

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA TROPICAL

GÉSSICA ALINE NOGUEIRA DOS SANTOS

DERIVA SIMULADA DE GLIFOSATO EM PLANTAS ADULTAS DE
GUARANAZEIRO E DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE FRUTOS, METILXANTINAS E
POLIFENÓIS

MANAUS-AM
2019

GÉSSICA ALINE NOGUEIRA DOS SANTOS

DERIVA SIMULADA DE GLIFOSATO EM PLANTAS ADULTAS DE
GUARANAZEIRO E DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE FRUTOS, METILXANTINAS E
POLIFENÓIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração Produção Vegetal.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FERREIRA DA SILVA
COORIENTADORA: DRA. FLÁVIA CAMILA SCHIMPL

MANAUS-AM
2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237d Santos, Géssica Aline Nogueira dos
Deriva simulada de glifosato em plantas adultas de guaranazeiro e dinâmica da produção de frutos, metilxantinas e polifenóis / Géssica Aline Nogueira dos Santos. 2019
77 f.: il.; 31 cm.

Orientador: José Ferreira da Silva
Coorientadora: Flávia Camila Schimpl
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Guaraná. 2. Herbicida. 3. Fisiologia Vegetal. 4. Planta daninha. 5. Cafeína. I. Silva, José Ferreira da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

GÉSSICA ALINE NOGUEIRA DOS SANTOS

DERIVA SIMULADA EM PLANTAS ADULTAS DE
GUARANAZEIRO E DINÂMICA DA PRODUÇÃO DE
FRUTOS, METILXANTINAS E POLIFENÓIS

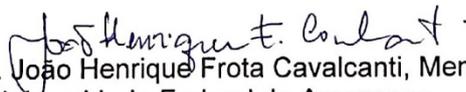
Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agronomia
Tropical da Universidade Federal do
Amazonas, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Agronomia Tropical, área de
concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 27 fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Flávia Camila Schimpl - Presidente
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. João Henrique Frota Cavalcanti, Membro
Universidade Federal do Amazonas



Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Dedico este trabalho aos meus pais Francenildo e Rosinelma, minhas irmãs Gerlane, Geandria e Geise, ao meu sobrinho Enzo Gabriel, e ao meu companheiro de vida Celso com todo carinho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas, pela infraestrutura, e a todos os técnicos, alunos e professores.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical e a todos os seus Professores que direta, ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Aos meus orientadores Professores Dr. José Ferreira da Silva, a quem eu admiro muito, pela oportunidade de aprendizado durante todos esses anos, pela confiança no meu trabalho, por todo apoio recebido durante a execução desta pesquisa, e pela amizade. E a Dra. Flávia Camila Schimpl, pela inspiração, apoio, oportunidade de aprendizado, incentivo, confiança, amizade e por me fazer uma profissional e uma pessoa melhor.

Ao Professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza do Centro de Análise Multidisciplinar-UFAM pela ajuda e disposição nas análises deste trabalho e toda sua equipe de laboratório.

Ao responsável técnico pelo Laboratório de Purificação de Biomoléculas Júlio Nino de Souza Neto do Centro de Análise Multidisciplinar-UFAM pela ajuda e disposição nas análises deste trabalho.

Ao Professor Dr. Emerson Silva Lima e toda sua equipe do Laboratório de Atividade Biológica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela ajuda nas análises.

Ao Professor Dr. Marciel José Ferreira FCA-UFAM e ao Victor Alexandre Hardt Ferreira dos Santos, pela colaboração nas análises.

Ao Professor Dr. José Francisco de Carvalho Gonçalves e toda sua equipe do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Vegetal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo apoio na execução deste projeto.

À Companhia de Bebidas das Américas (AMBEV) e toda sua equipe da Fazenda Santa Elena durante a realização do experimento.

Aos Engenheiros Agrônomos Roosevelt Hada Leal, e Miriam Frota, ao técnico Ernandis Pereira Barbosa, e a minha companheira de campo Luciana, funcionários da Ambev, responsáveis técnicos pela condução do experimento, por todo empenho e colaboração o que tornou possível a realização dessa pesquisa.

À Rafaela Oliveira pela ajuda nas análises no INPA.

A Adamir da Rocha Nina Junior e Natasha Veruska dos Santos pela ajuda nas análises, apoio, incentivo e amizade.

À equipe do Laboratório de Ciência das Plantas Daninhas, meus amigos: Ajax, Anselmo, Bruna, Francisco, Gilsimar, Jefferson, Karla, Laís, Mauro, Monique, Sara, Silvana, Vilson, pelo apoio e incentivos oferecidos e bons momentos vividos.

Ao Nascimento, secretário do PGATR, por sempre ajudar no que estivesse ao seu alcance.

Aos meus amigos, Osvaldo, Kédima, Macaulay, pela amizade e agradável companhia em sala de aula.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e motivaram, principalmente meus pais Rosinelma e Francenildo, minhas irmãs, Geise, Gerlane e Geandria, e ao meu sobrinho Enzo Gabriel, que com seu sorriso me dá forças para tudo.

À minha avó, Maria das Graças Lima Nogueira, por toda dedicação à minha educação.

À Rosinete Maria Lima Nogueira (*in memoriam*) por sempre estar ao meu lado e ser minha fonte de inspiração nessa vida.

Ao meu companheiro de vida, Celso Scherer Filho, que participou de todas as etapas desse trabalho, mas acima de tudo por sempre estar sempre ao meu lado com seu apoio e amor.

À Maria de Fátima Fernandes Scherer, Celso Scherer, Mariane Scherer, Matheus Scherer, Salime Scherer, e Conceição Castilho Fernandes por terem me apoiado durante a minha estadia em Maués, cidade onde os experimentos foram realizados, e fizeram sentir-me em casa.

Aos meus amigos Gabriella Almeida, Rodrigo Hidalgo, Raíssa Galvão e Amanda Jucá, por me apoiarem durante todo esse projeto.

À Juliana Arioli, por ter me ajudado na reta final deste trabalho (e na vida), pelo seu profissionalismo e ética.

Ao grupo do Facebook Bolsistas Capes, pelas palavras de apoio e conselhos.

O teu trabalho é o cântico de tua própria vida. Imprime nele onde estiveres a nota azul de teu amor. Estuda a Natureza: Age o vento compondo melodias. O rio mostra a força e convida ao serviço na cachoeira a estrondear. Não busques a tarefa que te cabe com a tristeza do escravo. O teu trabalho é a oficina em que podes forjar a tua própria luz.

Emmanuel

RESUMO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth) é uma planta com elevado conteúdo de cafeína e compostos antioxidantes, como catequina e epicatequina. Devido à importância econômica do guaraná para o Estado do Amazonas estudos tem buscado o aumento da produtividade. O controle de plantas daninhas é uma das práticas de manejo mais trabalhosas e que mais impacta a produtividade, sendo a adoção de herbicidas uma alternativa viável, no entanto, a deriva de aplicação de herbicidas pode causar prejuízos à cultura de interesse. Esse trabalho teve como objetivo avaliar as respostas fisiológicas e de produção de frutos de plantas adultas de guaranazeiro após serem expostas a diferentes concentrações de deriva simulada de glifosato (equivalente a 57,6; 115,2; 230,4; 460,8 g i.a. ha⁻¹). Sete dias após a aplicação dos tratamentos, foram feitas avaliações foliares quanto ao teor de pigmentos, fluorescência da clorofila, índice SPAD, conteúdo de malondialdeído, proteínas, compostos fenólicos totais, aminoácidos, polifenóis e metilxantinas nas folhas. Também foram avaliados os efeitos diferenciais do glifosato na produção de frutos e de compostos secundários de interesse econômico desta cultura. O glifosato causa efeitos leves na fisiologia de plantas adultas, mas são reversíveis e não causam alterações na produção e no conteúdo de metabólitos importantes podendo ser considerado como uma alternativa para o controle de plantas daninhas sem causar prejuízos a esta espécie. Adicionalmente, ao longo de dois meses da produção escalonada de frutos foi determinada a quantidade de frutos maduros colhidos por planta e cinco momentos de colheita foram quantificados os metabólitos de interesse comercial como cafeína, teobromina, teofilina, catequina e epicatequina com o intuito de se obter melhor aproveitamento desses compostos durante a safra e observou-se que elas podem aumentar ou diminuir ao longo do período da colheita. A quantidade de frutos colhidos tende a aumentar no fim da safra, tornando-se mais homogênea e menos frequente e os metabólitos secundários não acompanham a produção de frutos.

Palavras-chave: Herbicida. Planta daninha. Fisiologia. *Paullinia cupana*.

ABSTRACT

The Guarana plant (*Paullinia cupana* Kunth) is a plant with high caffeine content and antioxidant compounds such as catechin and epicatechin. Due to the economic importance of guarana to the State of Amazonas studies has sought to increase productivity. Weed control is one of the most laborious and most productive management practices, with the adoption of herbicides as a viable alternative, however the herbicide application drift can cause damage to the crop of interest. The objective of this work was to evaluate the physiological and fruit production responses of guarana adult plants after being exposed to different concentrations of simulated glyphosate drift (equivalent to 57.6, 115.2, 230.4, 460.8 g a.e. ha⁻¹). Seven days after application of the treatments, foliar evaluations were performed on pigment content, chlorophyll fluorescence, SPAD index, malondialdehyde content, proteins, total phenolic compounds, amino acids, polyphenols and methylxanthines in the leaves. We also evaluated the differential effects of glyphosate on fruit production and secondary compounds of economic interest in this crop. Glyphosate causes slight effects on the physiology of adult plants, but they are reversible and do not cause changes in the production and content of important metabolites. It can be considered as an alternative for the control of weeds without causing damage to this species. In addition, the amount of mature fruits harvested per plant and five harvest times were determined over two months of the stepwise production of the commercially important metabolites (caffeine, theobromine, theophylline, catechin and epicatechin) to obtain better utilization of these compounds during the harvest and it has been observed that they may increase or decrease throughout the harvest period. The amount of fruits harvested tends to increase at the end of the harvest, becoming more homogeneous and less frequent and the secondary metabolites do not accompany the production of fruits.

Keywords: Herbicide. Weed. Physiology. *Paullinia cupana*.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Importância econômica e social do guaranazeiro.....	14
2.2 Uso de herbicidas em guaranazais.....	16
2.3 O glifosato e seus efeitos nas plantas	17
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 REFERÊNCIAS.....	22
5 CAPÍTULO I: METABOLISMO DE PLANTAS DE GUARANAZEIRO E PRODUÇÃO DE FRUTOS SUBMETIDAS À DOSES DE GLIFOSATO	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	31
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO	47
CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS.....	55
6 CAPÍTULO II: DINÂMICA DOS METABÓLITOS DE INTERESSE ECONÔMICO E PRODUÇÃO DOS FRUTOS DE GUARANÁ DA CULTIVAR BRS MAUÉS DURANTE A SAFRA	60
RESUMO	60
ABSTRACT	61
INTRODUÇÃO.....	62
MATERIAL E MÉTODOS.....	64
RESULTADOS.....	66
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS.....	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
8 ANEXO.....	75

1 INTRODUÇÃO

O guaranazeiro (*Paullinia cupana* Kunth) (Sapindaceae) é uma espécie nativa da região Amazônica do Brasil, muito utilizada pelos índios Sateré-Mawé, documentada desde o século XVII por suas propriedades estimulantes (HENMAN, 1982; MARAVALHAS, 1965). Sabe-se hoje que os efeitos pelo uso do guaraná ocorrem principalmente pela presença de alcaloides de purina (teofilina, teobromina e cafeína), sendo encontrada em maior quantidade a cafeína (2,5 a 6%) (SCHIMPL *et al.*, 2014).

Além disto, Machado *et al.* (2018) encontraram em sementes desta espécie, catequina e epicatequina, que comprovadamente são biodisponíveis para o consumo humano, atuando como poderoso antioxidante, desintoxicante, inclusive possuindo propriedade antienvhecimento. Hoje, além da medicina tradicional, os grãos desta espécie são utilizadas pela indústria alimentícia, principalmente na produção de refrigerantes (BASILE *et al.*, 2005), tendo tendência a se expandir devido aos novos benefícios associados ao seu consumo (BONADIMAN *et al.*, 2017; CAMPOS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2017; YONEKURA *et al.*, 2016).

Sabe-se que a colheita do guaraná não ocorre de forma homogênea, pois as flores masculinas e femininas podem estar presentes na mesma inflorescência, mas o florescimento de ambas as flores não ocorre de forma sincronizada (GONDIM, 1984), a espécie possui morfologia e mecanismos que favorecem a fertilização cruzada (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Desse modo, a colheita do guaraná pode prolongar-se por meses e não há na literatura dados que indiquem que os metabólitos de interesse econômico pelo consumo do guaraná são estáveis durante todo esse período, nem como se dá a produção de frutos, o que facilitaria a colheita na época de safra.

O Brasil é o único produtor de guaraná do mundo (IBGE, 2017) e para que a planta tenha elevada produção e seja resistente às doenças, foram realizados anos de pesquisas de melhoramento genético pela Embrapa Amazônia Ocidental (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Entretanto, para que o plantio do guaraná seja produtivo é necessário que sejam adotadas práticas de manejo contra pragas e doenças.

O controle de plantas daninhas é uma prática importante nas culturas agrícolas, evitando a competição de plantas indesejáveis com a cultura principal.

Essas plantas causam interferência negativa sobre a cultura do guaranazeiro, sendo o controle químico uma alternativa viável para os produtores (COUTINHO *et al.*, 1999).

Em uma consulta aberta à plataforma disponibilizada pelo AGROFIT (2018) é possível obter informações do registro de agrotóxicos para diversas culturas, e não há nenhum herbicida recomendado para o guaranazeiro. Porém, em casos de elevada infestação de plantas daninhas ou na presença de espécies agressivas, como o capim taripucu, a Embrapa Amazônia Ocidental recomenda o controle com herbicidas dessecantes, à base de glifosato (N-fosfometil glicina), aplicando-os dentro das normas de segurança, de modo que o produto não atinja o guaranazeiro (TAVARES *et al.*, 2005).

O glifosato é um herbicida derivado da glicina, não seletivo e sistêmico, sendo amplamente utilizado em culturas para controlar plantas daninhas desde a década de 70. Seu uso aumentou cerca de 15 vezes desde o lançamento das culturas “Roundup Ready” na década de 80 (BENBROOK, 2016), é bastante utilizado principalmente antes do plantio de culturas agrícolas tradicionais e durante o cultivo de culturas geneticamente modificadas (POWLES, 2010). Por ser um herbicida não seletivo, sua utilização não se restringe somente a culturas geneticamente modificadas, sendo utilizado para limpeza de áreas e entrelinhas de outras culturas.

Nos campos agrícolas, o glifosato é pulverizado na folhagem das plantas daninhas, porém, uma parte deste pode ser depositada em plantas não-alvo do produto ocasionando a deriva (MONQUERO *et al.*, 2016). Em um ambiente agrícola, as plantas não-alvo são as culturas principais e diversos estudos buscaram avaliar esses efeitos nessas plantas (BROWN *et al.*, 2009; CHANG *et al.*, 2016; MADSEN *et al.*, 1995; RABELLO *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016; ZOBIOLE *et al.*, 2010). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos do glifosato em plantas de guaraná expostas à deriva simulada de glifosato e descrever a dinâmica de produção de frutos e metabólitos de interesse econômico durante a colheita desta cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica e social do guaranazeiro

O guaranazeiro, também conhecido como guaraná-da-Amazônia, guaranaina, guaranauva, uarana ou narana é uma espécie nativa da região Amazônica do Brasil. O primeiro relato do uso do guaraná ocorreu em 1669, quando em expedição jesuíta pela Amazônia, o missionário João Felipe Bettendorf registrou que os índios Sateré-Mawé consumiam frequentemente essa bebida, atribuindo-lhe efeito estimulante, diurético, contra dores de cabeça, febre e câibras (HENMAN, 1982; MARAVALHAS, 1965).

Além disso, o jesuíta não fez nenhuma menção de que outra etnia utilizasse esta planta (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Além da medicina tradicional, as sementes desta espécie são utilizadas pela indústria alimentícia na produção de refrigerantes (BASILE *et al.*, 2005).

A expansão da produção de guaraná começou em 1921, com a criação do refrigerante 'Guaraná Antártica'. A rápida difusão do consumo da bebida em escala nacional fez com que a empresa se instalasse na cidade de Maués-AM nos anos quarenta. Em 1971 foi instalada uma grande fazenda, dando início ao processo de melhoramento da produção de guaraná. O objetivo da Antártica era distribuir variedades melhoradas aos produtores da região e posteriormente comprar grandes quantidades de frutos com preços mais baixos (PINTON, 2010).

As indústrias de refrigerantes cumprem as normas regidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamentou pelo Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas no país. Na legislação vigente é exigida uma quantidade mínima de semente de guaraná (gênero *Paullinia*) ou seu equivalente, em extrato em quatro tipos de preparado, sendo proibida a adição de cafeína sintética ou da obtida de outro vegetal. A bebida não alcoólica, o refresco, e o refrigerante devem conter no mínimo 0,02 g 100 mL⁻¹ de

bebida, enquanto para o preparado ser considerado xarope, deve haver 0,2 g 100 mL⁻¹, bebida (BRASIL, 2009).

O Brasil é o único produtor de guaraná do mundo, com uma área plantada de 15.182 ha. Em 2017 o Estado do Amazonas produziu 744 t de sementes de guaraná (27% do total nacional) ficando atrás apenas da Bahia com 2.600 t (71%) (IBGE, 2017).

A produtividade dos guaranazais do Amazonas é a mais baixa do país, no ano passado foi 170 a 455 Kg ha⁻¹ enquanto os guaranazeiros da Bahia produziram até 700 Kg ha⁻¹ (CONAB, 2018). A baixa produtividade dos guaranazeiros no Amazonas pode estar diretamente ligada com a idade dos plantios e a falta de adoção de práticas de manejo pelos produtores rurais (CARDOSO, 2010).

Em 2018 o valor pago pelo guaraná no Amazonas foi de R\$ 20,00/Kg e na Bahia foi R\$ 12,00/Kg (CONAB, 2018). A discrepância no valor do guaraná comercializado é devido aos produtores do Estado do Amazonas negociarem diretamente com as indústrias que beneficiam o guaraná localizadas exclusivamente no Estado, já o guaraná produzido na Bahia, tem seu custo aumentado pelo transporte até as indústrias no Amazonas (SAGRI, 2010).

No Estado do Amazonas os pequenos e grandes produtores plantam guaraná e grandes grupos corporativos possuem plantações variando de 80 a 500 ha (ATROCH, 2001; 2002). Maués tem cerca de 1.600 agricultores familiares de guaraná, com uma área média de três hectares e são responsáveis por 35% da área plantada e 35% da produção do estado (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018).

Aproximadamente 70% do total de guaraná produzido é utilizado pelas indústrias de bebidas, dos quais, 45% são para a produção de refrigerantes e 25% para a produção de extrato e outras preparações. Cerca de 20% da produção é absorvido pela indústria farmacêutica e de cosméticos, e os outros 10% é comercializado em farmácias e lojas de produtos naturais nas formas de pó, cápsulas, comprimidos, ou associados a outros ingredientes (ATROCH, 2002; KURI, 2008).

A utilização do guaraná em pó se deve principalmente à presença de alcaloides de purina (teofilina, teobromina e cafeína). No caso desta espécie, o grande conteúdo de cafeína nas sementes de guaraná (2,5 a 6%) é o principal composto responsável por sua atividade estimulante (SCHIMPL *et al.*, 2013).

Com a atividade estimulante já comprovada, recentemente foi descoberto novos benefícios do uso do guaraná. Yonekura *et al.* (2016) verificaram que as catequinas do guaraná são biodisponíveis e contribuem para reduzir o estresse oxidativo de indivíduos saudáveis por ação antioxidante e desintoxicante.

Esses estudos demonstram que os extratos de guaraná podem funcionar como um poderoso antioxidante *in vivo*, além de possuir propriedades antienvhecimento. Essas pesquisas sugerem que as atividades biológicas do guaraná vão além da extensiva estimulação do sistema nervoso central (PEREIRA *et al.*, 2017).

Em um estudo com a população idosa de Maués, foi encontrada relação do consumo regular de guaraná para proteção contra doenças oculares (BONADIMAN *et al.*, 2017). Recentemente também foi observado potencial anti-adipogênico em sementes de guaraná (LIMA *et al.*, 2017). Com a comprovação de novos benefícios associados ao consumo de guaraná em pó, a demanda por este produto pode aumentar gerando novas perspectivas de mercado para esta cultura ocasionando o aumento na utilização de sementes na indústria farmacêutica.

Dada a importância da cultura no Estado do Amazonas, o programa de melhoramento da Embrapa Amazônia Ocidental tem atuado como fonte de pesquisa para lançamento de cultivares de guaraná. Trabalhando desde 1976 com estudos relacionados a essa cultura, entre 1999 e 2015 lançou 19 cultivares clonais (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Para que haja fortalecimento e fixação da cultura, é necessário o aumento da produtividade através de práticas culturais de fácil acesso ao produtor, assim como estudos relacionados ao uso de produtos químicos em guaranazais.

2.2 Uso de herbicidas em guaranazais

No Estado do Amazonas a infestação de plantas daninhas é uma limitação do cultivo do guaraná devido à forte interferência negativa dessas plantas sobre a cultura. O controle químico é uma alternativa viável para os produtores, pois os métodos de controle realizados por capina manual ou mecânica podem elevar os custos de produção em até 35% (COUTINHO *et al.*, 1999).

Isso ocorre em razão da alta diversidade de espécies de plantas daninhas e do elevado número de espécies da família Poaceae (ALBERTINO *et al.*, 2004). Nesta família, há o maior número de espécies de plantas daninhas, que vegetam em quase todas as culturas, são bastante agressivas e possuem diversos mecanismos de sobrevivência e adaptação (MONQUERO, 2014). Além da competição por recursos, as plantas daninhas também afetam indiretamente o cultivo do guaraná hospedando microrganismos patogênicos para a cultura (MILÉO *et al.*, 2006).

Alguns estudos foram feitos com a utilização de herbicidas em plantas de guaraná. Soares e Figueiredo (2017) constataram a perda de 50% de produtividade nos casos que as plantas daninhas não são controladas no período crítico, que é de junho a agosto.

Em plantios de guaraná a infestação de plantas daninhas exercem forte concorrência com a cultura principal. Silva *et al.* (2005), testaram diversos herbicidas para controlar essas plantas, no entanto, nenhum estudo foi realizado com esta cultura para analisar os efeitos em plantas adultas após exposição à deriva. Fontes *et al.* (2010) analisaram o enraizamento de estacas de guaranazeiro com o uso de glifosato e detectaram apenas que a deriva simulada do glifosato provoca sintomas de fitointoxicação mais acentuados com a dose de 345,8 g de i.a. ha⁻¹ caracterizada por leve clorose e enrolamento das margens das folhas.

2.3 O glifosato e seus efeitos nas plantas

O glifosato é um herbicida derivado da glicina, não seletivo e sistêmico. A absorção acontece via foliar por meio da cutícula e a translocação na planta acontece pelo simplasto, podendo ocorrer tanto para as folhas e meristemas aéreos, quanto para os subterrâneos (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011).

Mesmo que depositado no solo, o glifosato pode ser continuamente absorvido pelas raízes, metabolizado e transportado (TONG *et al.*, 2017). Por ser muito móvel no floema, pode se acumular nos órgãos-dreno, tais como frutos e sementes (CASELEY; COUPLAND, 1985).

Após o uso do glifosato, o primeiro produto da sua degradação é o ácido aminometilfosfônico (AMPA) (SINGH; SINGH, 2016). E tanto o glifosato, quanto o AMPA, causam alterações no metabolismo vegetal (GOMES *et al.*, 2016). Corrêa *et*

al. (2016) verificaram que o AMPA é mais acumulado em plantas que o próprio glifosato.

O glifosato é amplamente utilizado em culturas para controlar plantas daninhas desde 1970, sendo expandido com o lançamento das culturas geneticamente modificadas “Roundup Ready” (BENBROOK, 2016). Continua sendo bastante utilizado antes do plantio de culturas agrícolas tradicionais e durante o plantio das geneticamente modificadas resistentes ao glifosato, como exemplo algodão (*Gossypium hirsutum* L.), milho (*Zea mays* L.), canola (*Brassica napus* L. e *B. rapa* L.), e soja (*Glycine max* L.) (POWLES, 2010). Por ser um herbicida não seletivo, sua utilização não se restringe somente a culturas geneticamente modificadas, sendo utilizado para limpeza de áreas e entrelinhas de outras culturas.

Nos campos agrícolas, o glifosato é pulverizado na folhagem das plantas, porém, uma parte da substância química pode ser depositada diretamente na superfície do solo ou levada pelo vento para os solos e plantas vizinhas, provocando a exposição de plantas não-alvo (MONQUERO *et al.*, 2016). Levando em consideração que as espécies não-alvo em cultivos agrícolas são as culturas principais, são necessárias pesquisas para determinar possíveis danos relacionados à deriva.

Em plantas de pequeno porte, Brown *et al.* (2009) notaram aumento de lesão por fitotoxicidade e diminuição na produção de soja (*G. max* Merr.). Corroborando com esses autores, Silva *et al.* (2016) também observaram alterações morfo-anatômicas em folhas de pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), após a exposição de deriva simulada de glifosato. Esses danos consistiam em células plasmolizadas, ruptura epidérmica, células distorcidas, hiperplasia, colapso celular, tecido necrótico e acúmulo de compostos fenólicos. No estudo de Rabello *et al.* (2015) a deriva de glifosato reduziu a massa seca dos ramos, brotações, e teores de diversos nutrientes em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Pérola.

Em um trabalho realizado com as espécies arbóreas *Croton floribundus*, *Heliocarpus americanus* e *Myrsine coriacea* submetidas a doses de deriva simulada de alguns herbicidas, mostrou que a ação desses produtos deve ser direcionada e protegida, pois seus efeitos mesmo em doses mais baixas são deletérios sob essas plantas (MONQUERO *et al.*, 2016).

Os estudos a respeito dos danos desse herbicida, não consistem apenas a alterações visuais ou morfológicas. Diversos autores têm buscado outras formas de analisar os efeitos da exposição involuntária de culturas agrícolas a este herbicida.

No metabolismo primário de plantas, a aplicação de glifosato diminui a clorofila, taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática de plantas como a soja e beterraba (*Beta vulgaris* L.) (MADSEN *et al.*, 1995; ZOBIOLE *et al.*, 2010). Chang *et al.* (2016) também verificaram que o glifosato causou danos ao aparato fotossintético, redução na concentração de carboidratos e nos pigmentos de cloroplastídeos, com danos ocasionais às membranas celulares. Esses efeitos foram maiores conforme o aumento das doses.

Após a exposição ao herbicida, também foram observadas respostas do metabolismo antioxidante de plantas. Zhong *et al.* (2018) concluíram que o glifosato induz o estresse oxidativo em plantas utilizando diversos marcadores como o malondialdeído (MDA), o conteúdo de pigmentos e a atividade da enzima catalase (CAT) aumentaram mesmo com baixas concentrações de glifosato. Além do glifosato, o seu metabólito AMPA, é capaz de induzir a acumulação de EROs (espécies reativas de oxigênio), levando ao dano celular.

Gomes *et al.* (2016), estudando os efeitos do glifosato e do AMPA na fisiologia foliar do salgueiro (*Salix miyabeana* cultivar SX64) chegaram à conclusão que o AMPA induziu a degradação da clorofila através de danos oxidativos, observados através da avaliação de teor de pigmentos, fluorescência da clorofila, e utilizando o teor de peróxido de hidrogênio e atividades enzimáticas antioxidantes como marcadores para esse tipo de estresse. Essas alterações foram desencadeadas por ambos os produtos através de diferentes mecanismos.

O efeito do glifosato nas plantas também pode alterar o metabolismo secundário. Os metabólitos secundários vegetais podem se originar de quatro rotas biossintéticas associadas ao metabolismo primário, são elas: Rota do metileritritol (MEP), rota do ácido mevalônico, rota do ácido malônico, e a rota do ácido chiquímico (TAIZ *et al.* 2017), sendo esta última, a via interrompida pelo glifosato.

A rota interrompida pelo glifosato é a rota do ácido chiquímico, que é responsável por biossintetizar três aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) que dão origem aos produtos secundários nitrogenados e participam da produção de compostos fenólicos. O glifosato atua na inibição do seu sítio alvo, a

enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) causando o acúmulo do ácido chiquímico, pois ele não converte o corismato (DEVINE *et al.*, 1992).

Atualmente a inibição da EPSPS e o acúmulo do ácido chiquímico são usados como indicador molecular de dano pelo glifosato (HERRMANN; WEAVER, 1999; REDDY *et al.*, 2010; SINGH; SHANER, 1998; ZABALZA *et al.*, 2017). No entanto o acúmulo desse metabólito é uma variável dependente da quantidade utilizada do herbicida, e do tempo de amostragem (SCHRÜBBERS *et al.*, 2014).

A inibição da rota do ácido chiquímico diminui a síntese dos flavonoides e compostos fenólicos totais (MOBIN *et al.*, 2015). Em ervilha (*Pisum sativum* L. cv. Snap Sugar Boys), Zabalza *et al.* (2017) notaram que diferentes metabólitos foram acumulados através das vias de chiquimato e fenilpropanóides após o uso de glifosato, enquanto que a qualidade de frutos de uva e de vinho foram afetadas pela alteração nas antocianinas, e o pH em plantas tratadas com o herbicida (DONNINI *et al.*, 2016). Além de alterações metabólicas, o glifosato e o AMPA podem ser acumulados em tecidos dreno da planta, como frutos e sementes, levando a uma diminuição na qualidade nutricional desses órgãos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito fisiológico e bioquímico de doses do herbicida glifosato em condição de deriva simulada em plantas adultas de guaraná e a dinâmica de produção de frutos e metabólitos de interesse econômico desta cultura.

3.2 Objetivos específicos

Investigar os efeitos fisiológicos de doses de glifosato em plantas de guaraná;

Avaliar o efeito das doses de deriva simulada de glifosato na produção de frutos de guaraná;

Identificar alterações nos compostos secundários em sementes de guaraná sob efeito de glifosato;

Analisar o comportamento da produção de frutos e metabólitos de interesse econômico ao longo do período da colheita.

4 REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Acesso em 2018: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2018.

ALBERTINO, Sônia Maria Figueiredo *et al.* Composição florística das plantas daninhas na cultura de guaraná (*Paullinia cupana*), no Estado do Amazonas Floristic composition of weeds in guarana (*Paullinia cupana*) crop in Amazonas, Brazil. **Planta Daninha**, v. 22, n. 3, p. 351-358, 2004.

ATROCH, André Luiz. Situação da cultura do guaraná no Estado do Amazonas. **Reunião técnica da cultura do guaraná no estado do Amazonas**, v. 1, 2001.

_____. Aspectos gerais da cultura do guaraná. **Foods and Food Ingredients Journal of Japan**, p. 53-59, 2002.

ATROCH, André Luiz; NASCIMENTO FILHO, Firmino José do. Guaraná *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. *In:* (Org.). **Exotic Fruits**: Elsevier, 2018. p. 225-236.

BASILE, Adriana *et al.* Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.

BENBROOK, Charles M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

BONADIMAN, Beatriz da Silva Rosa *et al.* Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 375-386, 2017.

BRASIL. **Decreto n. Nº 6.871, de 4 de julho de 2009.. Regulamenta a lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil 2009.

BROWN, Lynette R *et al.* Soybean response to simulated dicamba/diflufenzopyr drift followed by postemergence herbicides. **Crop protection**, v. 28, n. 6, p. 539-542, 2009.

CAMPOS, Maira Paschoin Oliveira *et al.* Guaraná (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 6, p. 505-512, 2011.

CARDOSO, Fernanda Benaion. **Aspectos da produção da guaranicultura nos municípios de Apuí e Uruará no período de 1990 à 2007: a produtividade da terra**. Manaus-AM. 2010. (Dissertação de Mestrado)

CASELEY, JC; COUPLAND, D. Environmental and plant factors affecting glyphosate uptake, movement and activity. **Herbicide glyphosate/edited by E. Grossbard, D. Atkinson**, 1985.

CHANG, JiaDong et al. Photosynthetic characteristics, stress responses and plant growth of *Eupatorium adenophorum* in response to foliar application of different concentrations of glyphosate. **Philippine Agricultural Scientist**, v. 99, n. 3, p. 267-276, 2016.

CONAB. **Acompanhamento de safra brasileira: Guaraná**. Brasil: Companhia Nacional de Abastecimento 2018.

CORRÊA, Elza Alves et al. Glyphosate-resistant and conventional canola (*Brassica napus* L.) responses to glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) treatment. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 18, p. 3508-3513, 2016.

COUTINHO, Enilton Fick et al. **Controle de plantas daninhas na cultura do guaranazeiro**. Embrapa Amazônia Ocidental, 1999.

DEVINE, Malcolm; DUKE, Stephen O; FEDTKE, Carl. **Physiology of herbicide action**. PTR Prentice Hall, 1992.

DONNINI, Sílvia et al. Glyphosate impacts on polyphenolic composition in grapevine (*Vitis vinifera* L.) berries and wine. **Food chemistry**, v. 213, p. 26-30, 2016.

FONTES, JRA; NASCIMENTO FILHO, FJ; MORAIS, RR de. Influência do glyphosate no enraizamento de estacas de guaranazeiro. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2010. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto. Responsabilidade social e ambiental no manejo de plantas daninhas. Ribeirão Preto: SBCPD, 2010. p. 3060-3064.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 130, p. 65-70, 2016.

GONDIM, Carlos José Esteves. Alguns aspectos da biologia reprodutiva do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke-Sapindaceae. **Acta Amazonica**, v. 14, n. 1-2, p. 9-38, 1984.

HENMAN, Anthony Richard. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.

HERRMANN, Klaus M; WEAVER, Lisa M. The shikimate pathway. **Annual review of plant biology**, v. 50, n. 1, p. 473-503, 1999.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Levantamento sistemático da produção agrícola – LSPA**. Acesso em 2018. Brasil: 82 p. 2017.

KURI, Carlos Miguel Barber. The guaraná industry in Brazil. **International Business and Economics Research Journal**, v. 7, n. 5, p. 87, 2008.

LIMA, Natália da Silva *et al.* Modulatory effects of guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 635, 2017.

MACHADO, Kamilla Nunes *et al.* A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food chemistry**, v. 239, p. 180-188, 2018.

MADSEN, KH *et al.* Photosynthetic parameters in glyphosate-treated sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Weed Research**, v. 35, n. 2, p. 81-88, 1995.

MARAVALHAS, N. **Teofilina e teobromina, metilpurinas constantes nas plantas produtoras de cafeína.** MARAVALHAS, N. Estudos sobre o guarana e outras plantas produtoras de cafeína. Manaus: INPA, 1965. p. 17-25 (INPA. Quimica, 10), 1965.

MILÉO, LJ *et al.* Plantas de cobertura de solo como hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* cover crops as intermediate hosts to *Colletotrichum guaranicola*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 677-683, 2006.

MOBIN, Mohammad *et al.* Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 1, p. 291-301, January 01 2015.

MONQUERO, Patrícia Andrea. Aspectos da biologia e manejo das plantas daninhas. São Carlos: RIMA, p. 400, 2014.

MONQUERO, Patrícia Andrea *et al.* Initial growth of tree species under herbicide drift. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 2, p. 162-172, 2016.

PEREIRA, José Odair *et al.* Overview on biodiversity, chemistry, and biotechnological potential of microorganisms from the brazilian Amazon. In: (Org.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**: Springer, 2017. p.71-103.

PINTON, Florence. La valorisation du guaraná en Amazonie Brésilienne: culture de rente et/ou culture des filières. ISDA 2010, 2010. Cirad-Inra-SupAgro. p.8 p.

POWLES, Stephen Duke Stephen B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. 2010.

RABELLO, Wanderson Souza *et al.* Dry matter yield and common bean nutrient content submitted to glyphosate drift in two soil classes. **Revista Ceres**, v. 62, n. 4, p. 384-391, 2015.

REDDY, Krishna N; BELLALOU, Nacer; ZABLOTOWICZ, Robert M. Glyphosate effect on shikimate, nitrate reductase activity, yield, and seed composition in corn. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 6, p. 3646-3650, 2010.

RODRIGUES, Benedito Noedi; ALMEIDA, Fernando Sousa de. **Guia de Herbicidas.** Londrina-PR, Brasil: 2011. 697

SAGRI. **Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária do Estado da Bahia. Guaraná** 2010.

SCHIMPL, Flávia Camila *et al.* Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. **Phytochemistry**, v. 105, p. 25-36, 2014/09/01/ 2014.

SCHIMPL, Flávia Camila *et al.* Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013/10/28/ 2013.

SCHRÜBBERS, Lars C *et al.* Glyphosate spray drift in *Coffea arabica*—Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 115, p. 15-22, 2014.

SILVA, José Ferreira *et al.* Controle de plantas daninhas com herbicidas em guaranazal no Município de Maués-AM. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2005. In: SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS COM O GUARANAZEIRO NA AMAZÔNIA, 1., 2005, Manaus. Anais... Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2005. p. 137-140.

SILVA, Lailla Queiroz *et al.* Morpho-anatomical changes of pequi leaves (*Caryocar brasiliense Cambess.*) exposed to simulated drift of glyphosate. **Revista Árvore**, v. 40, n. 4, p. 669-677, 2016.

SINGH, Baljinder; SINGH, Kashmir. Microbial degradation of herbicides. **Critical reviews in microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SINGH, Bijay K; SHANER, Dale L. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, v. 12, n. 3, p. 527-530, 1998.

SOARES, Daniel Oscar Pereira; FIGUEIREDO, Sônia Maria. **Período de interferência das plantas daninhas na cultura do Guaranazeiro**. Mestrado em Agronomia Tropical. Manaus, Brasil: 7-Mar-2017, p.49. 2017. (Dissertação de mestrado)

TAIZ, Lincoln *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAVARES, Adauto Maurício *et al.* Cultura do guaranazeiro no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental. Sistemas de Produção**, v. 4º, 2005.

TONG, Mengmeng *et al.* Uptake, translocation, metabolism, and distribution of glyphosate in nontarget tea plant (*Camellia sinensis* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 35, p. 7638-7646, 2017.

YONEKURA, Lina *et al.* Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & function**, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016.

ZABALZA, Ana *et al.* The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 141, p. 96-102, 2017.

ZHONG, Guidi *et al.* Responses of *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle and *Vallisneria natans* (Lour.) Hara to glyphosate exposure. **Chemosphere**, v. 193, p. 385-393, 2018.

ZOBIOLE, LHS *et al.* Effect of glyphosate on symbiotic N₂ fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. **Applied Soil Ecology**, v. 44, n. 2, p. 176-180, 2010.

5 CAPÍTULO I: METABOLISMO DE PLANTAS DE GUARANAZEIRO E PRODUÇÃO DE FRUTOS SUBMETIDAS À DOSES DE GLIFOSATO

RESUMO

O guaranazeiro, *Paullinia cupana* Kunth, é uma planta tipicamente amazônica de alto valor econômico devido aos compostos encontrados na sua semente, e para que atinja o máximo potencial produtivo é necessário que sejam adotadas práticas de manejo, como o controle de plantas daninhas. O controle químico tem sido uma alternativa viável para diversas culturas e o glifosato é bastante utilizado principalmente pela facilidade de ser encontrado no mercado. No entanto, é necessário que estudos sejam feitos, para avaliar possíveis injúrias deste produto ao guaranazeiro. Neste estudo, foram utilizadas doses equivalentes às de deriva simulada em única aplicação no guaranazeiro. Para analisar os efeitos diferenciais do glifosato na planta e se este afetaria a fisiologia e a produção de compostos de interesse econômico nas plantas de guaranazeiro, que foram tratadas com diferentes concentrações de glifosato equivalente a 57,6; 115,2; 230,4; 460,8 de ingrediente ativo ha⁻¹. As características avaliadas foram o teor de pigmentos, fluorescência da clorofila, índice SPAD, conteúdo de malonaldeído, proteínas, compostos fenólicos totais, polifenóis, metilxantinas e aminoácidos da via de atuação deste herbicida foram analisados em folhas após sete dias de aplicação. Além disso, também foram avaliadas a produção de frutos e a quantidade de metabólitos de interesse econômico desta cultura como cafeína, teobromina, teofilina, catequina e epicatequina. As doses aplicadas de glifosato em plantas adultas de guaraná causaram estresse oxidativo avaliado pelo aumento na peroxidação lipídica, no entanto não houve alteração significativa na fluorescência da clorofila e no teor de pigmentos foliares. Os efeitos mais significativos foram no incremento de aminoácidos aromáticos da via de atuação do glifosato como fenilalanina, tirosina e triptofano e redução de polifenóis e teobromina em folhas. Apesar disso, a produção de frutos e o conteúdo dos metabólitos de interesse comercial nos grãos, principalmente cafeína, teobromina, catequina e epicatequina não foram reduzidos em plantas pulverizadas com glifosato.

ABSTRACT

Guarana, *Paullinia cupana* Kunth, is a typically Amazonian plant of high economic value due to the compounds found in its seed, and to achieve maximum productive potential, it is necessary to adopt management practices, such as weed control. Chemical control has been a viable alternative for several crops and glyphosate has been widely used mainly for the ease of being found in the market, however, it is necessary that studies are done to evaluate possible damage to guarana plant. In this study, simulated drift doses were used in single application in guarana plant to analyze the differential effects of glyphosate on the plant and whether this would affect the physiology and production of compounds of economic interest in this crop. The guarana plants were treated with different concentrations of glyphosate (equivalent to 57.6, 115.2, 230.4, 460.8 g a.e. ha⁻¹), pigment content, chlorophyll fluorescence, SPAD content, of malonaldehyde, proteins, total phenolic compounds, polyphenols, methylxanthines and amino acids of the route of action of this herbicide were analyzed in leaves after seven days of application. In addition, evaluations of fruit production and the amount of metabolites of economic interest of this crop (caffeine, theobromine, theophylline, catechin and epicatechin) were also performed. The applied doses of glyphosate in adult guarana plants caused oxidative stress evaluated by the increase in lipid peroxidation, however, there was no significant alteration in chlorophyll fluorescence and foliar pigment content. The most significant effects were on the increase of aromatic amino acids of the glyphosate pathway (phenylalanine, tyrosine and tryptophan) and reduction of polyphenols and theobromine in leaves. In spite of this, the fruit production and the content of the commercial interest metabolites in the grains (caffeine, theobromine, catechin and epicatechin) were not affected in plants affected by glyphosate.

INTRODUÇÃO

O guaraná, *Paullinia cupana* Kunth (Sapindaceae), é uma espécie da região Amazônica cultivada há muito tempo pelos índios Sateré-Mawé é utilizada para diversos fins medicinais e energéticos. As pesquisas recentes comprovaram o conhecimento dos índios sobre o guaraná, que além de atuar como energético é um poderoso antioxidante *in vivo*.

Estudos tem mostrado as propriedades anti-envelhecimento, contra problemas oculares, anti-adipogênico auxiliando no tratamento de pacientes com câncer de mama ao aliviar os efeitos colaterais da quimioterapia (BONADIMAN *et al.*, 2017; CAMPOS *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2017; YONEKURA *et al.*, 2016) . O guaraná ganhou destaque na economia da região Amazônica devido a sua utilização por empresas de bebidas e com qualidades até então conhecidas pela medicina popular. Além da fixação de grandes empresas que absorvem a produção do guaraná, os avanços das pesquisas que investigam atividades farmacológicas podem ampliar o uso do mesmo pelo mercado, aumentando a demanda de produção desta cultura (BASILE *et al.*, 2005; BONADIMAN *et al.*, 2017; CAMPOS *et al.*, 2011; MAJHENIČ *et al.*, 2007; PALMA *et al.*, 2016).

Para que a planta de guaraná tenha elevada produção e seja resistente à doenças, foram realizados anos de pesquisas de melhoramento genético, e o resultado foi o lançamento de 19 cultivares de elite desde a década de 90 (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). No entanto, para o guaranazeiro ser produtivo é necessário que sejam adotadas práticas de manejo contra pragas e doenças.

Neste contexto, o controle de plantas daninhas é uma prática importante nas culturas agrícolas, evitando a competição de plantas indesejáveis com a cultura principal. Essas plantas causam interferência negativa sobre a cultura do guaranazeiro e o seu controle químico pode ser uma alternativa viável para os produtores (COUTINHO *et al.*, 1999).

Atualmente, não existe nenhum herbicida com uso autorizado pelo governo brasileiro para uso na cultura do guaranazeiro (AGROFIT, 2018). Nos casos de infestação severa de plantas daninhas ou na presença de espécies agressivas, como o capim taripucu, a Embrapa Amazônia Ocidental recomenda o controle com herbicidas dessecantes, à base de glifosato, aplicando-os dentro das normas de

segurança, de modo que produto não atinja o guaranazeiro (TAVARES *et al.*, 2005). Também, não existem estudos que avaliem o efeito de eventual deriva da aplicação de glifosato para o controle de plantas daninhas no cultivo de guaranazeiro.

O glifosato é utilizado em diversas culturas para controlar plantas daninhas desde a década de 70 (BENBROOK, 2016). Em 2016 o glifosato e seus sais ficaram em primeiro lugar no *ranking* dos dez ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, com 185.602,22 toneladas de ingrediente ativo vendidos (IBAMA, 2017).

Por ser um herbicida sistêmico, ao ser absorvido, ele pode ser transportado para outras partes da planta (TONG *et al.*, 2017). O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) da via do ácido chiquímico, e afeta a biossíntese de três aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano) e causa alterações metabólicas prejudiciais ao organismo vegetal, como interrupção da produção de proteínas, biossíntese de metabólitos secundários, além de uma ruptura geral da via de fenilpropanóides (FRANZ *et al.*, 1997). Como não é um herbicida seletivo é comumente utilizado no plantio direto e em limpeza de áreas e entrelinhas.

Se aplicado com condições climáticas inadequadas pode ocorrer deriva onde uma parte da substância química pode ser depositada diretamente na superfície do solo ou levada pelo vento para o solo e plantas vizinhas, submetendo plantas não-alvo à exposição ao produto (MONQUERO *et al.*, 2016). Diversos estudos buscaram analisar danos no metabolismo de plantas cultiváveis e na sua produção após serem submetidas à deriva (BROWN *et al.*, 2009; SCHRÜBBERS *et al.*, 2014; ZABALZA *et al.*, 2017).

Os efeitos de doses de deriva do herbicida em plantas não são completamente compreendidos, sendo variável entre espécies, estágio de desenvolvimento e fenológico da planta. Dessa forma, esse trabalho buscou investigar as alterações no metabolismo de plantas adultas de guaranazeiro expostas a diferentes doses de glifosato e possíveis efeitos no metabolismo, produção e na qualidade dos frutos de uma planta com grande valor econômico para região Amazônica e que está em ascensão no mercado.

Os resultados indicam que o glifosato causa pequenas perturbações na fotossíntese, sendo o metabolismo do carbono e síntese de aminoácidos mais sensíveis aos efeitos deste herbicida. O metabolismo secundário de plantas expostas

ao glifosato também é afetado, o que indica que o herbicida estimule a produção de sinalizadores já descritos na literatura como agentes de proteção de plantas.

Ademais, o herbicida não causa prejuízos à produção de frutos nem aos seus compostos de interesse econômico se aplicado em determinada época. Isso sugere que o herbicida pode ser uma alternativa no controle de plantas daninhas, sem que o mesmo cause prejuízos ao guaranazeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

O experimento foi realizado com plantas adultas de guaraná da cultivar BRS-Maués com seis anos de idade, em uma área experimental na região de Maués, latitude 3° 27' 0" S e longitude 57° 38' 60" W, Maués-AM, da Fazenda Santa Helena da Ambev. O solo predominante na área é Latossolo Amarelo Distrófico de textura muito argilosa e o clima na região é "Afi" (Clima Tropical Chuvoso) segundo Köppen (ALVARES *et al.*, 2013).

Todas as plantas foram submetidas a práticas culturais usualmente adotadas pela empresa. E o controle das plantas daninhas na região próxima aos guaranazeiros de experimento foi com capina manual.

Condução do experimento

A deriva simulada do herbicida glifosato no guaranazeiro foi realizada pela aplicação de quatro doses em dez plantas por tratamento correspondente às seguintes concentrações de equivalente ácido 57,6; 115,2; 230,4; 460,8 g ha⁻¹, o que é equivalente a 4,0; 8,0; 16,0 e 32%, respectivamente, da recomendação para cultura de porte e morfologia semelhante (FRANÇA *et al.*, 2010); e mais um tratamento, sem aplicação de herbicida, caracterizado como tratamento controle. A aplicação da solução de herbicida sobre as plantas foi após o período do florescimento (agosto) em estágio onde a maioria das flores haviam sido polinizadas, denominado *chumbinho*, em uma única vez no horário de 7 h da manhã com um pulverizador costal elétrico (YAMAHO FT-16), pressão de 4 Kg cm⁻², bico do tipo leque 110.02.

Além de uma proteção física no momento da aplicação, também foi utilizada uma fileira de plantas como bordadura. No momento da aplicação a temperatura estava em 29,9 °C, a umidade relativa do ar em 70% e a velocidade do vento em 2 Km h⁻¹.

Após sete dias da aplicação dos tratamentos foram avaliadas a fluorescência da clorofila *a* em três folíolos de cada planta experimental. Se coletou três folíolos dessas plantas sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e transportadas em gelo seco para o Laboratório de Ciência de Plantas Daninhas (LCPD) da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA-UFAM) onde foram maceradas em nitrogênio líquido e depois liofilizadas para as análises de aminoácidos, proteínas e açúcares.

Três folíolos frescas foram utilizadas para as análises de pigmentos cloroplastídicos. Também foram coletadas três folíolos que foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C até massa constante, para utilizar nas análises de compostos secundários após moagem.

Para as análises dos compostos secundários nos grãos, os frutos foram colhidos ao longo de todo o período de colheita, por cerca de dois meses. Foram homogeneizados de modo a compor uma única amostra por planta a ser analisada, para retirar qualquer interferência do período da colheita na composição química da semente. Uma parte dos frutos foi seca em estufa, moída, peneirada, armazenada e depois utilizadas para as análises de metilxantinas e polifenóis.

Índice SPAD

As determinações do índice de conteúdo de clorofila (ICC) foram realizadas nos mesmos folíolos utilizados para as análises de fluorescência, mensuradas em clorofilômetro portátil (modelo SPAD-502 Plus), entre 8 h e 10 h aleatoriamente, de modo que as avaliações fossem homogêneas entre os tratamentos.

Fluorescência da clorofila

Para as avaliações da fluorescência da clorofila foram utilizadas três folíolos , com bom aspecto fitossanitário de cada planta, e quatro plantas por tratamento. Os

folíolos foram submetidos a período de adaptação ao escuro, durante 30 minutos, com cliques apropriados, e posteriormente aferidos por meio de fluorômetro portátil (PEA, MK2 – 9600 – Hansatech, Norfolk, UK), com $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e comprimento de onda de 650 nm s^{-1} após sete dias da aplicação do herbicida, as leituras foram realizadas entre 8 h e 10 h, de forma aleatória entre os tratamentos, para que as avaliações fossem homogêneas para todos os tratamentos. A eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m) foi para determinar danos no fotossistema II pelo tratamento com glifosato.

Análises bioquímicas

Pigmentos foliares

Para determinação de pigmentos foliares foi utilizada a metodologia proposta por Hendry e Price (1993) cerca de 0,025 g de material vegetal fresco foi macerado em acetona 100% + 10 mL de uma solução de acetona (80% v:v) contendo MgCO_3 (0,5% m:v) para evitar a feofitinação. Posteriormente, o extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo nº 2 e o extrato filtrado foi usado para determinar a absorvância nos comprimentos $\lambda = 663, 645$ e 480 nm , com espectrofotômetro, e obteve-se as concentrações de clorofila *a* (chl *a*), clorofila *b* (chl *b*) e carotenoides, respectivamente.

Malonaldeído (MDA)

A peroxidação lipídica nas folhas foi pela reação do ácido tiobarbitúrico, que determina a concentração de malonaldeído (um dos subprodutos da peroxidação de lipídios), segundo Heath e Packer (1968). O material vegetal foi macerado e foi adicionado 3 mL de ácido tricloroacético a 0,1%, contendo 20% de polivinilpirrolidona.

Após a total homogeneização, o extrato foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 5 minutos. Foi adicionado 1,5 mL de ácido tricloroacético contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico, em 0,5 mL de sobrenadante.

A mistura foi mantida por 30 minutos em banho Maria a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ e seu resfriamento foi em gelo. Para separar os resíduos e clarear a amostra, foi novamente centrifugada a $10.000 \times g$ por 10 minutos. As absorvâncias foram medidas em 600 nm e subtraídas dos resultados da leitura das absorvâncias em 535 nm .

Carboidratos

Os teores de carboidratos foram obtidos de amostras liofilizadas pelo método enzimático após serem extraídos em etanol. Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados em fração solúvel em etanol e a fração de amido foi determinada na fração insolúvel (FERNIE *et al.*, 2001).

Proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada segundo ensaio de Bradford (1976), utilizando-se o reagente pronto da BioRad, com absorvância lida em 595 nm por espectrofotômetro e albumina sérica bovina (Sigma) para a construção da curva-padrão.

Aminoácidos por HPLC

A separação e quantificação de aminoácidos foram com base no método OPA (oftaldialdeído) (JARRETT *et al.*, 1986) conforme modificado por Puiatti e Sodek (1999). De acordo com este método, os aminoácidos foram primeiro transformados nos respectivos derivados OPA e separados em seguida por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Dessa forma, esse método permite quantificar os aminoácidos alanina, arginina, asparagina, aspartato, ácido gama-aminobutírico (gaba), glutamina, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, serina, treonina, tirosina e vanilina.

A concentração total de aminoácidos foi ajustada para a faixa de 0,2 a 1,0 mmol mL⁻¹ através de diluição com água. Uma alíquota de 20 µL foi misturada com 60 µL do reagente OPA (50 mg de OPA dissolvidos inicialmente em 1 mL de metanol, depois acrescidos de 6,5 mL de tampão borato-NaOH pH 9,5 e, no dia de uso, mais 10 mL/mL de 2-mercaptoetanol).

Após 2 minutos de reação com OPA, uma alíquota de 10 µL foi injetada na coluna do HPLC. A coluna (ODS-2 Superpac, tipo C18, 250 x 4,6 mm) foi eluída, com fluxo de 0,8 mL min⁻¹, por um gradiente formado com quantidades crescentes de

metanol 65% (solvente B) em relação ao tampão fosfato pH 7,2 (solvente A – Na₂HPO₄ 50 mM, acetato de sódio 50 mM, ácido acético 1,5 mL, tetrahidrofurano 20 mL e metanol 20 mL em 1 litro de água).

O gradiente foi programado para aumentar a proporção do solvente B em relação ao solvente A de 20 a 58% nos primeiros 35 minutos, seguido por um aumento de 58 a 75% durante o período de 35 a 40 minutos e, finalmente, de 75 a 100% de 40 a 60 minutos. A saída da coluna foi monitorada por um detector de fluorescência (Shimadzu modelo 10AXL) ajustado em 265 nm (luz de excitação) e 450 nm (luz de emissão). O sinal do monitor foi processado por um registrador/integrador (Cromatopac C-R6A, Shimadzu).

Compostos do metabolismo secundário

Para extração e quantificação de compostos do metabolismo secundário (cafeína, teobromina, teofilina, catequina e epicatequina), foi usada a metodologia proposta por Schimpl *et al.* (2014) e Machado *et al.* (2018), modificada. Cerca de 100 mg de material vegetal triturado e peneirado foi homogeneizado com 5 mL de metanol a 80% em tubos de vidro com tampa rosqueada e mantido em banho térmico a 50 °C durante 2 h, onde foi feita uma agitação a cada 15 minutos com agitador de tubos (vortex).

Após resfriamento em temperatura ambiente, retirou 1,2 mL da solução e transferiu para micro tubos de 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas a 14.000 x g durante 20 minutos e 0,3 mL do sobrenadante foi diluído em água ultrapura Milli-Q, na proporção de 1:1 (v:v) para folíolos e 4:1 (v:v) para frutos e depositados em vials para cromatografia.

Para a quantificação das metilxantinas, os extratos foram analisados em cromatógrafo HPLC com detector de diodo (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão) operando em 272 nm. A separação foi em coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm Allcrom®) sendo a fase móvel (A) água com ácido acético a 1% e (B) metanol, sob um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O gradiente utilizado foi de: 0 min 20% B, 13 min 45% B, 23 min 100% B e 30 min 20% B.

Para quantificação das metilxantinas e polifenóis foram construídas curvas com quantidades conhecidas de soluções com padrões comerciais de cafeína,

teobromina, teofilina, catequina e epicatequina (Sigma-Aldrich®). A partir da curva foi gerada uma equação linear para calcular as concentrações das metilxantinas e polifenóis nas amostras de guaraná em função da absorvância. O tempo de retenção das metilxantinas para a detecção em HPLC foi de 5 minutos para teobromina, 7 minutos para teofilina e 9 minutos para cafeína, para os polifenóis catequina e epicatequina, 7,1 minutos e 9,3 minutos utilizando o comprimento de onda em 270 nm para metilxantinas e 280 nm para os polifenóis, segundo (MACHADO *et al.*, 2018).

Compostos fenólicos totais foliares

Os compostos fenólicos totais foram determinados pela metodologia de Jennings (1981) utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. Foi medida a absorvância a 725 nm e utilizou ácido tânico nas curvas de calibração.

Análise de produtividade

A maturação dos frutos foi acompanhada em campo e colhidos somente os frutos maduros (para a cultivar Maués, frutos vermelhos e com pericarpo aberto, com a semente exposta), foram pesados e transformados em Kg planta⁻¹. Para avaliar a produtividade das plantas de guaraná foi realizada colheita na área útil até duas vezes por semana ao longo de todo o período de produção. Os frutos começaram a amadurecer 51 dias após a aplicação (DAA) do glifosato, se estendendo a 114 DAA.

Análise estatística

A análise estatística dos dados gerados foi no *software* ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO, 2016). Pelo teste de Shapiro-wilk foi testada a normalidade dos dados originais e quando necessário, foram transformados para a realização da ANOVA e o teste Tukey.

RESULTADOS

Nesse estudo foram avaliadas as respostas fisiológicas no índice SPAD, rendimento quântico máximo, pigmentos foliares, respostas na peroxidação lipídica, metabolismo primário e secundário após exposição única à deriva de glifosato. A colheita dos frutos dessas plantas durou cerca de 63 dias.

Índice SPAD

O índice SPAD foi utilizado para investigar possíveis danos à integridade da maquinaria do sistema fotossintético e do estado da clorofila, induzidos pelo glifosato. Em plantas do tratamento controle, o índice SPAD obteve média de 66,2. Em folíolos de plantas do tratamento com a maior dose de deriva (460,8 g i.a. ha⁻¹), este índice atingiu 49,13, mostrando que houve diminuição de 25% do índice SPAD na maior dose aplicada (Figura 1).

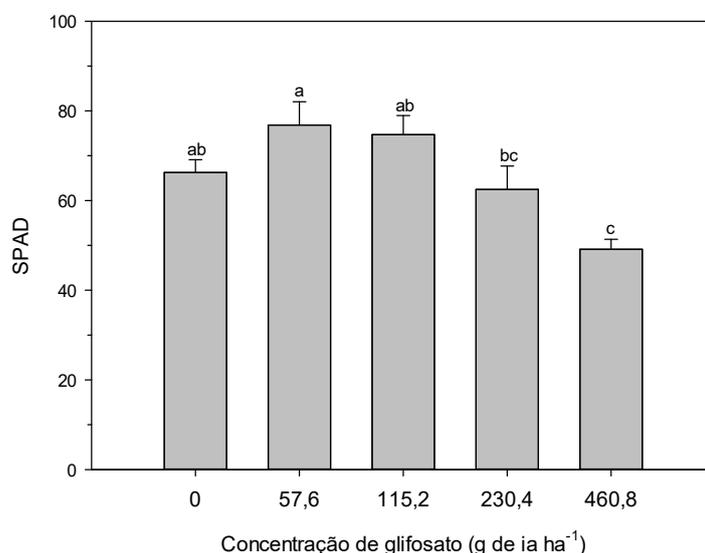


Figura 1 - Índice SPAD em folíolos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)
Fonte – Santos, 2019.

Apesar de não haver aferição deste índice para a cultura do guaranazeiro na literatura, entende-se que houve diferença entre o controle e os tratamentos que consistiam nas doses de 57,6 e 115,2 g i.a. ha⁻¹. Houve decréscimo nas duas maiores doses, mostrando que plantas que foram submetidas à deriva de glifosato em doses maiores tiveram o índice SPAD alterado sete dias após a aplicação do herbicida.

Análise do rendimento quântico e pigmentos foliares

O rendimento quântico máximo F_v/F_m , foi aferido sete dias após a exposição de plantas de guaraná a doses de deriva simulada de glifosato (Figura 2A). A fluorescência média do tratamento controle foi maior entre todos os tratamentos ($0,74 \pm 0,01$), no entanto, o tratamento com a maior dose aplicada ($460,80 \text{ g i.a. ha}^{-1}$) não diferiu do controle com valores médios de fluorescência de $0,71 \pm 0,03$, (Figura 2A). Nos demais tratamentos o rendimento ficou entre $0,63 \pm 0,04$ e $0,57 \pm 0,01$, demonstrando que a fluorescência foi pouco afetada pela aplicação de glifosato, mesmo em maiores doses (Figura 2).

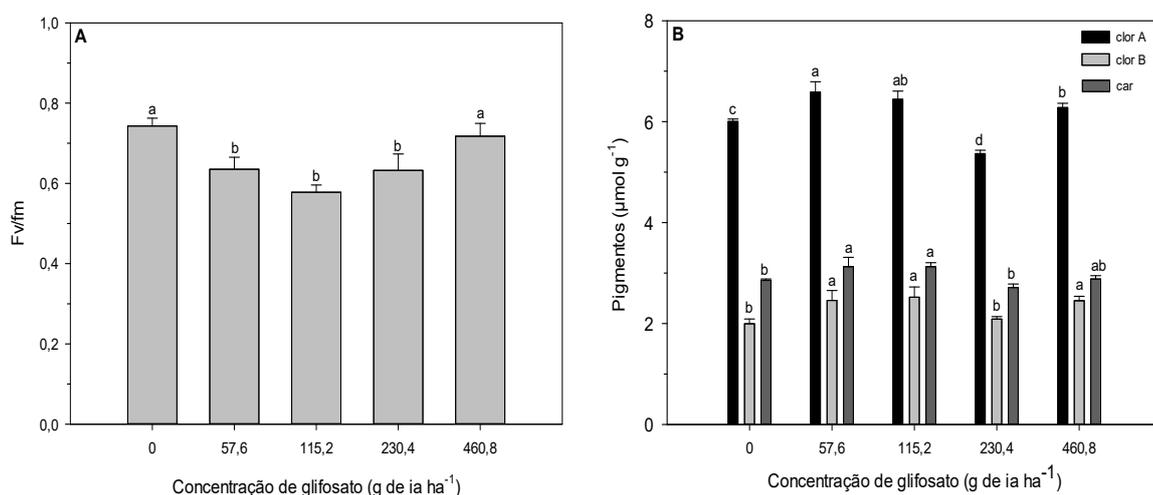


Figura 2 - Rendimento quântico máximo (F_v/F_m) (A) e teor de pigmentos foliares (B) em folíolos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)

Fonte – Santos, 2019.

Em relação aos pigmentos fotossintéticos, houveram diferenças significativas no teor de clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoide, e o tratamento controle apresentou quantidades menores desses pigmentos. Entre os outros tratamentos houveram diferenças, mas não ocorreram de forma proporcional com as doses aplicadas (Figura 2B).

Concentração de malondialdeído (MDA)

Plantas de guaraná foram submetidas ao tratamento de doses de deriva de glifosato e junto com as plantas controle, foram analisadas quanto à resposta antioxidante sete dias após a exposição ao herbicida. Para avaliar o dano oxidativo foi utilizada a reação do ácido tiobarbitúrico que determina a concentração de malondialdeído (MDA).

O dano oxidativo foi detectado nos tratamentos com aplicação de glifosato, em relação ao controle e foi encontrado aumento em todos os tratamentos de deriva simulada de glifosato (Figura 3).

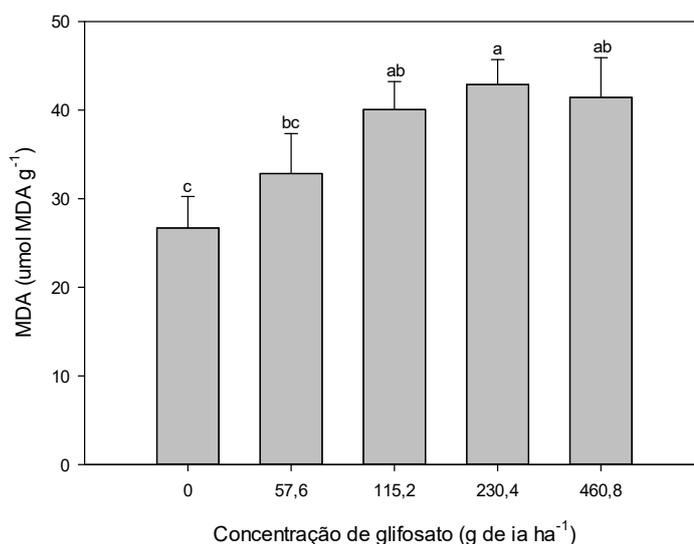


Figura 3 - Malondialdeído (MDA) em folíolos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)

Fonte – Santos, 2019.

Compostos do metabolismo primário

Carboidratos

Diferentes compostos do metabolismo primário de plantas foram analisados, entre eles alguns carboidratos em folíolos de plantas de guaraná coletadas sete dias após aplicação de glifosato. De modo geral, houve um aumento significativo em pelo menos dois desses carboidratos. Os teores de glicose variaram entre as doses e a maior foi encontrada no tratamento de 230,4 g i.a. ha⁻¹ sendo 282,4% maior do que o conteúdo em plantas não expostas ao herbicida (Figura 4A), apesar disso, essa tendência não se expressou na maior dose aplicada, que obteve 35,8% a menos de glicose do que o quantificado no tratamento controle.

Os teores de frutose não diferiram entre o controle, e as doses de 57,60 e 460,8 g i.a. ha⁻¹. Houve um aumento significativo no teor deste carboidrato na dose de 115,2 g i.a. ha⁻¹, sendo 92,9% maior do que o tratamento controle (Figura 4A).

As médias dos teores de sacarose não obtiveram diferença significativa entre o tratamento controle e as doses de 57,6, 115,2 e 230,4 g i.a. ha⁻¹, mas no tratamento que representava a maior dose houve pequeno incremento de 12,4% no teor deste carboidrato em relação às plantas que não receberam os tratamentos com o glifosato.

O conteúdo de amido aumentou significativamente de acordo com o aumento da dose do herbicida e na maior quantidade de ingrediente ativo aplicada foi quantificado 379,8% mais amido do que o encontrado em folhas do tratamento controle, sendo o carboidrato que mais se acumulou (Figura 4A).

Proteínas

Em relação ao teor de proteínas totais quantificados em folhas de plantas de guaraná após exposição a doses de deriva simulada de glifosato, houve uma pequena variação nos teores de 20,01 mg proteína g⁻¹ MS±1,90 na dose de 460,8 g ha⁻¹ a 23,33 mg proteína g⁻¹ MS±0,41 com a dose de 230,4 g ha⁻¹ (Figura 4B). Apesar disso, não houveram diferenças significativas entre os tratamentos com as doses e o controle.

Aminoácidos

Os teores de aminoácidos totais e mais especificamente os teores de três aminoácidos (tirosina, triptofano e fenilalanina) que são sintetizados pela via do ácido chiquímico que é a via interrompida pelo glifosato. Houve um aumento significativo de aminoácidos totais em plantas que foram submetidas as doses de glifosato em relação ao controle (Figura 4C). A maior quantidade de aminoácidos totais foi encontrada na dose de 460,8 g ha⁻¹ e representou um acréscimo de 63,7% em relação ao tratamento controle, no entanto, entre as doses não houve diferença significativa.

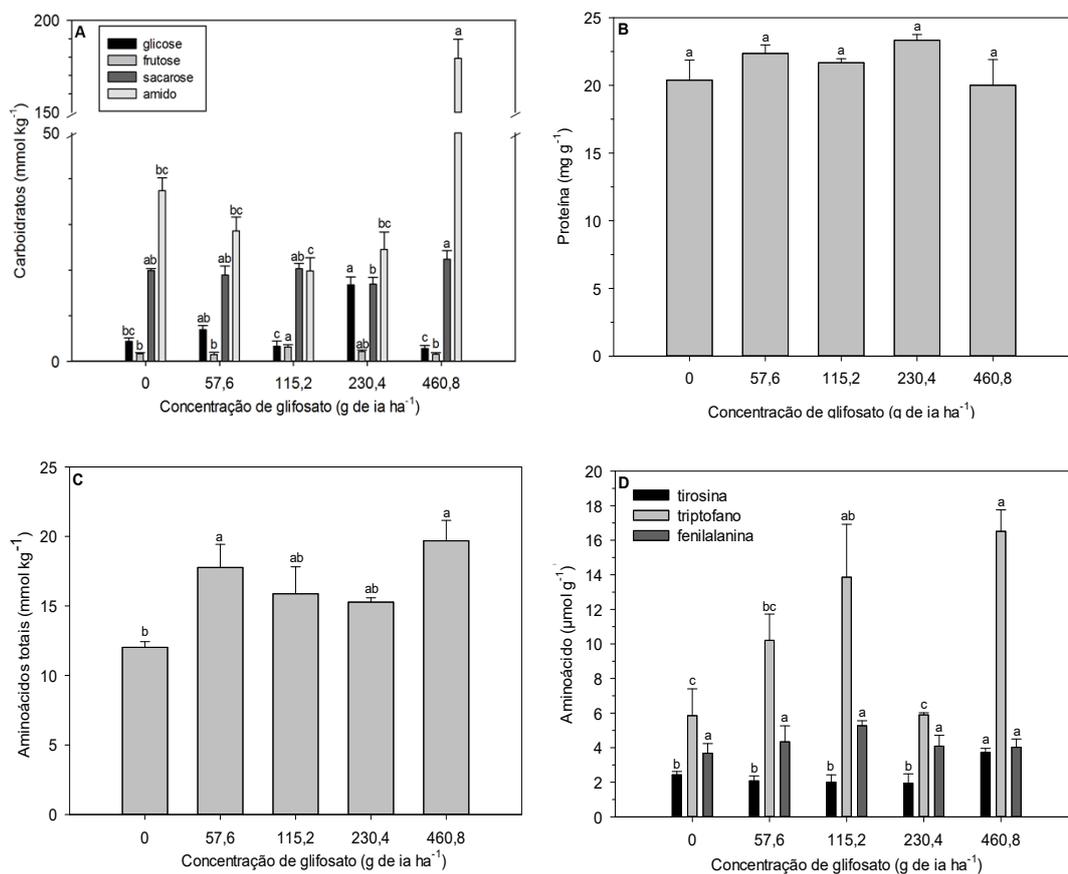


Figura 4 - Teores de aminoácidos totais (A), aminoácidos da via do ácido chiquímico (B), carboídratos (glicose, frutose, sacarose e amido) (C), e proteínas (D) em folíolos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)

Fonte - Santos, 2019.

Analisando os três aminoácidos biossintetizados pela via do ácido chiquímico, observa-se que não houve diferença significativa entre o tratamento controle e as doses de 57,6, 115,2, e 230,4 g ha⁻¹ de glifosato para tirosina (Figura 4D) no entanto, em relação ao tratamento controle, as plantas que foram submetidas à dose de 460,8 g ha⁻¹ apresentaram a média de acréscimo de 53,4% deste aminoácido. O aminoácido triptofano foi o que mais apresentou aumento em relação aos outros aminoácidos analisados e o tratamento que consistia na maior dose aplicada apresentou um acréscimo de 182,2%. A fenilalanina foi o aminoácido que não diferiu do controle e as plantas que foram submetidas à deriva de glifosato.

Compostos do metabolismo secundário

Compostos fenólicos totais, polifenóis e teobromina em folíolos.

Os compostos fenólicos totais e mais especificamente dois polifenóis (catequina e epicatequina) foram avaliados sete dias após a aplicação dos tratamentos. Não foram encontradas diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais de plantas do tratamento controle e de plantas que foram sujeitas à aplicação de glifosato (Figura 5A), no entanto, a média dos teores variou de 42,46 ug compostos fenólicos totais mg⁻¹ ±1,44 a 47,11 ug compostos fenólicos totais mg⁻¹ ±2,02, que representam respectivamente o tratamento controle e a menor dose aplicada (57,6 g i.a. ha⁻¹). Apesar disso, houveram mudanças quando dois polifenóis foram analisados separadamente.

Os polifenóis foram quantificados e as médias dos teores para catequina variou de 0,41%±0,07 para a dose de 460,8 g i.a. ha⁻¹ a 0,73%±0,06 para 57,6 g i.a. ha⁻¹ (Figura 5B). Este polifenol diminuiu em até 38,9% nos folíolos de plantas em que foi aplicada a maior dose do herbicida quando comparado ao tratamento controle.

Para epicatequina, os teores variaram 0,15%±0,04 para a 460,8 g i.a. ha⁻¹ a em de 0,15 a 0,40%±0,05 para o tratamento controle (Figura 5B). O que representa uma redução de 62% deste composto em folíolos de plantas que foram aplicadas com a maior dose de herbicida. Nota-se que a menores quantidades de ambos os polifenóis foram encontradas no tratamento que consistia a maior dose de ingrediente ativo aplicada, de modo que os teores de catequina e epicatequina diminuíram

consideravelmente sete dias após a exposição de plantas a maior dose de deriva simulada em folhos de plantas adultas de guaraná.

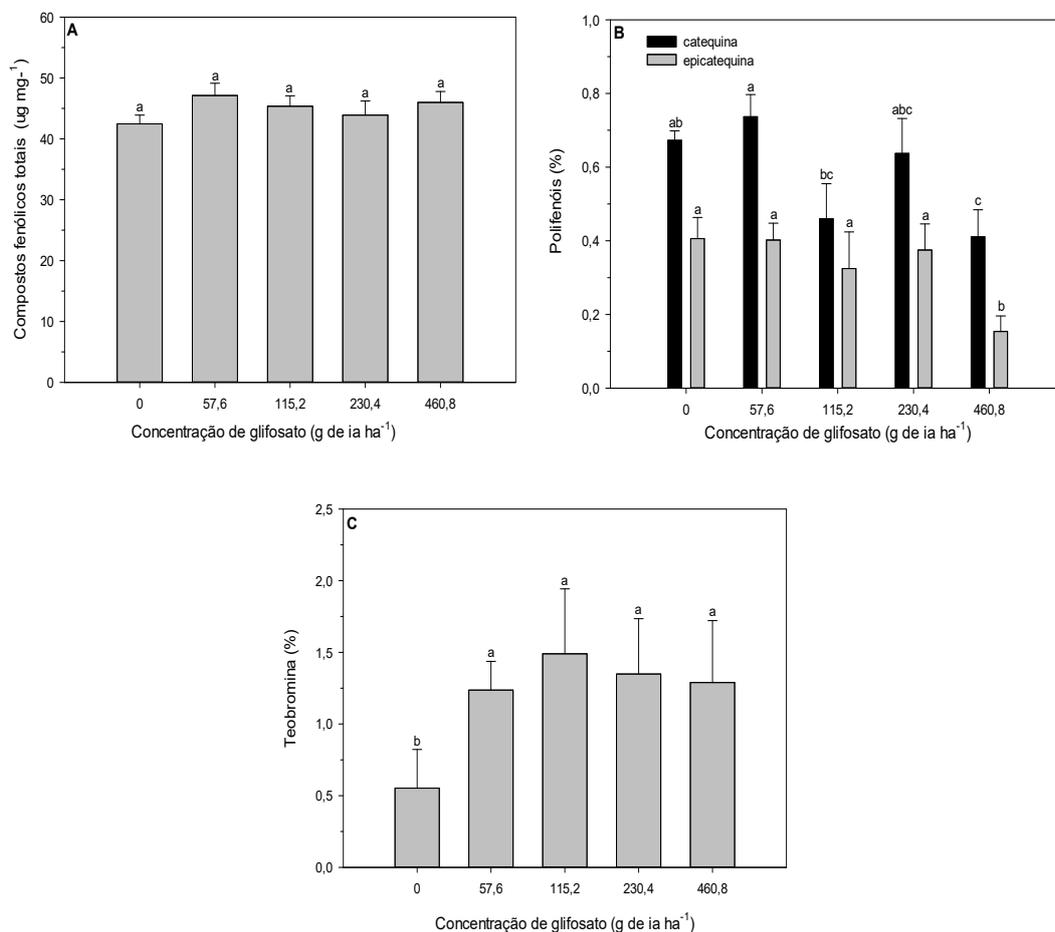


Figura 5 - Teores de compostos fenólicos totais (A), catequina, epicatequina (B) e teobromina (C) em folíolos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)

Fonte - Santos, 2019.

Entre as metilxantinas analisadas em folíolos de plantas de guaraná, apenas a teobromina foi detectada, que é a metilxantina mais abundante em tecidos vegetativos de guaranazeiro (SCHIMPL *et al.*, 2014). Os teores de teobromina aumentaram consideravelmente em folíolos de plantas que foram expostas à deriva do glifosato. O valor médio do tratamento controle foi de $0,5\% \pm 0,26$, já em plantas submetidas à dose de glifosato, o conteúdo de teobromina mais do que dobrou, variando de 1,23-1,48%, dependendo da dose aplicada (Figura 5C).

Produção

Plantas adultas de guaranazeiro foram submetidas a doses de deriva de glifosato no período após a polinização, em simulação de deriva e foram monitoradas individualmente quanto à produção. Apesar da variação média de produção ser de 8,27 Kg planta⁻¹ ±2,63 a 13,13 Kg planta⁻¹±7,38 entre os tratamentos, a produção de frutos de guaraná não diferiu entre o controle e as doses aplicadas do herbicida (57,6-460,8 g i.a. ha⁻¹) (Figura 6).

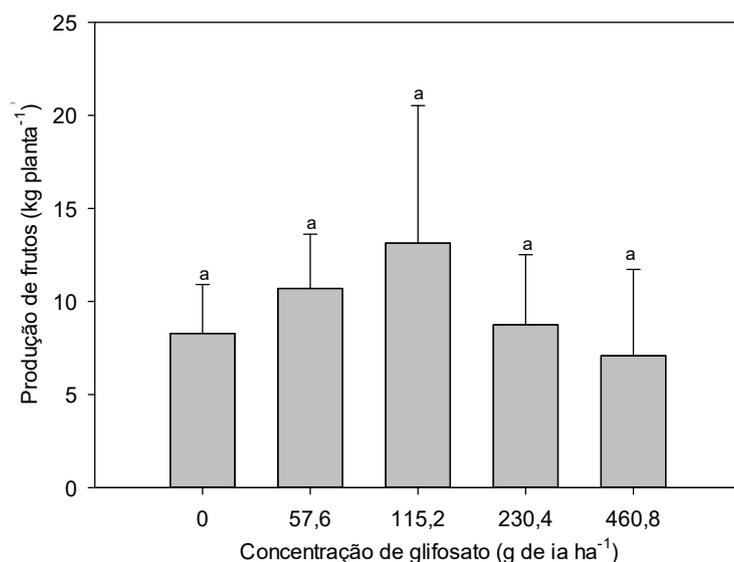


Figura 6 - Produção de frutos de plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 8$)

Fonte - Santos, 2019.

Compostos do metabolismo secundário em frutos

Alguns estudos foram realizados para investigar os teores desses metabólitos em *P. cupana* (MACHADO *et al.*, 2018; SCHIMPL *et al.*, 2014), mas não há na literatura informações que busquem elucidar esses teores em plantas dessa espécie sob estresse.

As metilxantinas, teobromina, teofilina e cafeína foram quantificadas em sementes provenientes das plantas do tratamento controle e das plantas que foram submetidas à deriva de glifosato afim de investigar se há alterações na quantidade desses compostos de interesse econômico. Os teores de teofilina em sementes de guaraná variaram de 0,01 a 0,12%, no entanto, não foi realizada uma análise estatística desses dados devido à presença desse alcaloide ter sido detectada de forma ocasional em apenas algumas sementes, por esse método.

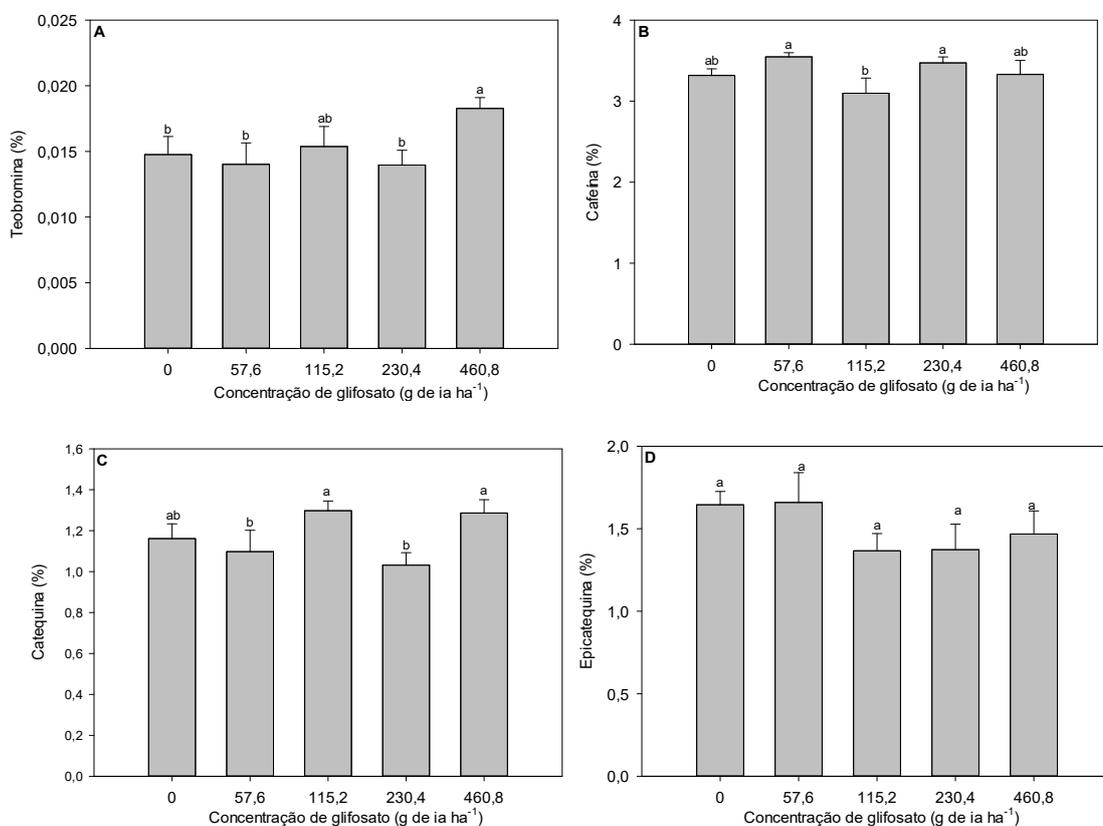


Figura 7 - Teobromina (A), cafeína (B), catequina (C) e epicatequina (D) em sementes das plantas de guaraná não expostas e plantas tratadas com deriva simulada de glifosato. Médias seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) e as barras representam o erro padrão ($n = 4$)

Fonte - Santos, 2019.

Os teores de teobromina variaram pouco, não ultrapassou 0,01% (Figura 7A). Para cafeína, o tratamento controle diferiu das amostras de plantas oriundas do tratamento que consistia na maior dose de ingrediente ativo. As alterações nos teores

das demais doses (Figura 7B). Para cafeína, houve variação nos teores de $3,09\% \pm 0,18$, para a dose de $230,4 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ a $3,54\% \pm 0,05$, para $57,6 \text{ g i.a. ha}^{-1}$.

Os polifenóis também foram quantificados em amostras de frutos e os teores de catequina foram $1,16\% \pm 0,07$ para o tratamento controle, $1,09\% \pm 0,104$ para $57,6 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, $1,29\% \pm 0,04$ para $115,2 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, $1,03\% \pm 0,06$ para $230,4 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, e $1,28\% \pm 0,06$ para $460,8 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ (Figura 7C). A média dos teores de catequina do tratamento controle não diferiu dos demais tratamentos (Figura 7C).

Para epicatequina os teores foram de $1,64\% \pm 0,08$ para o tratamento controle, $1,65\% \pm 0,18$ para $57,6 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, $1,36\% \pm 0,10$ para $115,2 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, $1,37\% \pm 0,15$ para $230,4 \text{ g i.a. ha}^{-1}$, e $1,46\% \pm 0,14$ para $460,8 \text{ g i.a. ha}^{-1}$ (Figura 7D). Não houve diferença entre os tratamentos controle e os demais.

DISCUSSÃO

Efeitos na fotossíntese e metabolismo primário

O índice SPAD tem se mostrado uma boa ferramenta para diagnosticar a integridade do sistema fotossintético e auxilia nas interpretações do processo fotoquímico de plantas. Este recurso também pode ser utilizado para analisar os pigmentos fotossintéticos de forma não destrutível, auxiliando também na avaliação de nitrogênio total (HAWKINS *et al.*, 2009; NETTO *et al.*, 2005).

No cafeeiro (*Coffea canephora*), uma espécie de porte semelhante ao guaranazeiro, as leituras do SPAD menores que 40 representam prejuízo no processo fotossintético (NETTO *et al.*, 2005). Estendendo esse parâmetro para o guaraná, em que o menor índice encontrado foi 49,13, seria um indicativo de que o processo fotossintético das plantas não foi afetado pelo glifosato.

Para Netto *et al.* (2005) e Gomes *et al.* (2016), o decréscimo do índice SPAD não foi acompanhado da diminuição dos teores de pigmentos fotossintéticos, e diferentemente dos resultados encontrados por esses autores, no tratamento controle, o qual não se utilizou glifosato, demonstrou menores quantidades de pigmentos fotossintéticos e flutuações nos teores destes nos tratamentos aplicados, não apresentando nenhuma tendência linear de suas quantidades mediante a exposição ou não ao herbicida, ao que parece ser uma flutuação de teor de pigmentos da própria espécie (Figura 3B). Por sua vez, Yanniccari; Tambussi; *et al.* (2012b) observaram que inicialmente, o tratamento com glifosato não alterou o teor de clorofila nas folhas de *Lolium perenne* L., mas uma redução significativa de clorofila foi observada dentro de sete dias após a aplicação em plantas suscetíveis como primeira resposta ao tratamento com glifosato.

Um outro parâmetro analisado que reflete o *status* do aparato fotossintético foi a eficiência quântica máxima do PSII (F_v/F_m), para determinação dos efeitos do herbicida no fotossistema II, por meio da fluorescência da clorofila *a*. Valores de F_v/F_m em torno de 0,83, medidos para a maioria das espécies de plantas, indicam que o aparato fotossintético não possui dano, logo, valores abaixo de 0,83 indicam algum tipo de estresse (BJÖRKMAN; DEMMIG, 1987; JOHNSON *et al.*, 1993). No entanto, existe uma variação entre espécies, Li *et al.* (2004), estudaram 99 espécies de plantas

da Mongólia, encontraram valores médios normais de F_v/F_m em torno de 0,72. Em plantas da região Amazônica, como andiroba (*Carapa guianensis*) valores variam de 0,82 a 0,83, já para cumaru (*Dipteryx odorata*) o F_v/F_m de plantas saudas foi de 0,76 a 0,79 (GUIMARÃES *et al.*, 2010).

Plantas de guaraná do tratamento controle tiveram F_v/F_m médio de 0,74, enquanto as plantas sob efeito do glifosato reduziram a eficiência quântica máxima, sinalizando estresse após sete dias da aplicação. Esses resultados sugerem uma alteração no rendimento quântico máximo com a aplicação de herbicida, mas que não é proporcional à dose.

Normalmente, diminuições em F_v/F_m estão ligadas ao aumento da excitação de energia no fotossistema II, e essa diminuição é geralmente considerada um dos indicativos de baixo fluxo no transporte de elétrons, resultando uma menor taxa fotossintética (HORTON *et al.*, 1996). Resultados semelhantes foram encontrados por Yannicari; Tambussi; *et al.* (2012b), que ao analisarem os efeitos do glifosato em *L. perenne* encontraram diminuição no rendimento quântico máximo cinco dias após a exposição ao herbicida, chegando a 30% menor aos sete dias após a aplicação.

Comumente, com a diminuição do valor de F_v/F_m e a taxa de transporte de elétrons (ETR), há a diminuição de pigmentos fotossintéticos (GOMES *et al.*, 2016). Entretanto, como já exposto, não houve modificações nesse sentido, pois os teores de pigmentos encontrados em plantas do tratamento controle foram ligeiramente menores do que os teores encontrados nas folhas de plantas submetidas a doses de glifosato.

A mensuração da fluorescência foi aos sete DAA, os efeitos também podem ter acontecido antes ou depois desse período. Catunda *et al.* (2005) ao avaliarem os efeitos de alguns herbicidas no abacaxizeiro, verificaram que logo após a exposição a um herbicida houve danos ao aparato fotossintético, havendo queda no valor de F_v/F_m aos cinco DAA, porém, após dez DAA, a razão F_v/F_m voltou a subir, sugerindo que o herbicida tenha causado danos reversíveis ao aparato fotossintético e que as plantas tenha conseguido se recuperar sem sintomas aparentes.

O glifosato é conhecido por induzir estresse oxidativo em plantas e a peroxidação lipídica utilizada para obter respostas oxidativas por dano deste herbicida. Em plantas de salgueiro, o glifosato induziu a peroxidação lipídica (conteúdo de MDA de 29 a 52%) (GOMES *et al.*, 2015).

Em guaraná, pode-se dizer que pequenas doses de glifosato são capazes de ocasionar dano celular por peroxidação lipídica, uma vez que o conteúdo de MDA aumentou em relação à dose ministrada (Figura 3). De acordo com Yannicari; Tambussi; *et al.* (2012b) o aumento da peroxidação lipídica seria um efeito tardio, resultado da inibição de CO₂ sem alteração na taxa de transporte de elétrons fotossintéticos que não foi afetada no período pós-aplicação.

Assim, o aumento dessa relação à aplicação do glifosato poderia redirecionar os elétrons dissipadores para elétrons alternativos, o que poderia resultar em espécies reativas de oxigênio após a aplicação do glifosato como resultado da peroxidação lipídica e do dano da membrana nas folhas. Além disso, no trabalho desses autores, o teor de clorofila diminuiu em sete DAA.

O glifosato afeta diretamente os tecidos em crescimento, o que pode ser explicado pela inibição da síntese de aminoácidos, que interfere na síntese de enzimas importantes para os tecidos meristemáticos. Essas inibições também seriam independentes dos efeitos do herbicida ocasionados na parte aérea como a inibição da fotossíntese (FRANZ *et al.*, 1997; YANNICCARI; ISTILART; *et al.*, 2012a).

Desse modo, a demanda de assimilação diminuiu, o que ocasiona acúmulo de carboidratos nas folhas como foi encontrado. Carboidratos como amido e sacarose tiveram incremento mais significativo do que glicose e frutose, mas ainda assim aumentaram em algumas doses.

O acúmulo de açúcares solúveis como frutose, sacarose e glicose, pode ocorrer em folhas sob ação de glifosato e corroboram com o estudo de Orcaray *et al.* (2012). No entanto, diferentemente do encontrado por esses autores que testaram doses de glifosato em ervilha, teores de amido foram muito superiores em folíolos de guaranazeiro tratadas com a maior dose de 460,8 g i.a. ha⁻¹.

O acúmulo de carboidratos solúveis nas folhas das plantas tratadas pode estar relacionado ao aumento da fotossíntese ou a falta de translocação de fotoassimilados, pois o acúmulo de carboidratos solúveis ocorreu antes do declínio fotossintético, e os carboidratos se acumulam nas folhas devido a uma diminuição na força de escoamento (ORCARAY *et al.*, 2012), esse fato também foi ressaltado por Yannicari; Istilart; *et al.*, (2012a).

Estudos relacionados a perturbações no metabolismo de carbono induzido por glifosato não demonstram especificamente como ocorrem, no entanto, Su *et al.* (1992)

identificaram diminuição da atividade da enzima ácido invertase, por intermédio de alterações na produção de auxina, que catalisa a hidrólise da sacarose em glicose e frutose, resultando no acúmulo de sacarose. Nas plantas de guaraná houve um pequeno aumento desse carboidrato na maior dose aplicada de herbicida, indicando um possível estrangulamento na atividade desta enzima.

Além de alterações no metabolismo de carboidratos de plantas expostas ao glifosato, também foram relatados aumento de aminoácidos e diminuição de proteínas (ORCARAY *et al.*, 2012). Zulet *et al.* (2013) concluíram que a diminuição de proteínas promovida pelo aumento de atividades proteolíticas (atividades do proteossoma e ubiquitina-26S) causam um incremento no conteúdo total de aminoácidos livres, de modo que as proteases podem estar envolvidas na degradação de proteínas para fornecer às plantas aminoácidos que não podem ser sintetizados devido à inibição do herbicida.

Para o guaranazeiro não foi observada alteração no conteúdo de proteínas em folíolos de plantas, que não foram expostas ao herbicida e de plantas submetidas à deriva. Porém, houve aumento significativo no teor de aminoácidos totais e mais especificamente no teor dos aminoácidos biossintetizados na via do ácido chiquímico, triptofano, fenilalanina e tirosina.

A via de ação do glifosato como herbicida é pela inibição da enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) da rota do chiquimato, atingindo diretamente a biossíntese de três aminoácidos (tirosina, fenilalanina e triptofano). Entretanto, é possível que hajam mecanismos reguladores em vez de um caminho alternativo da via, uma vez que não foi constatada a incorporação de ácido chiquímico marcado no triptofano de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench) submetidos ao glifosato (HOLLÄNDER; AMRHEIN, 1980).

Assim, sob condições restritas da conversão em corismato, quando ocorre exposição ao glifosato, por exemplo, o ácido chiquímico é preferencialmente utilizado para a produção de antranilato (e, portanto, triptofano), em vez de para a produção de prefenato (tirosina e fenilalanina) (AMRHEIN *et al.*, 1980). Neste caso, houve um aumento considerado de triptofano na maior dose aplicada (Figura 4D).

Houve alterações no metabolismo primário. O acúmulo de carboidratos foi mais sensível que os efeitos na fluorescência da clorofila, que por sua vez seria um

evento mais tardio, causado pelas alterações do metabolismo do carbono como já exposto.

O aumento da peroxidação lipídica está associado à degradação de clorofilas, mas em guaranazeiro foram inconclusivos, pois não houve diminuição do conteúdo desses pigmentos. O teor de aminoácidos da via do ácido chiquímico aumentaram sob estresse causado pelo glifosato, o que já está bem documentado na literatura.

Efeitos no metabolismo secundário de folíolos expostos ao glifosato

Apesar de não haver na literatura estudos que forneçam dados sobre os efeitos de herbicidas nos teores de compostos de interesse como os do guaranazeiro, Mobin *et al.* (2015) testaram a exposição de *Echinacea purpurea* (L.) Moench ao glifosato e verificaram uma redução mais pronunciada no teor de flavonoides. Nesse mesmo trabalho, houve aumento no teor total de fenóis e flavonoides ao ser adicionado fenilalanina e triptofano. O aumento mais proeminente foi com a adição deste último, pois esses aminoácidos são precursores desses metabólitos. Nesta pesquisa não indicaram diferenças significativas no teor de compostos fenólicos totais, mas o teor de dois polifenóis com ação antioxidante, a catequina e a epicatequina.

As catequinas são produtos sintetizados ao final da via dos fenilpropanóides, mediados pela fenilalanina, em que as enzimas fenilalanina amônia liase (PAL) juntamente com cinamato 4-hidroxilase (C4H) são os pontos dominantes de controle biossintético (Figura 13). Como em folíolos de guaraná ocorreu diminuição relativamente gradativa de catequina e epicatequina conforme o aumento da dose de glifosato aplicada, é possível que tenha havido aumento na atividade da PAL após a aplicação de glifosato, o que pode ser interpretado como uma resposta à aplicação do herbicida na tentativa de aumentar o fluxo de carbono nesta rota (MOBIN *et al.*, 2015).

Os efeitos do glifosato no metabolismo primário podem ser refletidos no metabolismo secundário de plantas, e no que diz respeito às metilxantinas, ocorreu aumento significativo de teobromina em folíolos que foram expostas a maior quantidade de ingrediente ativo do tratamento com herbicida (Figura 5C). A teobromina, assim como a cafeína e a teofilina, são alcaloides purínicos, ou seja, são derivados de bases purínicas que tem origem na rota das pentoses fosfato, a partir da ribose-6-fosfato, que é precursor da ribose e da desoxirribose em plantas, no entanto,

a ribose parece ser sintetizada por outra rota, ainda desconhecida (LI *et al.*, 2016; TAIZ *et al.*, 2017).

Posteriormente, os alcaloides de purina são sintetizados a partir de xantosina que é produzida através de pelo menos quatro vias: da adenosina libertada do ciclo SAM (via SAM); a partir do PIM proveniente da síntese *de novo* de purina (via *de novo*); do *pool* de nucleotídeos de adenina celular (via AMP); e do *pool* de nucleotídeos guanina (via GMP). A teobromina faz parte de uma série de conversões que culminam na biossíntese da cafeína, a partir da xantosina, 7-metilxantosina, 7-metilxantina, teobromina e por fim, cafeína (ASHIHARA *et al.*, 1996; ASHIHARA *et al.*, 2008). O aumento da teobromina, pode ter ocorrido em razão de uma desregulação ainda nas reações do metabolismo primário sediado no fluxo de carbono na via das pentoses fosfato.

Apesar de haver alteração foliar no teor de compostos de interesse da cultura do guaranazeiro, esse efeito não se estende aos teores dos frutos. Para cafeína, a média do tratamento controle e da maior dose aplicada foram estatisticamente iguais. Embora haja diferenças entre as demais doses, isso não se deve à exposição do glifosato, uma vez que a diferença dos teores desses compostos no guaraná é considerada normal.

Machado *et al.* (2018) encontraram para esses compostos os teores: 0,0177% para teobromina, 0,0131% para teofilina, 2,94% para cafeína, 0,46% para catequina, 0,55% para epicatequina. SCHIMPL *et al.* (2013) encontraram teores de cafeína, o alcaloide mais importante do guaraná, entre 2,5 e 6%.

A exposição acidental de glifosato não altera a produção de frutos desta cultura

Os dados de produção de guaraná apresentam elevada variação, devido a frutificação desuniforme, associada a erros decorrentes do manuseio da produção, fazendo com que o coeficiente de variação fique acima da média de outras culturas (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2016). Para essa análise o coeficiente de variação foi 38,81, que pode ser considerado um valor bom, levando em consideração trabalho realizado para classificar o coeficiente desta cultura para sementes secas, onde valor

de CV igual ou menor que 44,03, é considerado baixo para o guaranazeiro (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2016).

Os efeitos de doses de glifosato são variáveis entre espécies. Alguns experimentos têm encontrado efeitos deletérios, como queda de produção e sintomas de fitotoxidez em quantidades mínimas do herbicida aplicado (FLORENCIA *et al.*, 2017). No tomateiro, uma perda de 25% no rendimento ocorreu com doses de 8,5 e 7,5 g i.a. ha⁻¹ aplicado durante o período de florescimento (KRUGER *et al.*, 2012).

Já no algodoeiro, as plantas apresentaram sintomas de fitotoxidez a partir de 130 g i.a. ha⁻¹, mas sem interferência na produção. Enquanto na dose de 65 g i.a. ha⁻¹ ocorreu aumento na produção com diferença de aproximadamente 693 Kg ha⁻¹ em relação ao tratamento controle, caracterizando um efeito hormético do herbicida na cultura (ROSA *et al.*, 2011).

A redução na produção de frutos de plantas atingidas com glifosato ocorre devido à queda de frutos presentes na região atingida pela pulverização, e isto pode estar associado ao estímulo na produção de etileno proporcionado pela ação do glifosato, causando abscisão de frutos (GRAVENA, 2006). Após 15 DAA de doses de 360, 720 e 1.080 g ha⁻¹ i.a. de glifosato em citros, ocorreu 9, 16 e 19% de queda, respectivamente. Aos 60 DAA, a porcentagem de frutos caídos nas duas maiores doses foi de 70%.

Segundo Gravena (2006), para que haja queda de frutos são necessárias doses altas, fruto com estágio avançado de desenvolvimento e aplicação direta sobre o fruto. No guaranazeiro, a colheita foi realizada aos 51 DAA e não houve queda de frutos, talvez devido a época de aplicação, que aconteceu no início de agosto quando a maioria das plantas de guaraná já haviam sido polinizadas e encontravam-se no estágio denominando *chumbinho*, no experimento acima citado (GRAVENA, 2006) a aplicação foi realizada quando os já estavam em desenvolvimento.

Esse período coincide com o período crítico de controle de plantas daninhas constatado por Soares e Figueiredo (2017), que é de junho a agosto. Desse modo, não há necessidade de frutos em desenvolvimento serem expostos ao herbicida. Assim, a utilização de glifosato para o controle de plantas daninhas não causa prejuízos para a cultura do guaranazeiro. Entretanto, se faz necessário avaliar o resíduo do herbicida em sementes oriundas de plantas que foram expostas ao mesmo, para garantia da segurança alimentar.

CONCLUSÃO

Foram fornecidas evidências dos efeitos fitotóxicos desencadeados em resposta à aplicação do glifosato em guaranazeiro, mas não afetam significativamente o aparato fotossintético de plantas adultas, sendo mais sensíveis às perturbações no metabolismo primário, podendo acumular aminoácidos e compostos importantes para o metabolismo secundário, como catequina, epicatequina e teobromina.

A produção de frutos não foi alterada nas plantas expostas à deriva de glifosato, bem como os metabólitos de interesse comercial nas sementes, principalmente a cafeína. No entanto, apesar de não haver efeitos fitotóxicos irreversíveis sobre o guaranazeiro que prejudiquem a produção de frutos ou dos compostos importantes de suas sementes, esses resultados não eximem o controle rígido ao utilizar este ou qualquer outro herbicida em guaranazais, pois a descalibração de equipamentos e má aplicação, são prejudiciais a outros fatores do agroecossistema.

REFERÊNCIAS

AGROFIT. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Acesso em 2018: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2018.

ALVARES, Clayton Alcarde et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

AMRHEIN, Nikolaus et al. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. **Plant Physiology**, v. 66, n. 5, p. 830, 1980.

ASHIHARA, Hiroshi et al. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. **Plant Physiology**, v. 111, n. 3, p. 747-753, 1996.

ASHIHARA, Hiroshi; SANO, Hiroshi; CROZIER, Alan. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**, v. 69, n. 4, p. 841-856, 2008/02/01 2008.

ATROCH, André Luiz; NASCIMENTO FILHO, Firmino José do. CLASSIFICAÇÃO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO NA CULTURA DO GUARANAZEIRO. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, p. 43-48%N 43, 2016-08-10 2016.

_____. *Guaraná Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. In: (Org.). **Exotic Fruits**: Elsevier, 2018. p.225-236.

BASILE, Adriana et al. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32-36, 2005.

BENBROOK, Charles M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

BJÖRKMAN, Olle; DEMMIG, Barbara. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, v. 170, n. 4, p. 489-504, 1987.

BONADIMAN, Beatriz da Silva Rosa et al. Guarana (*Paullinia cupana*): Cytoprotective effects on age-related eye dysfunction. **Journal of Functional Foods**, v. 36, p. 375-386, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.

BROWN, Lynette R et al. Soybean response to simulated dicamba/diflufenzopyr drift followed by postemergence herbicides. **Crop protection**, v. 28, n. 6, p. 539-542, 2009.

CAMPOS, Maira Paschoin Oliveira et al. Guaraná (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 17, n. 6, p. 505-512, 2011.

CATUNDA, MG et al. Efeitos de herbicidas na atividade fotossintética e no crescimento de abacaxi (*Ananas comosus*). **Planta daninha**, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005.

COUTINHO, Enilton Fick et al. **Controle de plantas daninhas na cultura do guaranazeiro**. Embrapa Amazônia Ocidental, 1999.

FERNIE, Alisdair R. et al. Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta**, v. 212, n. 2, p. 250-263, 2001/01/01 2001.

FLORENCIA, Ferreira María et al. Effects of the herbicide glyphosate on non-target plant native species from Chaco forest (Argentina). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 144, p. 360-368, 2017.

FRANÇA, AC et al. Crescimento de cultivares de café arábica submetidos a doses do glyphosate. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 599-607, 2010.

FRANZ, John E; MAO, Michael K; SIKORSKI, James A. **Glyphosate: a unique global herbicide**. American Chemical Society, 1997.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 130, p. 65-70, 2016.

GOMES, Marcelo Pedrosa et al. Consequences of phosphate application on glyphosate uptake by roots: Impacts for environmental management practices. **Science of The Total Environment**, v. 537, p. 115-119, 2015/12/15/ 2015.

GRAVENA, Renan. **Respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas de citros atingidas pelo glyphosate**. 2006. Universidade de São Paulo. 2006.

GUIMARÃES, Diogo gato et al. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. **Acta Amazonica**, v. 40, n. 1, p. 89-98, 2010.

HAWKINS, Tracy S.; GARDINER, Emile S.; COMER, Greg S. Modeling the relationship between extractable chlorophyll and SPAD-502 readings for endangered plant species research. **Journal for Nature Conservation**, v. 17, n. 2, p. 123-127, 2009/05/01/ 2009.

HEATH, Robert L; PACKER, Lester. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 125, n. 1, p. 189-198, 1968.

HENDRY, GAF; PRICE, AH. **Stress indicators: chlorophylls and carotenoids.** 1993.

HOLLÄNDER, Heike; AMRHEIN, Nikolaus. The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate. **Plant Physiology**, v. 66, n. 5, p. 823, 1980.

HORTON, P; RUBAN, AV; WALTERS, RG. Regulation of light harvesting in green plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 655-684, 1996.

IBAMA. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos.** Brasil: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis 2017.

JARRETT, Harry W. et al. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica columns. **Analytical Biochemistry**, v. 153, n. 1, p. 189-198, 1986/02/15/ 1986.

JENNINGS, A. C. The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 118, n. 2, p. 396-398, 1981/12/01/ 1981.

JOHNSON, GN et al. The dissipation of excess excitation energy in British plant species. **Plant, Cell & Environment**, v. 16, n. 6, p. 673-679, 1993.

KRUGER, Greg R et al. Dose response of glyphosate and dicamba on tomato (*Lycopersicon esculentum*) injury. **Weed Technology**, v. 26, n. 2, p. 256-260, 2012.

LI, Yong-Geng et al. Traits of chlorophyll fluorescence in 99 plant species from the sparse-elm grassland in Hunshandak Sandland. **Photosynthetica**, v. 42, n. 2, p. 243-249, 2004.

LI, Zhi-Xin et al. Developmental changes in carbon and nitrogen metabolism affect tea quality in different leaf position. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 327-335, 2016/09/01 2016.

LIMA, Natália da Silva et al. Modulatory Effects of Guarana (*Paullinia cupana*) on Adipogenesis. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 635, 2017.

MACHADO, Kamilla Nunes et al. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food chemistry**, v. 239, p. 180-188, 2018.

MAJHENIČ, Lucija; ŠKERGET, Mojca; KNEZ, Željko. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007/01/01/ 2007.

MOBIN, Mohammad et al. Studies on the glyphosate-induced amino acid starvation and addition of precursors on caffeic acid accumulation and profiles in adventitious roots of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 1, p. 291-301, January 01 2015.

MONQUERO, Patricia Andrea et al. Initial growth of tree species under herbicide drift. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 59, n. 2, p. 162-172, 2016.

NETTO, Alena Torres et al. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005/03/30/ 2005.

ORCARAY, Luis et al. Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 1, p. 27-33, 2012/01/01/ 2012.

PALMA, Cláudia G. Latorre et al. Guarana (*Paullinia cupana*) Improves Anorexia in Patients with Advanced Cancer. **Journal of Dietary Supplements**, v. 13, n. 2, p. 221-231, 2016/03/03 2016.

PEREIRA, Jose Odair et al. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potential of Microorganisms from the Brazilian Amazon. *In: (Org.) Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics*: Springer, 2017. p.71-103.

PUIATTI, Mário; SODEK, Ladaslav. Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 767-773, 1999/10/01/ 1999.

ROSA, Carlos Eduardo et al. Subdoses de glifosato e componentes da produção do algodoeiro. Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2011. CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 8.; COTTON EXPO, 1., 2011, São Paulo. Evolução da cadeia para construção de um setor forte: Anais. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão.

SCHIMPL, Flávia Camila et al. Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. **Phytochemistry**, v. 105, p. 25-36, 2014/09/01/ 2014.

SCHIMPL, Flávia Camila et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013/10/28/ 2013.

SCHRÜBBERS, Lars C et al. Glyphosate spray drift in *Coffea arabica*—Sensitivity of coffee plants and possible use of shikimic acid as a biomarker for glyphosate exposure. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 115, p. 15-22, 2014.

SILVA, F. de A. S. ; AZEVEDO, C. A. V. The Assistat Software version 7.7 and its use in the analysis of experimental data. **Campina Grande-PB: Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN-Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Campina.** , 2016.

SOARES, Daniel Oscar Pereira; FIGUEIREDO, Sônia Maria. **Período de interferência das plantas daninhas na cultura do Guaranazeiro**. Mestrado em Agronomia Tropical. Manaus, Brasil: 7-Mar-2017, p.49. 2017. (Dissertação de mestrado)

SU, Ling Yuan et al. The Relationship of Glyphosate Treatment to Sugar Metabolism in Sugarcane: New Physiological Insights. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, n. 2, p. 168-173, 1992/06/01/ 1992.

TAIZ, Lincoln et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TAVARES, Adauto Maurício et al. Cultura do guaranazeiro no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental. Sistemas de Produção**, v. 4º, 2005.

TONG, Mengmeng et al. Uptake, Translocation, Metabolism, and Distribution of Glyphosate in Nontarget Tea Plant (*Camellia sinensis* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 35, p. 7638-7646, 2017.

YANNICCARI, Marcos et al. Efecto del glifosato sobre el crecimiento y acumulación de azúcares libres en dos biotipos de *Lolium perenne* de distinta sensibilidad al herbicida. **Planta daninha**, v. 30, 2012.

YANNICCARI, Marcos et al. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 210-217, 2012/08/01/ 2012.

YONEKURA, Lina et al. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & function**, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016.

ZABALZA, Ana et al. The pattern of shikimate pathway and phenylpropanoids after inhibition by glyphosate or quinate feeding in pea roots. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 141, p. 96-102, 2017.

ZULET, Amaia et al. Proteolytic Pathways Induced by Herbicides That Inhibit Amino Acid Biosynthesis. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73847, 2013.

6 CAPÍTULO II: DINÂMICA DOS METABÓLITOS DE INTERESSE ECONÔMICO E PRODUÇÃO DOS FRUTOS DE GUARANÁ DA CULTIVAR BRS MAUÉS DURANTE A SAFRA

RESUMO

O guaraná da Amazônia é utilizado na suplementação humana principalmente devido a presença de metilxantinas e polifenóis representados por cafeína, teobromina e teofilina. Estes alcaloides possuem atividade energética enquanto catequina e epicatequina contém propriedades antioxidantes. Este trabalho teve como objetivo investigar a produção de frutos e a quantidade desses metabólitos durante o período de colheita do guaraná, que devido a desuniformização de polinização e maturação dos frutos pode durar até três meses. A produção dos frutos foi analisada diariamente durante todo o período de frutificação do guaranazeiro, sendo colhidos somente os frutos maduros e abertos, com 12 colheitas num intervalo de 63 dias. Para análise das metilxantinas e polifenóis foram selecionados frutos de cinco momentos de colheitas desde o início da produção, com intervalo de 14 dias. Os frutos foram secos e os compostos extraídos com metanol e os teores de teofilina, teobromina, cafeína, epicatequina e catequina quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As quantidades de todos os compostos foram maiores na primeira colheita, quando os primeiros frutos amadureceram e em algum momento tiveram um decréscimo em seus teores, não sendo estáveis durante os períodos avaliados. Inicialmente, a colheita dos frutos foi realizada duas vezes por semana, até a oitava colheita. Posteriormente, foi necessário somente uma colheita por semana até o final da safra. A quantidade de frutos colhidos em cada colheita sofreu alterações e também alcançou um pico de produtividade na décima colheita.

Palavras-chave: cultura, alcaloides, sementes.

ABSTRACT

Amazonian guarana is used in human supplementation mainly due to the presence of methylxanthines and polyphenols. Represented by caffeine, theobromine and theophylline, these methylxanthines have energetic activity while catechin and epicatechin have antioxidant activities. The objective of this job was to investigate fruit production and the amount of these metabolites during the guarana harvest period, which, due to the lack of uniformity of pollination and fruit maturation, can last up to three months. The fruit production was analyzed daily during the entire guarana fruiting period, with only ripe and open fruits being harvested, totaling 12 crops in a period of 63 days. For the analysis of the methylxanthines and polyphenols, fruits from five harvest moments were selected from the beginning of production, with an interval of 14 days. The fruits were dried and the compounds were extracted using methanol, and the theophylline, theobromine and caffeine, epicatechin and catechin contents were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The amounts of all the compounds were higher in the first harvest, when the first fruits matured and at some point had a decrease in their contents, not being stable during the evaluated periods. Initially, the fruits were harvested twice a week, until the eighth harvest. Subsequently, only one harvest per week was required by the end of the harvest. The quantity of fruits harvested in each harvest underwent changes and also reached a peak of productivity in the tenth harvest.

Keywords: crop, alkaloids, seed.

INTRODUÇÃO

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Sapindaceae) também conhecido como guaraná-da-Amazônia é uma espécie nativa da região Amazônica. O primeiro relato do uso do guaraná ocorreu em 1669, quando em expedição jesuíta pela Amazônia, o missionário João Felipe Bettendorf registrou que os índios Sateré-Mawé consumiam frequentemente essa bebida, atribuindo-lhe efeito estimulante, diurético, contra dores de cabeça, febre e câibras (HENMAN, 1982; MARAVALHAS, 1965).

Hodiernamente pesquisadores confirmaram os benefícios associados ao consumo das sementes de guaraná vão além das propriedades estimulantes ocasionadas pelos altos teores de cafeína (SCHIMPL *et al.*, 2013). A teobromina, também encontrada em produtos derivados do cacau causa efeitos na pressão arterial (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2010), essas sementes também possuem polifenóis com diversos benefícios na suplementação humana.

As catequinas presentes nessa espécie são biodisponíveis e contribuem para reduzir o estresse oxidativo de indivíduos por ação antioxidante (YONEKURA *et al.*, 2016). Possuem atividade antidiabética ao inibir a α -amilase e a α -glicosidase (KIM *et al.*, 2016) e também agem beneficemente de uma forma geral na saúde vascular (BABU *et al.*, 2008).

Sabe-se até então que teobromina concentra-se principalmente nas folhas, caules, inflorescências e pericarpo e a cafeína é acumulada principalmente em sementes, podendo atingir 6% dependendo da cultivar (SCHIMPL *et al.*, 2014). Para catequina e epicatequina foi relatado 1,48% de teor em sementes de guaraná (SOUSA *et al.*, 2010). Apesar desses estudos, não existe informação quanto a produção de metilxantinas e polifenóis ao longo do período de colheita do guaraná.

Normalmente, as análises desses metabólitos nesta espécie mencionam apenas um período estático de colheita. Isso ocorre porque diferentemente de outras culturas, o guaranazeiro não possui uma colheita homogênea de frutos.

A produção de frutos de guaraná tem características intrínsecas, pois a espécie possui mecanismos morfológicos que favorecem a polinização cruzada, o que afeta o modo como a colheita ocorre, e um dos problemas observados nas plantações de guaraná é falta de uniformidade durante esse processo, podendo uma planta ser colhida de dez a vinte vezes durante o período de safra (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018).

Apesar de flores masculinas e femininas estarem presentes na mesma inflorescência, o florescimento de ambas não ocorre ao mesmo tempo (GONDIM, 1984) sendo a antese simultânea um fenômeno raro nesta espécie, mas que pode ser uma característica da cultivar. Normalmente, quanto mais tempo o período de inflorescência, maior a probabilidade de mais de um período de floração feminino. É por isso que as frutas e flores em diferentes estágios de maturação são encontradas, e que mais de uma colheita é necessária (ANGELO *et al.*, 2007).

A produção dos frutos do guaranazeiro não ocorre de forma única e homogênea, mas o que não significa que seja um problema, pois a maioria dos produtores de guaraná da Amazônia, são produtores de porte pequeno caracterizados por pequenas áreas (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Para esses produtores, a colheita é feita basicamente pelo núcleo familiar (TRICAUD *et al.*, 2016) e uma única colheita não seria interessante, pois o produtor pode não conseguir colher todas as plantas em tempo hábil.

Como o guaraná também é plantado por grupos de empresas a maturação homogênea dos frutos seria um fator importante, pois diminuir-se-ia o custo com mão de obra, e facilitaria a mecanização da colheita durante a safra (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2018). Também conhecer a dinâmica da produção desses frutos se torna necessária para melhor administração de recursos de pequenos, médios e grandes produtores.

Até então, não haviam informações a respeito do volume da produção de frutos e o conteúdo de metilxantinas e polifenóis em sementes de guaranazeiro em relação ao período de frutificação durante a safra. Os resultados desta pesquisa encontraram diferenças significativas no teor desses compostos ao longo do período de colheita do guaraná, além disso, observou-se um pico de colheita de frutos com maior incremento na colheita total ao final da safra. Entretanto, a variação de produção entre plantas ainda é muito alta, sendo uma dificuldade no planejamento da produção de guaraná.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Para este ensaio foram utilizadas plantas adultas de guaraná da cultivar BRS-Maués com idade de sei anos de idade, em uma área experimental localizada no município de Maués-Amazonas, Brasil, latitude 3° 27' 0" S e longitude 57° 38' 60" W. O solo predominante na área é Latossolo Amarelo Distrófico textura muito argilosa e o clima é "Afi" (Clima Tropical Chuvoso) segundo Köppen (ALVARES *et al.*, 2013).

Todas as plantas foram manejadas de acordo com as recomendações para a cultura, inclusive o controle de plantas daninhas por meio de capina manual. Em fevereiro do mesmo ano foi realizada poda para uniformizar a arquitetura das plantas.

O florescimento e a polinização da maioria das plantas ocorreram em agosto, a maturação dos primeiros frutos ocorreu em setembro e os últimos frutos foram colhidos em novembro. Destas plantas, foram colhidos frutos e pesados para análise de produção por planta.

Para análise de compostos do metabolismo secundário, foram separadas sementes com intervalo de coleta de 14 dias desde o início da colheita, que representavam em relação ao período de florescimento 51, 65, 79, 93 e 107 dias após a maioria das plantas já estarem polinizadas, o experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. As sementes coletadas foram secas em estufa a 50 °C até massa constante e trituradas finamente em moinho de facas tipo Willey, peneirado e armazenado para as análises em laboratório.

Análise de produtividade

Em campo foi avaliado o comportamento de maturação dos frutos no decorrer do tempo. Os frutos foram colhidos até duas vezes por semana. Esse procedimento foi necessário pois a maturação dos frutos do guaranazeiro não é uniforme, e foram colhidos somente os frutos maduros e abertos. Posteriormente, os frutos foram

levados para galpão de beneficiamento, pesados e transformados para produção em Kg planta⁻¹.

Compostos do metabolismo secundário

Para determinar a quantidade de metilxantinas e polifenóis os métodos descritos por Schimpl *et al.* (2014) e Machado *et al.* (2018) foram adaptados. Cerca de 100 mg do material vegetal foi homogeneizado com 5 mL de metanol a 80% em tubos de vidro com tampa rosqueada e mantido em banho térmico a 50 °C durante 2 h, com agitação a cada 15 minutos em vortex.

Após resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas à 15000 x g durante 20 minutos e 100 µL do sobrenadante foi diluído em água destilada, na proporção de 1:4. A partir destes extratos, procedeu-se às análises de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de diodo (Shimadzu Inc., Kyoto, Japão) operando em 280 nm para os polifenóis e 272 nm para as metilxantinas.

A separação foi em coluna de fase reversa C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm Allcrom®) sendo a fase móvel (A) água com ácido acético a 1% e (B) metanol, sob um fluxo de 1,2 mL min⁻¹. O gradiente de eluição utilizado foi: 0 min 20% B, 13 min 45% B, 23 min 100% B e 30 min 20% B. Para a determinação das quantidades dos alcaloides e polifenóis foram realizadas curvas padrão com cafeína, teofilina, teobromina, catequina e epicatequina (Sigma).

O tempo de retenção das metilxantinas para a detecção na HPLC foi de aproximadamente cinco minutos para teobromina, sete minutos para teofilina e nove minutos para cafeína em 272 nm, para os polifenóis, aproximadamente sete minutos para catequina, e 9,2 minutos para epicatequina em 280 nm.

Para a análise da produção foram utilizadas as médias da produção acumulada no decorrer do tempo e as médias da produção nos dias em que se procedeu a colheita. Os dados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade pelos testes Shapiro-Wilk, devido a não normalidade dos dados de teobromina, efetuou-se a transformação dos mesmos para raiz quadrada, e posteriores testes paramétricos. A análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

A colheita dos frutos foi monitorada durante todo o período da safra do guaraná e no total, foram colhidos em média 8,27 Kg de frutos planta⁻¹. Os primeiros frutos foram colhidos aos 51 DAP e os últimos aos 114 DAP. No total, a safra durou cerca de 63 dias.

A colheita se mostrou estável nos primeiros 19 dias de colheita com cerca de 0,280 Kg de frutos planta⁻¹ colhidos diariamente e foram necessárias duas colheitas por semana. A partir daí, ainda com duas colheitas por semana, houve um incremento de em média 0,647 Kg de frutos planta⁻¹ colhidos diariamente.

A próxima colheita foi realizada oito dias após a última desse período, com o valor aproximado da última colheita, mas com um intervalo de tempo maior. Aos 104 DAP ocorreu o pico da safra, quando a maior quantidade de frutos foi colhida com incremento médio de 3,17 Kg de frutos planta⁻¹. Após esse período, foram realizadas mais duas colheitas uma vez por semana, com o incremento médio de 0,558 Kg de frutos planta⁻¹ (Figura 8).

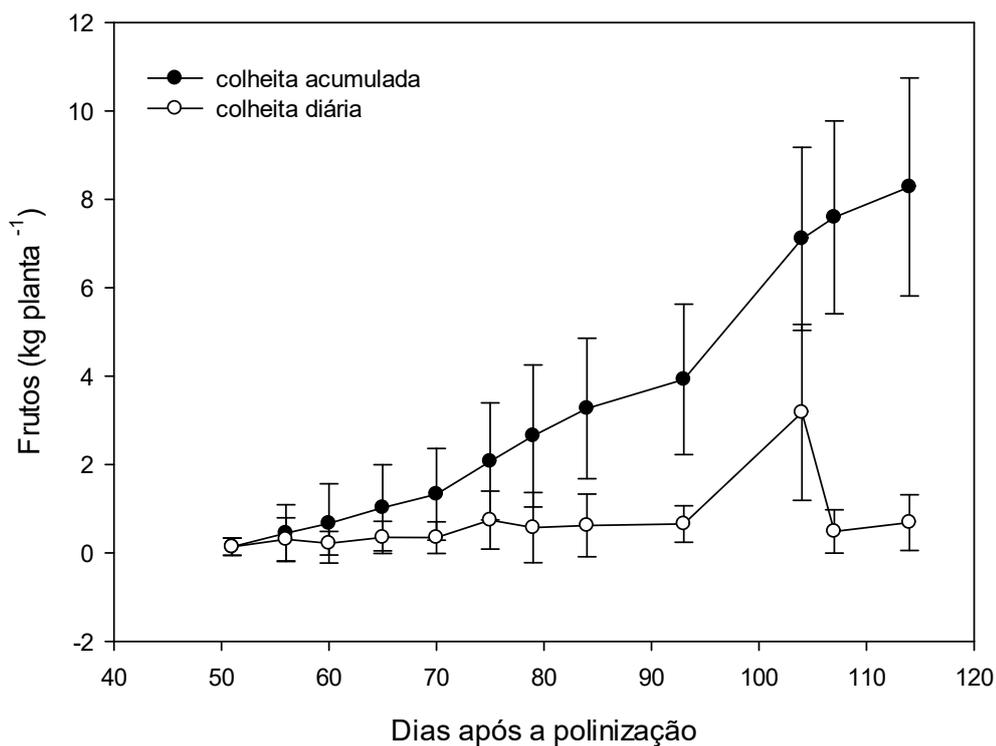


Figura 8 – Colheita acumulada e colheita diária de frutos de guaraná durante a safra. As barras representam o erro padrão das médias (n = 8)
 Fonte - Santos, 2019.

Neste estudo foram avaliados os teores dos polifenóis: catequina e epicatequina; e as metilxantinas: teobromina, teofilina e cafeína de frutos durante o período da colheita de uma safra. Cinco intervalos de colheita após o período de polinização, que representaram respectivamente 51, 65, 79, 93 e 107 DAP com duração de 63 dias. Com exceção da cafeína, que pouco variou durante as colheitas, os teores de teobromina, catequina e epicatequina foram maiores nos primeiros frutos colhidos (Figura 9).

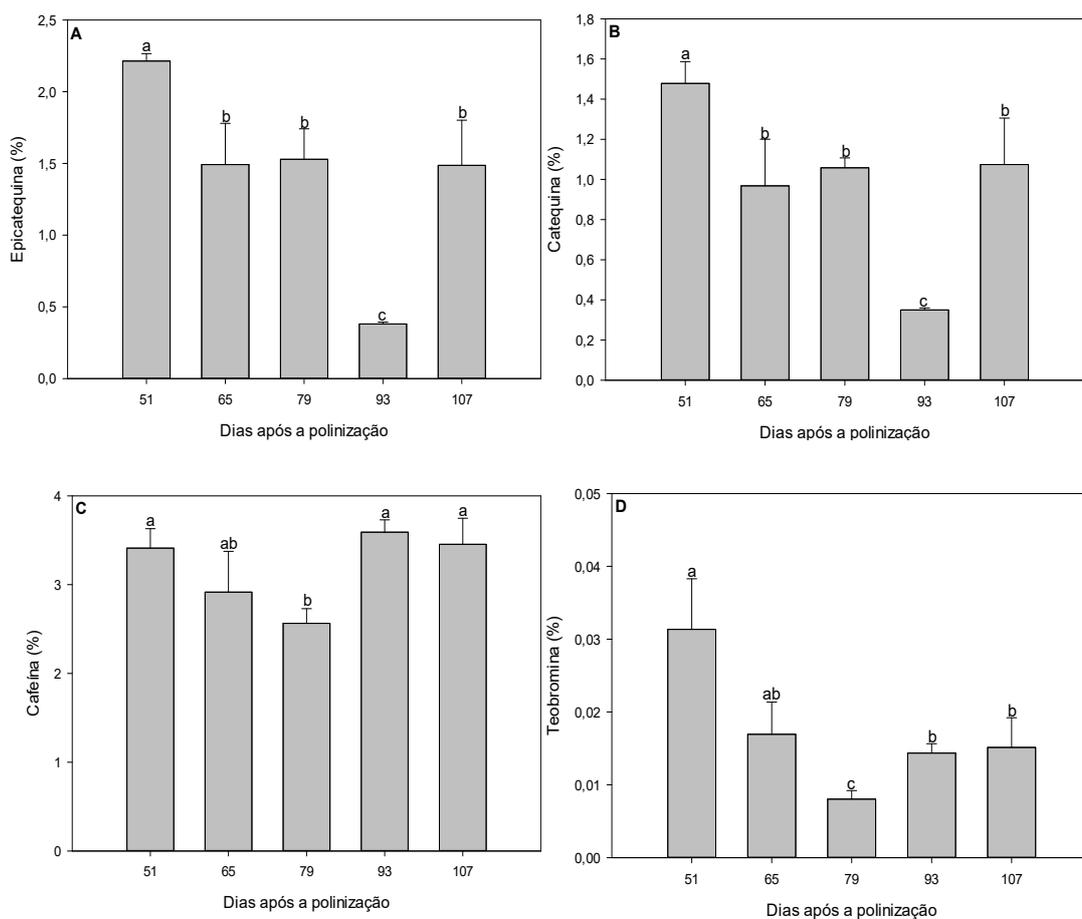


Figura 9 – Teores de epicatequina (A), catequina (B), cafeína (C) e teobromina (D) em sementes de guaranzeiro colhidas durante cinco períodos durante a safra. Médias seguidas com a mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e as barras representam o erro padrão (n = 4)
 Fonte - Santos, 2019.

Os polifenóis foram quantificados e as médias dos teores para epicatequina variou de $0,38\% \pm 0,01$ para o período de 93 DAP a $2,21\% \pm 0,05$ para o período de 51 DAP (Figura 9A). Este último é representado pela primeira colheita realizada. Este foi o valor mais alto observado durante os períodos analisados, e foi mais de cinco vezes que o menor valor encontrado. Os teores de epicatequina para 65, 79 e 107 dias após o florescimento não diferiram estatisticamente entre si.

Catequina e epicatequina apresentaram o mesmo comportamento durante a frutificação, mas em proporções diferentes, sendo os valores de epicatequina 21% mais elevados do que catequina (Figura 9A-B). Para o conteúdo desses compostos, a primeira colheita foi mais significativa, com redução nos períodos seguintes, principalmente aos 93 DAP, onde ambos os compostos tiveram reduções expressivas nas sementes.

As metilxantinas, teobromina, teofilina e cafeína foram quantificadas em sementes provenientes das plantas durante os mesmos períodos. Teofilina foi detectada ocasionalmente nas amostras em valores abaixo de 0,12%, portanto, esses dados não foram apresentados.

Para cafeína, os teores variaram de $2,5\% \pm 0,1$ para 79 DAP, e de $3,5\% \pm 0,1$ aos 51 DAP. Os teores de 51, 93 e 107 DAP não diferiram estatisticamente entre si, e representam os maiores teores encontrados deste alcaloide. Os menores teores encontrados representam o período central da colheita (Figura 9A).

Os teores de teobromina em sementes foram quantificados e o maior valor foi encontrado na primeira colheita dos frutos (51 DAP), valor este que é mais de três vezes o menor valor encontrado (51 DAP) (Figura 9D).

DISCUSSÃO

A colheita dos frutos apresentou quatro períodos de estabilização da quantidade colhida, no primeiro, cinco colheitas foram responsáveis por um incremento médio diário de 3,31% na colheita total. No segundo, cada dia de colheita representava um acréscimo médio de 7,84% na colheita total.

Em seguida, o pico de colheita, que ocorreu em apenas um dia, representou um acréscimo de 38,39% na colheita total de frutos ao término da safra. O quarto

período de estabilização da produção de frutos ocorreu nas últimas duas colheitas, com um acréscimo médio de 7,09% em cada colheita.

Sabe-se que no guaranazeiro a maturação dos frutos não ocorre de forma homogênea devido ao fato de flores masculinas e femininas estarem presentes na mesma inflorescência, mas antese simultânea raramente ocorre (GONDIM, 1984). Normalmente, quanto mais tempo o período de inflorescência, maior a probabilidade de mais de um período de floração feminino. É por isso que os frutos e flores em diferentes estágios de maturação são encontrados e que várias colheitas são necessárias (ANGELO *et al.*, 2007).

Os dados de produção de guaranazeiro demonstram elevada variação e valores altos para erro padrão e coeficiente de variação. Esses valores são comuns em decorrência da frutificação desuniforme e dos erros decorrentes do manuseio da produção, de modo que esses valores fiquem acima da média de outras culturas (ATROCH; NASCIMENTO FILHO, 2016).

No presente estudo, visto que foram necessárias duas colheitas por semana, totalizando oito com essa frequência. A partir desse período, foi feita colheita apenas uma vez por semana até o final da colheita.

Estudos que buscam analisar os perfis desses compostos tem sido amplamente realizado para o chá (*Camellia sinensis*) e quanto ao guaraná, pesquisas relacionadas a estes compostos nesta espécie ainda são escassas, e não há análise de frutos durante todo o processo de colheita, que pode durar várias semanas. Sabe-se, que os teores de metilxantinas podem variar de acordo com a maturação dos frutos, sendo os teores maiores em frutos verdes, devido a atividade biossintética ser mais em tecidos jovens (SCHIMPL *et al.*, 2014).

Como todos os frutos do guaranazeiro foram colhidos no mesmo ponto de colheita, ou seja, com o pericarpo vermelho e aberto, recomendado para essa cultivar (BRS-Maués), logo, não se deve considerar a variação metabólica da maturação dos frutos na relação de conteúdo de metilxantinas aqui avaliada.

Compostos secundários, de maneira geral, tem sua regulação metabólica influenciada pelo ambiente, uma vez que muitos deles são compostos de defesa e comunicação (TAIZ *et al.*, 2017). Em folhas de chá, por exemplo, foram encontradas diferenças no perfil de diversos compostos, entre eles a teobromina, dependendo da

época de colheita, o que estaria relacionado com as condições climáticas (FANG *et al.*, 2017).

O aumento da precipitação desde a seca da primavera até a colheita do chá no período das monções (fenômeno climático caracterizado por fortes chuvas e longos períodos de seca) pode aumentar significativamente o peso e o comprimento da folha de chá. Simultaneamente, as mesmas condições climáticas resultariam em concentrações significativamente menores de polifenóis (epicatequina 3-galato, epigallocatequina 3-galato, epigallocatequina, ácido gálico, galocatequina, galato de galocatequina, catequina e galato de catequina) e de concentração total de metilxantina (TMC) (AHMED *et al.*, 2014). Logo, o estresse hídrico causado pelas secas, produziriam plantas com folhas menores, mas com teores maiores de metilxantinas e polifenóis.

É importante ressaltar que a influência ambiental em metabólitos vegetais é sentida de forma diferente entre diferentes órgãos. Uma vez que a biossíntese desses compostos ocorre mais intensamente na fase inicial do desenvolvimento, as condições do ambiente durante essa fase é que poderiam afetar a qualidade dos frutos. Evidenciando mais um problema na desuniformização da frutificação do guaranazeiro, pois além de onerar a colheita, pode-se afetar o rendimento final dos compostos de interesse comercial dos grãos de guaraná.

O trabalho que analisou os frutos de guaranazeiro ao longo do tempo, refere-se à qualidade germinativa das sementes. Carvalho *et al.* (1980) chegaram à conclusão que a germinação e o vigor de sementes de guaraná não são afetadas pela época de colheita. Ainda se fazem necessários outros estudos que visem elucidar questões relacionadas com o desenvolvimento da planta do guaranazeiro, as interações ambientais com a planta e o metabolismo de compostos secundários, de modo que novas técnicas e conhecimentos sejam aplicados para o aumento do rendimento da cultura e redução dos gastos de produção. De todo modo, os resultados desses estudos necessitam de avaliações durante diversos anos para consolidar as alterações de produção de frutos, polifenóis e metilxantinas de guaranazeiro em detrimento de fatores climáticos.

CONCLUSÃO

Foram registradas diferenças significativas no teor de polifenóis e metilxantinas ao longo do período de colheita do guaraná, além disso, a produção dos frutos apresentou tendência a aumentar em relação à produção com maior incremento da quantidade de frutos na colheita final da safra.

REFERÊNCIAS

AHMED, Selena et al. Effects of extreme climate events on tea (*Camellia sinensis*) functional quality validate indigenous farmer knowledge and sensory preferences in tropical China. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e109126, 2014.

ALVARES, Clayton Alcarde et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n. 6, p. 711-728, 2013.

ANGELO, Paula Cristina da Silva et al. Padrões de florescimento de clones de guaranazeiro. Embrapa Amazônia Ocidental-Artigo em anais de congresso (ALICE), 2007. In: SEMINÁRIO SOBRE PESQUISAS COM O GUARANAZEIRO NA AMAZÔNIA, 1., 2005.

ATROCH, André Luiz; NASCIMENTO FILHO, Firmino José do. CLASSIFICAÇÃO DO COEFICIENTE DE VARIAÇÃO NA CULTURA DO GUARANAZEIRO. **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, p. 43-48%N 43, 2016-08-10 2016.

_____. Guaraná *Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. In: (Org.). **Exotic Fruits**: Elsevier, 2018. p.225-236.

BABU, Anandh; PON, V; LIU, Dongmin. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 18, p. 1840-1850, 2008.

CARVALHO, Jeu de et al. Germinação de sementes de guaraná provenientes de diferentes épocas de colheita. **Embrapa Amazônia Oriental-Séries anteriores (INFOTECA-E)**, 1980.

FANG, Rui et al. Variation of theanine, phenolic, and methylxanthine compounds in 21 cultivars of *Camellia sinensis* harvested in different seasons. **Food Chemistry**, v. 220, p. 517-526, 2017/04/01 2017.

GONDIM, Carlos José Esteves. Alguns aspectos da biologia reprodutiva do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke-Sapindaceae. **Acta Amazonica**, v. 14, n. 1-2, p. 9-38, 1984.

HENMAN, Anthony Richard. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central Amazon basin. **Journal of ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.

KIM, Yoona; KEOGH, Jennifer; CLIFTON, Peter. Polyphenols and glycemic control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 17, 2016.

MACHADO, Kamilla Nunes et al. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in Brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food chemistry**, v. 239, p. 180-188, 2018.

MARAVALHAS, N. **Teofilina e teobromina, metilpurinas constantes nas plantas produtoras de cafeína.** MARAVALHAS, N. Estudos sobre o guarana e outras plantas produtoras de cafeína. Manaus: INPA, 1965. p. 17-25 (INPA. Quimica, 10), 1965.

SCHIMPL, Flávia Camila et al. Molecular and biochemical characterization of caffeine synthase and purine alkaloid concentration in guarana fruit. **Phytochemistry**, v. 105, p. 25-36, 2014/09/01/ 2014.

SCHIMPL, Flávia Camila et al. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 1, p. 14-31, 2013/10/28/ 2013.

SOUSA, Sandra A et al. Determinação de taninos e metilxantinas no guaraná em pó (*Paullinia cupana* Kunth, Sapindaceae) por cromatografia líquida de alta eficiência. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 866-870, 2010.

TRICAUD, Solène; PINTON, Florence; PEREIRA, Henrique dos Santos. Saberes e práticas locais dos produtores de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth var. *sorbilis*) do médio Amazonas: duas organizações locais frente à inovação. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, v. 11, n. 1, p. 33-53, 2016.

VAN DEN BOGAARD, Bas et al. Effects on peripheral and central blood pressure of cocoa with natural or high-dose theobromine: a randomized, double-blind crossover trial. **Hypertension**, v. 56, n. 5, p. 839-846, 2010.

YONEKURA, Lina et al. Bioavailability of catechins from guarana (*Paullinia cupana*) and its effect on antioxidant enzymes and other oxidative stress markers in healthy human subjects. **Food & function**, v. 7, n. 7, p. 2970-2978, 2016.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram demonstradas evidências dos efeitos de doses da deriva de glifosato em guaranazeiro, porém, esses efeitos são transitórios e não afetam a produção e os compostos de interesse econômico da cultura. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados sobre a existência de possíveis resíduos em sementes de guaraná oriundos de plantas tratadas com este ou outro herbicida. Ademais, os cuidados para utilização de agrotóxicos em plantios devem ser considerados, uma vez que afetam outros fatores de um sistema agrícola.

O guaranazeiro não possui uma única colheita, e para fins industriais, deve-se considerar a seleção de materiais ou tecnologias que uniformizem a produção de frutos. Além disso, os compostos de interesse econômico de suas sementes, podem variar de acordo com a época de colheita de uma mesma safra e a interação desses resultados com fatores ambientais. A partir dessa possibilidade, deve ser estudado vários ciclos produtivos considerando-se outras variáveis de manejo.

8 ANEXO

Anexo 1. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de clorofila *a* (Ca), clorofila *b* (Cb) e carotenoide (Car) em folíolos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

FV	Quadrado Médio			
	GL	Ca	Cb	Car
Tratamentos	4	0,92613**	0,23388**	0,13153**
Resíduo	10	0,02229	0,02646	0,01353
C.V (%)		2,43	7,07	3,96

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 2. Resumo da análise de variância (ANOVA) do índice SPAD (SPAD), fluorescência da clorofila (F_v/F_m) e teor de MDA (MDA) em folíolos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

FV	QUADRADO MÉDIO			
	GL	SPAD	F_v/F_m	MDA
Tratamentos	4	367,38515**	0,01834**	186,86580**
Resíduo	10	25,65137	0,00115	18,97966
C.V (%)		7,69	5,12	11,85

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 3. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de proteínas (Pro), glicose (Glic), frutose (Frut), sacarose (Sac) e amido (Ami) em folíolos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

FV	QUADRADO MÉDIO					
	GL	Pro	Glic	Frut	Sac	Ami
Tratamentos	4	5,70024 ns	0,06549**	1,48958**	11,77009*	0,00092**
Resíduo	10	1,94583	0,00474	0,23047	3,33315	0,00004

C.V (%)	6,47	15,04	23,66	9,28	19,28
----------------	------	-------	-------	------	-------

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 4. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de aminoácidos totais (AT), tirosina (Tir), triptofano (Tri), fenilalanina (Fen) em folíolos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

QUADRADO MÉDIO					
FV	GL	AT	Tir	Tri	Fen
Tratamentos	4	24,73866**	1,67549**	67,74826**	1,08199 ns
Resíduo	10	2,69363	0,19565	4,69497	0,56188
C.V (%)		10,18		20,70	17,52

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 5. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de compostos fenólicos totais (CFT), teobromina (Teo), catequina (Cat) e epicatequina (Epi) em folíolos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

QUADRADO MÉDIO					
FV	GL	CFT	Teo	Cat	Epi
Tratamentos	4	9,91222 ns	0,72816**	0,05964**	0,01864 ns
Resíduo	10	5,31316	0,07397	0,00835	0,00662
C.V (%)		5,13	22,12	15,66	26,45

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 6. Resumo da análise de variância (ANOVA) da produção de frutos por planta (Pf) de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

QUADRADO MÉDIO		
FV	GL	Pf

Tratamentos	4	0,10796 ns
Resíduo	10	0,05348
C.V (%)		25,06

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 7. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de cafeína (Caf), teobromina (Teo), catequina (Cat) e epicatequina (Epi) em frutos de guaranazeiros submetidos a diferentes doses de glifosato

QUADRADO MÉDIO					
FV	GL	Caf	Teo	Cat	Epi
Tratamentos	4	0,11889**	0,00005**	0,05415**	0,08130*
Resíduo	10	0,02126	0,00004	0,00702	0,02498
C.V (%)		4,35	10,04	7,13	10,52

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)

Anexo 8. Resumo da análise de variância (ANOVA) dos teores de cafeína (Caf), teobromina (Teo), catequina (Cat) e epicatequina (Epi) em frutos de guaranazeiros de diferentes períodos de colheita

QUADRADO MÉDIO					
FV	GL	Caf	Teo	Cat	Epi
Tratamentos	4	0,74621**	15,22740**	0,65986**	1,73205**
Resíduo	10	0,10439	1,03581	0,03247	0,06128
C.V (%)		10,14	12,22	18,28	17,43

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq ,01$)

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p \leq ,05$)

ns não significativo ($p > 0,05$)