soja irrigadas com glifosato (Figura 37), houve uma redução nos valores de *QY máximo* (Figura 47), resultante da menor assimilação de CO_2 . Além disso, houve um aumento da razão F685/F735, indicando menor quantidade de clorofila. Todos esses aspectos contribuíram para redução da vitalidade das plantas (*Rfd*).

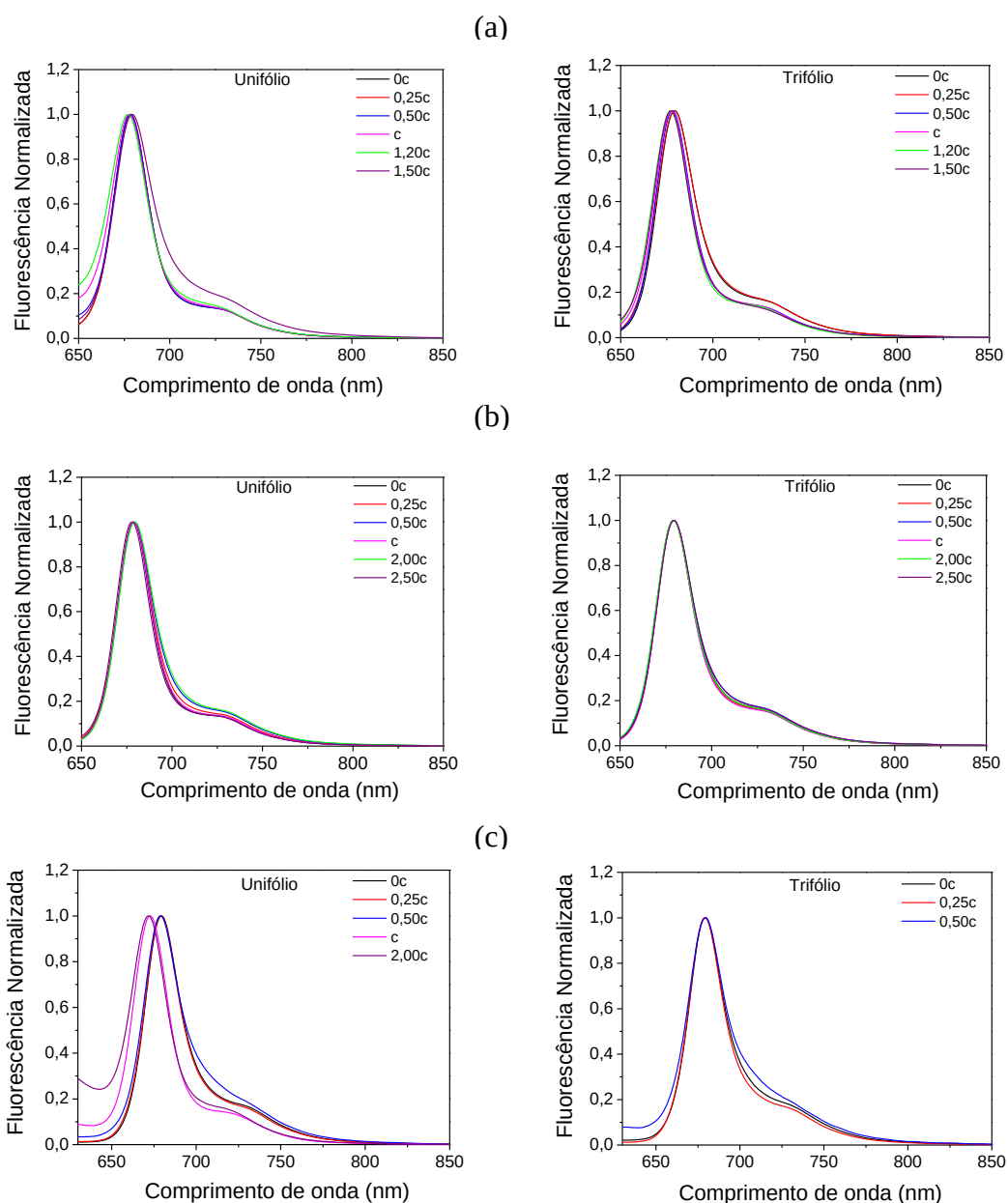
Esses dados corroboram o trabalho desenvolvido por Synowiec et al. que observaram uma redução em *QY máximo* e *Rfd* em plantas de brócolis (*Brassica oleracea* L.) induzida por eugenol, constituinte do óleo de cravo, e que tem sido utilizado como herbicida.⁷⁸ Os autores sugeriram que esses dois parâmetros de fluorescência podem representar bons indicadores iniciais de estresse fitotóxico em tecidos vegetais.

Por sua vez, para as plantas de soja irrigadas com difenoconazol, os dados revelam um aumento na condutância estomática (Figura 37) e, conseqüentemente, na assimilação de CO_2 , promovendo maiores valores de *QY máximo* (Figura 47) e menores valores da razão F685/F735, em função do aumento da quantidade de clorofila. Uma redução dos valores de *Rfd* no unifólio foi identificada, indicando que, mesmo a capacidade fotossintética da planta sendo maior, o estresse causado pelo fungicida afetou a vitalidade dessas folhas. Entretanto, a ação do difenoconazol não foi capaz de influenciar a vitalidade dos trifólios, possivelmente porque esses são mais novos que os unifólios.

As plantas irrigadas com metomil apresentaram um aumento da condutância estomática, o que pode ter ocorrido como uma forma de tentativa de recuperação da planta, aumento dos valores da razão F685/F735 para o unifólio, indicando menor quantidade de clorofila, o que provavelmente ocasionou menores valores de *QY máximo*, indicando menor capacidade fotossintética, o que corrobora os menores valores de *Rfd*.

Um estudo de fluorescência da clorofila presente nos extratos das folhas, sob excitação em 405 nm, foi realizado. Os espectros de fluorescência da clorofila estão dispostos na figura 52.

Figura 52 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



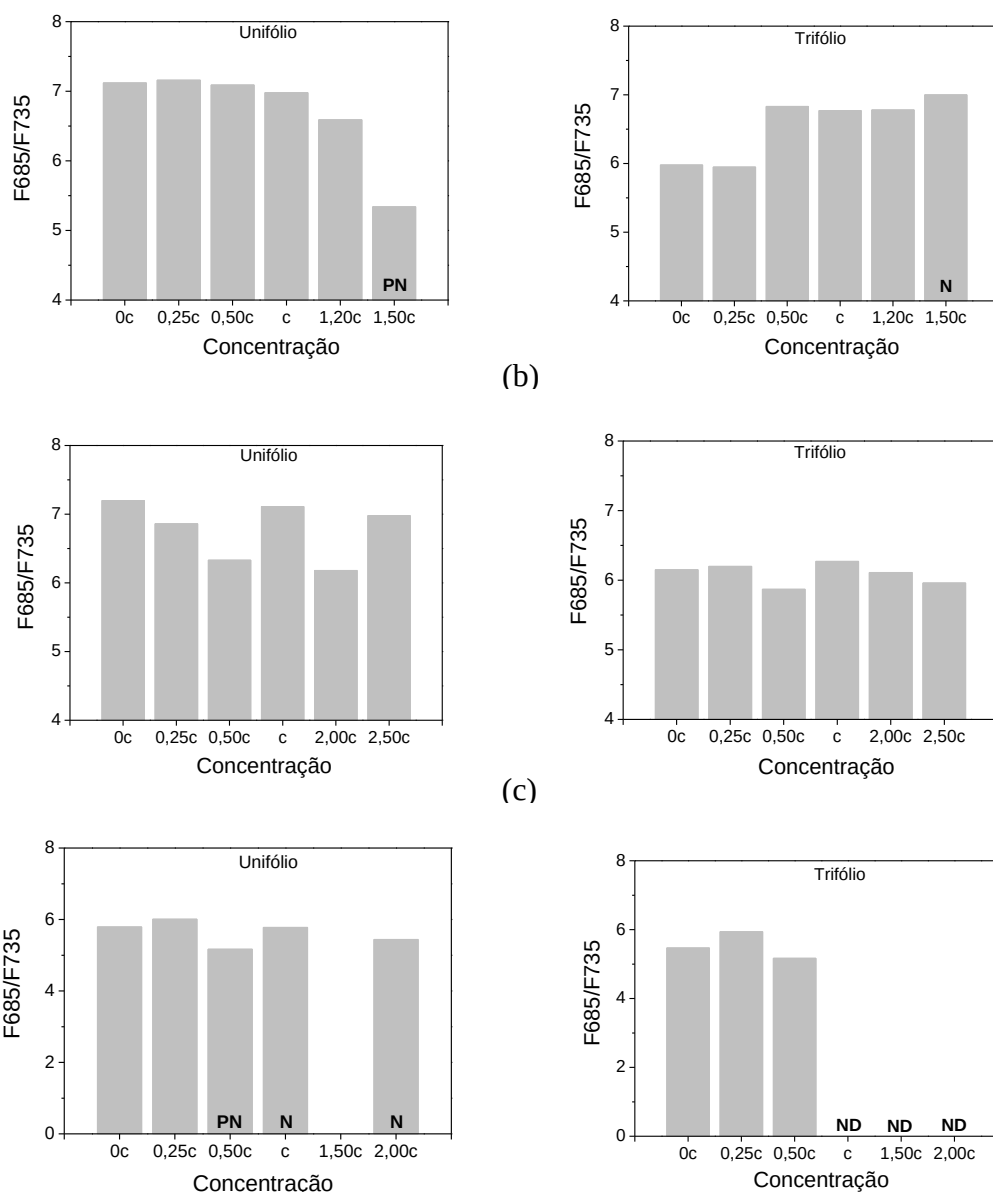
Fonte: Próprio autor.

Os espectros de fluorescência normalizada dos extratos indicam discretas alterações do perfil espectral da banda em 735 nm para algumas concentrações. Assim, F685/F735 foi

adotado como um padrão interno no sentido de possibilitar uma análise detalhada das possíveis mudanças. Vale destacar que, nesse caso, F685/F735 não está associado à capacidade fotossintética da planta, visto que a análise não está sendo feita na planta *in vivo*. A figura 53 mostra as razões F685 /F735 associadas às diferentes plantas, pesticidas e concentrações. Os resultados não apontaram diferenças significativas entre o grupo de teste das plantas de soja irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil, e os respectivos grupos de controle.

Não há o resultado para 1,50c do unifólio das plantas irrigadas com metomil porque a amostra foi contaminada.

Figura 53 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de soja, com excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

A tabela 3 exhibe a concentração mínima de pesticida presente na solução de irrigação capaz de ser detectado, a partir da análise do bioindicador aliado a uma dada técnica experimental. Este valor foi definido tomando como referência os dois grupos consecutivos,

com menor concentração, que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 2 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido a partir da combinação bioindicador (soja)-parâmetro avaliado. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.

Soja						
	Glifosato		Difenoconazol		Metomil	
Comprimento da raiz	0,25c		0,50c		0,25c	
	Unifólio	Trifólio	Unifólio	Trifólio	Unifólio	Trifólio
Condutância estomática	0,50c	c	0,25c	0,25c	0,25c	0,25c
Temperatura foliar	1,50c	c	0,25c	2,50c	0,50c	0,25c
F685/F735 (405 nm)	0,25c	c	c	0,50c	c	0,25c
F685/F735 (532 nm)	0,25c	c	c	2,00c	c	0,25c
<i>QY máximo</i>	c	0,25c	0,50c	0,25c	0,25c	0,50c
<i>Rfd</i>	0,25c	0,25c	c	-	0,25c	0,25c

Fonte: Próprio autor.

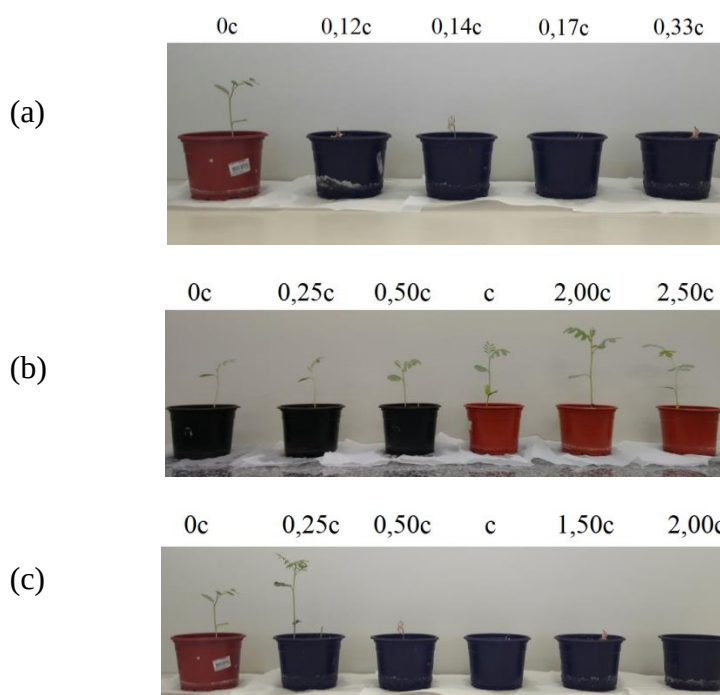
As menores frações de concentrações detectadas pela combinação bioindicador (soja)-parâmetro avaliado nas plantas irrigadas com glifosato foram o comprimento da raiz, F685/F735 para unifólio, *QY máximo* para trifólio e *Rfd* tanto para unifólio quanto para trifólio. No caso das plantas irrigadas com difenoconazol, as menores fração de concentrações detectadas foram obtidas a partir dos parâmetros de condutância estomática, para unifólio e trifólio, temperatura foliar no unifólio e *QY máximo* no trifólio. Já para as plantas irrigadas com metomil as menores concentrações detectadas foram obtidas a partir do comprimento da raiz, condutância estomática e *Rfd* (para unifólio e trifólio), *QY máximo* no unifólio e todos os parâmetros, exceto *QY máximo* no trifólio.

5.2 Sesbania

5.2.1 Sintomas visuais

As plantas de sesbania germinaram, mas não se desenvolveram na presença de glifosato, mesmo nas menores frações de concentrações (Figura 54a). Como o glifosato inibe a síntese dos aminoácidos essenciais para a planta e a sesbania não apresenta o gene que confere tolerância ao glifosato, ela não consegue se desenvolver na presença desse herbicida.

Figura 54 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de sesbania; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Já na sesbania irrigada com difenoconazol observou-se que as frações de concentrações c, 2,00c e 2,50c apresentaram acentuado perfilhamento e alongamento proeminente do caule em relação ao grupo controle. Um dos motivos pode ser a mutação de fitocromos, fazendo com que a planta não responda à luz branca, provocando um alongamento do hipocótilo,³⁵ como descrito na seção 5.1.1.

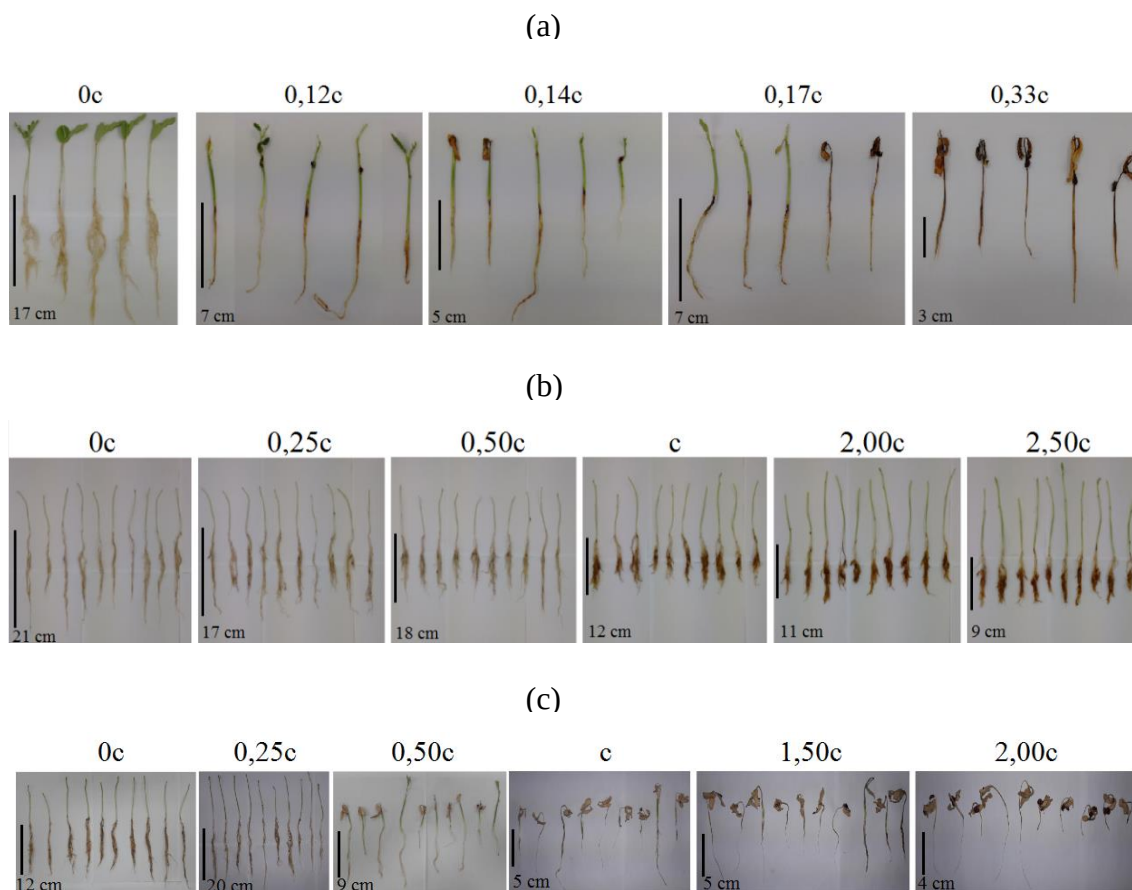
As plantas de sesbania irrigadas com metomil apresentaram necrose parcial do unifólio na fração de concentração 0,25c e necrose total nas demais frações de concentrações,

provavelmente relacionado à formação de EROs que, em excesso, causam diversos danos nos sistemas biológicos como a indução ao estresse oxidativo.⁹³

5.2.2 Métodos Analíticos

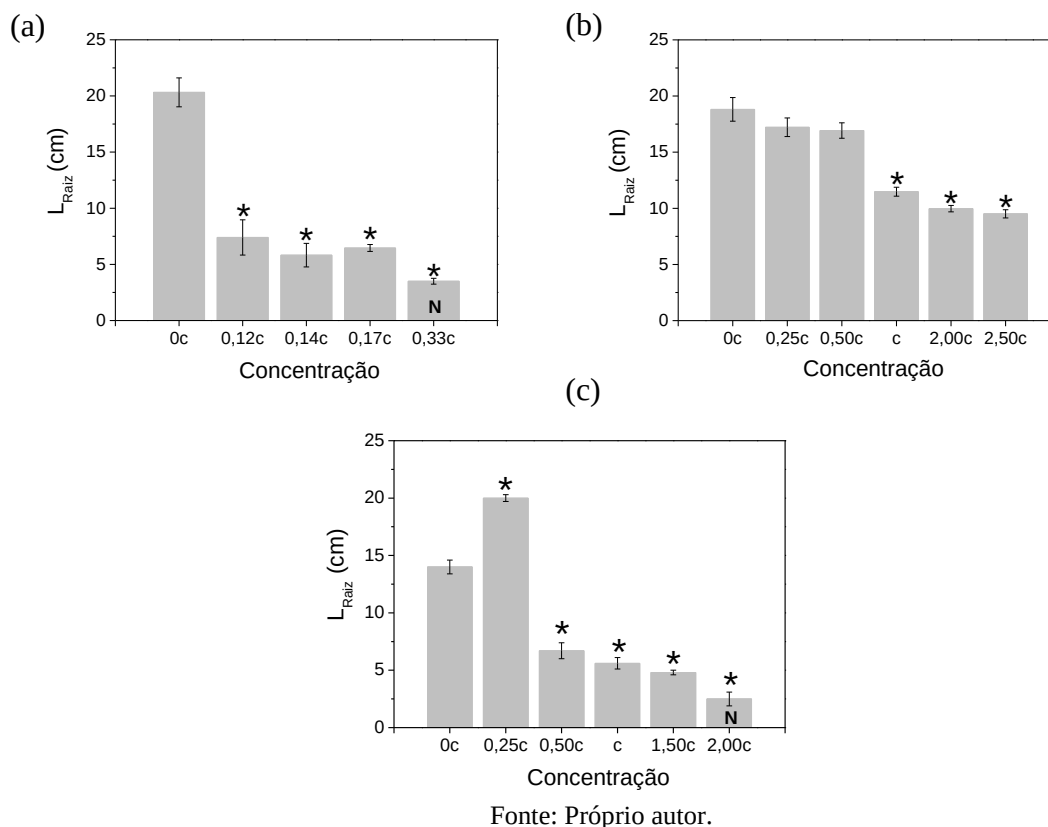
Observa-se nas figuras 55 e 56 que ao submeter às plantas de sesbania aos pesticidas, houve uma redução significativa do crescimento médio das raízes quando comparado ao grupo controle.

Figura 55 – Fotos da raiz de plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Figura 56 – Comprimento da raiz de plantas de sesbania irrigadas com (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. N indica grupos com plantas totalmente necrosadas.



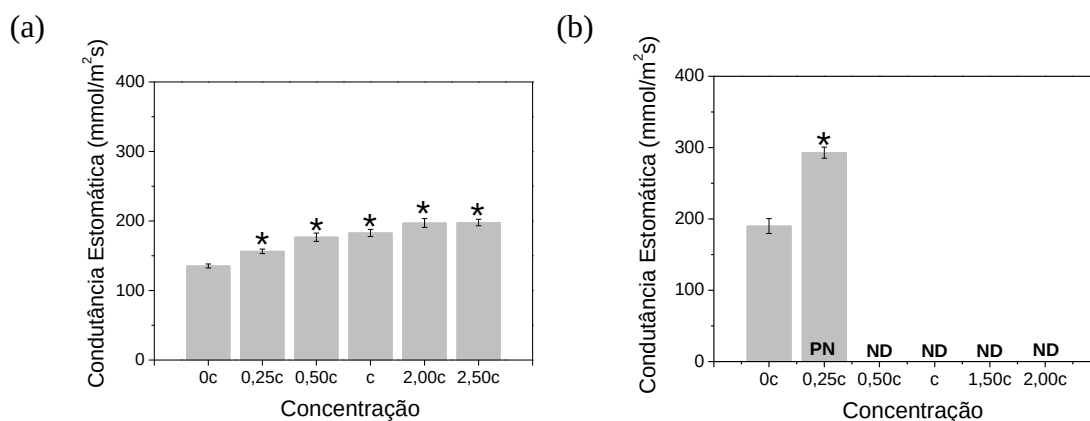
Todos os pesticidas induziram uma redução no comprimento das raízes das plantas de sesbania, sendo que essas plantas se mostraram mais sensíveis ao glifosato e metomil, assim como a soja.

O glifosato inibe a síntese de IAA⁹⁵, que é um dos promotores do crescimento radicular, o que pode ocasionar a redução no comprimento da raiz. O difenoconazol inibe o crescimento radicular, fato esse ainda não citado na literatura, o que não nos permite concluir por qual motivo isso ocorre; já o metomil aumenta a produção de EROs, que quando em baixas concentrações viabiliza o alongamento celular e, possivelmente, por esse motivo na fração de concentração 0,25c há um aumento no comprimento das raízes, porém quando em excesso leva a planta ao estresse oxidativo, provocando uma redução radicular, como nas demais frações de concentrações utilizadas.⁹⁶

A inibição dos hormônios, no caso das plantas irrigadas com glifosato, e a formação de EROs, no caso das plantas irrigadas com metomil, estão relacionados à inibição do índice mitótico.^{99, 100}

Os valores de condutância estomática aumentaram para as plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol e metomil (Figura 57), porém no caso do metomil apenas uma concentração foi avaliada. No caso das plantas irrigadas com glifosato não foram realizadas as medições a partir dos métodos analíticos utilizando as folhas, já que essas não se desenvolveram na presença desse herbicida.

Figura 57 – Condutância estomática de plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.

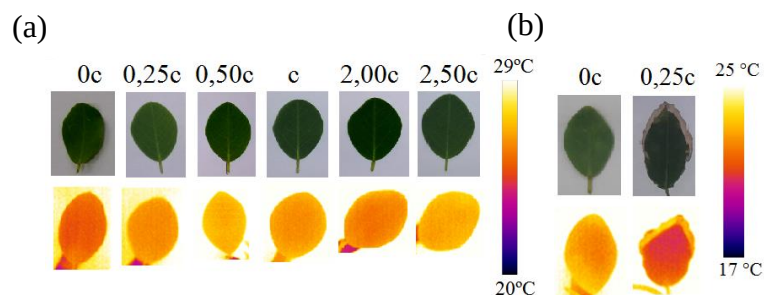


Fonte: Próprio autor.

Qualquer fator que altere o metabolismo das células-guardas, altera o movimento dos estômatos, podendo ocasionar o aumento da condutância estomática,³⁵ como citado na seção 5.1.2.

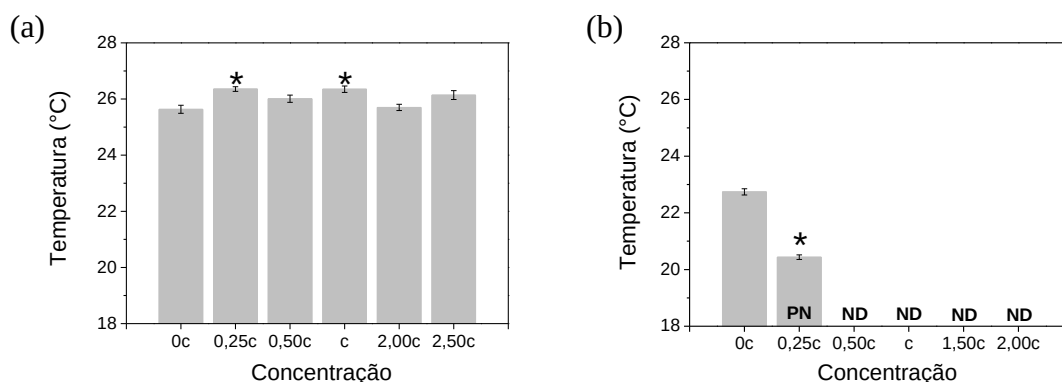
Foram realizadas as imagens térmicas das folhas de sesbania irrigadas com difenoconazol e com metomil (Figuras 58 e 59).

Figura 58 – Fotos e imagens térmicas das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação.



Fonte: Próprio autor.

Figura 59 – Temperatura das folhas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.

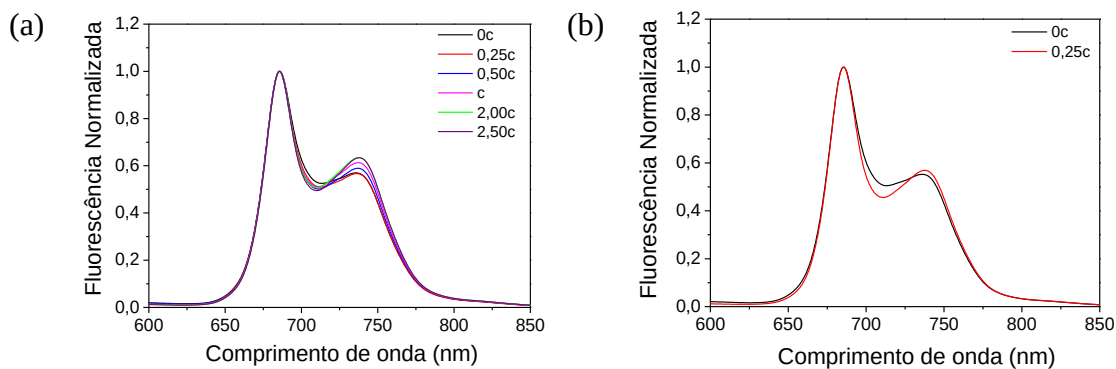


Fonte: Próprio autor.

Houve um aumento da temperatura em plantas de sesbania irrigadas com algumas concentrações de difenoconazol, porém não há uma tendência clara desse parâmetro na determinação da presença desse fungicida. No entanto, é possível notar que a redução na temperatura foliar das plantas irrigadas com 0,25c de metomil foi significativa, o que pode ser resultado do grande aumento na condutância estomática, pois a maior abertura dos estômatos promove maior refrigeração foliar.³⁵

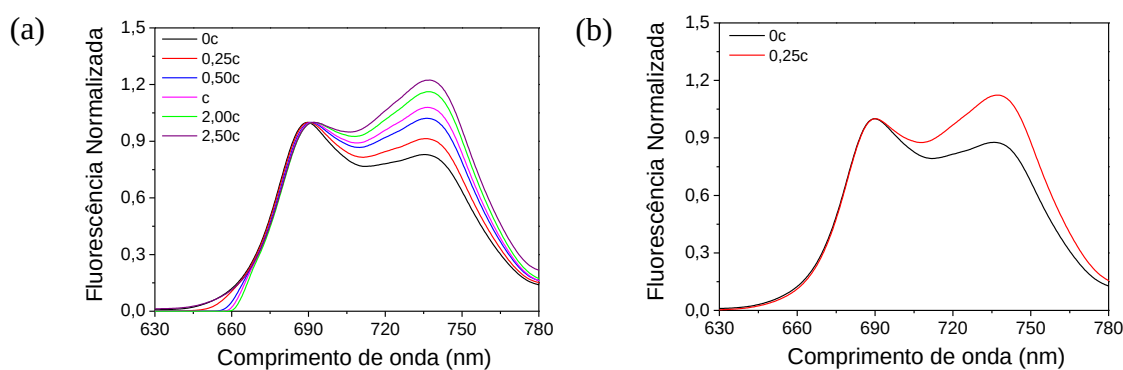
Os espectros de fluorescência *in vivo* das plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol e metomil estão apresentados nas figuras 60 e 61.

Figura 60 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de sesbania, sob excitação em 405 nm, irrigadas com soluções de (a) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

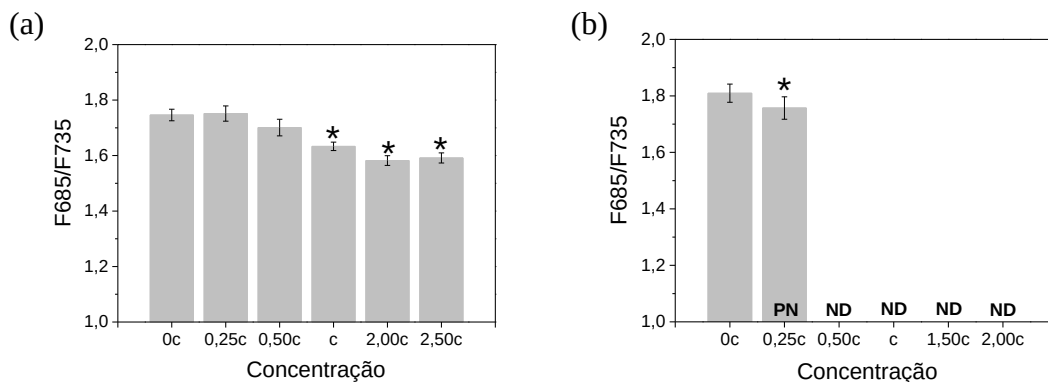
Figura 61 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de sesbania, sob excitação em 532 nm, irrigadas com soluções de (a) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

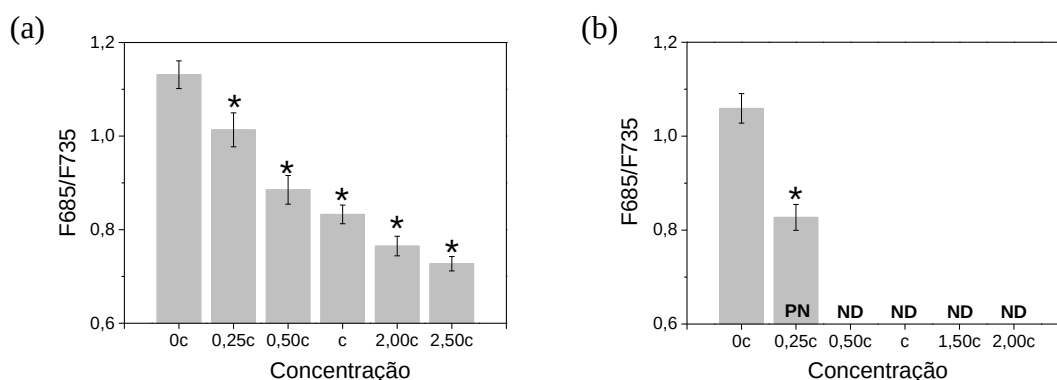
Um aumento na banda de 735 nm é observado, portanto, para avaliar as alterações espectrais causadas pela presença dos pesticidas, foram determinadas as razões F_{685}/F_{735} (Figuras 62 e 63).

Figura 62 – Razão F685/F735, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de sesbania. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Figura 63 – Razão F685/F735, sob excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de sesbania. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas necrosadas e que não se desenvolveram, respectivamente.



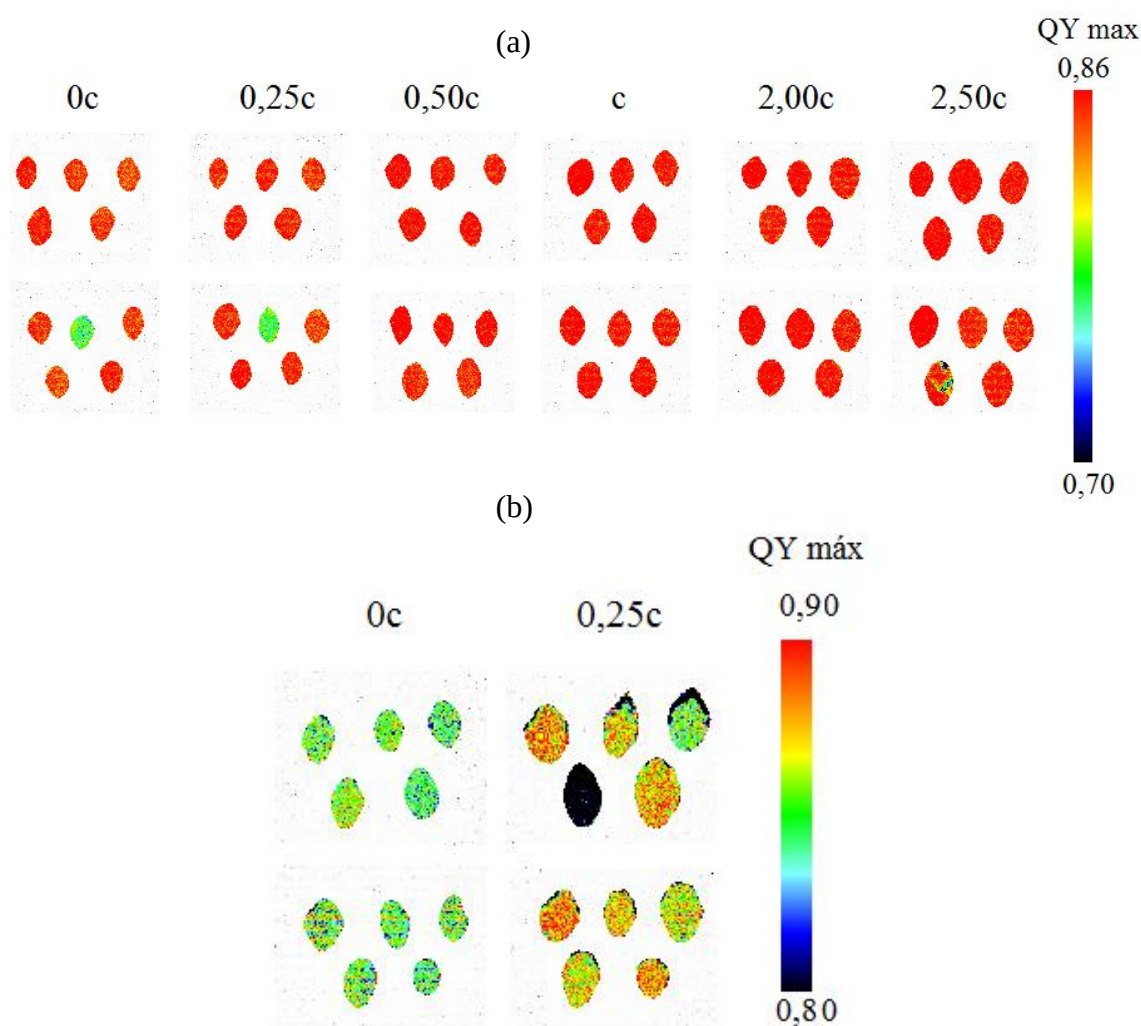
Fonte: Próprio autor.

Houve um decréscimo nas razões F685/F735 para as plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol e com metomil para os comprimentos de onda de excitação utilizados (405 e 532 nm). Em 405 nm, a diferença significativa das plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol foi notada na fração de concentração c, enquanto que para a excitação em 532 nm, tal diferença foi observada já na fração de concentração 0,25c. Para as plantas irrigadas com metomil também notou-se um decréscimo de F685/F735 para ambos os comprimentos de onda utilizados na excitação, porém a redução foi mais pronunciada para a excitação em 532

nm. Ou seja, nessa planta, tanto o difenoconazol quanto o metomil causam maior impacto nos cloroplastos mais profundos. Tal redução da razão F685/F735, indica que houve uma quantidade de clorofila maior que nas plantas do grupo controle.

A eficiência do fotossistema II foi caracterizada pelo parâmetro *QY máximo* (Equação 2, pag. 45). Para obtenção desse parâmetro as folhas também foram retiradas, assim como no experimento com a soja.

Figura 64 – Imagens associadas ao *QY máximo* para plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.

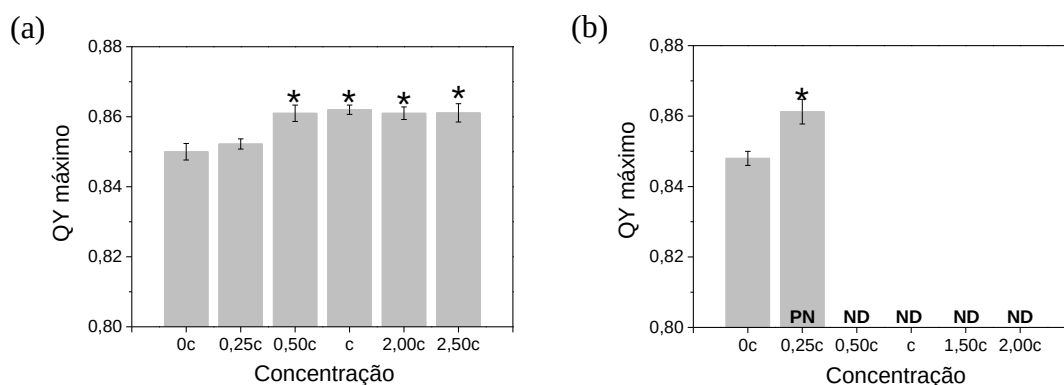


Fonte: Próprio autor.

A partir das imagens associadas ao *QY máximo* para as plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol não foi possível perceber alterações (Figura 64a); já para as plantas irrigadas com metomil (Figura 64b) observou-se que houve um aumento desse parâmetro,

podendo ser detectada diferença significativa a partir da fração de concentração 0,25c. Os valores médios de *QY máximo* são mostrado na Figura 65.

Figura 65 – *QY máximo* das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

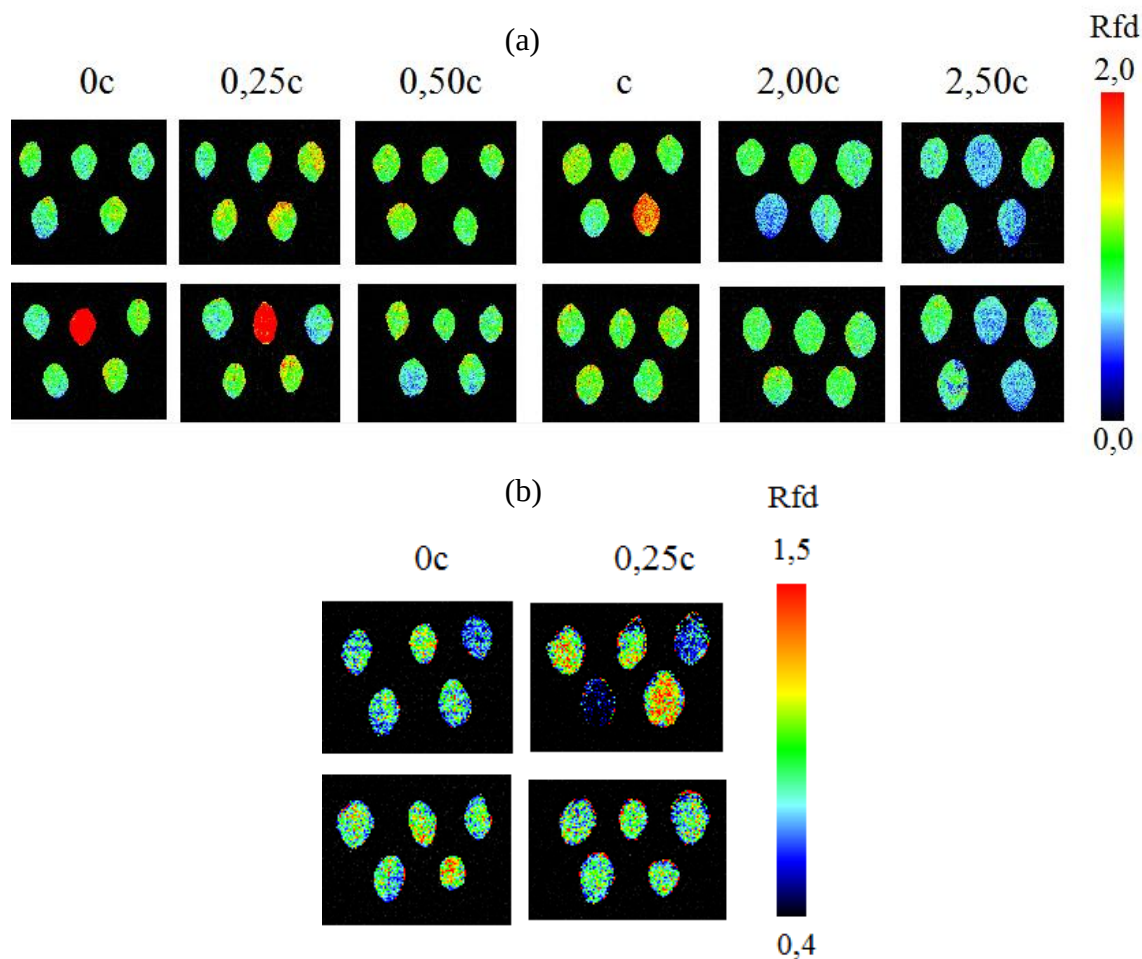
Para as plantas irrigadas com difenoconazol observou-se um aumento no parâmetro *QY máximo*, sendo que a diferença significativa em relação ao grupo controle foi verificada na fração de concentração 0,50c, enquanto que para as plantas irrigadas com metomil, na fração de concentração 0,25c, já detectou-se a diferença significativa.

Tanto para as plantas irrigadas com difenoconazol quanto para as irrigadas com metomil houve um aumento da condutância estomática, aumentando a maior assimilação de CO_2 , menores valores de $F685/F735$, indicando um aumento na quantidade de clorofila, o que provavelmente ocasionou o aumento na eficiência quântica do FS II (*QY máximo*).

O efeito dos pesticidas sobre a vitalidade das plantas também foi avaliado por meio do parâmetro *Rfd* (Equação 3, pag. 45). Esse parâmetro, obtido a partir da imagem de fluorescência, assim como o *QY máximo*, foi determinado a partir de medições feitas nas folhas retiradas das plantas. As imagens associadas ao *Rfd* são mostradas na figura 66.

A partir das imagens associadas ao *Rfd* é possível detectar a presença do difenoconazol somente na fração de concentração 2,50c, enquanto que nas plantas irrigadas com metomil não foi possível detectar a presença do inseticida.

Figura 66 – Imagens associadas ao *Rfd* para plantas de sesbania irrigadas com diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil; c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.

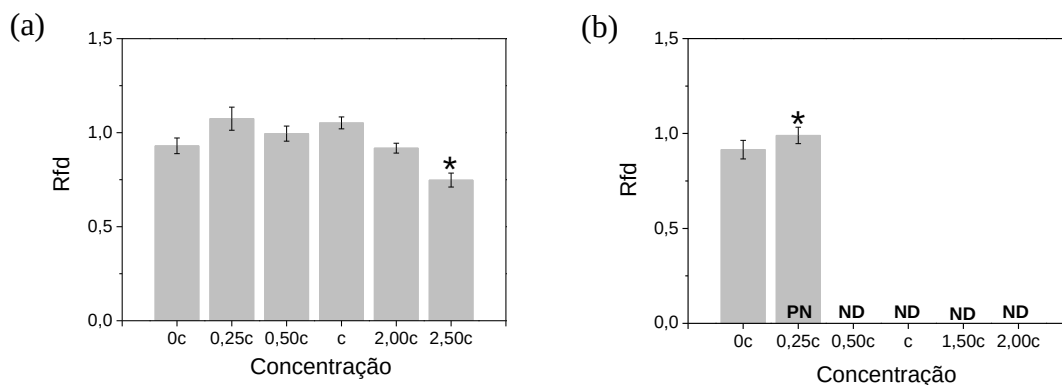


Fonte: Próprio autor.

O valor médio de *Rfd* está apresentado na figura 67 para as plantas de sesbania irrigadas com difenoconazol e metomil.

Para sesbania irrigada com difenoconazol, um decréscimo de *Rfd*, em relação ao grupo controle, foi notada somente na fração de concentração 2,50c, enquanto que nas plantas irrigadas com metomil houve um pequeno aumento, já na fração de concentração 0,25c.

Figura 67 – *Rfd* das plantas de sesbania em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente necrosadas e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



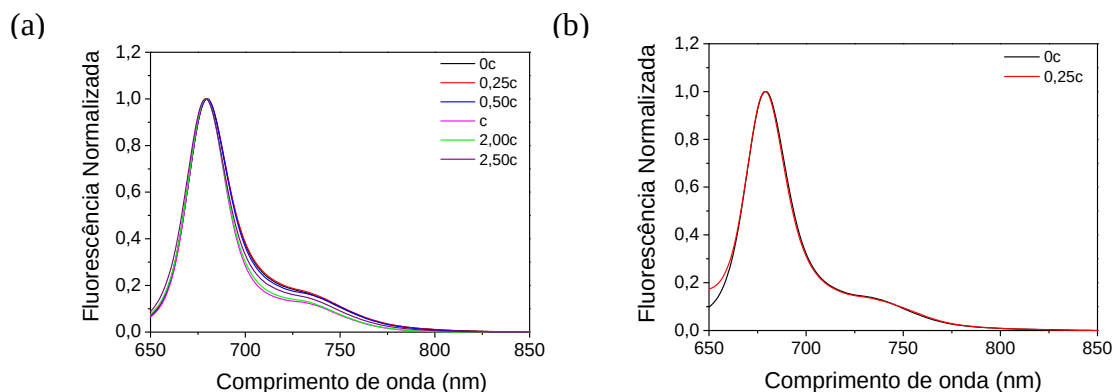
Fonte: Próprio autor.

Como houve maior fixação de CO_2 nas plantas irrigadas com difenoconazol, indicado pelo aumento na condutância estomática (Figura 57), e maior teor de clorofila, observado na redução de F685/F735 (Figuras 62 e 63), era esperado que a eficiência do fotossistema II também aumentasse, pois para maiores quantidades de CO_2 disponível e de clorofila espera-se um aumento na capacidade fotossintética da planta, diretamente vinculado ao parâmetro *QY máximo* (Figura 65). Porém, tal aumento não impactou a vitalidade das plantas até a fração de concentração 2,00c (Figura 67).

No caso das plantas irrigadas com metomil houve um aumento nos valores de condutância estomática (Figura 57), uma redução nos valores da razão F685/F735 (Figura 62 e 63), indicando maior quantidade de clorofila, resultando em um aumento do *QY máximo*, o que causou um pequeno aumento na vitalidade da planta, associada ao parâmetro *Rfd* (Figura 67).

Um estudo dos extratos das folhas foi realizado somente com excitação em 405 nm, pois a clorofila foi extraída. Os espectros de fluorescência da clorofila estão dispostos na figura 68.

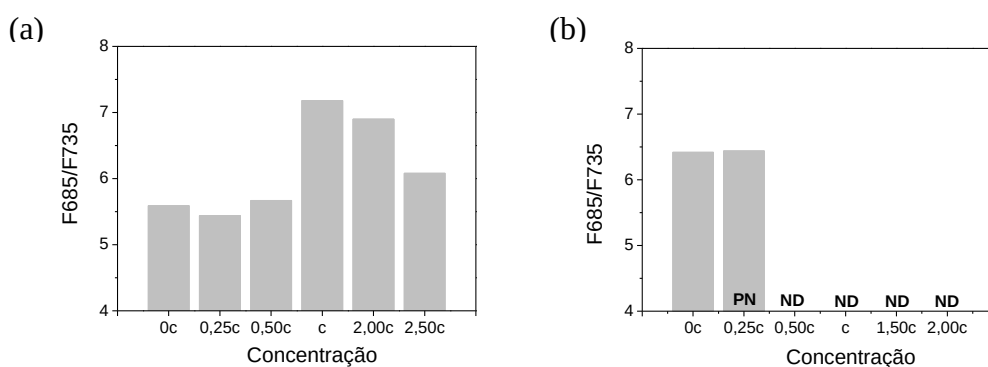
Figura 68 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de sesbania irrigadas com soluções de contendo diferentes concentrações de (a) difenoconazol e (b) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

A partir dos espectros de fluorescência foram obtidas as razões F685/F735 como um padrão interno no sentido de possibilitar uma análise detalhada das possíveis mudanças. Destaca-se nesse caso, F685/F735 não está associado à capacidade fotossintética da planta, visto que a análise não está sendo feita na planta *in vivo*.

Figura 69 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de sesbania, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) difenoconazol e (b) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e plantas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

O extrato de clorofila da sesbania irrigada com difenoconazol apresentou maiores valores de F685/F735 a partir da fração de concentração c, enquanto que as plantas de sesbania irrigadas com metomil na fração de concentração 0,25c não apresentaram alterações.

Determinou-se a fração de concentração mínima de pesticida detectada por cada técnica (Tabela 4).

Foi adotado um critério para determinação do valor mínimo de fração de concentração de pesticida presente na solução de irrigação capaz de ser detectado a partir da análise do bioindicador aliado a uma dada técnica experimental. Este valor foi definido tomando como referência os dois grupos consecutivos, com menor fração de concentração, que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 3 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido a partir da combinação bioindicador (sesbania)-parâmetro avaliado. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.

	Sesbania		
	Glifosato	Difenoconazol	Metomil
Comprimento da raiz	0,12c	c	0,50c
Condutância estomática	-	0,25c	0,25c
Temperatura foliar	-	-	0,25c
F685/F735 (405 nm)	-	c	0,25c
F685/F735 (532 nm)	-	0,25c	0,25c
<i>QY máximo</i>	-	0,50c	0,25c
<i>Rfd</i>	-	2,50c	0,25c

Fonte: próprio autor.

As plantas irrigadas com glifosato não se desenvolveram, dessa forma, só foi possível avaliar o comprimento da raiz. A menor concentração detectada de difenoconazol nas plantas de sesbania foi obtida a partir da condutância estomática e F685/F735 sob excitação de 532 nm. O efeito provocado pelo metomil foi detectado na menor concentração utilizada por todos os parâmetros, exceto comprimento da raiz.

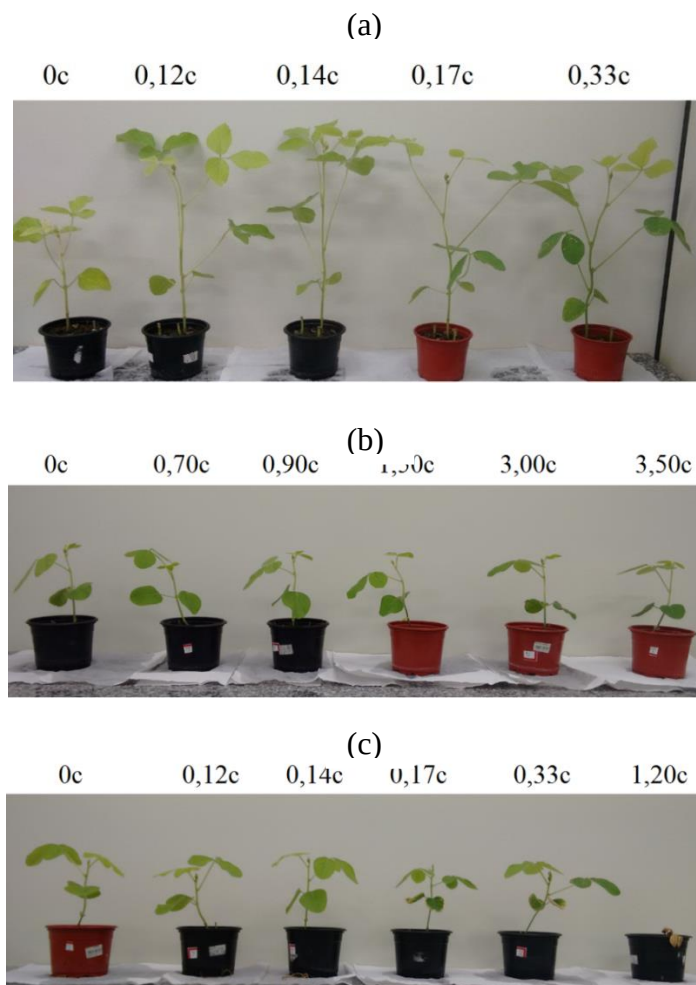
5.3 Soja em concentrações intermediárias

Com o intuito de determinar a fração de concentração mínima de pesticida por cada técnica foi realizado um experimento com frações de concentrações intermediárias às utilizadas na seção 5.1. As frações de concentrações utilizadas foram: 0c, 0,12c, 0,14c, 0,17c, 0,33c para glifosato, 0c, 0,70c, 0,90c, 1,50c, 3,00c, 3,50c para difenoconazol e 0c, 0,12c, 0,14c, 0,17c, 0,33c e 1,20c para metomil.

5.3.1 Sintomas visuais

Na figura 70 estão apresentadas as fotos das plantas irrigadas com as concentrações intermediárias de cada pesticida.

Figura 70 – Sintomas visuais do efeito do (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil em diferentes concentrações em plantas de soja; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



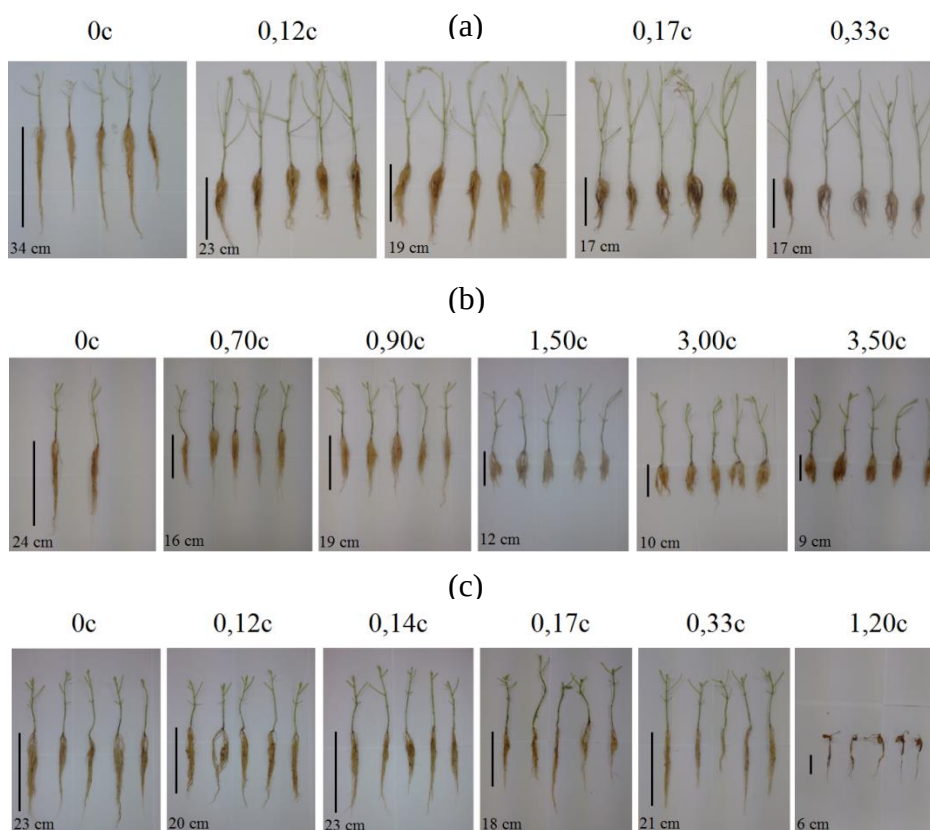
Fonte: Próprio autor.

Visualmente é possível detectar a presença do glifosato já na fração de concentração 0,12c que apresenta estiolamento proeminente (Figura 70a), mas não é possível perceber a presença do difenoconazol (Figura 70b), porém o metomil é percebido na fração de concentração 0,17c causando necrose parcial do unifólio (Figura 70c).

5.3.2 Métodos analíticos

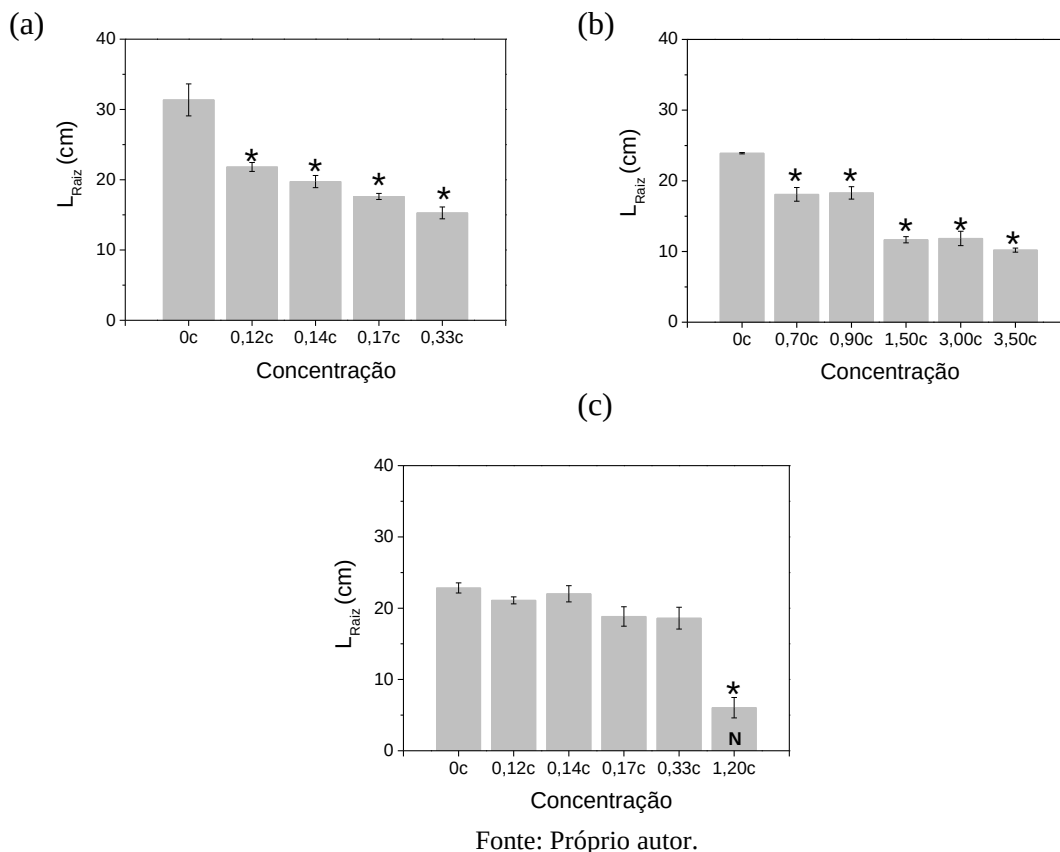
Na figura 71 e 72 estão apresentadas as fotos das raízes e o valor médio, respectivamente.

Figura 71 – Fotos da raiz de plantas de soja irrigadas diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

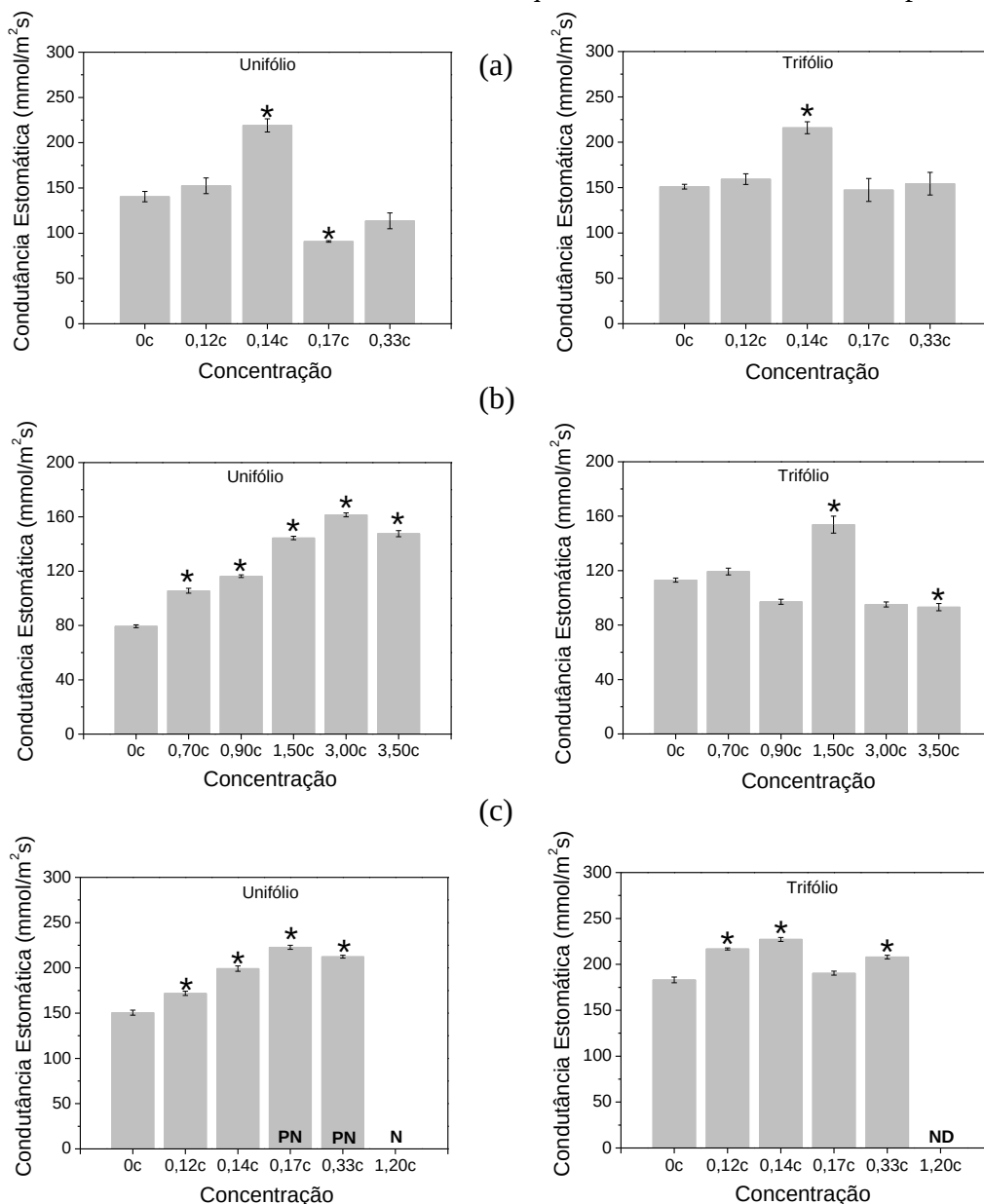
Figura 72 – Comprimento da raiz de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. N destaca grupos que apresentaram plantas totalmente necrosadas.



Por meio do comprimento da raiz foi possível observar que todos os pesticidas causaram redução radicular, sendo que o glifosato foi detectado na fração de concentração 0,12c, o difenoconazol na fração de concentração 0,70c, enquanto que o metomil só foi detectado na fração de concentração 1,20c, onde a planta já estava necrosada. A soja é mais sensível ao glifosato por esse ser um herbicida, ou seja, ter a função de eliminar as plantas daninhas, porém este é não seletivo e acaba por interferir no crescimento/desenvolvimento de espécies de interesse.

Na figura 73 estão apresentados os dados de condutância estomática.

Figura 73 – Condutância estomática de plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=5$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

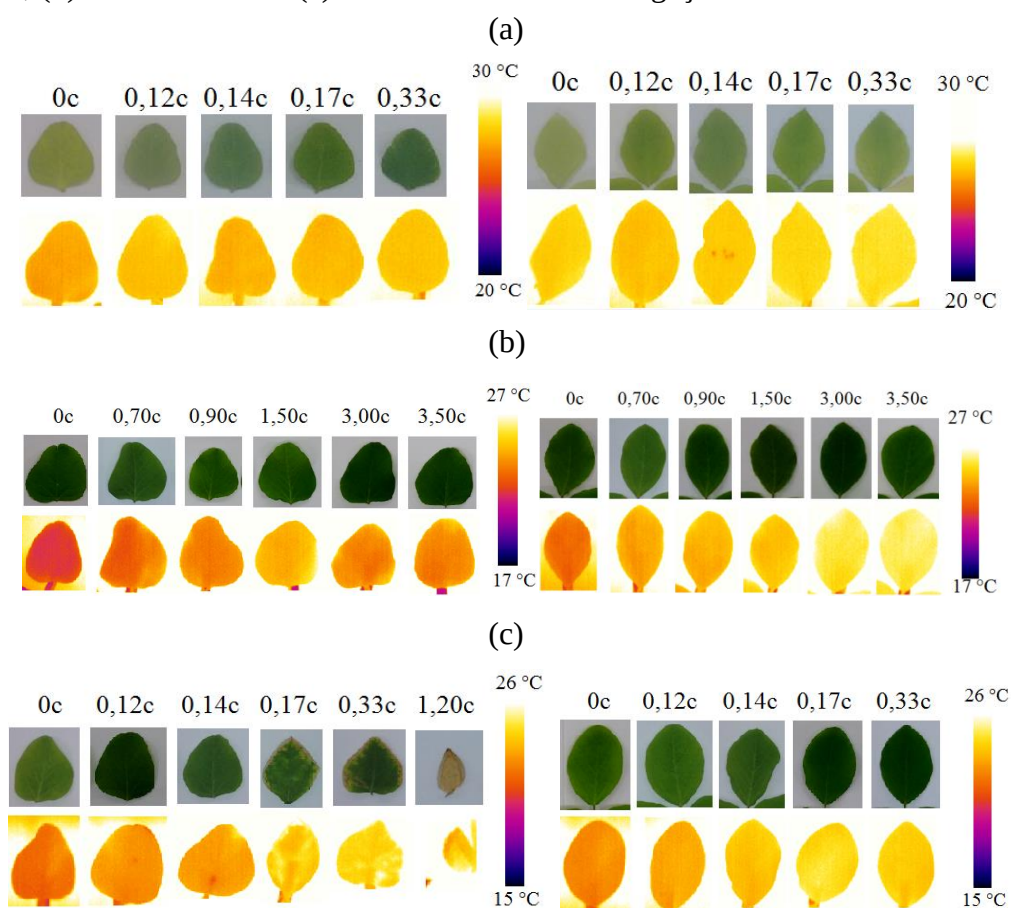
Para as plantas irrigadas com glifosato somente as frações de concentrações 0,14c e 0,17c apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle para o unifólio e somente a fração de concentração 0,17c para o trifólio. Sendo assim, nessas concentrações a condutância estomática não se mostrou sensível na detecção do glifosato.

Para as plantas irrigadas com difenoconazol a condutância estomática mostrou-se eficaz na detecção desse fungicida no unifólio, apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle na fração de concentração 0,70c, já para o trifólio essa técnica não se mostrou sensível.

A condutância estomática foi mais sensível na detecção do metomil nas plantas de soja, sendo notada diferença significativa na fração de concentração 0,12c para unifólio e trifólio.

Na figura 74 estão apresentadas as fotos e imagens térmicas para as plantas de soja irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil.

Figura 74 – Fotos e imagens térmicas das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação.

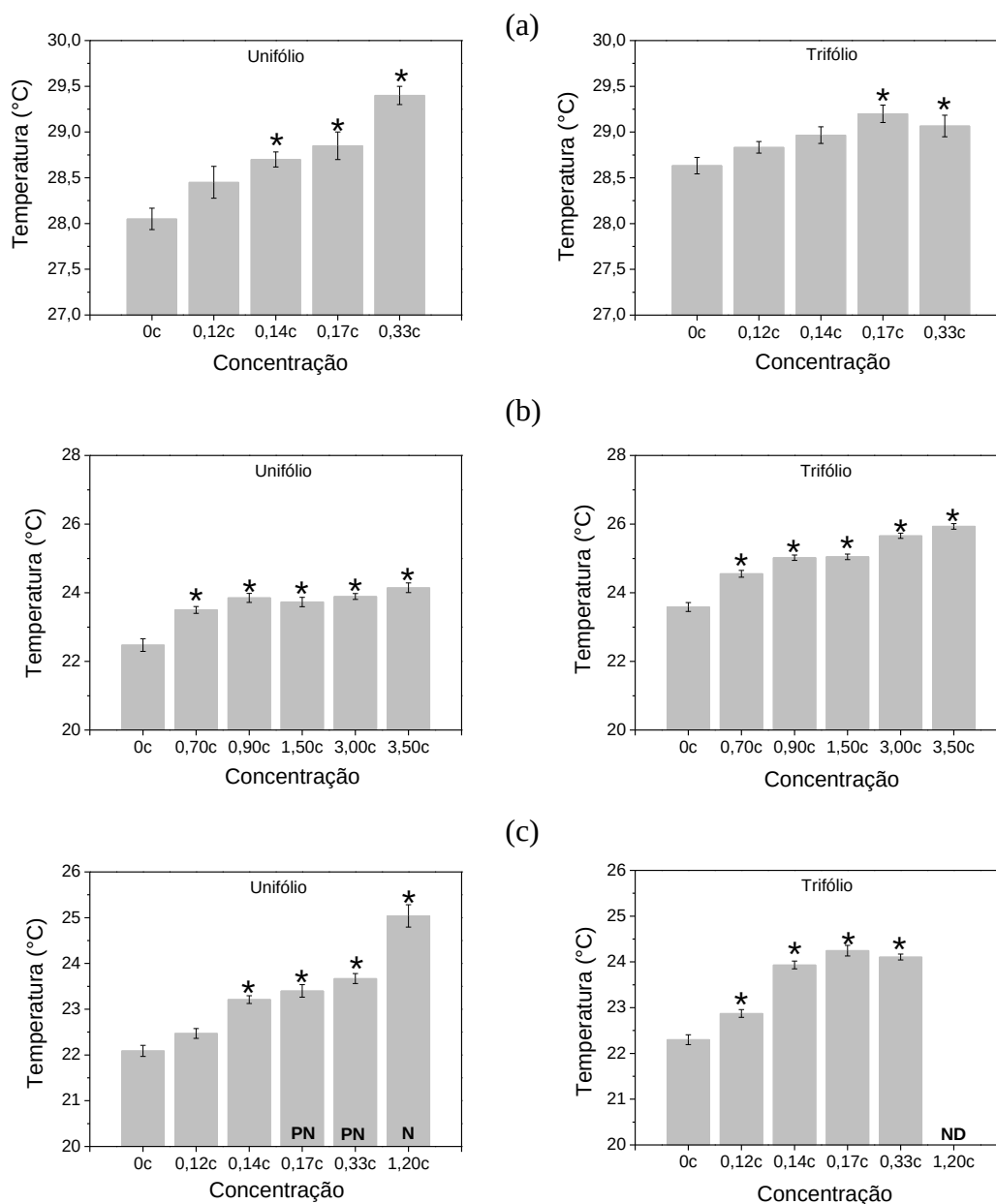


Fonte: Próprio autor.

A partir das imagens térmicas não é possível perceber a presença do glifosato nas plantas de soja, já nas plantas irrigadas com difenoconazol e metomil é possível observar um aumento da temperatura causada pela presença desses pesticidas.

Foram obtidas as médias das temperaturas que estão apresentadas na figura 75.

Figura 75 – Temperatura das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

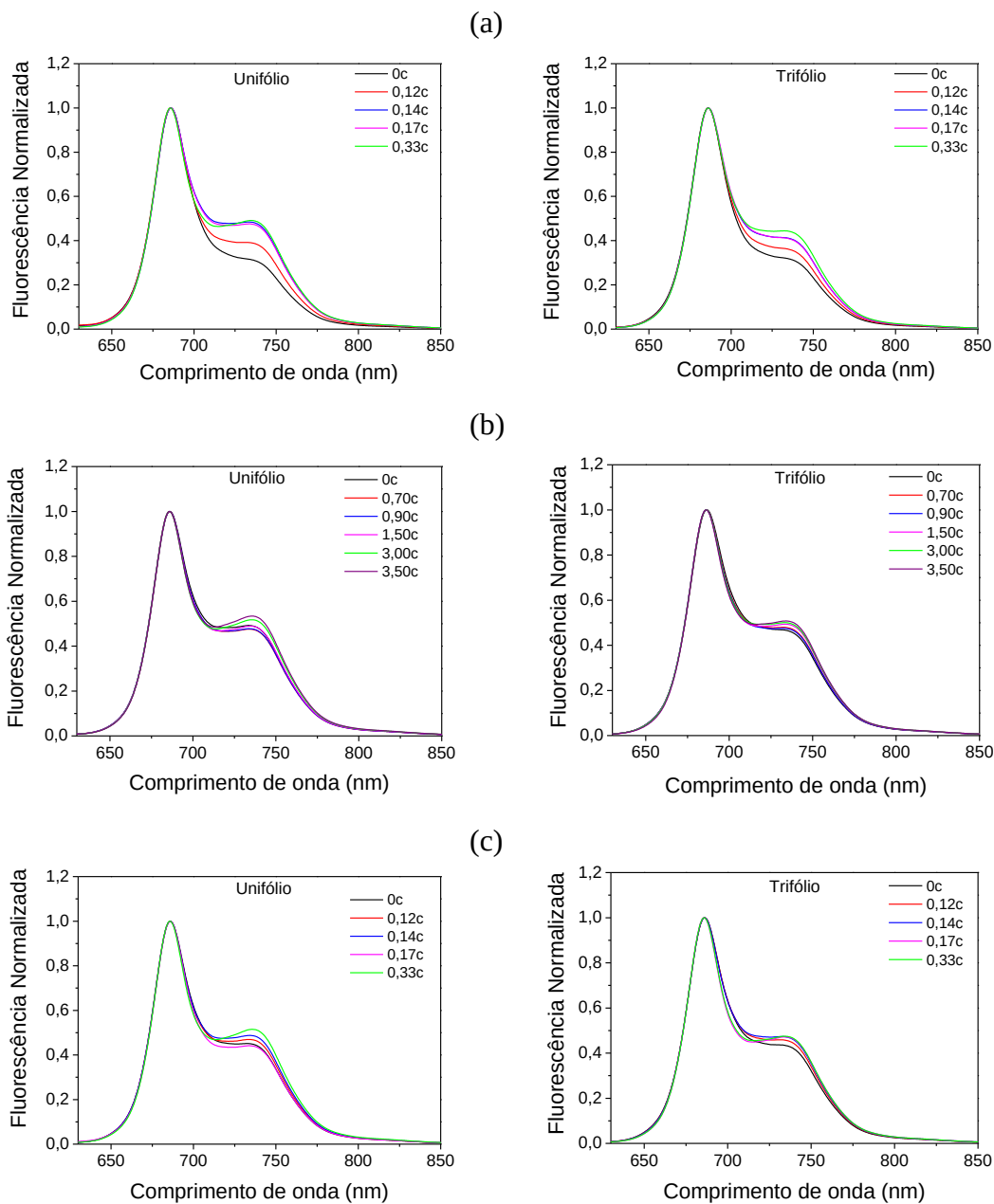
A partir das médias foi possível verificar que todos os pesticidas utilizados provocaram um aumento da temperatura foliar, sendo que para o glifosato a diferença significativa foi notada na fração de concentração 0,14c, para unifólio, e 0,17c, para trifólio. No caso das plantas irrigadas com difenoconazol a alteração foi percebida na fração de concentração 0,70c

para unifólio e trifólio, ao passo que nas plantas irrigadas com metomil tal diferença foi notada na fração de concentração 0,14c, para unifólio, e 0,12c, para trifólio.

A temperatura foliar foi mais efetiva na determinação da presença dos pesticidas nas concentrações intermediárias que no primeiro experimento utilizando a soja, descrito na seção 5.1.

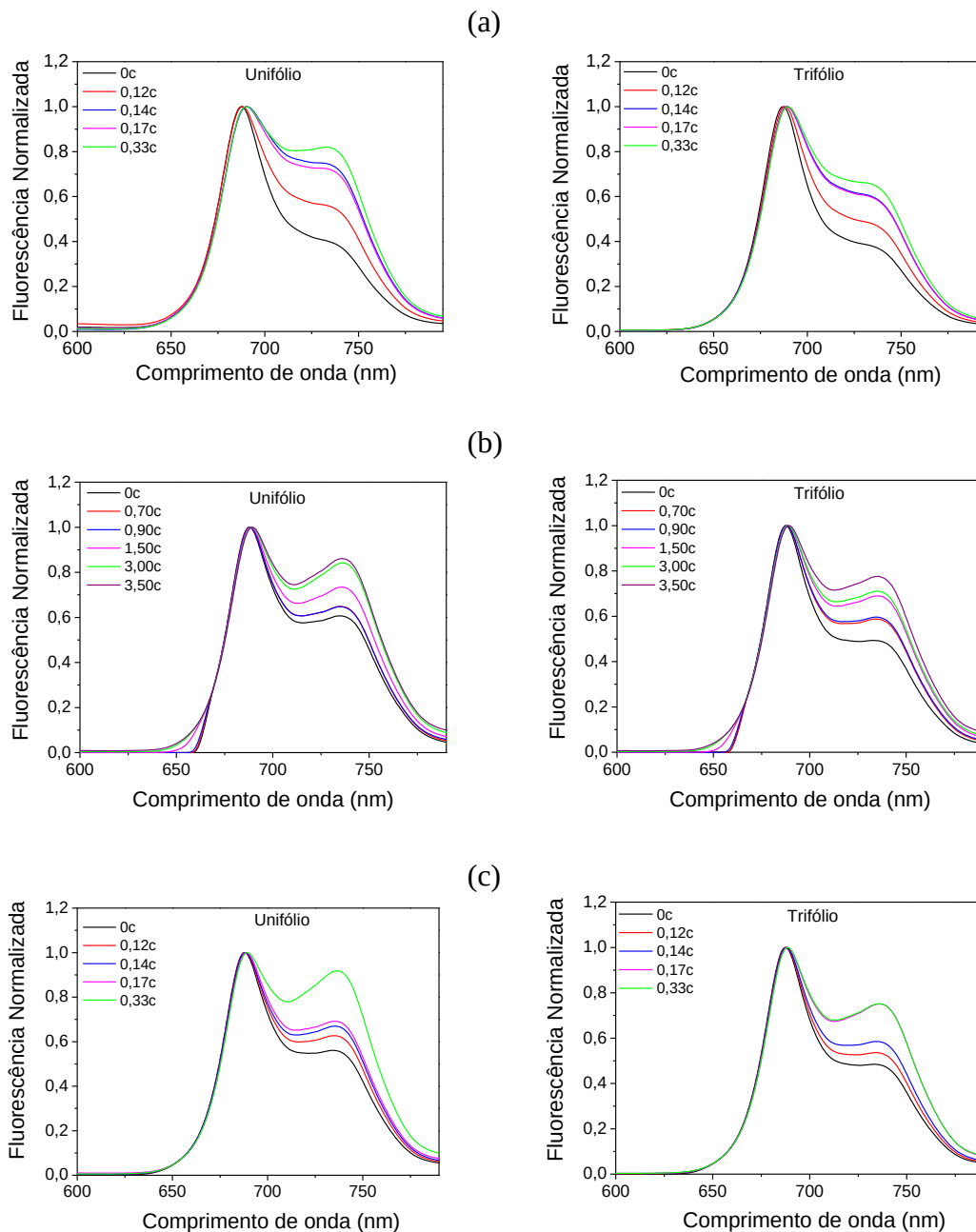
A fim de avaliar o efeito dos pesticidas nas plantas de soja por meio de técnicas de fluorescência foram obtidos os espectros de fluorescência da clorofila *in vivo* (Figura 76 e 77).

Figura 76 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 405 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

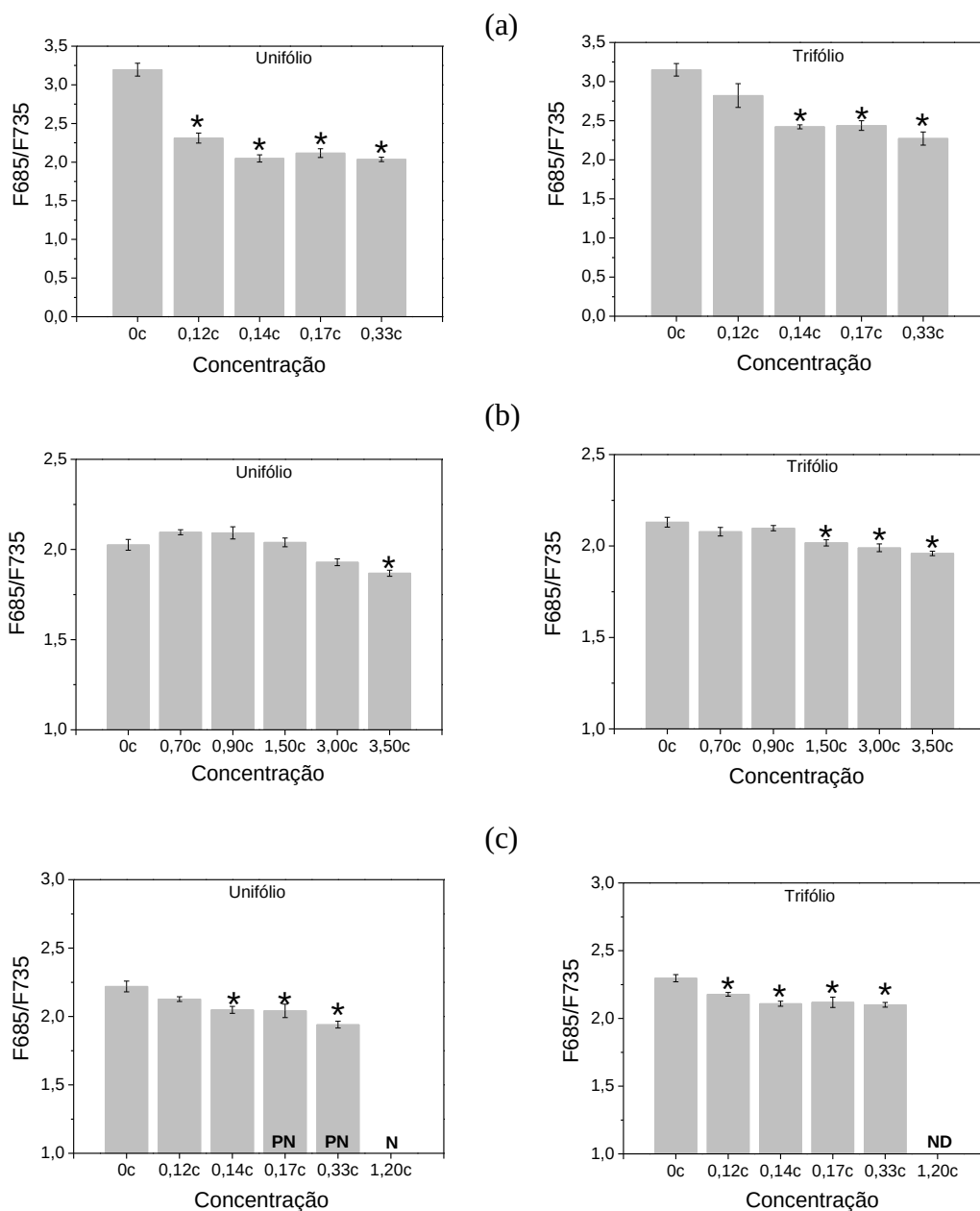
Figura 77 – Espectros de fluorescência normalizada de plantas de soja, sob excitação em 532 nm, irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

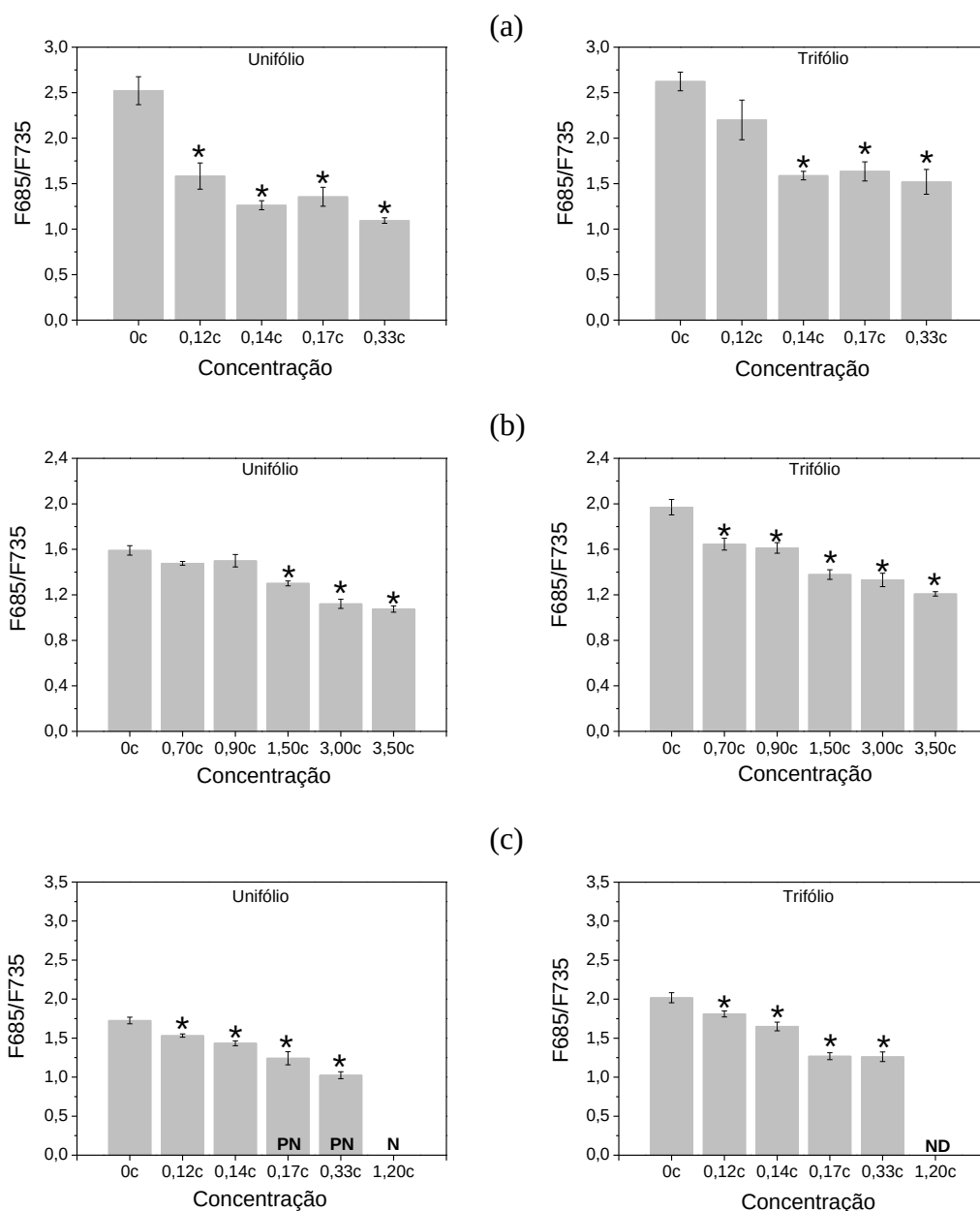
Com base nos espectros de fluorescência normalizados percebeu-se alterações nas bandas em 735 nm das plantas irrigadas com os pesticidas, então obteve-se as razões F_{685}/F_{735} para uma análise mais detalhada, os dados obtidos estão mostrados nas figuras 78 e 79.

Figura 78 – Razão F685/F735, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Figura 79 – Razão F685/F735, sob excitação em 532 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

A partir da razão F685/F735 notou-se a presença de glifosato nas plantas de soja na fração de concentração 0,12c e 0,14c para unifólio e trifólio, respectivamente, tanto para excitação em 405 nm como para excitação em 532 nm.

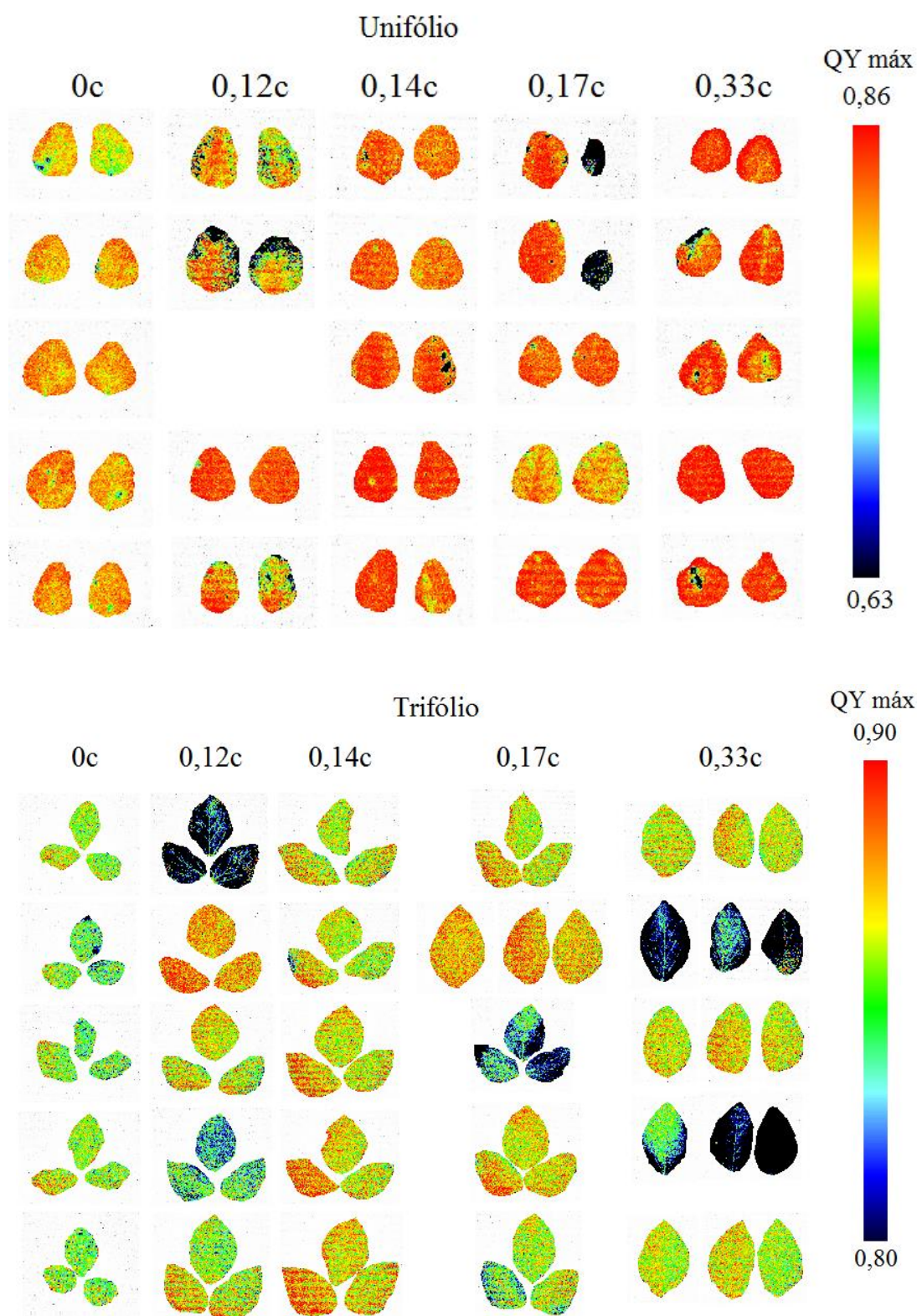
O parâmetro F685/F735 mostrou-se mais sensível no comprimento de onda de excitação de 532 nm para plantas irrigadas com difenoconazol, pois a presença desse fungicida foi detectada na fração de concentração 1,50c e 0,70c para unifólio e trifólio, respectivamente, enquanto que utilizando 405 nm como comprimento de onda de excitação a presença deste foi notada na fração de concentração 3,50c, para unifólio, e 1,50c, para trifólio.

Para as plantas irrigadas com metomil a diferença significativa foi verificada na fração de concentração 0,14c e 0,12c para unifólio e trifólio, respectivamente, para o comprimento de onda de excitação de 405 nm. Já para 532 nm, as frações de concentrações que apresentaram alterações devido à presença desse inseticida foram de 0,12c, para unifólio e trifólio.

Não foram apresentados os resultados para as plantas que estavam totalmente necrosadas porque este parâmetro é obtido a partir da fluorescência da clorofila e, nas plantas necrosadas, não há clorofila.

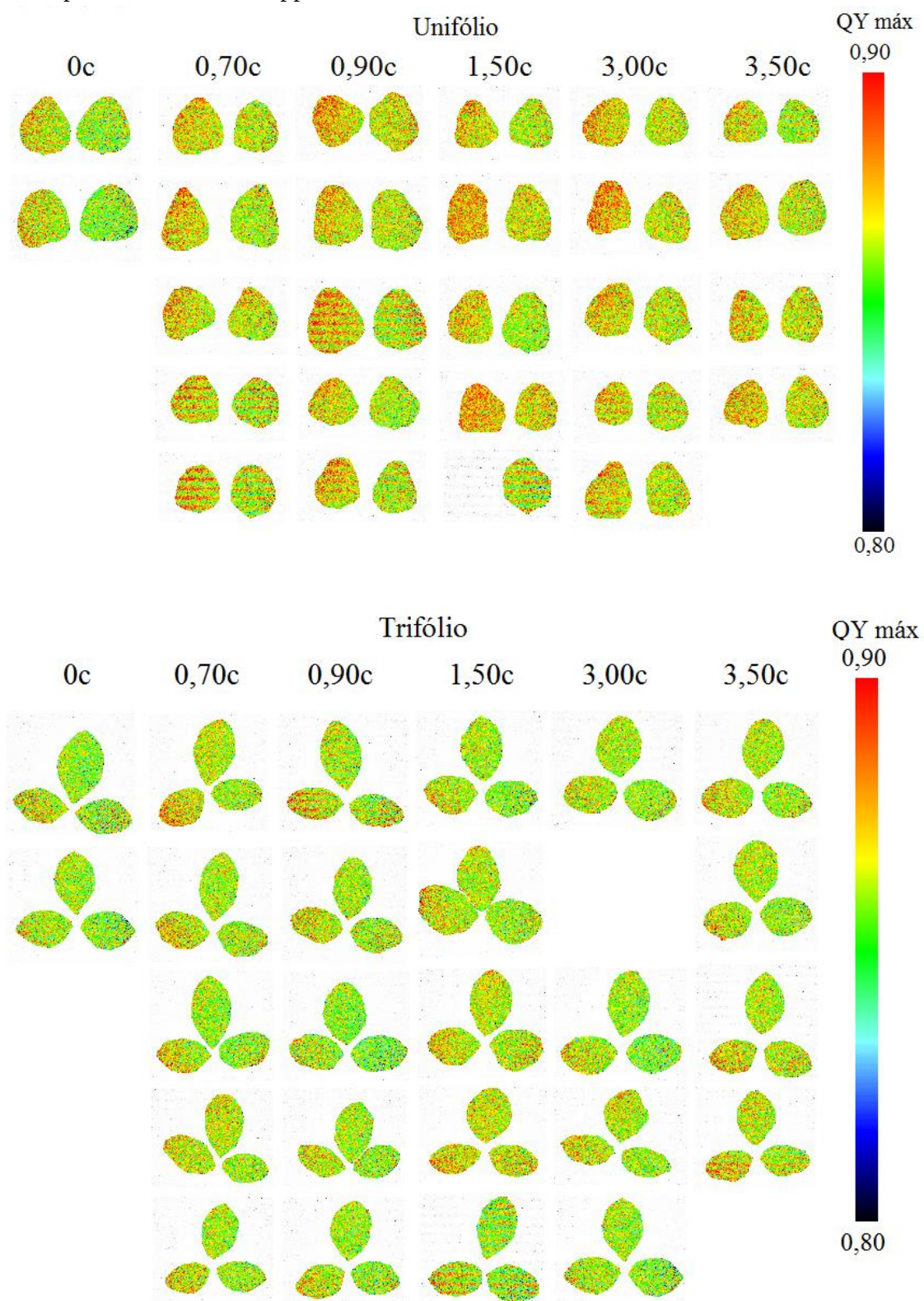
Com a finalidade de avaliar o efeito dessas concentrações de pesticidas na eficiência do fotossistema II nas plantas de soja foram realizadas análises de fluorescência por imagem. As imagens associadas ao *QY máximo* (Equação 2, pag. 45) estão apresentadas nas figuras 80, 81 e 82.

Figura 80 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.



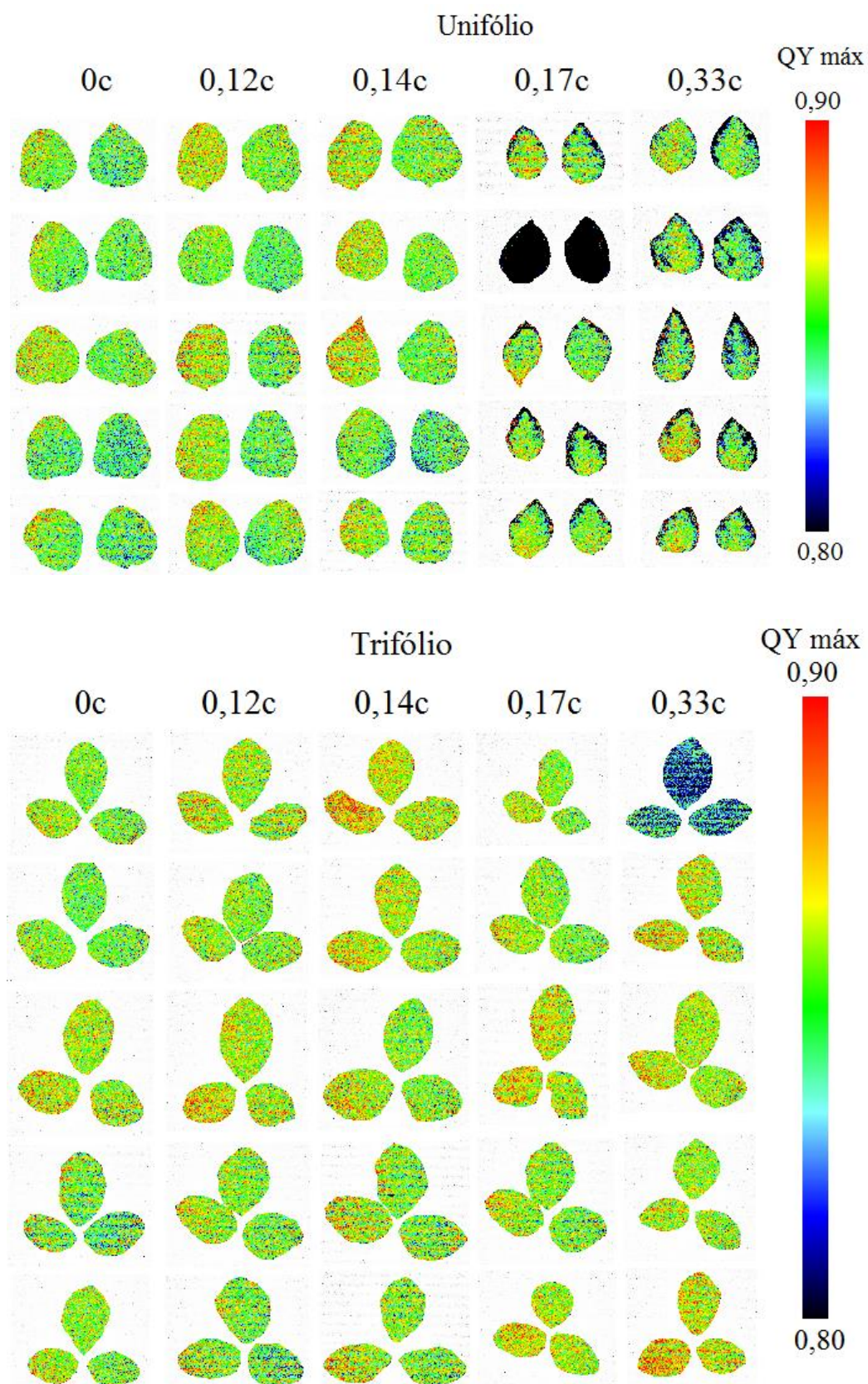
Fonte: Próprio autor.

Figura 81 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 500 ppm.



Fonte: Próprio autor.

Figura 82 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 1075 ppm.



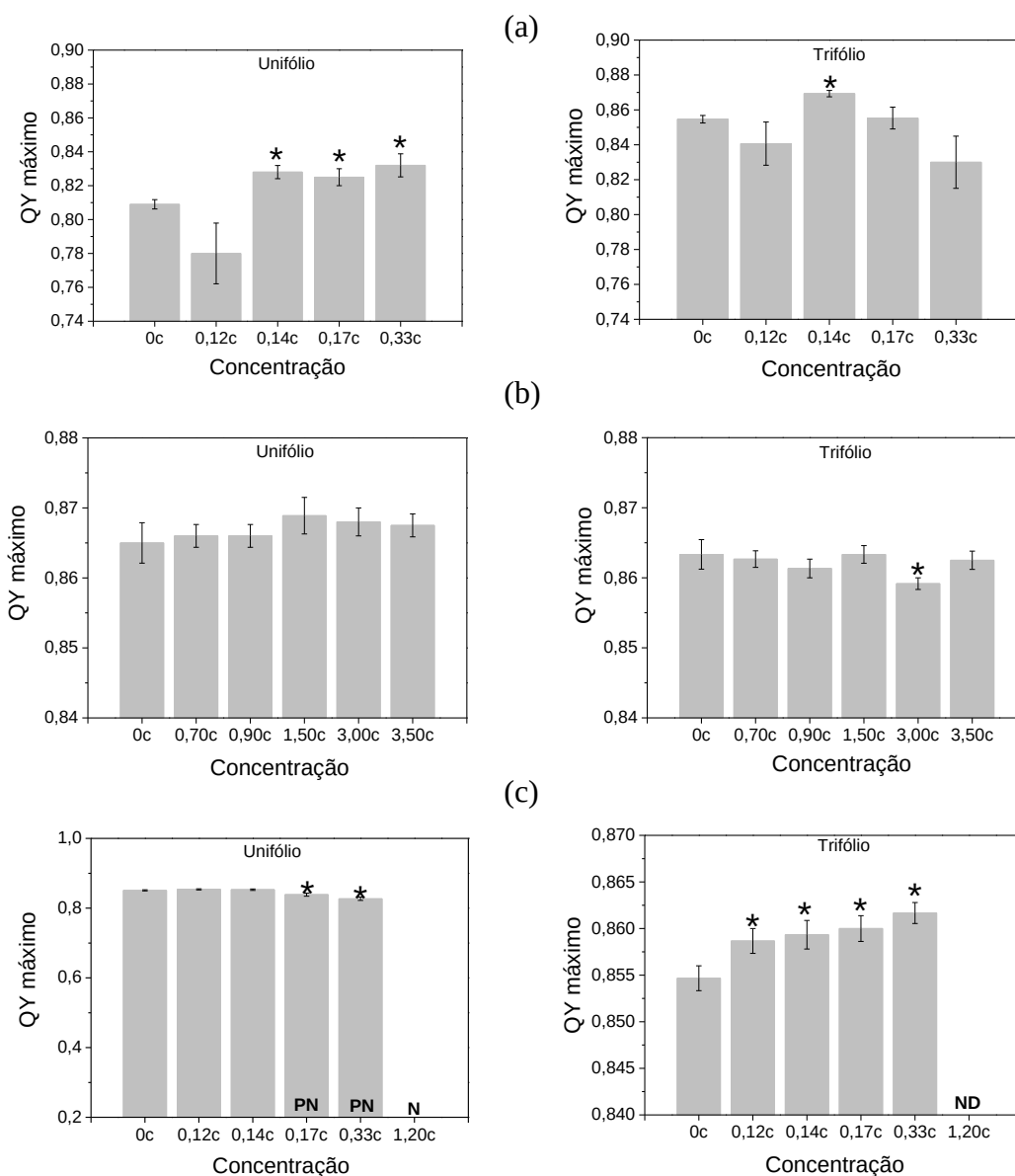
Fonte: Próprio autor.

Por meio das imagens associadas ao *QY máximo* foi possível perceber um aumento desse parâmetro no unifólio das plantas irrigadas com glifosato a partir da fração de concentração 0,14c. No experimento utilizando frações de concentrações maiores (seção 5.1) notou-se um decréscimo nos valores de *QY máximo* para plantas de soja irrigadas com glifosato, porém quanto utilizadas concentrações menores houve um pequeno aumento do valor desse parâmetro, provavelmente resultado de uma tentativa de recuperação da planta.

No caso do trifólio das plantas irrigadas com glifosato e, tanto unifólio quanto trifólio, das plantas irrigadas com difenoconazol não foi possível observar alterações nas imagens associadas ao *QY máximo*.

Observou-se uma redução de *QY máximo* nas bordas dos unifólios irrigadas com 0,17c de metomil, já no trifólio não foram notadas alterações nessas imagens. Baseados nas imagens associadas ao *QY máximo* foram obtidos os valores médios desse parâmetro (Figura 83).

Figura 83 – *QY máximo* das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Kruskal-Wallis, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil. PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



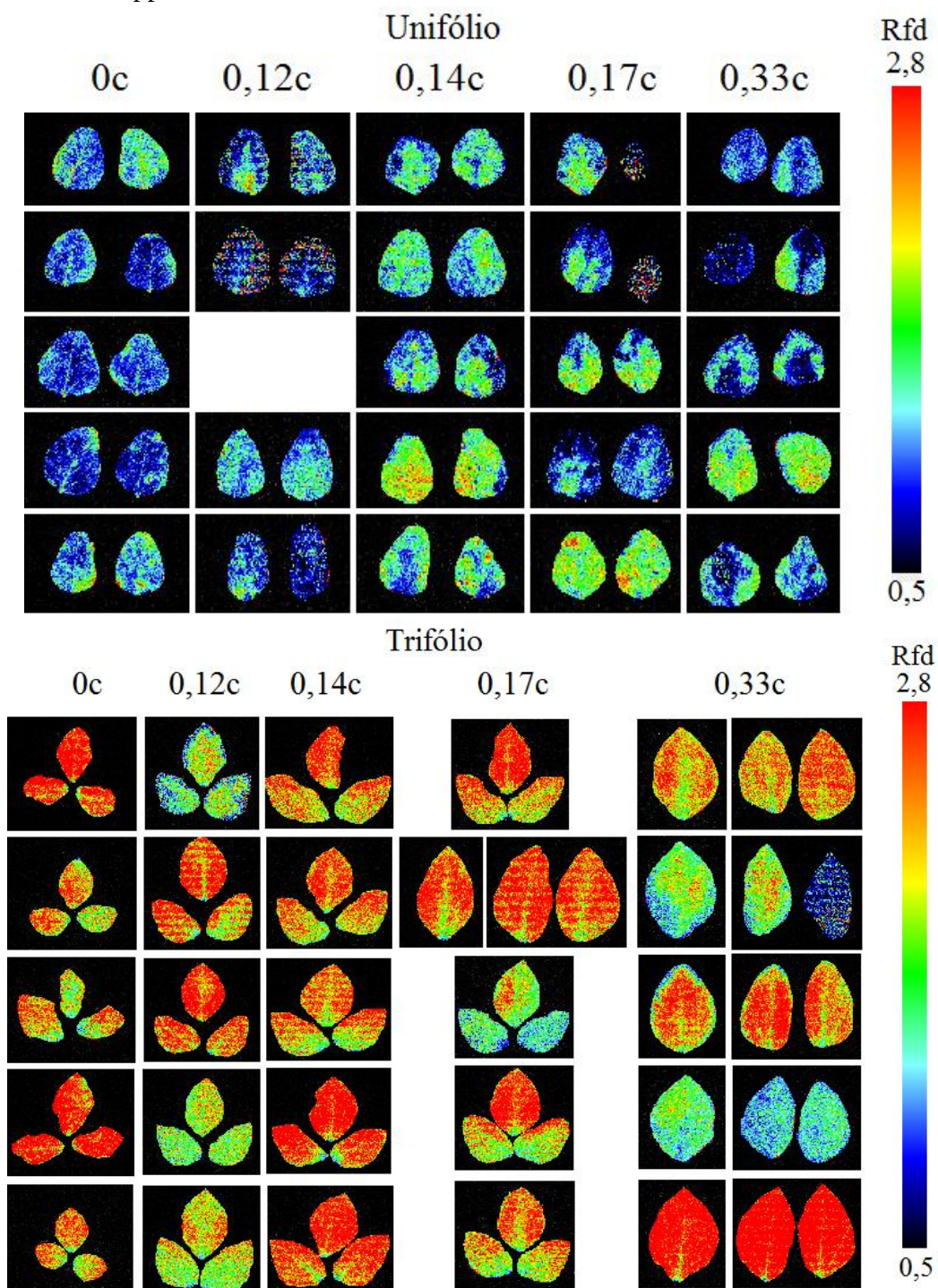
Fonte: Próprio autor.

A partir das médias de *QY máximo* verificou-se que no unifólio das plantas irrigadas com glifosato, a presença desse herbicida foi percebida na fração de concentração 0,14c, para unifólio, utilizando o parâmetro *QY máximo*, sendo a análise inconclusiva para o trifólio e para as plantas irrigadas com difenoconazol, tanto para o unifólio quanto para o trifólio.

No unifólio das plantas que foram irrigadas com metomil só foi possível notar alterações nas folhas em que as frações de concentrações causaram necrose parcial. Já no trifólio a presença do inseticida foi percebida na menor fração de concentração utilizada, 0,12c. No caso das plantas necrosadas esse parâmetro não foi avaliado, pois o *QY máximo* é obtido a partir da fluorescência da clorofila e, nesse caso, não há esse pigmento.

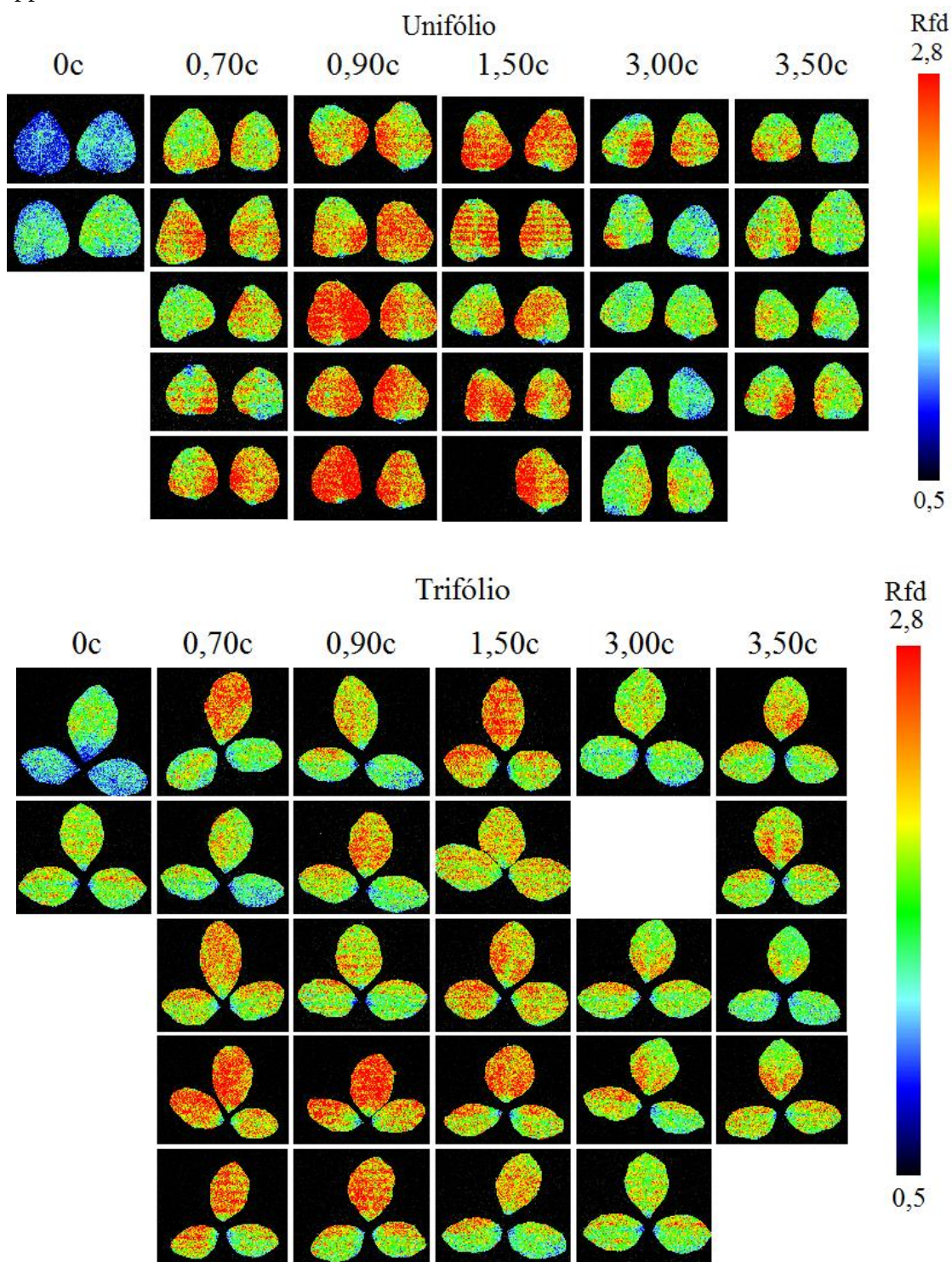
Para avaliar o efeito desses pesticidas na vitalidade das folhas, foram obtidas as imagens de *Rfd* (Equação 3, pag. 45) apresentadas nas figuras 84, 85 e 86.

Figura 84 – Imagens associadas ao *Rfd* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de glifosato; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm.



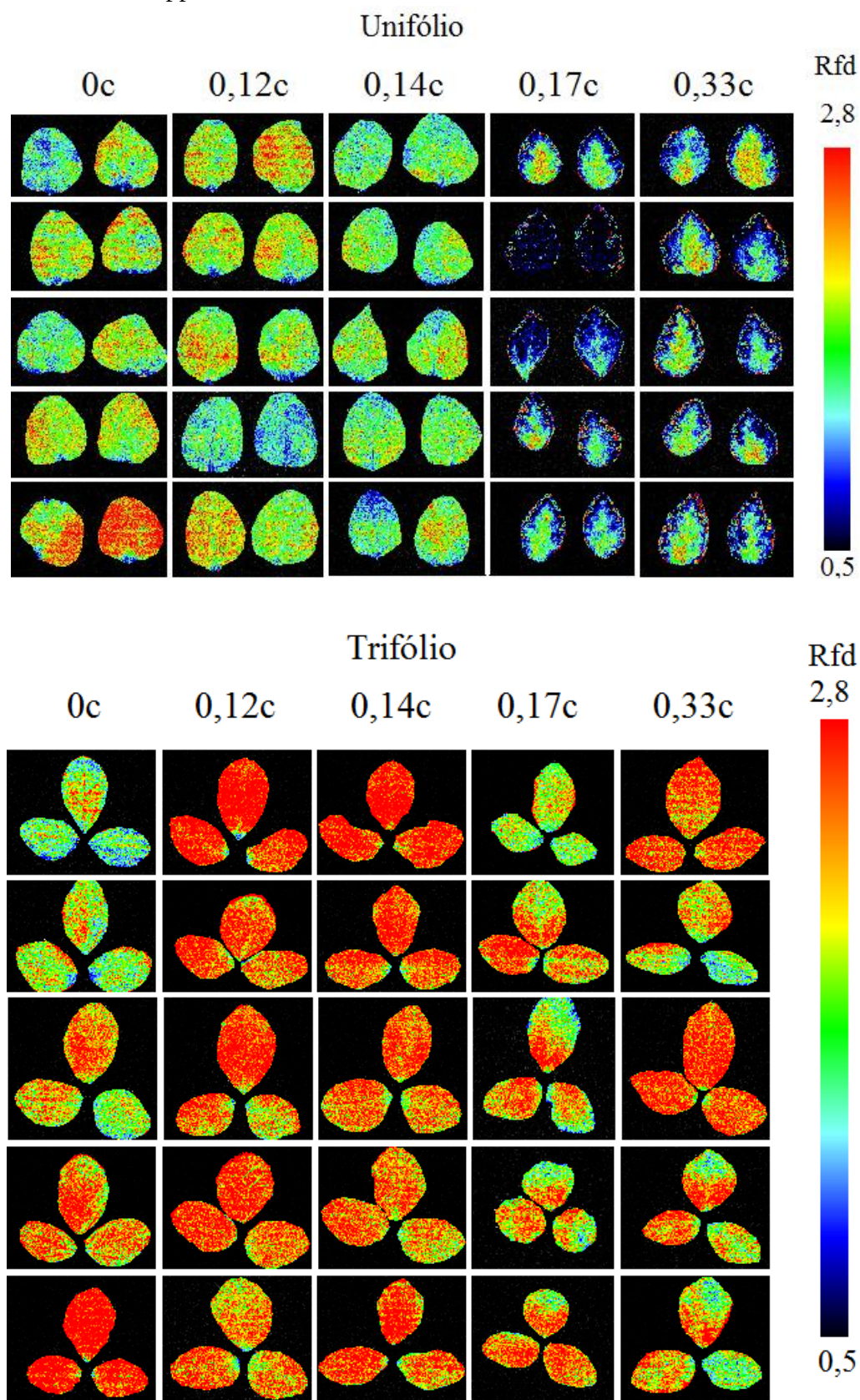
Fonte: Próprio autor.

Figura 85 – Imagens associadas ao *Rfd* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de difenoconazol; c é a concentração indicada pelo fabricante, 500 ppm.



Fonte: Próprio autor.

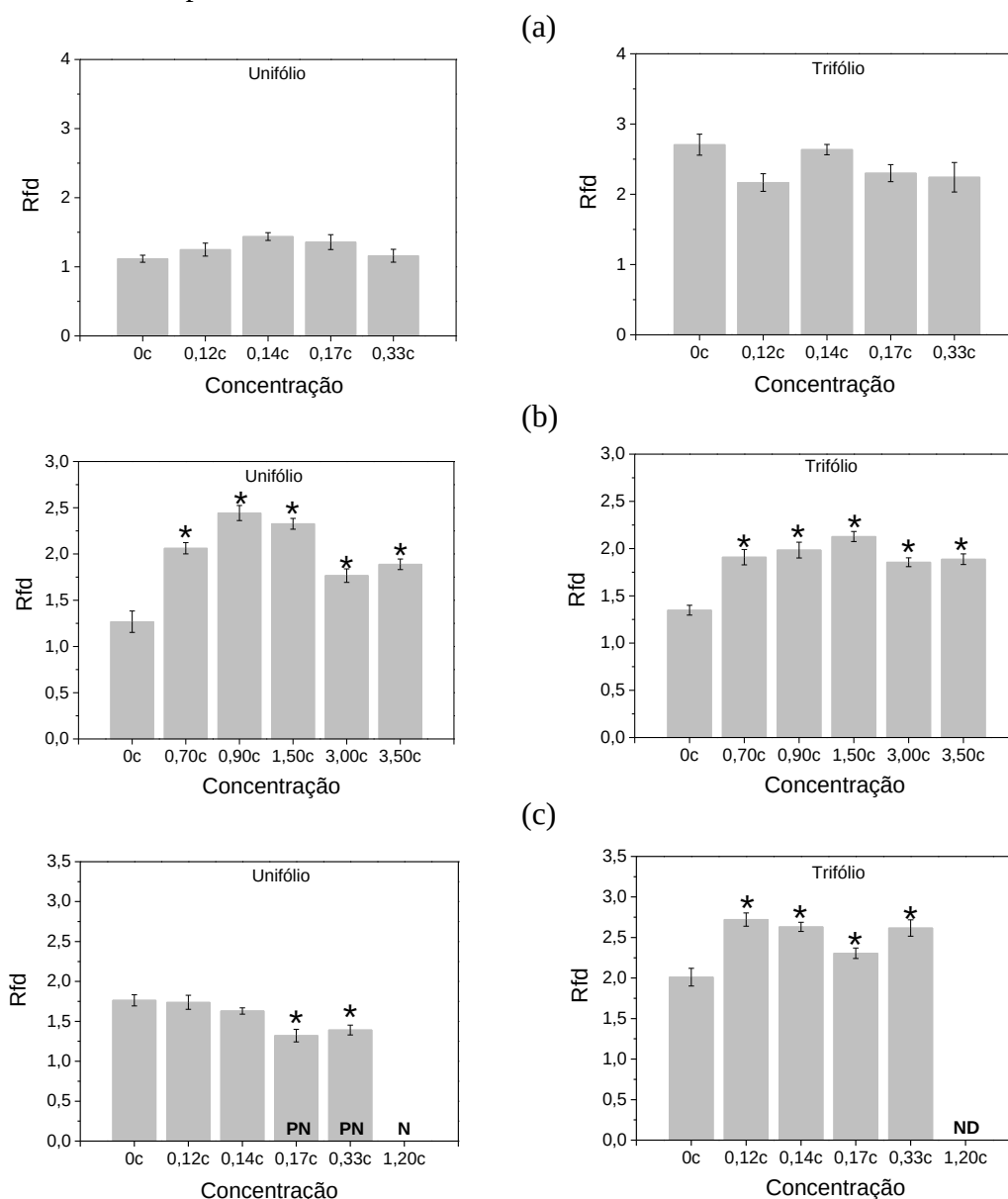
Figura 86 – Imagens associadas ao *QY máximo* para unifólio e trifólio de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 1075 ppm.



Fonte: Próprio autor.

A partir das imagens associadas ao *Rfd* foram obtidas as médias desse parâmetro que estão apresentadas na figura 87.

Figura 87 – *Rfd* das plantas de soja em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil. *Grupo com diferença significativa em relação ao grupo controle de acordo com o teste Tukey, $p \leq 0,05$; barras de erro indicam $\pm SE$ ($n=10$ para unifólio e $n=15$ para trifólio); c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN, N e ND destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, e folhas que não se desenvolveram, respectivamente.



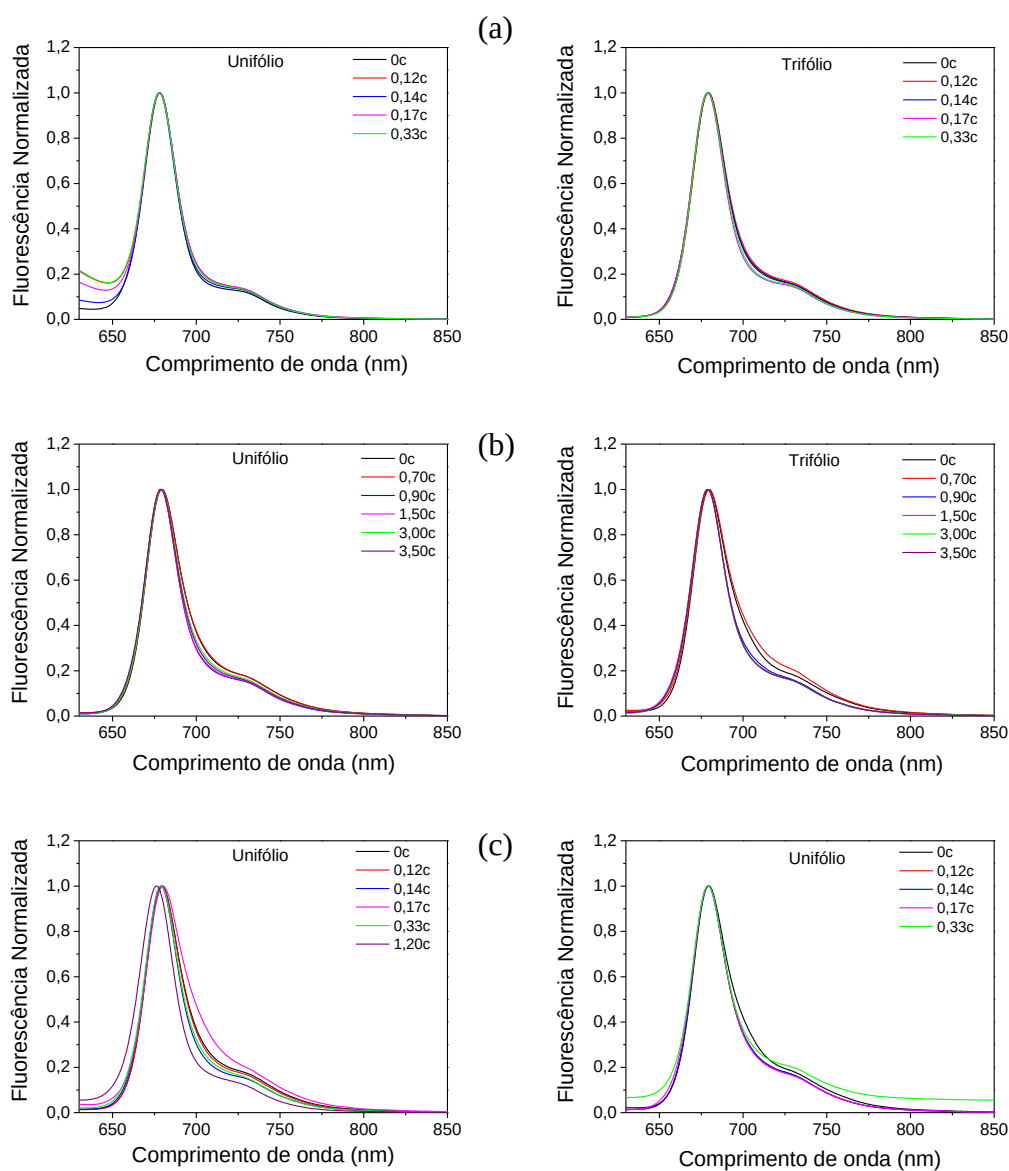
Fonte: Próprio autor.

A partir das imagens relacionadas ao *Rfd* e das médias não foi possível detectar alterações nas plantas irrigadas com glifosato. Já nas plantas irrigadas com difenoconazol foi

possível notar um aumento a partir da fração de concentração 0,70c, para unifólios e trifólios. Nos unifólios das plantas irrigadas com metomil pode-se notar uma redução de *Rfd* a partir da fração de concentração 0,17c, ou seja, nas folhas que apresentavam necrose parcial, enquanto que nos trifólios as alterações foram percebidas já na fração de concentração 0,12c. Para as folhas necrosadas esse parâmetro não foi obtido porque nelas não há clorofila.

Foram obtidos os extratos das folhas utilizadas nas medições e os espectros de fluorescência da clorofila estão dispostos na figura 88.

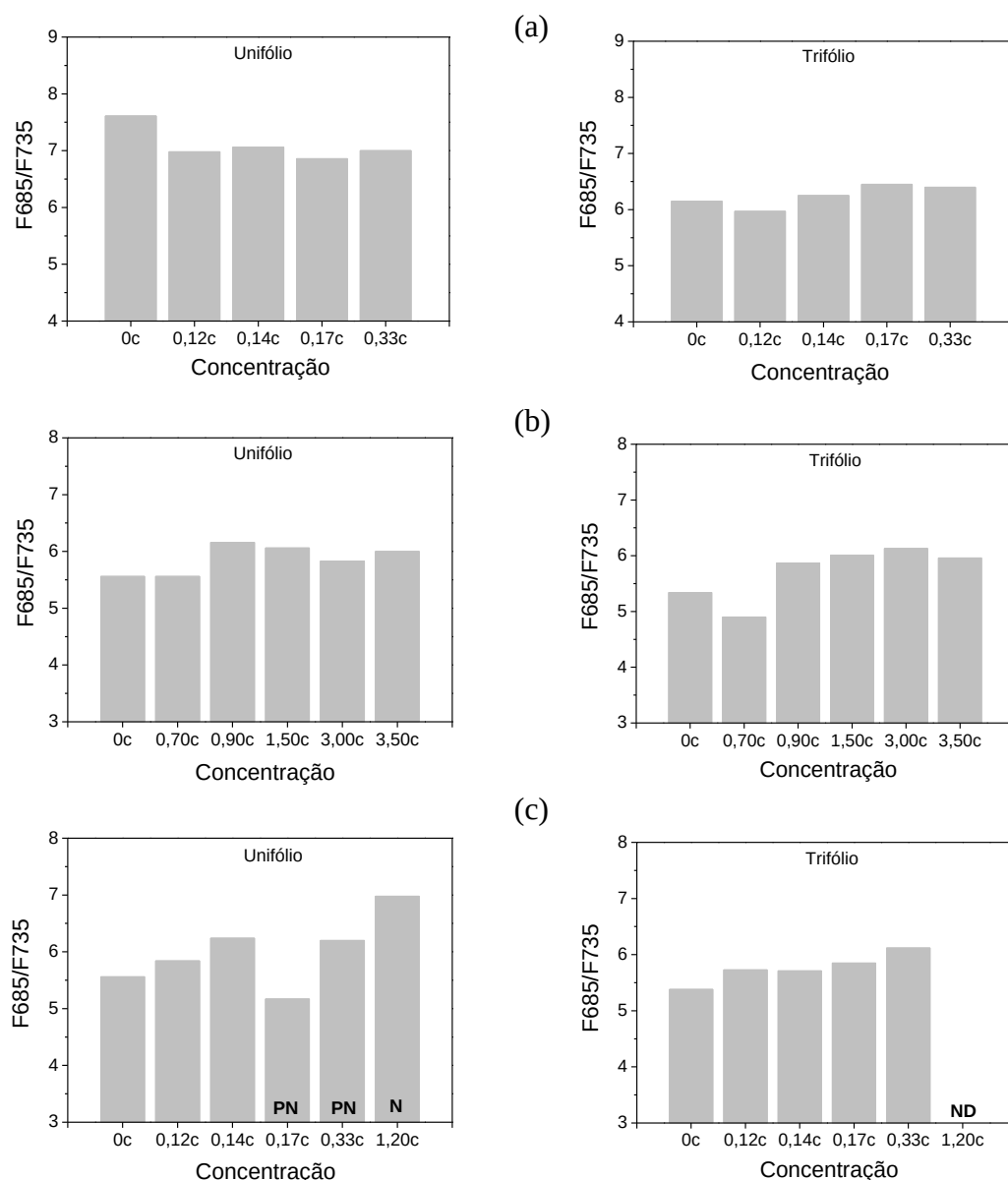
Figura 88 – Espectro de fluorescência normalizada dos extratos de plantas de soja irrigadas com diferentes concentrações de (a) glifosato, b) difenoconazol e (c) metomil; c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.



Fonte: Próprio autor.

Com base nos espectros de fluorescência foram obtidas as razões F685/F735 que estão apresentadas na figura 89. Nesse caso a razão F685/F735 foi utilizada apenas como padrão interno e não mais como um indicador da eficiência do fotossistema II.

Figura 89 – Razão F685/F735 para o extrato, das folhas de soja, sob excitação em 405 nm, em função da concentração de (a) glifosato, (b) difenoconazol e (c) metomil utilizada na irrigação de plantas de soja. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil; PN e N destacam grupos que apresentaram folhas parcialmente e totalmente necrosadas, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Nos unifólios das plantas irrigadas com glifosato houve um decréscimo dessa razão, enquanto que os trifólios dessas plantas não apresentaram alterações. Tanto nos unifólios

quanto nos trifólios das plantas irrigadas com difenoconazol e com metomil, essa razão apresentou uma tendência de aumento.

Determinou-se a fração de concentração mínima detectada em cada técnica para as concentrações utilizadas (Tabela 5).

Foi adotado um critério para determinação do valor mínimo de fração de concentração de pesticida presente na solução de irrigação capaz de ser detectado a partir da análise do bioindicador aliado a uma dada técnica experimental. Este valor foi definido tomando como referência os dois grupos consecutivos, com menor fração de concentração, que apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle.

Tabela 4 – Valor mínimo de fração de concentração de pesticida obtido pela combinação bioindicador (soja)-parâmetro avaliado nas concentrações intermediárias. c é a concentração de referência indicada pelo fabricante, 3600 ppm de glifosato, 500 ppm de difenoconazol e 1075 ppm de metomil.

	Soja					
	Glifosato		Difenoconazol		Metomil	
Comprimento da raiz	0,12c		0,70c		1,20c	
	Unifólio	Trifólio	Unifólio	Trifólio	Unifólio	Trifólio
Condutância estomática	0,14c	-	0,70c	3,50c	0,12c	0,12c
Temperatura foliar	0,14c	0,17c	0,70c	0,70c	0,14c	0,12c
F685/F735 (405 nm)	0,12c	0,14c	3,50c	1,50c	0,14c	0,12c
F685/F735 (532 nm)	0,12c	0,14c	1,50c	0,70c	0,12c	0,12c
<i>QY máximo</i>	0,14c	-	-	-	0,17c	0,12c
<i>Rfd</i>	-	-	0,70c	0,70c	0,17c	0,12c

Fonte: Próprio autor.

A menor fração de concentração detectada de glifosato nas plantas de soja foi obtida pelo comprimento de raiz e F685/F735 para unifólio. Nas plantas irrigadas com difenoconazol, a menor fração de concentração detectada foi por meio do comprimento da raiz, temperatura foliar e *Rfd* tanto para unifólio quanto para trifólio, condutância estomática

no unifólio e F685/F735 (sob excitação de 532 nm) no trifólio. Todas as técnicas utilizadas detectaram o efeito do metomil no trifólio na menor fração de concentração utilizada; já no unifólio a menor fração de concentração utilizada foi percebida pela condutância estomática e F685/F735 sob excitação de 532 nm.

6 - CONCLUSÕES

Visualmente é possível perceber as alterações causadas, em plantas de soja, pela presença de glifosato e metomil, tanto nas maiores concentrações quanto nas concentrações intermediárias utilizadas, já as plantas de sesbania não conseguem se desenvolver na presença do glifosato. Porém, as plantas irrigadas com difenoconazol não promovem alterações perceptíveis visualmente nas plantas de soja, mas as plantas de sesbania apresentam maior perfilhamento na presença de difenoconazol. Enquanto que as plantas de soja irrigadas com metomil se desenvolvem até a fração de concentração 0,50c, e as de sesbania somente até a fração de concentração 0,25c.

A imagem térmica mostra-se inconclusiva na avaliação de plantas (soja e sesbania) cultivadas na presença de pesticidas nas maiores frações de concentrações. Porém é eficiente na detecção dos três pesticidas utilizados nas concentrações intermediárias na soja. A condutância estomática é eficiente na análise dos efeitos dos pesticidas em plantas de soja e sesbania irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil, quando utilizadas nas maiores concentrações e também nas concentrações intermediárias utilizadas na soja, exceto para o glifosato.

As medições do comprimento de raiz se mostram eficientes para avaliar a presença desses pesticidas nas plantas de soja e sesbania. Redução no comprimento é observada tanto para plantas de soja como para de sesbania, em todos os pesticidas utilizados.

Há alterações na razão F685/F735 para as plantas irrigadas com glifosato, difenoconazol e metomil, sendo observado aumento para as folhas que estão necrosadas. Esse parâmetro tem por base a fluorescência da clorofila para monitorar alterações associadas ao estado fisiológico das plantas, e mostra-se, nesse trabalho, como um bom indicador da presença dos pesticidas no cultivo das plantas.

A partir das imagens de *QY máximo* e *Rfd* é possível verificar diferenças entre as plantas irrigadas com as soluções contendo diferentes concentrações e as plantas do grupo controle. Os resultados também revelam que esses parâmetros são bons indicadores de estresse em plantas induzido pela presença dos pesticidas.

Apesar da forma de irrigação utilizada nesse trabalho ser desafiadora, pois a planta precisa absorver os pesticidas do solo, esta mostra-se eficiente já que são observadas alterações nos parâmetros avaliados provocadas pela presença desses pesticidas mesmo em folhas próximo ao ápice da planta.

As plantas de soja, por serem transgênicas, mostram-se mais resistentes à presença do glifosato que as de sesbania, que se trata de uma espécie nativa. O glifosato causou maiores danos, pelo fato deste ser um herbicida não seletivo, ou seja, elimina qualquer espécie de planta, exceto as transgênicas, quando em baixas concentrações. Para os três pesticidas utilizados, as maiores concentrações são as que provocam maiores danos tanto nas plantas de soja como nas de sesbania. Por fim, concluímos que as plantas de soja e sesbania, aliadas às técnicas de fluorescência, podem ser utilizadas como bioindicadores da presença de glifosato, difenoconazol e metomil na água de cultivo.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ LIMA, J. E. F. W. Recursos hídricos no Brasil e no mundo. Documentos - Embrapas Cerrados, Planaltina, n. 33, p. 1 - 46, 2001.
- ² REBOUÇAS, A. C. Água e desenvolvimento rural. **Estudos Avançados**, v. 15, n. 43, p. 327 - 344, 2001.
- ³ PEREIRA, R. S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n.1, p. 20 - 36, 2004.
- ⁴ BERNHARDT, H. Control of reservoir water quality. In: Hahn, H.H. & Klute, R. (eds) Chemical water and wastewater treatment. Springer, Berlin, 1990.
- ⁵ PEREIRA, R. S. Poluição hídrica: causas e consequências. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 1 - 19, 2004.
- ⁶ SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Revista Engenharia Sanitária**, v. 22, n. 2, 2017.
- ⁷ AKSOY, A.; SAHIN, U.; DUMAN, F. Robinia pseudo-acacia L. as a possible biomonitor of heavy metal pollution in Kayseri. **Turkish Journal of Botany**, v. 24, p. 279 - 284, 2000.
- ⁸ REMON, E.; BOUCHARDON, J.-L.; LE GUÉDARD, M.; BESSOULE, J.-J.; CONORD, C.; FAURE, O. Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? **Environmental Pollution**, v. 175, p. 1 - 7, 2013.
- ⁹ MATOS, P. F.; PESSÔA, V. L. S. A modernização da agricultura no Brasil e os novos usos do território. **Geo UERJ**, v. 2, n. 22, p. 290 – 322, 2011.
- ¹⁰ BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. **Revista de Geografia Agrária**, v. 1, n. 2, p. 123 – 151, 2006.
- ¹¹ FILHO, J. E. R. V.; FISHLOW, A. Agricultura e indústria no Brasil – Inovação e competitividade. Brasília: Ipea, 2017.
- ¹² IBAMA – Instituto brasileiro do meio ambiente e recursos naturais renováveis. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2015. Disponível em: <http://siscom.ibama.gov.br/monitora_biomass/>. Acesso em: 24 de outubro 2017.
- ¹³ FILHO, J. E. R. V.; VIEIRA, A. C. P. A inovação na agricultura brasileira: uma reflexão a partir da análise dos certificados de proteção de cultivares. Brasília: Ipea, 2013.
- ¹⁴ Conab: Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira. Monitoramento agrícola - safra 2015/16, v. 9, nono levantamento, p. 1 – 178, 2016.
- ¹⁵ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio – Brasil 2016/17 a 2026/27. 8ª edição. SPA/Mapa: Brasília, 2017.

- ¹⁶ MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, A. L. Soja: Fatores que afetam o crescimento e o rendimento de grãos. Departamento de plantas de lavoura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Porto Alegre, 2005.
- ¹⁷ FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. Ecofisiologia da soja. 1ª edição. Circular técnica, Londrina – PR, 2007.
- ¹⁸ BERLATO, M. A. Bioclimatologia da soja. **A Soja no Brasil**, Campinas, p.90-175, 1981.
- ¹⁹ CÂMARA, G. M. S.; HEFFIG, A. **Soja: tecnologia de produção II**. Piracicaba, ESALQ/LPV, 450p, 2000.
- ²⁰ GAZZIERO, D. L. P.; ADEGAS, F.; VOLL, E. Glifosato e soja transgênica. 1ª edição. Circular técnica, Londrina – PR, 2008.
- ²¹ ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Impact of glyphosate and Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 825-831, 2004.
- ²² GRUYS, K.J.; SIKORSKI, A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B.K. (Ed.). **Plant amino acids – biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 357-365.
- ²³ PELAEZ, V.; ALBERGONI, L.; GUERRA, M. P. Soja transgênica versus soja convencional: uma análise comparativa de custos e benefícios. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 2, p. 279 – 309, 2004.
- ²⁴ Glyphosate. Disponível em: <http://www.usfumigation.org/Chemical_Herbicides/Glyphosate/>. Acesso em 25 de outubro 2017.
- ²⁵ CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO –Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, 1ª Parte, p. 1 - 98, Rio de Janeiro, abril de 2012.
- ²⁶ ANVISA & UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.
- ²⁷ SAMÔR, O.J.M. Comportamento de mudas de *Sesbania virgata* e *Anadenanthera macrocarpa*, produzidas em recipientes e substratos, destinadas à recuperação de áreas degradadas pela extração de argila. Campos de Goytacazes. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense, 1999.
- ²⁸ ARAUJO, E. C.; MENDONÇA, A. V. R.; BARROSO, B. G.; LAMÔNICA, K. R.; SILVA, R. F. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (CAV.) PERS. **Revista brasileira de sementes**, v. 26, n. 1, p. 105 – 110, 2004.
- ²⁹ *Sesbania Virgata*. Disponível em: <<http://faunayfloradelargentinanativa.blogspot.com.br/2011/02/rama-negra-sesbania-virgata.html>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2018.

- ³⁰ BRANZINI, A.; GONZÁLEZ, R. S.; ZUBILLAGA, M. Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgata*. **Journal of Environmental Management**, v. 102, p. 50 -54, 2012.
- ³¹ LACERDA, C. F.; FILHO, J. E.; PINHEIRO, C. B. *Fisiologia Vegetal*. 3ª Ed. Fortaleza – CE: 2017.
- ³² TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p., 2004.
- ³³ Cloroplastos. Disponível em: <<https://www.todamateria.com.br/cloroplastos/>>. Acesso em: 31 de outubro de 2017.
- ³⁴ Thylakoid membrane. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thylakoid_membrane_2_gl.svg>. Acesso em: 31 de outubro de 2017.
- ³⁵ KERBAUY, G. B. *Fisiologia vegetal*. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan S.A., 2004, p. 209.
- ³⁶ CUNHA, G. S. A fase ‘independente’ da luz na fotossíntese. 2011. Disponível em: <<http://www.teliga.net/2011/11/fase-independente-da-luz-na.html>>. Acesso em: 31 de outubro de 2017.
- ³⁷ HIRAKURI, M. H.; LAZZAROTTO, J. J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Soja, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Documentos 349, Londrina, junho de 2014.
- ³⁸ YORINORI, J.T. Doenças da soja no Brasil. In: FUNDAÇÃO CARGILL. Soja no Brasil Central. Campinas : Fundação Cargill, 1986. p. 301-363.
- ³⁹ KRUIZE, N. D.; TREZZI, M. M.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores da EPSPs: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 1, n. 2, p. 139-146, 2000.
- ⁴⁰ SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277 – 284, 2016.
- ⁴¹ SILVA, J. M. Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em sedimento por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente com microdetector por captura de elétrons. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ⁴² SILVA L. Q.; ARAÚJO, A. C. F.; ALMEIDA, G. M.; FILHO, A. J. V.; COSTA, A. C.; JAKELAITIS, A. Modificações fisiológicas em folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) causadas pela aplicação de glyphosate. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 15, p. 184 – 194, 2016.
- ⁴³ FIGUEIREDO, L. A. Nutrição nitrogenada (15 N) em soja convencional e transgênica sob aplicação do herbicida glifosato. Dissertação (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. 82 p.

⁴⁴ YORINORI, J. T.; PAIVA, W. M.; FREDERICK, R. D.; FERNANDEZ, P. F. T. Ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) no Brasil e no Paraguai, nas safras 2000/01 e 2001/02. Resumos, II Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu - PR, p.94. 2002.

⁴⁵ GODOY, C. V.; FLAUSINO, A. M. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem asiática da soja em Londrina e Tamarana, PR, na safra 2007/08. **Embrapa Soja**, Circular técnica 57, p. 1 – 4, 2008.

⁴⁶ Difenconazole. Disponível em:
<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Difenconazole#section=Top>>. Acesso em 03 de janeiro de 2018.

⁴⁷ GARCIA, A. Fungicidas I: utilização no controle químico de doenças e sua ação contra os fitopatógenos. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, 1999. 32 p.

⁴⁸ GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia brasileira**, v. 29, n. 1, p. 97 – 101, 2004.

⁴⁹ SANTOS, P. I. M. Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase do peixe *Danio rerio*. 2009. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN.

⁵⁰ ALI, A.; CHOUDHURY, R. A. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.

⁵¹ NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PONTES NETTO, D.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 201 – 204, 2007.

⁵² CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 19-27, 2012.

⁵³ KLUMPP, A.; KLUMPP, G. Plants are bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. **Environmental Pollution**, v. 85, p. 109 - 116, 1994.

⁵⁴ MANNING, W. J.; GODZIK, B. Bioindicator plants for ambient Ozone in Central and Eastern Europe. **Environmental Pollution**, v. 130, p. 33 – 39, 2004.

⁵⁵ REMON, E.; BOUCHARDON, J.-L.; LE GUÉDARD, M.; BESSOULE, J.-J.; CONORD, C.; FAURE, O. Are plants useful as accumulation indicators of metal bioavailability? **Environmental Pollution**, v. 175, p. 1-7, 2013.

⁵⁶ KHANUJA, S. P. S.; DAROKAR, M. P.; MISHRA, S.; GANGWAR, A.; SHASANY, A. K.; KUMAR, T. R. S.; SAIKIA, D.; KUMAR, S. Development of a Novel Plant System as Biosensor for Detecting Environmental Hazards and Bioactive Molecules Through Distinct Responses. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 20, n. 1, p. 15 – 22, 2001.

⁵⁷ AUGÉ, R. M.; TOLER, H. D.; SAXTON, A. M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. **Mycorrhiza**, v. 25, n. 1, p. 13 - 24, 2015.

⁵⁸ Anhanguera. Questões de vestibular: biologia, química e ciências da natureza. Disponível em: <<http://questoesbiologicas.blogspot.com.br/2014/12/biologia-uefs.html>>. Acesso em: 16 de novembro de 2017.

⁵⁹ OLIVEIRA, A. D.; FERNANDES, E. J.; RODRIGUES, T. J. D. Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. **Engenharia Agrícola**, v. 25, n. 1, p. 86 – 95, 2005.

⁶⁰ MEDINA, C. L.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. A. Condutância estomática , transpiração e fotossíntese em Laranjeira ‘Valência’ sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 11, n. 1, p. 29 – 34, 1999.

⁶¹ SILVA, M. V. P.; SILVA, J. F.; SILVA, E. S. S.; JÚNIOR, A. S. A.; MOUSINHO, F. E. P. Parâmetros fisiológicos de variedades de cana-de-açúcar submetidas a distintos regimes hídricos. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 2, n. 4, p. 509 – 518, 2017.

⁶² WISE, R.R.; OLSON, A.J.; SCHRADER, S.M.; SHARKEY, T.D. Electron transport is the functional limitation of photosynthesis in field-grown Pima cotton plants at high temperature. **Plant, Cell and Environment**, v. 27, p. 717-724, 2004.

⁶³ RIBEIRO, R. V. Influência da temperatura na fotossíntese de laranjeira 'pêra' com clorose variegada dos citros. 2002. 74 p. Dissertação - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba – SP, 2002.

⁶⁴ DIAS, D. P.; MARENCO, R. A. Fotossíntese e fotoinibição em mogno e acariquara em função da luminosidade e temperatura foliar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 305 – 311, 2007.

⁶⁵ SHABALA, L.; ROSS, T.; MCMEEKIN, T.; SHABALA, S. Non-invasive microelectrode ion flux measurements to study the adaptive responses of microorganisms to the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 472 – 486, 2006.

⁶⁶ MARTUSCELLO, J. A.; MAJEROWICZ, N.; CUNHA, D. N. F. V.; AMORIM, P. L.; BRAZ, T. G. S. Características produtivas e fisiológicas de capim-elefante submetido à adubação nitrogenada. **Archivos de Zootecnia**, v. 65, n. 252, p. 565 - 570, 2016.

⁶⁷ TAVARES, L.C.; MENDONÇA, A. O.; ZANATTA, Z. C. N.; BRUNES, A. P.; VILLELA, F. A. Efeito de fungicidas e inseticidas via tratamento de sementes sobre o desenvolvimento inicial da soja. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 10, n. 18; p. 1400, 2014.

⁶⁸ ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-química**. 7. Ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2004. v. 2.

⁶⁹ LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. Springer, 2006.

⁷⁰ SILVA, A. J.; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. S.; SILVA-JR, E. A. LED-Induced Chlorophyll Fluorescence Spectral Analysis for the Early Detection and Monitoring of Cadmium Toxicity in Maize Plants. **Water Air Soil Pollut**, v. 223, p. 3527 – 3533, 2012.

⁷¹ BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.

⁷² LICHTENTHALE, H. K.; MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 8, p. 316 – 320, 1997.

⁷³ MECHRIA, B.; CHEHEB, H.; BOUSSADIAB, O.; ATTIA, F.; MARIEMB, F. B.; BRAHAMB, M.; HAMMAMIA, M. Effects of agronomic application of olive mill wastewater in a field of olive trees on carbohydrate profiles, chlorophyll a fluorescence and mineral nutrient content. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 184–191, 2011.

⁷⁴ FERNANDES, J.; FALCO, W. F.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Changes in chlorophyll a fluorescence of glyphosate-tolerant soybean plants induced by glyphosate: in vivo analysis by laser-induced fluorescence spectroscopy. **Applied Optics**, v. 52, p. 3004 - 3011, 2013.

⁷⁵ FALCO, W. F.; QUEIROZ, A. M.; FERNANDES, J.; BOTERO, E. R.; FALCÃO, E. A.; GUIMARÃES, F. E. G.; M'PEKO, J. -C.; OLIVEIRA, S. L.; COLBECK, I.; CAIRES, A. R. L. Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 299, p. 203 – 209, 2015.

⁷⁶ QUEIROZ, A. M.; MEZACASA, A. V.; GRACIANO, D. E.; FALCO, W. F.; M'PEKO, J. -C.; GUIMARÃES, F. E. G.; LOWSON, T.; COLBECK, I.; OLIVEIRA, S. L.; CAIRES, A. R. L. Quenching of chlorophyll fluorescence induced by silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 168, p. 73–77, 2016.

⁷⁷ MOŹDŹEŃ, K.; BOJARSKI, B.; RUT, G.; MIGDAŁEK, G.; REPKA, P.; RZEPKA, A. Effect of drought stress induced by mannitol on physiological parameters of maize (*Zea Mays* L.) seedlings and plants. **Journal Microbiology Biotechnology Food Sciences**, v. 4, n. 2, p. 86-91, 2015.

⁷⁸ SYNOWIEC, A.; MOŹDŹEŃ, K.; SKOCZOWSKI, A. Early physiological response of broccoli leaf to foliar application of clove oil and its main constituents. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 523-529, 2015.

⁷⁹ GENTY, B.; BRIANTAIS, J-M.; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 990, n. 1, p. 87 – 92, 1989.

⁸⁰ MURCHIE, E. H.; LAWSON, T. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 13, p. 3983 - 3998, 2013.

⁸¹ KALAJI, H. M.; SCHANSKER, G.; LADLE, R. J.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; BRESTIC, M.; BUSSOTTI, F.; CALATAYUD, A.; DĄBROWSKI, P.; ELSHEERY, N. I.; FERRONI, L.; GUIDI, L.; HOGEWONING, S. W.; JAJOO, A.; MISRA, A. N.; NEBAUER, S. G.; PANCALDI, S.; PENELLA, C.; POLI, D.; POLLASTRINI, M.; ROMANOWSKA-DUDA, Z. B.; RUTKOWSKA, B.; SERÔDIO, J.; SURESH, K.; SZULC, W.; TAMBUSSI, E.; YANNICCARI, M.; ZIVCAK, M. Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues. **Photosynthesis research**, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

⁸² OREKHOV, D. I.; YAKOVLEVA, O. V.; GORYACHEV, S. N.; PROTOPOPOV, F. F.; ALEKSEEV, A. A. The use of parameters of chlorophyll a fluorescence induction to evaluate the state of plants under anthropogenic load. **Biophysics**, v. 60, n. 2, p. 263-268, 2015.

⁸³ KALMATSKAYA, O. A.; KARAVAEV, V. A. The Fluorescent Indices of Bean Leaves Treated with Sodium Fluoride. **Biophysics**, v. 60, n. 5, p. 843 – 848, 2015.

⁸⁴ Aboissa Óleos Vegetais. Líquido da casca da castanha de caju – LCC, 2013. Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/produtos/view/130/liquido-da-casca-de-castanha-de-caju-lcc.html>>. Acesso em: 5 de Dezembro de 2016.

⁸⁵ FALCO, W. F.; BOTERO, E. R.; FALCÃO, E. A.; SANTIAGO, E. F.; BAGNATO, V. S.; CAIRES, A. R. L. In vivo observation of chlorophyll fluorescence quenching induced by gold nanoparticles. **Jouranl of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 225, p. 65 – 71, 2011.

⁸⁶ FREITAS, G. Aula Prática 2: Organografia vegetal – tipos de folha. Plantoteca, 2013. Disponível em: <http://plantotecanoturno2farmacia.blogspot.com.br/2013_09_01_archive.html>. Acesso em: 11 de Junho de 2015.

⁸⁷ FALCO, W. F. Avaliação das alterações fisiológicas em plantas de Vicia Faba induzidas por nanopartículas de prata. 2017. 142 p. Tese de doutorado – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2017.

⁸⁸ QUEIROZ, A. M. Interação nanopartícula-clorofila: uma análise via espectroscopia óptica. 2014. 80 p. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2014.

⁸⁹ PORRA, R. J. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. **Photosynthesis Research**, v. 73, n. 1 - 3, p. 149 - 156, 2002.

⁹⁰ OLIVEIRA, M. Erro padrão da média. Disponível em: <<http://www.manoeloliveira.net.br/2016/10/erro-padrao-da-media.html>>. Acesso em 30 de outubro de 2017.

⁹¹ TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Rvista HCPA**, v. 32, n. 2, 2012.

- ⁹² YAU, C. R Tutorial with Bayesian Statistics Using OpenBUGS. Disponível em: <<http://www.r-tutor.com/elementary-statistics/non-parametric-methods/kruskal-wallis-test>>. Acesso em: 11 de novembro de 2017.
- ⁹³ BAILEY-SERRES, J.; MITTLER, R. The roles of reactive oxygen species in plant cells. **Plant Physiology**, v. 141, p. 311, 2006.
- ⁹⁴ MITTLER, R. ROS are good. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 1, p. 11 – 19, 2017.
- ⁹⁵ MOORE, R.; EVANS, M.L. How roots perceive and respond to gravity. **American Journal of Botany**, v. 73, n. 4, p. 574-587, 1986.
- ⁹⁶ MAIA, J. M.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividades de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 2, p. 342 – 349, 2012.
- ⁹⁷ READE, J., COBB, A.H. Herbicides: Modes of Action and Metabolism. In: Weed Management Handbook (9th Edition), Naylor R. (ed), Blackwell Publications. Chapter 8, pp. 134, 2002.
- ⁹⁸ SHABALA L, ROSS T, MCMEEKIN T, SHABALA S. Non-invasive microelectrode ion flux measurements to study the adaptive responses of microorganisms to the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 472 – 486, 2006.
- ⁹⁹ HERRERA, R. C.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; SALGADO, C. C.; MAGALHÃES, M. M.; SOARES, F. P. Índice mitótico e viabilidade celular de calos embriogênicos de murici-pequeno. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 54, n. 1, p. 28 – 32, 2011.
- ¹⁰⁰ MARTINS, M. B. G.; CASTRO, P. R. C. Efeitos de giberlina e ethephon na anatomia de plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 10, p. 1855 – 1863, 1999.
- ¹⁰¹ D'AQUINO, L., PINTO, M.C., NARDI, L., MORGANA, M., TOMMASI, F. Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in *Triticum durum*. **Chemosphere**, v. 75, p. 900–905, 2009.
- ¹⁰² QIN, R., WANG, C., CHEN, D., BJØRN, L.O., LI, S. Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. *Agrogarum* L. involves disturbances in cell division and DNA damage. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 34, p. 1045 – 1055, 2015.
- ¹⁰³ WATERWORTH, W. M.; FOOTITT, S.; BRAY, C. M.; FINCH-SAVAGE, W. E.; WEST, C. E. DNA damage checkpoint kinase ATM regulates germination and maintains genome stability in seeds. **PNAS**, v. 113, n. 34, p. 9647 – 9652, 2016.
- ¹⁰⁴ ABU-IRMAILEH, B.E.; JORDAN, L.S.; KUMAMOTO, J. Enhancement of CO₂ and ethylene production and cellulase activity by glyphosate in *Phaseolus vulgaris*. **Weed Science**, v. 27, n. 1, p. 103 - 106, 1979.
- ¹⁰⁵ MERCIER, H. AUXINAS. IN: KERBAUY, G.B. (Ed.). **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.217-249, 2004.

- ¹⁰⁶ DING, W.; REDDY, K. N.; ZABLOTOWICZ, R. M.; BELLALLOUI, N.; BRUNS, H. A. Physiological responses of glyphosate-resistant and glyphosate-sensitive soybean to aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 593 – 598, 2011.
- ¹⁰⁷ LUDLOW, M.M.; MUCHOW, R.C. A critical evaluation of traits for improving crop yields in waterlimited environments. **Advances in Agronomy**, v. 43, p. 107 - 53, 1990.
- ¹⁰⁸ CEROVIC, Z. G.; SAMSON, G.; MORALES, F.; TREMBLAY, N.; MOYA, I. Ultraviolet-induced fluorescence for plant monitoring: present state and prospects. **Agronomie**, v. 19, p. 543 – 578, 1999.
- ¹⁰⁹ SMITH, H. L.; McAUSLAND, L.; MURCHIE, E. H. Don't ignore the green light: exploring diverse roles in plant processes. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 9, p. 2099 – 2110, 2017.
- ¹¹⁰ CONCENÇO, G.; FERREIRA, E. A.; MARQUES, R. F.; NUNES, T. C.; SANTOS, S. A.; PALHARINI, W. G.; MARSCHALL, I. R.; ALES, M. E. S.; MENDONÇA, C. G. Características fisiológicas de *Crambe abyssinica* sob aplicação de herbicidas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 37, n. 3, p. 361 – 369, 2014.
- ¹¹¹ LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C.; KNAPP, M. How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. **Photosynthetica**, v. 43, p. 379 – 393, 2005.