

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O  
ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR  
HERBICIDAS EM ARROZ IRRIGADO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Keli Souza da Silva**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

# **PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS EM ARROZ IRRIGADO**

**Keli Souza da Silva**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

**Orientador: Sérgio Luiz de Oliveira Machado**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Keli Souza da  
Proteção do óxido nítrico sobre o estresse oxidativo  
causado por herbicidas em arroz irrigado / Keli Souza da  
Silva.-2015.  
86 f.; 30cm

Orientador: Sérgio Luiz de Oliveira Machado  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia, RS, 2015

1. Proteção de plantas 2. Antioxidantes 3. Espécies  
reativas de oxigênio I. Machado, Sérgio Luiz de Oliveira  
II. Título.

---

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Keli Souza da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: keli\_agro@yahoo.com.br

---

**Universidade Federal De Santa Maria  
Centro De Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

**PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO  
CAUSADO POR HERBICIDAS EM ARROZ IRRIGADO**

elaborada por  
**KELI SOUZA DA SILVA**

Como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Agronomia

**Comissão Examinadora**

**Prof. Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado**  
(Presidente/Orientador)

**Prof. Dr<sup>a</sup>. Luciane Almeri Tabaldi** (UFSM)

**Prof. Dr. Ubirajara Russi Nunes** (UFSM)

  
**Dr<sup>a</sup>. Liliane Márcia Mertz Henning** (EMBRAPA)

**Dr. Nilson Lemos de Menezes** (UFSM)

Santa Maria, 31 de julho de 2015.

À minha querida avó Elvira Dellinghausen da Silva (*in memoriam*),  
que soube ser exemplo de coragem, determinação e força, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e aos anjos de luz que guiam e orientam meu caminho, sou grata.

Aos meus pais, Jorge e Salete, que sempre fizeram o melhor por mim.

Ao meu companheiro de todas as horas, Lauri Scherer.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, na pessoa de seus professores e funcionários.

À CAPES, pela bolsa de estudo e auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Sérgio Machado pela orientação e amizade.

Aos meus co-orientadores Enio Marchesan e Nelson Kruse pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

À Luciane Tabaldi e Liana Rossato, por terem acreditado e viabilizado esse trabalho.

Ao amigo Leonardo Urban, por toda a ajuda e suporte.

Aos colegas de laboratório André, Andrisa, César, Fernando, Geovane e Kelen, pela amizade, convivência e aprendizado.

Ao sempre disposto Fernando Gnocatto.

Aos amigos que fiz, ao seguir este caminho.

À todos, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO GERAL

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Universidade Federal de Santa Maria - RS, Brasil

### PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO POR HERBICIDAS EM ARROZ IRRIGADO

AUTORA: KELI SOUZA DA SILVA  
ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DE OLIVEIRA MACHADO  
Data e local da defesa: Santa Maria, 31 de julho de 2015.

Embora seletivos, alguns herbicidas causam injúrias nas plantas, resultando na produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio. O óxido nítrico (NO) é apontado como um redutor dos efeitos causados pelo estresse oxidativo em plantas, entretanto, seus mecanismos de mitigação ainda não são claros. Este trabalho teve por objetivos avaliar os mecanismos de proteção do óxido nítrico, fornecido através de nitroprussiato de sódio (SNP), em plantas de arroz da cultivar Puita INTA CL, expostas aos herbicidas clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (240 g i.a. L<sup>-1</sup>), oxadiazon (250 g i.a. L<sup>-1</sup>) e à mistura formulada de paraquat (200 g i.a. L<sup>-1</sup>) + diuron (100 g i.a. L<sup>-1</sup>), *in vitro* e *in vivo*. Para tal, (I) segmentos foliares foram pré-incubados com 0, 200 e 2000 µM de SNP e expostos a cinco concentrações dos herbicidas, sendo o efeito protetor confirmado pelo seqüestrador de NO, carboxyPTIO, (II) sementes foram embebidas, por uma e 10 horas, em solução contendo 200 µM de SNP e após a semeadura, clomazone (1,7 e 3,4 L p.c. ha<sup>-1</sup>) foi aplicado em pós-semeadura e no ponto de agulha, (III) plantas foram tratadas com 200 e 2000 µM de SNP e pulverizadas com 1,0 L ha<sup>-1</sup> dos herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen e paraquat + diuron. A concentração de 200 µM de SNP reduziu, em até 14%, o extravasamento de eletrólitos em segmentos foliares de arroz expostos a 755,9 µM de oxadiazon, bem como, a embebição das sementes em 200 µM de SNP por 10 horas aumentou em 33,1% o teor de clorofila total, mantendo a pigmentação das plântulas expostas a 3,4 L ha<sup>-1</sup> de clomazone, aplicado no ponto de agulha. Quando pulverizados na parte aérea das plantas, paraquat + diuron, oxyfluorfen e oxadiazon, respectivamente, causaram o extravasamento de 89,8; 62,8 e 18,3%, dos íons celulares, enquanto que as plantas pré-tratadas com 2000 µM de SNP apresentaram redução de 11 e 25,4% no dano causado pelos dois primeiros, contudo, sem redução na injúria causada por oxadiazon. O pré-tratamento com SNP minimizou o estresse oxidativo causado pelos herbicidas, através da redução dos níveis de peróxido de hidrogênio e Tbars e do aumento nos níveis de pigmentos, refletindo na menor atividade das enzimas SOD e POD, entretanto, tais alterações foram dependentes da concentração de SNP, tempo de exposição e do nível de estresse causado pelos herbicidas. Na ausência ou em baixos níveis de estresse, o NO mostrou-se tóxico às plantas.

**Palavras-chave:** Proteção de plantas. Antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio.

## GENERAL ABSTRACT

PhD Thesis  
Programa de Pós-Graduação em Agronomia  
Universidade Federal de Santa Maria - RS, Brasil

### PROTECTION OF NITRIC OXIDE ON THE OXIDATIVE STRESS CAUSED BY HERBICIDES IN THE FLOODED RICE

AUTHOR: KELI SOUZA DA SILVA  
ADVISOR: SÉRGIO LUIZ DE OLIVEIRA MACHADO  
Date and location of defense: Santa Maria, July 31<sup>th</sup>, 2015.

Although selective, some herbicides cause injury in plants, resulting in uncontrolled production of reactive oxygen species. Nitric oxide (NO) is appointed as a reducer of the effects caused by oxidative stress in plants; however, their mitigation mechanisms are not yet clear. This study aimed to evaluate the nitric oxide protection mechanisms, provided by sodium nitroprusside (SNP), in the flooded rice cultivar Puitá INTA CL exposed to clomazone herbicide (360 g a.i. L<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (240 g a.i. L<sup>-1</sup>), oxadiazon (250 g a.i. L<sup>-1</sup>) and the formulated mixture of paraquat (200 g a.i. L<sup>-1</sup>) + diuron (100 g a.i. L<sup>-1</sup>) *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, (i) leaf segments were pre-incubated with 0, 200 and 2000 µM of SNP and exposed to five herbicides concentrations, and the protective effect confirmed by the NO scavenger, carboxyPTIO, (ii) seeds were soaked by one and 10 hours in solution containing 200 µM of SNP and after sowing, clomazone (1.7 and 3.4 L ha<sup>-1</sup> of c.p.) was applied in the post-seeding and the needle stage (iii) plants were treated with 200 and 2000 µM of SNP and sprayed with 1.0 L ha<sup>-1</sup> of herbicides oxadiazon, oxyfluorfen + diuron and paraquat. The concentration of 200 µM of SNP has reduced, up to 14% the electrolyte leakage in rice leaf segments exposed to 755.9 µM of oxadiazon, as well as, the imbibition of seeds with 200 µM of SNP for 10 hours increased by 33.1% the total content of chlorophyll, maintaining the pigmentation of seedlings exposed to 3.4 L h<sup>-1</sup> of clomazone, applied to the needle stage. When sprayed on the shoot, paraquat + diuron, oxyfluorfen and oxadiazon, respectively, caused the ions leakage of 89.8; 62.8 and 18.3%, while the pre-treatment of the plants with 2000 µM of SNP decreased by 11 and 25.4% the damage caused by the first two, however, there was not reduction in injury caused by oxadiazon. The pre-treatment with SNP minimized the oxidative stress caused by herbicides, by the reducing in the hydrogen peroxide levels and TBARS and by the increase in the pigments levels, reflecting on the lower activity of the enzymes SOD and POD, however, such changes are dependent on the SNP concentration, exposure time and the level of stress caused by herbicides. In the absence or low levels of stress, NO was toxic to plants.

**Keywords:** Plant protection. Antioxidants. Reactive species of oxygen.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos a diferentes concentrações dos herbicidas oxadiazon (a) e oxyfluorfen (b), incubados por cinco, 24 e 48 horas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias, enquanto que as barras horizontais correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro da dose que causa 50% de extravasamento dos eletrólitos (CMP<sub>50</sub>). Santa Maria, 2015. ....40
- Figura 2 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos a diferentes concentrações dos herbicidas clomazone (a) e paraquat + diuron (b), incubados por cinco, 24 e 48 horas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias, enquanto que as barras horizontais correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro da dose que causa 50% de extravasamento dos eletrólitos (CMP<sub>50</sub>). Santa Maria, 2015. ....40
- Figura 3 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com 0, 200 e 2000 µM de nitroprussiato de sódio e incubados por 48 horas com diferentes concentrações dos herbicidas oxadiazon (a) e oxyfluorfen (b). Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias. Santa Maria, 2015. ....43
- Figura 4 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com 0, 200 e 2000 µM de nitroprussiato de sódio e incubados por 48 horas com diferentes concentrações dos herbicidas clomazone (a) e paraquat + diuron (b). Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias. Santa Maria, 2015. ....43
- Figura 5 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com água destilada, nitroprussiato de sódio e/ou cPTIO e incubados por 48 horas com 1835,9; 820,0+410,2; 546,8 e 377,9 µM, respectivamente, de (a) clomazone, (b) paraquat + diuron, (c) oxyfluorfen e (d) oxadiazon. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste t (p=0,05) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015. ....45
- Figura 6 – Níveis de carotenóides em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200 µM de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 1,7 L ha<sup>-1</sup> (p.c.) de clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por

	letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015. ....	56
Figura 7 –	Níveis de carotenóides em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200 $\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 3,4 $\text{L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone (360 g i.a. $\text{L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015. ....	57
Figura 8 –	Níveis de clorofila a em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200 $\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 1,7 $\text{L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone (360 g i.a. $\text{L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015. ....	57
Figura 9 –	Atividade da superóxido dismutase em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200 $\mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 3,4 $\text{L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone (360 g i.a. $\text{L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015. ....	62
Figura 10 –	Níveis de clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$ de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL. Santa Maria, 2015. Barras verticais correspondem ao desvio padrão da média. ....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações dos herbicidas, proporcionais a 0,5, 1, 2 e 4 vezes a concentração necessária para causar 50% de condutividade máxima potencial (CMP50).....	42
Tabela 2 – Principais características físico-químicas do solo.....	54
Tabela 3 – Níveis de clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$ de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com $200 \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a $3,4 \text{ L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015. ....	58
Tabela 4 – Níveis de clorofila b ( $\text{mg g}^{-1}$ de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com $200 \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a $1,7$ e $3,4 \text{ L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015. ....	59
Tabela 5 – Níveis de clorofila total ( $\text{mg g}^{-1}$ de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com $200 \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a $1,7$ e $3,4 \text{ L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015. ....	60
Tabela 6 – Atividade da superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$ de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com $200 \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a $1,7 \text{ L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015. ....	61
Tabela 7 – Atividade da guaiacol peroxidase ( $\text{U mg}^{-1}$ de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com $200 \mu\text{M}$ de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a $1,7$ e $3,4 \text{ L ha}^{-1}$ (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.....	62
Tabela 8 – Condutividade máxima potencial (%) de folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....	73
Tabela 9 – Níveis de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....	74
Tabela 10 – Níveis de TBARs ( $\text{nmol de MDA mg}^{-1}$ de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....	75
Tabela 11 – Atividade da enzima superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$ de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....	77

- Tabela 12 – Atividade da enzima guaiacol peroxidase ( $\text{U mg}^{-1}$  de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....78
- Tabela 13 – Níveis de clorofila b, total e carotenóides ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.....79

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>REVISÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>ÓXIDO NÍTRICO: MITIGADOR DO ESTRESSE CAUSADO POR HERBICIDAS</b> ...	<b>16</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>16</b>
<b>Abstract:</b> .....	<b>17</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>17</b>
<b>Ativação do oxigênio e estresse oxidativo</b> .....	<b>18</b>
<b>Herbicidas como fontes de estresse oxidativo</b> .....	<b>19</b>
<b>Peroxidação de lipídeos</b> .....	<b>20</b>
<b>Mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo</b> .....	<b>21</b>
<b>Óxido nítrico</b> .....	<b>22</b>
<b>Efeito mitigador do óxido nítrico</b> .....	<b>24</b>
<b>Considerações finais</b> .....	<b>26</b>
<b>Referências</b> .....	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>33</b>
<b>EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS E EFEITO PROTETOR DE ÓXIDO NÍTRICO EM FOLHAS DE ARROZ IRRIGADO EXPOSTAS A HERBICIDAS in vitro</b> .....	<b>33</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>33</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>34</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>35</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>37</b>
<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>39</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>45</b>
<b>Referências</b> .....	<b>46</b>
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>51</b>
<b>ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ PRÉ-TRATADAS COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E EXPOSTAS À CLOMAZONE</b> .....	<b>51</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>51</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>52</b>
<b>Introdução</b> .....	<b>52</b>
<b>Material e métodos</b> .....	<b>54</b>
<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>55</b>
<b>Conclusão</b> .....	<b>63</b>
<b>Referências</b> .....	<b>63</b>

<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>67</b>
<b>PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE ARROZ IRRIGADO PRÉ- TRATADAS COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E EXPOSTAS A HERBICIDAS.....</b>	<b>67</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>67</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>68</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>68</b>
<b>Material e métodos.....</b>	<b>70</b>
<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>72</b>
<b>Conclusão .....</b>	<b>80</b>
<b>Referências.....</b>	<b>80</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>86</b>

## INTRODUÇÃO

As plantas estão continuamente expostas a adversidades, que podem causar estresse e dano oxidativo. Espécies de oxigênio, eletronicamente carregadas, portanto reativas, são produzidas, causando a deterioração dos fotossistemas, desnaturação de proteínas, peroxidação de lipídeos, rompimento de membranas e extravasamento do conteúdo celular, dentre outros, conduzindo a célula ao colapso e conseqüentemente, morte. Como proteção, os vegetais desenvolveram estratégias de defesa, desde adaptações anatômicas e morfológicas, até complexos enzimáticos com grande capacidade antioxidante.

Dentre as inúmeras fontes de estresse, estão os alguns herbicidas, que causam, como conseqüência do seu mecanismo de ação, danos oxidativos severos, levando plantas sensíveis à morte. Apesar da seletividade desses herbicidas, prejuízos também podem ser causados na cultura, em virtude do uso de doses errôneas ou até mesmo, da deriva desses compostos para culturas sensíveis.

O óxido nítrico, uma molécula endógena ou exogenamente fornecida através de compostos doadores, atua em diferentes frentes, na redução do dano causado pelo estresse oxidativo. Diversos trabalhos relatam a atividade protetora do óxido nítrico em situações de estresse causadas por salinidade, frio, déficit ou excesso hídrico, toxicidade por arsênico e alumínio e inclusive, por herbicidas. Nesse caso, poucos trabalhos relatam a aplicação dos doadores em condições de campo, restringindo os efeitos a condições *in vitro*. Contudo, os resultados se mostram promissores, promovendo elevados percentuais de seletividade, confirmando a habilidade do óxido nítrico em proteger sistemas vegetais do dano oxidativo.

A cultura do arroz irrigado destaca-se pela produção e área cultivada, representando, além de importante fonte de renda, base nutricional da alimentação da população de diversos países. Apesar dos recursos tecnológicos aplicados à cultura, alavancando sua produtividade, alguns entraves ainda dificultam a obtenção de patamares superiores, dentre eles, a competição pelos recursos produtivos imposta pela presença de plantas daninhas, justifica a necessidade do uso de herbicidas para minimizar tais impactos. Assim, a aplicação de herbicidas consiste em uma importante ferramenta para o adequado manejo da cultura.

Entretanto, para a longevidade dessa ferramenta de manejo, são necessários a rotação e o uso racional de diferentes mecanismos de ação, a fim de evitar a resistência de plantas daninhas aos herbicidas. No Brasil, diversos produtos comerciais são registrados para o uso na cultura do arroz irrigado, entretanto, alguns deles têm menor expressividade, principalmente devido à seletividade restrita, condicionada por diversos fatores climáticos e ambientais, a exemplo dos inibidores de protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) e da síntese de carotenóides. Assim como estes, os herbicidas inibidores dos fotossistemas I e II também são capazes de desencadear processos oxidativos nas plantas, através da produção de espécies reativas de oxigênio, como oxigênio singleto, radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.

O óxido nítrico pode reagir diretamente com o radical superóxido, evitando a formação de uma espécie ainda mais reativa, o radical hidroxila. Além disso, a capacidade de interromper a propagação da cadeia de peroxidação lipídica e alterar o perfil enzimático também é relatada. Nessas circunstâncias, a compreensão dos mecanismos de proteção do óxido nítrico, sobre o estresse oxidativo causado por tais herbicidas, pode contribuir para o aumento ou até mesmo, promover a seletividade desses produtos para a cultura do arroz irrigado, possibilitando o uso seguro dos mesmos. Por sua vez, os processos bioquímicos e fisiológicos desencadeados pelo uso dos herbicidas clomazone, oxyfluorfen, oxadiazon, paraquat e diuron estão claramente estabelecidos, servindo os mesmos, como ferramentas para a elucidação dos mecanismos de proteção do óxido nítrico, sobre o estresse oxidativo.



## REVISÃO

# ÓXIDO NÍTRICO: MITIGADOR DO ESTRESSE CAUSADO POR HERBICIDAS

## Nitric oxide: mitigator of stress caused by herbicides

### Resumo

Alguns herbicidas causam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), conhecidas por atacar biomoléculas, causando a desorganização das células. O óxido nítrico (NO) tem sido apontado por reduzir os efeitos deletérios causado pelo estresse oxidativo em plantas. Essa revisão teve por objetivo reunir informações sobre os processos de geração de EROs, bem como os possíveis mecanismos de proteção do NO. Conforme a literatura consultada, o óxido nítrico pode alterar o perfil enzimático, aumentar a produção de clorofilas, reagir diretamente com o superóxido ou ainda, atuar diretamente sobre a propagação da cadeia de peroxidação lipídica. Além de sinalizador, durante o estresse, o óxido nítrico, em algumas circunstâncias, pode exercer toxicidade sobre as células.

**Palavras chave:** superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila, clorofila triplete, oxigênio singleto, estresse oxidativo

## Abstract

Some herbicides cause the production of reactive oxygen species (ROS), known to attack biomolecules, causing the disruption of cells. Nitric oxide (NO) has been suggested to reduce the deleterious effects caused by oxidative stress in plants. This review aimed to gather information about the processes of ROS generation and the possible protective mechanisms of NO. According to the literature, nitric oxide can alter the enzymatic profile, increase the production of chlorophyll, react directly with superoxide or even act directly on the spread of lipid peroxidation chain. In addition the messenger role during stress, nitric oxide, under some circumstances, can exert toxicity upon the cells.

**Key words:** superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, triplet chlorophyll, singlet oxygen, oxidative stress

## Introdução

Considerando os fatores limitantes à produtividade vegetal, o estresse ambiental está entre os mais importantes. Muitos dos processos deletérios sofridos pelas plantas submetidas a condições adversas são mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas em diferentes compartimentos celulares como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas como de processos fisiológicos normais. Existem diversas situações ambientais capazes de produzir estresse oxidativo, portanto a produção de EROs pode ser considerada como uma característica universal do estresse (CARRILLO; VALLE, 2005).

Durante o estresse oxidativo, como resposta aos elicitores, pode ocorrer a alteração do estatus energético do oxigênio, conduzindo este para formas reduzidas e reativas, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical/ânion superóxido ( $O^{\bullet-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) e o oxigênio "singlet" ( $^1O_2$ ), ou seus respectivos derivados, formados por reações com outras moléculas orgânicas ou complexos com metais de

transição (GRATÃO et al., 2005). O estresse oxidativo implica em um conjunto de eventos prejudiciais a planta, onde as EROs desencadeiam reações à partir de radicais livres que, de maneira indiscriminada, atingem qualquer tipo de macromolécula alterando a funcionalidade das mesmas (MARTINEZ-CAYUELA, 1998). Em baixas concentrações, as espécies reativas de oxigênio, especialmente o  $H_2O_2$ , podem atuar como sinalizadores para a ativação do sistema de defesa contra o estresse. Entretanto, sua produção descontrolada pode causar injúrias severas, como a destruição de clorofilas, fragmentação de DNA, peroxidação de lipídeos e extravasamento de íons, causando a morte celular (DODGE, 1994).

### **Ativação do oxigênio e estresse oxidativo**

A ativação do oxigênio ocorre por dois mecanismos principais. O primeiro é dado pela transferência de um éxciton de um aceitador de prótons excitado, que geralmente é um pigmento, a um oxigênio no estado basal, produzindo  $^1O_2$ . Em plantas superiores esta energia é obtida a partir de quantuns de luz que podem ser transferidos pela clorofila ao oxigênio molecular (SCANDALIOS, 2005). O  $^1O_2$  pode se adicionar a ligações duplas de ácidos graxos insaturados, presentes em membranas, formando, por exemplo, lipoperóxidos (LOOP) (LEDFORD; NIYOGI, 2005).

O outro mecanismo é pela redução de oxigênio por transferência de um, dois, três ou quatro elétrons formando, respectivamente,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  e água (ELSTNER, 1991). O processo de formação do ânion superóxido é mediado por enzimas como a NADPH oxidase e xantina oxidase ou por compostos não enzimáticos como a semi-ubiquinona componente da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria (DRÖGE, 2002). O  $O_2^{\cdot-}$  é a base conjugada do radical ácido fraco peridroxila ( $OH_2$ ). Sob condições ácidas, o radical  $OH_2$  é predominante, porém em valores de pH altos predomina o  $O_2^{\cdot-}$  (SCANDALIOS, 2005).

A subsequente redução do oxigênio leva a formação do  $H_2O_2$ , uma molécula de relativa longa vida que pode difundir-se facilmente através de membranas (MITTLER, 2002). A reatividade do  $H_2O_2$  não é significativa em comparação a outros radicais livres, mas a capacidade de reagir com metais pesados pela reação de

Haber-Weiss faz com que se origine o  $\text{OH}^\bullet$  (VAN BREUSEGEM et al., 2001). A desintoxicação enzimática do  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é preferencial nos organismos, devido ao fato do  $\text{OH}^\bullet$  exercer sua ação deletéria rapidamente, apesar de sua curta meia vida e não poder ser transformado enzimaticamente, portanto seria inviável agir diretamente contra ele.

Devido ao potencial destrutivo, as EROs devem ter sua produção finamente controlada (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002). Assim a formação de EROs é uma consequência inevitável do metabolismo dos organismos (MALLICK; MOHN, 2000), portanto, qualquer condição em que a homeostase redox celular seja alterada, pode ser definida como estresse oxidativo. Quando a quantidade de pró-oxidantes é aumentada, ocorre um desbalanço nesse estatus redox, podendo resultar na potencialmente perigosa redução univalente do oxigênio molecular (ALSCHER; DONAHUE; CRAMER, 1997).

### **Herbicidas como fontes de estresse oxidativo**

Alguns herbicidas causam estresse oxidativo (PEIXOTO et al., 2006; SONG et al., 2007) como produto da sua ação, a fim de controlar plantas indesejadas por meio do acúmulo de EROs que levam a peroxidação celular e ao dano molecular (YIN et al., 2008; CHEN et al., 2009). Esses herbicidas têm a capacidade de modificar o balanço redox celular, pela alteração na atividade de enzimas, pela interferência no transporte de elétrons ou pelo dano a outros sistemas de defesa antioxidante (ABDOLLAHI et al., 2004).

Os herbicidas que interferem na fotossíntese, através da inibição da síntese de carotenóides, promovem a ativação e aumento das EROs de maneira indireta, devido a falta de drenagem do excesso de luz, resultando na degradação fotooxidativa e destruição de membranas fotossintéticas (WAKABAYASHI; BÖGER, 2004). As principais enzimas alvo dos herbicidas que afetam a biossíntese de carotenóides são as desaturases. Os sistemas fotossintéticos desprovidos de carotenóides não são estáveis na presença de ar e luz, levando à inibição do desenvolvimento do cloroplasto através de um intrincado sistema de controle que

correlaciona expressão de genes do cloroplasto e do núcleo (MAYFIELD; TAYLOR, 1987).

A enzima protoporfirinogênio oxidase, que faz parte da rota biossintética de clorofilas e tetrapirróis também é alvo da ação de herbicidas. Após a inibição da enzima, o substrato protoporfirinogênio acumulado se difunde para fora do cloroplasto, estando sujeito a uma oxidação que o converte em protoporfirina IX (JUNG; BACK, 2005), levando, na presença de luz, a formação de  $^1\text{O}_2$  com a conseqüente geração de estresse oxidativo (JUNG; KUK, 2003).

Os inibidores do fotossistema I (FSI), a exemplo do paraquat, são herbicidas não seletivos, que interagem com a ferredoxina, competindo com o  $\text{NADP}^+$  pelos elétrons transportados ao longo do fotossistema, tornando-se um radical livre instável, que retornam rapidamente ao estado iônico pela transferência de energia ao oxigênio molecular, produzindo  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e conseqüentemente,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{OH}^{\cdot}$ , que por sua vez, dá início à peroxidação de lipídeos e à rápida degradação das membranas. Enquanto que os inibidores de fotossistema II (FSII), como o diuron, competem com a plastoquinona pelo domínio de ligação na quinona B (QB), interrompendo o fluxo de elétrons no fotossistema, resultando na formação de clorofila tripleto e oxigênio singleto (HESS, 2000).

## **Peroxidação de lipídeos**

A ação dos herbicidas relacionados direta ou indiretamente à fotossíntese culmina na peroxidação de lipídios, sendo que, aproximadamente 90% da membrana plasmática é composta de ácidos graxos insaturados, principalmente, ácido linolênico e ácido linoléico (MEROTTO Jr.; VIDAL, 2001). Os radicais livres presentes no interior celular peroxidam estes lipídios através da remoção de um hidrogênio do grupo metil posicionado próximo à insaturação da cadeia pela ação de um radical livre. Esta primeira oxidação origina um radical lipídico peroxidado, o qual reage com outros lipídios da membrana, formando uma reação em cadeia, tendo como produto final etano (HESS, 2000). Além de etano, os produtos finais da degradação da membrana por radicais livres também podem ser pentano e malondialdeído (MDA), entre outros (MEROTTO Jr.; VIDAL, 2001).

## Mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo

Devido a produção de EROs fazer parte da rotina celular, como resposta aos diversos estresses aos quais estão sujeitos, os vegetais desenvolveram ao longo da evolução, diferentes estratégias de proteção ao dano oxidativo. Adaptações anatômicas como o movimento ou enrolamento das folhas e estômatos escondidos sob estruturas especializadas, adaptações fisiológicas como metabolismo C4 e CAM e mecanismos moleculares, como o rearranjo do aparato fotossintético de acordo com a qualidade da luz, são estratégias utilizadas a fim de minimizar ou evitar o estresse, constituindo uma primeira linha de defesa desenvolvida pelas plantas (LEDFORD; NIYOGI, 2005).

As oxidases alternativas (AOXs) são enzimas que participam da canalização alternativa nas cadeias de transporte de elétrons dos cloroplastos e mitocôndrias, desviando os elétrons, para usá-los na redução do oxigênio à água. Essa estratégia permite a redução da formação de EROs e também da concentração celular de oxigênio (MITTLER, 2002). Como outra estratégia, compostos oxidantes podem agir diretamente sobre as EROs, competindo com outros substratos oxidáveis, portanto, diminuindo significativamente a oxidação destes substratos (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989).

Nesta definição incluem-se as enzimas superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione peroxidase (GPX), guaiacol peroxidase (POD) e catalase (CAT). Também se pode incluir aqueles não enzimáticos, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), e glutathione (GSH) (DRÖGE, 2002). O uso de enzimas implica na vantagem de existir uma ampla variedade de mecanismos de regulação que permitem se adaptar às necessidades celulares (HARRIS, 1992), além de várias destas enzimas poderem ser induzidas, inibidas ou ativadas por efetores endógenos (GRATÃO et al., 2005).

Na aplicação de herbicidas, além do alvo, a cultura e as demais plantas presentes ou próximas à área tratada podem receber o ativo, estando sujeitas a efeitos colaterais, como alterações no metabolismo do nitrogênio, nos níveis hormonais e no metabolismo secundário da planta (RIZZARDI et al., 2003). Wu et al. (2010) observaram aumentos nos níveis de  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  em folhas de arroz expostas ao fluroxipir, sugerindo a presença de estresse oxidativo, enquanto que Beligni e

Lamattina (2002) correlacionaram o aumento na produção de  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$  com o dano fotooxidativo causado pelo diquat em folhas de batata.

O comportamento de enzimas antioxidantes pode variar de acordo com o mecanismo de ação do herbicida aplicado, conforme mostram estudos (GEOFFROY et al., 2002; EKMEKCI; TERZIOGLU, 2005). Bowler et al. (1992) relatam que o estresse fotooxidativo causado pelo paraquat modifica intensamente a atividade da SOD e o nível de proteína CuZn-SOD nas folhas. Pastori e Trippi (1992), bem como Kraus e Fletcher (1994) relatam o mesmo para discos foliares de milho e plântulas de trigo, respectivamente, expostos ao herbicida. A ativação da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase também ocorreu quando folhas *Vicia faba* foram tratadas com nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de óxido nítrico (NO) e expostas a radiação UVB. Houve também a diminuição das injúrias causadas, com aumento do conteúdo de clorofila e rendimento quântico de elétrons no fotossistema II, além de redução do dano oxidativo nas membranas dos tilacóides (SHI et al., 2005).

## **Óxido nítrico**

Uma série de trabalhos tem relatado a atividade do óxido nítrico, endógeno ou fornecido através de compostos doadores, sobre o complexo de defesa antioxidante, sendo sua habilidade em conter o dano celular causado pelas espécies reativas de oxigênio, primeiramente reportada em animais (WOJTASZEK, 1997), o que deu início a uma série de estudos sobre seu papel em vegetais (BELIGNI; LAMATTINA, 2002; ROCKEL et al., 2002; LAMATTINA et al., 2003; NEILL; DESIKAN; HANCOCK, 2003; SHI et al., 2005; QIAN et al., 2009; MISRA; MISRA; SINGH, 2010). Entretanto, existem poucos relatos sobre a aplicação *in planta* do óxido nítrico com o objetivo de proteger plantas do dano oxidativo causado por herbicidas (BELIGNI; LAMATTINA, 1999; CORNIANI et al., 2010; FERREIRA et al., 2011).

O óxido nítrico é um radical livre endógeno, presente em diferentes tipos de células (animal e vegetal) e produzido a partir da atividade da enzima óxido nítrico sintase (BELIGNI; LAMATTINA, 1999). Em plantas, a principal rota de síntese é a partir do nitrito, pela atuação da nitrato redutase, que reduz nitrato para nitrito e pode

reduzir nitrito para óxido nítrico, como observado em *Glycine max* (DELLEDONNE et al., 1998), *Helianthus annuus* (ROCKEL et al., 2002), *Chlamydomonas reinhardtii* (SAKIHAMA; YAMASAKI., 2002) e *Anabaena doliolum* (MALLICK; MOHN., 2000). É um gás lipofílico, eletronicamente neutro e com moderada solubilidade em água (KRASYLENKO et al., 2010), podendo ser encontrado na célula sob a forma de radical livre óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ ), cátion nitrosônico ( $\text{NO}^+$ ) e ânion nitroxil ( $\text{NO}^-$ ) (HONG et al., 2008).

O óxido nítrico está envolvido na regulação do ciclo celular, diferenciação e morfogênese, incluindo o florescimento e a formação de raízes. Promove a plasticidade adaptativa sobre infecções patogênicas, estando envolvido na resposta de hipersensibilidade e na resistência sistêmica adquirida e ainda, aumenta a resistência a estresses abióticos através da sua ação antioxidante (HONG et al., 2008; NEILL et al., 2008). Estimula o crescimento de plantas, (ZHANG et al., 2004; AN et al., 2005; NEILL et al., 2008), bem como de partes da planta, como raízes primárias (HU et al., 2005), hipocótilo (BELIGNI; LAMATTINA, 2002), mesocótilo (ZHANG et al., 2004), raízes laterais, adventícias (CORREA-ARAGUNDE et al., 2006; PAGNUSSAT et al., 2004) e folhas (AN et al., 2005). Segundo Graziano e Lamattina (2005), o NO é capaz de manter a homeostase do ferro e beneficiar o seu transporte interno, promovendo assim, a biossíntese de clorofila e o desenvolvimento de cloroplastos.

O pequeno tamanho da molécula e a ausência de cargas determinam a habilidade do óxido nítrico para a transmissão intercelular de sinais. Já o transporte em longas distâncias é realizado pela S-nitrosoglutationa (GSNO), com o auxílio da transnitrosilação do S para N e S para S de proteínas do grupo thiol (BESSON-BARD; PUGIN; WENDEHENNE, 2008). O óxido nítrico é caracterizado pelas reações de nitração (adição de nitril), nitrosilação (adição de nitrosil), nitrosação (adição do radical livre  $\text{NO}^\bullet$ ) e oxidação (autooxidação e produção de peroxinitrito) (ARASIMOWICZ; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007).

Pode se difundir dentro da célula, do local de síntese para outras regiões onde pode induzir algum efeito pela interação com proteínas específicas. Pode também se difundir para fora da célula, através da membrana plasmática, para células adjacentes, podendo criar, portanto, uma pequena região de células responsivas ao óxido nítrico. Considerando a reatividade do óxido nítrico, tal difusão pode ser limitada, entretanto, alguns autores aceitam a hipótese de que precursores



do óxido nítrico ou compostos de estocagem podem ser transportados, com a geração ou liberação em locais distantes, de forma semelhante ao transporte do precursor de etileno, ACC (MISRA; MISRA; SINGH, 2010). Arginina e nitrito também podem servir como transportadores para precursores de óxido nítrico (ROCKEL et al., 2002; MODOLO et al., 2005).

### **Efeito mitigador do óxido nítrico**

Em diferentes sistemas celulares, foi verificada tanto a atividade protetora, quanto tóxica do óxido nítrico, essa última, principalmente quando em concentrações elevadas desse composto (FILEP et al., 1997). Entretanto, quando a toxicidade é causada por outros radicais livres, como espécies reativas de oxigênio, o óxido nítrico pode proteger a célula, devido a sua capacidade de detoxificar as EROs e suas reações (BELIGNI; LAMATTINA, 1999). Besson-Bard et al. (2008) mostraram que o óxido nítrico exógeno ou sintetizado endogenamente afeta o perfil de expressão de genes que garantem a transdução de sinal, defesa de plantas contra a invasão por patógenos, apoptose, fotossíntese, processos de transporte celular e a produção e detoxificação de espécies reativas de oxigênio.

Assim, a atividade do óxido nítrico como protetor, auxiliando na detoxificação de espécies reativas de oxigênio, que podem causar dano oxidativo, tem sido amplamente relatada. Durner, Wendehenne e Klessig (1998) demonstraram que o tratamento de folhas de *Nicotianum tabaco* com óxido nítrico induziu a expressão de genes de defesa, assim como, Arasimowicz e Floryszak-Wieczorek (2007) verificaram aumentos simultâneos na concentração de NO e nível citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  livre, durante a transdução de sinal iniciada por fatores de estresse bióticos e abióticos, confirmando a participação do óxido nítrico nos processos de defesa.

Há evidências de que o óxido nítrico promove o crescimento de raízes de *Triticum aestivum*, após este ser retardado por baixas concentrações de cloreto de sódio, além de ativar a superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, assim, protegendo as células apicais da raiz contra o dano oxidativo induzido pela salinidade (NEILL et al., 2008). O tratamento de plântulas de milho com nitroprussiato de sódio (SNP) estimulou a absorção e o transporte de  $\text{K}^+$  para os

pontos de crescimento, reduzindo o acúmulo e transporte de  $\text{Na}^+$ , impedindo o extravasamento de eletrólitos (ZHANG; LIU; LIU, 2004), também minimizando, dessa forma, os efeitos da salinidade.

Em arroz, o óxido nítrico retardou a senescência das folhas, quando induzida pelo peróxido de hidrogênio, agindo como um eliminador de EROs (HUNG; KAO, 2003). Em soja, a adição de nitroprussiato de sódio impediu a degradação dos pigmentos fotossintéticos e desacelerou a peroxidação de lipídeos nos cotilédones (JASID et al., 2009), enquanto que o pré-tratamento de folhas de *Phaseolus vulgaris* com SNP mitigou injúrias no aparato fotossintético, induzido pela radiação UVB (SHI et al., 2005). Em nível celular, as propriedades antioxidantes do óxido nítrico manifestaram-se por meio da supressão na peroxidação de lipídeos (BELENGHI et al., 2007).

Evidências têm sido providas de que o óxido nítrico atua como um protetor, mitigando os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio, provenientes da ação de herbicidas que causam, como fruto do seu mecanismo, o estresse oxidativo. Beligni e Lamattina (1999) comprovaram a capacidade do óxido nítrico de proteger plantas de batata do dano causado por herbicidas metilviologens, reduzindo os sintomas visíveis de fitointoxicação e redução dos teores de clorofila, comprovando a atividade antioxidante deste em plantas. Em outros experimentos com paraquat e diquat, Beligni e Lamattina (2002) demonstraram que a ação destrutiva dos mesmos pode ser evitada, devido ao pré-tratamento de plantas de *Solanum tuberosum* e *Oryza sativa*, com doadores de óxido nítrico.

A alga *Chlorella vulgaris*, quando exposta aos herbicidas atrazine e glifosato, em combinação com óxido nítrico exógeno, teve as concentrações de malondialdeído (MDA),  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outras espécies reativas de oxigênio substancialmente diminuídas, acompanhadas pelo aumento no conteúdo de clorofila e enzimas antioxidantes (QIAN et al., 2009). Corniani et al. (2010) constataram que o óxido nítrico fornecido através da solução de SNP teve efeito protetor em relação ao dano causado por oxyfluorfen, reduzindo os teores de lipoperóxidos, recomendando, por esse motivo, a utilização de NO na eucaliptocultura, de maneira a reduzir o estresse oxidativo gerado pelo herbicida. O pré-tratamento de plantas de soja com SNP reduziu as injúrias causadas pelo herbicida lactofen em folíolos jovens, entretanto, nas doses aplicadas, houve redução do crescimento das plantas (FERREIRA et al., 2011).

## Considerações finais

A interação de compostos doadores de óxido nítrico, com os herbicidas causadores de estresse oxidativo, merece ser elucidada, visto que o estudo da resposta antioxidante pode dar informações importantes sobre a tolerância de uma planta à aplicação de um herbicida. Tais informações podem ser decisivas na hora de avaliar a produtividade do cultivo e o dano ao meio ambiente, através das doses necessárias para ativar esses mecanismos de resposta. Embora não haja dúvidas de que as plantas percebem e respondem ao óxido nítrico, os mecanismos pelos quais tal percepção ocorre, bem como a resposta conjugada ao uso de herbicidas, merecem esclarecimentos.

Além disso, desenvolver novas moléculas herbicidas exige um longo e complexo processo, assim, o uso de compostos protetores, que atuam promovendo ou aumentando a seletividade dos produtos já existentes, cria novas possibilidades quanto ao controle de plantas daninhas. Esse aspecto favorece também o manejo de espécies de difícil controle e resistentes, visto que doses podem ser responsabilmente aumentadas ou ainda, herbicidas portadores de mecanismos de ação com uso restrito podem ser seletivamente aplicados.

Os herbicidas causadores de estresse oxidativo, oxyfluorfen (inibidor da Protox), paraquat (inibidor do fotossistema I), diuron (inibidor de fotossistema II) e clomazone (inibidor da síntese de carotenóides) são opções recomendadas para a cultura, permitindo a rotação de diferentes mecanismos de ação. Devido a particularidades como seletividade, capacidade de translocação, momento de aplicação e espectro, a utilização desses produtos pode consistir em uma alternativa viável de manejo de plantas daninhas para a cultura. Ainda, com mecanismos de ação bem documentados, tais herbicidas podem auxiliar na elucidação dos mecanismos protetores do óxido nítrico.

## Referências

ABDOLLAHI, M.; RANJBAR, A.; SHADNIA, S.; NIKFAR, S.; REZAI, A. Pesticides and oxidative stress: a review. **Med Sci Monit**, v. 10, n. 6, p. 141-147, 2004.

ALSCHER, R. G.; DONAHUE, J. L.; CRAMER, C. L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 224-233, 1997.

AN, L.; LIU, Y.; ZHANG, M.; CHEN, T.; WANG, X. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. **J. Plant Physiol.**, v. 162, n. 3, p. 317-326, 2005.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses, **Plant Sci.**, v. 172, n. 5, p. 876-887, 2007.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, 2002.

BELENGHI, B.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; VERCAMMEN, D.; BRACKENIER, A.; INZÉ, D.; DELLEDONNE, M.; VAN BREUSEGEM, F. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1352-1358, 2007.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photo oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species, **Plant Cell Environ**, v. 25, n. 6, p. 737-748, 2002.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 3, n.3, p. 199-208, 1999.

BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. New insights into nitric oxide signaling in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 21-39, 2008.

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 43, p. 83-116, 1992.

CARRILLO, N.; VALLE, E. M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**. v. 2, n. 2. Mar. 2005.

CHEN, J.; SHIYAB, S.; HAN, F. X.; MONTS, D. L.; WAGGONER, C. A.; YANG, Z. M.; SU, Y. Bioaccumulation and physiological effects of Mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 1, p. 110-121, 2009.

CORNIANI, N.; REMAEH, L. M. R.; CATANEO, A. C.; FUMIS, T. F. Ação do óxido nítrico nos teores de lipoperóxidos em *Eucalyptus saligna* tratado com oxyfluorfen. XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. (**Anais...**) Ribeirão Preto – SP. 2010.

CORREA-ARAGUNDE, N.; GRAZIANO, M.; CHEVALIER, C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide modulates the expression of cell-cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato, **J. Exp. Bot.**, v. 57, n. 3, p. 581-588, 2006.

DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R. A.; LAMB, C. 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v. 394, n. 6693, p. 585-588, 1998.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: **Causes of Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants** (Foyer, C. H.; Molineaux, P. M. Eds.), p. 219-236. CRC. Boca Raton. F.L., 1994.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D. F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic gmp, and cyclic adp ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 17, p. 10328-10333, 1998.

EKMEKCI, Y.; TERZIOGLU, S. Effects of oxidative stress unduced by paraquat on wild and cultivated wheats. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 83, n. 2. p. 69-81, 2005.

ELSTNER, E. F. Mechanism of oxigen activation in different compartments of plant cells. In: PELL, E.; STEFFEN, K. **Active oxigen/oxidative stress and plant metabolism**. New York: American Society of plants Physiologists, 1991.

FERREIRA, L. C; CATANEO, A. C; REMAEH, L. M. R; BÚFALO, J; SCAVRONI, J; ANDRÉO-SOUZA, Y; CECHIN, I; SOARES, B. J. A. Morphological and physiological

alterations induced by lactofen in soybean leaves are reduced with nitric oxide. **Planta daninha**, v. 29, n. 4, p. 837-847, 2011.

FILEP, J. G.; LAPIERRE, C. H.; LACHANCE, S.; CHAN, J. S. D. Nitric oxide cooperates with hydrogen peroxide in inducing DNA fragmentation and cell lysis in murine lymphoma cells. **Biochem. J.**, v. 321, p. 897-901, 1997.

GEOFFROY, L.; TEISSEIRE, H.; COUDERCHET, M.; VERNET, G. Effect of oxyfluorfen and diuron alone and in mixture on antioxidative enzymes of *Scenedesmus obliquus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, n. 3, p. 178-185, 2002.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 32, p. 481-494, 2005.

GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 4-8, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2nd ed. Oxford: Clarendon, 1989. 496 p.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB Journal**, v. 6, n. 9, p. 2675-2683, 1992.

HESS, F. D. Review Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Sci.**, v. 48, n. 2, p. 160-70, 2000.

HONG, J. K.; YUN, B. W.; KANG, J. G.; RAJA, M. U.; KWON, E.; SORHAGEN, K.; CHU, C.; WANG, Y.; LOAKE, G. J., Nitric oxide function and signalling in plant disease. **J. Exp. Bot.**, v. 59, n. 2, p. 147-154, 2008.

HU, X.; NEILL, S. J.; TANG, Z.; CAI, W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. **Plant Physiol.**, v. 137, n. 2, p. 663-670, 2005.

HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide. **Journal Plant Physiology**, v. 160, n. 8, p. 871-879, 2003.

JASID, S.; GALATRO, A.; VILLORDO, J. J.; PUNTARULO, S.; SIMONTACCHI, M. role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. **Plant Sci.**, v. 176, n. 5, p. 662-668, 2009.

JUNG, S.; BACK, K. Herbicidal and antioxidant responses of transgenic rice overexpressing *Myxococcus xanthus* protoporphyrinogen oxidase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 423-430, 2005.

JUNG, S.; KUK, Y. I. The expression level of a specific catalase isozyme of maize mutants alters catalase and superoxide dismutase during norflurazon-induced oxidative stress oxidative stress in *Scutella*. **Journal of Pesticide Science**, v. 28, n. 3, p. 287-292, 2003.

KRASYLENKO, Y. A.; YEMETS, A. I.; BLUME, Y. B. Functional role of nitric oxide in plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 4, p. 451-461, 2010.

KRAUS, T. E.; FLETCHER, A. Paclobutrazol protects wheat seedling from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? **Plant Cell Physiol.**, v. 35, n. 1, p. 45-52, 1994.

LAMATTINA, L.; GARCIA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 54, n. 6, p. 109-136, 2003.

LEDFORD, H. K.; NIYOGI, K. K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. **Plant Cell and Environment**, v. 28, n. 8, p. 1037-1045, 2005.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MARTINEZ-CAYUELA, M. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. **Ars Pharmaceutica**, v. 39, n. 1, p. 5-18, 1998.

MAYFIELD, S. P.; TAYLOR, W. C. Chloroplasts photooxidation inhibits the expression of a set of nuclear genes. **Molecular & General Genetics**, v. 208, n. 1, p. 309-314, 1987.

MEROTTO Jr., A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R. A., MEROTTO Jr., A. **Herbicidologia**. Porto Alegre, 2001. cap. 8, p. 69-86, 2001.

MISRA, A. N.; MISRA, M.; SINGH., R. Nitric oxide biochemistry, mode of action and signaling in plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 25, p. 2729-2739, 2010.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MODOLO, L. V.; AUGUSTO, O.; ALMEIDA, I. M. G.; MAGALHAES, J. R.; SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 17, p. 3814-3820, 2005.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J. T. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytol.**, v. 159, n. 1, p. 11-35, 2003.

NEILL, S. et al. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 165-176, 2008.

PAGNUSSAT, G. C.; LANTERI, M. L.; LOMBARDO, M. C.; LAMATTINA, L. Nitric oxide mediates the indolacetic acid induction of a mitogen activated protein kinase cascade involved in adventitious roots development, **Plant Physiol.**, v. 135, n. 1, p. 279-286, 2004.

PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Oxidative stress induces high rate of glutathione reductase synthesis in a drought-resistant maize strain. **Plant Cell Physiol.**, v. 33, n. 7, p. 957-961, 1992.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochem Physiol**, v. 85, n. 2, p. 91-96, 2006.

QIAN, H.; CHEN, W.; LI, J.; WANG, J.; ZHOU, Z.; LIU, W.; FU, Z. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*, **Aquat. Toxicol.**, v. 92, n. 4, p. 250-257, 2009.

RIZZARDI, M. A.; FLECK, N. G.; AGOSTINETTO, D.; BALBINOT JR., A. A. Ação de herbicidas sobre mecanismos de defesa das plantas aos patógenos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 957-965, 2003.



ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W. M. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. **J. Exp. Bot.**, v. 53, n. 366, p. 103-110, 2002.

SAKIHAMA, Y.; YAMASAKI, H. Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminum ions. **Biol. Plant.**, v. 45, n. 2, p. 249-254, 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2005

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2005

SONG, N. H.; YIN, X.; CHEN, G. F.; YANG, H. Biological responses of wheat (*Triticum aestivum*) plants to the herbicide chlorotoluron in soils. **Chemosphere**, v. 68, n. 9, p. 1779-1787, 2007.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

WAKABAYASHI, K.; BÖGER, P. Phytotoxic sites of action for molecular design of modern herbicides (Part 1): the photosynthetic electron transport system. **Weed Biology and Management**, v. 4, n. 1, p. 8-18, 2004.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochem j**, v. 15, n. 3, p. 681-692, 1997.

WU, G. L.; CUI, J.; TAO, L.; YANG, H. Fluroxypyr triggers oxidative damage by producing superoxide and hydrogen peroxide in rice (*Oryza sativa*). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 124-132, 2010.

YIN, X. L.; JIANG, L.; SONG, N. H.; YANG, H. Toxic reactivity of wheat (*Triticum aestivum*) plants to herbicide isoproturon. **J Agri Food Chem**, v. 56, n. 12, p. 4825-4831, 2008.

ZHANG, Y. Y.; LIU, J.; AND LIU, Y. L.; Nitric oxide alleviates growth inhibition of maize seedlings under nacl stress, **Nitric Oxide**, v. 30, n. 4, p. 455-459, 2004.

## CAPÍTULO I

### EXTRAVASAMENTO DE ELETRÓLITOS E EFEITO PROTETOR DE ÓXIDO NÍTRICO EM FOLHAS DE ARROZ IRRIGADO EXPOSTAS A HERBICIDAS *in vitro*

#### Electrolyte leakage and protective effect of nitric oxide on leaves of irrigated rice exposed to herbicides *in vitro*

##### Resumo

Os herbicidas elicitores de estresse oxidativo causam a peroxidação dos lipídeos de membranas, levando ao extravasamento do conteúdo celular. O óxido nítrico endógeno ou fornecido através de compostos doadores tem sido apontado como mitigador do estresse, reduzindo as injúrias causadas pela produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio. Com o objetivo de avaliar o efeito protetor do óxido nítrico no extravasamento de eletrólitos, segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL foram incubados com 0, 5, 50, 500 e 5000  $\mu\text{M}$  dos herbicidas clomazone (360 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ), oxadiazon (250 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ), oxyfluorfen (240 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) e com a mistura formulada de paraquat (200 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) + diuron (100 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ), para a obtenção da condutividade máxima potencial de 50% ( $\text{CMP}_{50}$ ). Posteriormente, segmentos foliares foram pré-tratados com 0, 200 e 2000  $\mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio (SNP) por quatro horas e após, incubados por 48 horas, com 0; 0,5; 1; 2 e 4 vezes a concentração dos herbicidas que causou a  $\text{CMP}_{50}$ , sendo o efeito protetor, reavaliado na presença do seqüestrador de óxido nítrico, carboxyPTIO. A  $\text{CMP}_{50}$  foi causada pela exposição a 188,9; 273,4; 410,2 + 205,1 e 917,0  $\mu\text{M}$  de oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron e clomazone. O pré-tratamento com 200  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu o extravasamento de eletrólitos nos

segmentos foliares expostos à 2 e 4 vezes a  $CMP_{50}$  de oxadiazon e paraquat + diuron, enquanto que 2000  $\mu\text{M}$  reduziu o dano causado pelo oxyfluorfen, nas mesmas concentrações. Assim como, 200 e 2000  $\mu\text{M}$  de SNP foram eficientes para clomazone, sendo a proteção, confirmada pelo carboxyPTIO em todos os casos.

Palavras-chave: *Oryza sativa* L., nitroprussiato de sódio, clomazone, oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron

### Abstract

The herbicides elicitors of oxidative stress cause peroxidation of membrane lipids, leading to leakage of cellular contents. The endogenous nitric oxide or provided through donor compounds has been appointed as mitigator of stress, reducing injuries caused by uncontrolled production of reactive oxygen species. In order to evaluate the protective effect of nitric oxide in leakage of electrolytes, leaf segments of Puita INTA CL rice cultivar were incubated with 0, 5, 50, 500 and 5000  $\mu\text{M}$  clomazone herbicide (360  $\text{g L}^{-1}$  of a.i.) , oxadiazon (250  $\text{g L}^{-1}$  of a.i.), oxyfluorfen (240  $\text{g L}^{-1}$  of a.i.) with the formulated mixture of paraquat (200  $\text{g L}^{-1}$  of a.i.) + diuron (100  $\text{g L}^{-1}$  of a.i.) to obtain the maximum potential conductivity of 50% ( $MPC_{50}$ ). Subsequently, leaf segments were pre-treated with 0, 200 and 2000  $\mu\text{M}$  of sodium nitroprusside (SNP) for four hours and further incubated for 48 hours with 0; 0.5; 1; 2 and 4 times the concentration of the herbicide causing the  $CMP_{50}$ , and the protective effect reassessed in the presence of nitric oxide scavenger, carboxyPTIO. The  $MPC_{50}$  was caused by exposure to 188.9; 273.4; 410.2 + 205.1 and 917.0  $\mu\text{M}$  of oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron and clomazone. The pretreatment with 200  $\mu\text{M}$  of SNP reduced electrolyte leakage in leaf segments exposed to 2 and 4 times the  $MPC_{50}$  to oxadiazon and paraquat + diuron, while 2000  $\mu\text{M}$  reduced the damage caused by oxyfluorfen, at the same concentrations. As well as, 200 and 2000  $\mu\text{M}$  of SNP were efficient for clomazone, and the protection was confirmed by carboxyPTIO in all cases.

Key-words: *Oryza sativa* L., nitroprussiato de sódio, clomazone, oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron.

## Introdução

Os herbicidas inibidores da síntese de carotenóides, da enzima protoporfirinogênio oxidase (protox) e dos fotossistemas I e II são amplamente utilizados na agricultura para o controle de plantas daninhas mono e dicotiledôneas. Para tais mecanismos de ação, a exposição à luz é fundamental para que a fitotoxicidade ocorra, afetando a integridade das membranas, causando danos nos tecidos e conseqüentemente, a morte das plantas (HESS, 2000), como resultado da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singleto ( $^1O_2^*$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^*$ ) (FOYER et al., 1994).

A produção descontrolada de EROs, resultante do estresse oxidativo causado por esses herbicidas, promove injúrias severas, como a destruição de clorofilas, fragmentação de DNA, peroxidação de lipídeos e o extravasamento do conteúdo celular (DODGE, 1994). O óxido nítrico (NO), um radical livre endógeno ou fornecido através de compostos doadores como o nitroprussiato de sódio (SNP), tem sido estudado pela sua habilidade em conter os danos causados pelo estresse oxidativo em plantas (BELIGNI; LAMATTINA, 1999; CORNIANI et al., 2010; FERREIRA et al., 2011), com sua ação protetora confirmada pela utilização do seqüestrador de óxido nítrico carboxyPTIO (cPTIO) (NEILL et al., 2003).

Diversos, porém intrinsecamente específicos, são os mecanismos celulares mitigadores do estresse, atribuídos ao óxido nítrico. Dentre esses estão, a indução da expressão de genes de defesa (DURNER et al., 1998), a ativação das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) (NEILL et al., 2003), supressão de danos (JASID et al., 2009) e aumento do conteúdo de pigmentos fotossintéticos (QIAN et al., 2009), facilitação do transporte interno e manutenção da homeostase do ferro, favorecendo a biossíntese de clorofila e o desenvolvimento de cloroplastos (GRAZIANO; LAMATTINA, 2005), supressão na peroxidação de lipídeos (BELENGHI et al., 2007), por meio da redução nos teores de

malondialdeído (MDA),  $H_2O_2$  e outras espécies reativas de oxigênio (HUNG; KAO, 2003), o que resulta na preservação da integridade das membranas e redução do extravasamento do conteúdo celular.

O extravasamento de íons do interior da célula tem sido utilizado como eficiente parâmetro para o monitoramento do dano causado por mecanismos de ação herbicida que afetam a integridade das membranas, cujos efeitos podem ser rapidamente detectados pela medida do aumento da condutividade eletrolítica da solução na qual os tecidos foram submergidos (KOO et al., 1994, DUKE; KENYON, 1993, YANASE et al., 1990). Estudos desse tipo apresentam dentre muitas vantagens, a possibilidade de teste de um vasto número de tratamentos em um experimento de pequena escala, o que, em condições de casa de vegetação, ou em campo, demandaria grandes espaços e mão-de-obra (GLOMSKI; NETHERLAND, 2013), além da rápida obtenção de resultados, consistindo assim, em uma alternativa para ensaios preliminares.

Simple e reprodutível (DUKE; KENYON, 1993), a condutividade eletrolítica da solução é representativa da injúria ocasionada pelo estresse oxidativo nas membranas (FALK et al., 2006; VANSTONE; STOBBE, 1977) e tem sido utilizada para avaliar o dano potencial de herbicidas como os inibidores de protox (CHOI et al., 1999; DAYAN et al., 1996; LIU; HUANG, 2000, FALK et al., 2006; TREZZI et al., 2011, GLOMSKI; NETHERLAND, 2013), inibidores da síntese de celulose (KOO et al., 1994), inibidores do transporte fotossintético de elétrons (YANASE et al, 1990, KOSCHNICK et al., 2006; KRUSE et al., 2006) e da síntese de carotenóides (KRUSE et al., 2006). Na cultura do arroz irrigado, tais herbicidas surgem como uma alternativa no manejo de plantas daninhas, entretanto, a seletividade dos mesmos , condicionada por diversos fatores de ordem ambiental, carece do uso de protetores.

Este trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, o efeito protetor do óxido nítrico, fornecido através de nitroprussiato de sódio, por meio do extravasamento de eletrólitos de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá Inta CL, expostos a diferentes concentrações dos herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen, clomazone e à mistura formulada de paraquat + diuron.

## Material e métodos

A cultivar Puitá INTA CL foi cultivada em área apropriada para a produção de arroz irrigado, no município de Formigueiro (latitude 30°4',13,6"S e longitude 53°33'0,06"W), Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Foi utilizada a densidade de semeadura de 350 sementes m<sup>-2</sup>, bem como, adotadas as práticas de manejo preconizadas pelas recomendações para a cultura (SOSBAI, 2012), entretanto, sem a aplicação de produtos fitossanitários. No estágio de desenvolvimento de três folhas (V<sub>3</sub>) (COUNCE et al., 2000), as plantas foram transferidas com solo, para vasos e conduzidas ao Laboratório de Herbologia, da Universidade Federal de Santa Maria, onde os experimentos foram realizados.

Três experimentos complementares foram conduzidos para cada herbicida: (I) curvas de dose-resposta aos herbicidas clomazone, oxadiazon, oxyfluorfen e à mistura formulada de paraquat e diuron, (II) efeito protetor do óxido nítrico contra o dano causado pelos herbicidas e por fim, (III) contraprova com o seqüestrador de óxido nítrico, carboxyPTIO. Para tal, folhas de arroz, sem a bainha, foram lavadas em água destilada e secas em papel toalha, para a coleta de 0,5 g de segmentos foliares de aproximadamente 0,25 cm<sup>2</sup>, colocados em tubos falcon contendo 30 ml de solução de incubação, de acordo com o preconizado em cada ensaio e descrito a seguir.

Para a determinação da dose que proporcionou a condutividade máxima potencial de 50% (CMP<sub>50</sub>), os segmentos foliares foram incubados em soluções contendo 1,0 mM do tampão MES (2-(N-morfolino) ácido etanosulfônico), 1% (p v<sup>-1</sup>) de sacarose (pH 6,5) e o herbicida. Dessa forma, foram preparadas soluções concentradas em ingrediente ativo (i.a.) dos herbicidas comerciais clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>), oxadiazon (250 g i.a. L<sup>-1</sup>), oxyfluorfen (240 g i.a. L<sup>-1</sup>) e da mistura formulada de paraquat (200 g i.a. L<sup>-1</sup>) e diuron (100 g i.a. L<sup>-1</sup>) e realizadas diluições de forma a obter as concentrações de 5, 50, 500 e 5000 µM de ingrediente ativo. Na mistura formulada, as concentrações obtidas para o diuron foram de 2,5, 25, 250 e 2500 µM. Na testemunha (padrão), os segmentos foram incubados apenas com a solução tampão.

A condutividade eletrolítica da solução foi medida (Condutivímetro Tec-4MP TECNAL, ajustado para 25°C) em cinco, 24 e 48 horas após o início da incubação,

que ocorreu em câmara de crescimento com temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e luz fluorescente constante, sob 2500 lux (Digital lux meter LD-200 INSTRUTHERM), condições utilizadas para todos os experimentos. Após a última medida, os tubos foram incubados por duas horas em banho-maria, a  $75 \pm 2^\circ\text{C}$ , para a obtenção da condutividade máxima, padrão para todos os experimentos. Os dados de condutividade foram transformados em porcentagem da condutividade máxima (FALK et al., 2006), sendo expressos em condutividade máxima potencial (%) (DAYAN et al., 1997). As concentrações e os períodos de incubação, em fatorial, consistiram nos tratamentos, organizados sob delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Definidas as  $\text{CMP}_{50}$ , segmentos foliares foram incubados por quatro horas, em soluções de 200 e 2000  $\mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio, acompanhadas da testemunha (água destilada). Após esse período, a solução foi completamente removida e substituída pelo meio de incubação, anteriormente descrito, nas concentrações de zero (apenas solução de incubação), 0,5; 1, 2 e 4 vezes a concentração de herbicida correspondente a  $\text{CMP}_{50}$ . Foi realizada a medida da condutividade da solução 48 horas após o início da incubação. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em banho-maria, para a obtenção da condutividade máxima potencial. Os dados foram expressos em CMP (%) e os níveis de concentração de SNP, combinados com as concentrações dos herbicidas, consistiram nos tratamentos, organizados em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições.

Para validar o efeito mitigador de estresse, exercido pelo óxido nítrico, 0,2 g de segmentos foliares foram incubados em 12 ml de água destilada (testemunha), solução de nitroprussiato de sódio ou solução de nitroprussiato de sódio acompanhada de 200  $\mu\text{M}$  de carboxyPTIO, pelo período de quatro horas, nas condições ambientais anteriormente descritas. Após, as soluções foram removidas por completo e adicionado o meio de incubação, contendo solução herbicida nas concentrações de 377,97, 546,8, 1825,94 e  $820,30 + 410,15 \mu\text{M}$ , respectivamente, para oxadiazon, oxyfluorfen, clomazone e paraquat + diuron. A condutividade eletrolítica da solução foi medida 48 horas após o início da incubação com os herbicidas, e após o resfriamento dos tubos, que ao final do período de incubação, foram aquecidos em banho-maria por duas horas, para a obtenção do extravasamento máximo de eletrólitos.

Todos os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade das variâncias e transformados ( $\arcsen(\sqrt{x/100})$ ), quando necessário, para atender aos pressupostos do modelo. Os dados dos experimentos I e II foram submetidos à análise da variância, com posterior regressão, enquanto que os dados do experimento III foram submetidos ao teste t ( $\alpha=0,05$ ), com a comparação pareada dos tratamentos SNP e SNP+ cPTIO com os herbicidas sem pré-tratamento.

## Resultados e discussão

Houve interação entre as concentrações dos herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen e da mistura formulada de paraquat e diuron com os períodos de incubação (Figura 1, a e b, Figura 2, b), enquanto que para o clomazone, a interação não foi estatisticamente significativa (Figura 2, a). Entretanto, como a determinação das concentrações que causaram a condutividade máxima potencial de 50% (CMP<sub>50%</sub>) possibilita a comparação entre os herbicidas, os resultados obtidos foram ajustados por regressão em todos os casos.

O percentual de eletrólitos liberados na solução de incubação, resultante do dano nas membranas, aumentou progressivamente com o incremento na concentração dos herbicidas, ocorrendo o mesmo para os crescentes períodos de incubação. Após cinco horas de incubação, 5000  $\mu\text{M}$  dos herbicidas clomazone e oxadiazon, respectivamente, causaram o extravasamento de 66,46 e 76,18% do total de eletrólitos, com valores intermediários para a mesma concentração de oxyfluorfen e da mistura formulada de paraquat e diuron. Decorridas 24 horas de incubação, tal concentração de clomazone, paraquat + diuron, oxyfluorfen e oxadiazon proporcionou o extravasamento de 72,8; 85,0; 88,1 e 95,7% dos eletrólitos. Após 48 horas, respectivamente, 76,9; 90,4; 96,0 e 95,7% dos eletrólitos celulares foram liberados para a solução.



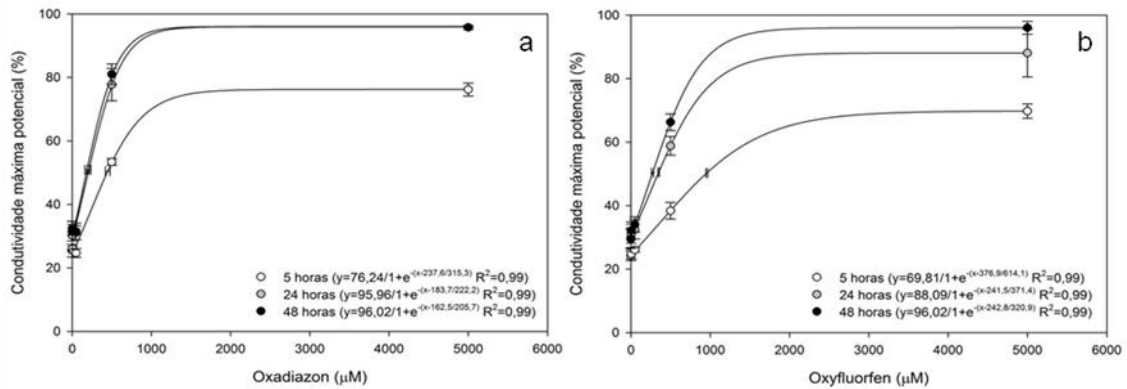


Figura 1 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos a diferentes concentrações dos herbicidas oxadiazon (a) e oxyfluorfen (b), incubados por cinco, 24 e 48 horas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias, enquanto que as barras horizontais correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro da dose que causa 50% de extravasamento dos eletrólitos ( $\text{CMP}_{50}$ ). Santa Maria, 2015.

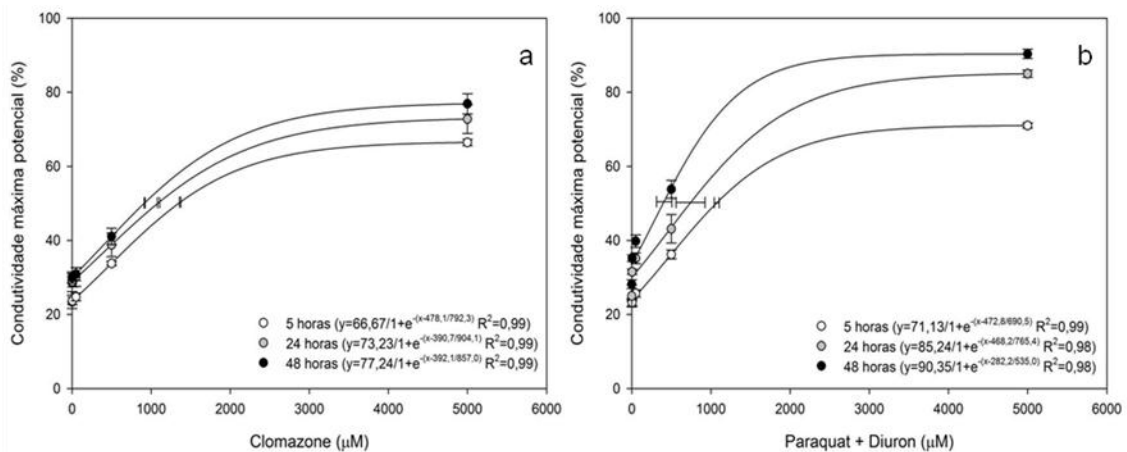


Figura 2 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos a diferentes concentrações dos herbicidas clomazone (a) e paraquat + diuron (b), incubados por cinco, 24 e 48 horas. Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias, enquanto que as barras horizontais correspondem ao intervalo de confiança em 95% de probabilidade de erro da dose que causa 50% de extravasamento dos eletrólitos ( $\text{CMP}_{50}$ ). Santa Maria, 2015.

O ajuste dos dados pelas equações permitiu o cálculo das concentrações necessárias para o extravasamento de 50% dos eletrólitos celulares ( $\text{CMP}_{50}$ ). Após 48 horas de incubação foram necessários 188,9; 273,4; 410,2 + 205,1 e 917,0  $\mu\text{M}$

de oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron e clomazone, para que tal percentual fosse atingido, mesma ordem encontrada para os períodos de incubação de 5 e 24 horas. Entretanto, não houve diferença significativa entre os períodos de incubação de 24 e 48 horas para o herbicida oxadiazon, adotando-se nesse caso, a menor concentração, relativa ao período de incubação de 48 horas, como referência para o experimento seguinte.

O paraquat, um herbicida inibidor do fotossistema I, assim como os inibidores da protox, oxadiazon e oxyfluorfen, exercem rápida ação nas plantas. Todos exigem luz para sua ação, entretanto, a fotossíntese é um requerimento para a atividade dos herbicidas que atuam no transporte fotossintético de elétrons, caso do paraquat e do diuron (DUKE et al., 1991). Além disso, os autores citados ressaltam a capacidade dos inibidores de protox em causar o acúmulo de protoporfirina IX, composto fotodinâmico que no citoplasma e na presença de luz, converte rapidamente o oxigênio molecular em oxigênio singlete, mesmo com a inibição de uma pequena quantidade da enzima cloroplástica.

O pré-herbicida clomazone necessita ser convertido ao metabólito ativo 5-cetoclomazone (DAYAN; WATSON, 2011) para então inibir a 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato sintase (FERHATOGLU; BARRETT, 2006), enzima da rota metileritritol fosfato (MEP) de produção de isoprenóides, sintetizados nos cloroplastos (EISENREICH et al, 2004), culminando na redução nos níveis de caroteno e fitol e por conseguinte, da clorofila (TIMOSSI; ALVES, 2001). Como os carotenóides também exercem papel protetor nos fotossistemas, dissipando o excesso de energia da clorofila no estado excitado, é necessário que, para a ação herbicida, igualmente, ocorra fluxo de elétrons nos fotossistemas. Tais considerações podem explicar a maior atividade do oxadiazon e do oxyfluorfen, em menores concentrações, quando comparados a mistura formulada de paraquat e diuron e ao herbicida clomazone.

Quando expostos ao pré-tratamento com nitroprussiato de sódio e posteriormente, a diferentes concentrações de herbicidas (Tabela 1), o comportamento da condutividade eletrolítica da solução foi dependente da combinação dos níveis de ambos os fatores, indicando uma interação significativa entre estes, para todos os herbicidas avaliados. O pré-tratamento dos segmentos foliares com 200  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu o extravasamento de íons nas concentrações de 2 e 4 vezes a  $\text{CMP}_{50}$  dos herbicidas oxadiazon (Figura 3, a) e paraquat + diuron (Figura 4, b), enquanto que a concentração de 2000  $\mu\text{M}$  de SNP causou redução,

nas mesmas concentrações do herbicida oxyfluorfen (Figura 3, b). Ambas as concentrações de SNP diminuíram a liberação de eletrólitos dos segmentos tratados com 2 e 4 vezes a  $CMP_{50}$  de clomazone (Figura 4, a), não havendo diferença significativa entre 200 e 2000  $\mu M$  de SNP, nesse caso.

Tabela 1 – Concentrações dos herbicidas, proporcionais a 0,5, 1, 2 e 4 vezes a concentração necessária para causar 50% de condutividade máxima potencial ( $CMP_{50}$ ).

Herbicidas	0,5	1	2	4
	----- Concentração ( $\mu M$ de i.a.) -----			
Clomazone	458,9	917,9	1835,9	3681,9
Oxadiazon	94,5	188,9	377,9	755,9
Oxyfluorfen	136,7	273,4	546,8	1093,6
Paraquat + Diuron	205,1 + 102,9	410,2 + 205,1	820,3 + 410,2	1640,6 + 820,3

Embora os segmentos foliares pré-tratados com SNP e expostos às concentrações herbicidas de 2 e 4 vezes a  $CMP_{50}$  tenham apresentado redução de 3,1 a 14,1% no extravasamento de seus eletrólitos, como no caso do paraquat + diuron e oxadiazon, respectivamente, tais concentrações de SNP proporcionaram um leve aumento na condutividade máxima potencial, quando isoladas ou em concentrações menores dos herbicidas. Os efeitos do óxido nítrico em plantas, a muito, têm sido associados à sua concentração (ANDERSON; MANSFIELD, 1979), sendo considerado agente indutor (LESHEM, 1996) ou mitigador do estresse (HSU; KAO, 2004).

O comportamento ambíguo do óxido nítrico, atuando como um potente oxidante e um efetivo antioxidante também foi relatado por Popova e Tuan (2010), apontando a concentração, características da espécie, do ambiente e do estresse elicitor, como condicionantes. Segundo os autores, sob severas condições de estresse e conseqüentemente de EROs, o NO pode interromper a cadeia de peroxidação de lipídeos, limitando o dano, enquanto que isolado, pode agir como uma espécie reativa de nitrogênio e dar início à reações em cadeia, causando injúrias à célula. De acordo com Hayat et al. (2010) o papel citoprotetor do óxido

nítrico é baseado na sua habilidade em manter a homeostase redox e regular o nível e toxicidade das espécies reativas de oxigênio. Caro e Puntarulo (1998) apontam a modulação na formação de superóxido e a inibição da peroxidação de lipídeos como mecanismos de proteção.

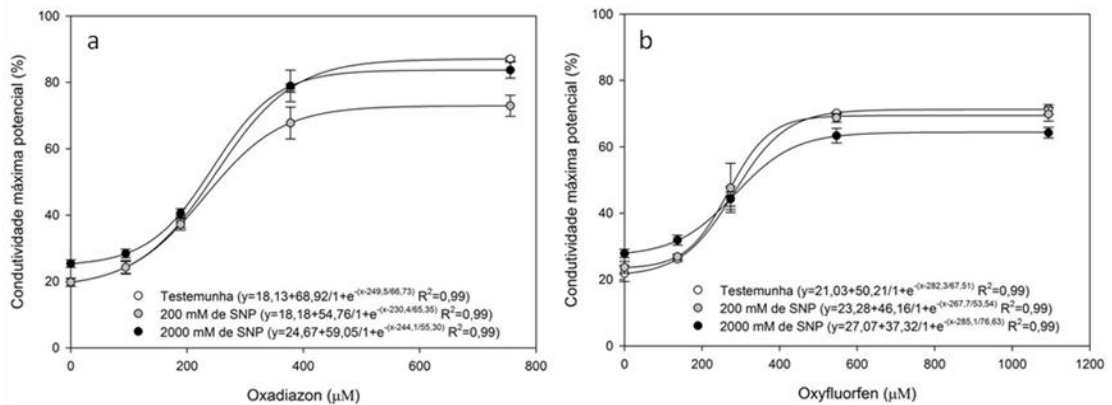


Figura 3 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com 0, 200 e 2000 μM de nitroprussiato de sódio e incubados por 48 horas com diferentes concentrações dos herbicidas oxadiazon (a) e oxyfluorfen (b). Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias. Santa Maria, 2015.

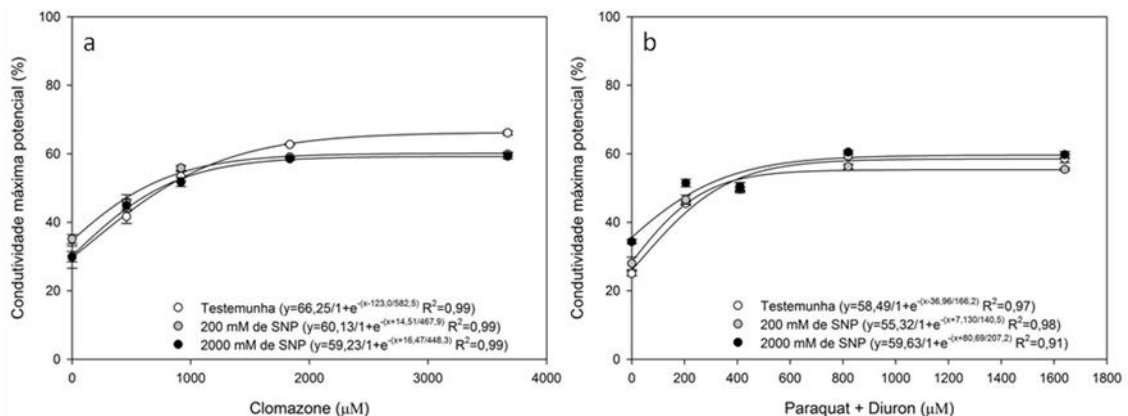


Figura 4 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com 0, 200 e 2000 μM de nitroprussiato de sódio e incubados por 48 horas com diferentes concentrações dos herbicidas clomazone (a) e paraquat + diuron (b). Barras verticais correspondem ao desvio padrão das médias. Santa Maria, 2015.

Em sistemas biológicos, o radical óxido nítrico ( $\text{NO}^{\bullet}$ ) reage muito rapidamente com superóxido, produzindo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), sendo a taxa de formação dependente da concentração das moléculas parentais. Em pH fisiológico, o peroxinitrito é protonado, formando ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), que dependendo da sua concentração, é rapidamente decomposto a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou radical hidroxila (POPOVA; TUAN, 2010). Embora também exerça ação citotóxica, o peroxinitrito e seus subprodutos podem agir como potentes moduladores da regulação redox em várias rotas de transdução de sinal (LIAUDET et al., 2009), através da nitração de proteínas (ARASIMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2011). Contudo, o exato mecanismo que determina a ação tóxica ou citoprotetora do  $\text{ONOO}^-$ , endógeno ou produzido pela reação do NO fornecido exogenamente com o superóxido proveniente do estresse oxidativo, ainda é desconhecido (ARASIMOWICZ-JELONEK & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2011).

O 2-4-carboxifenil-4,4,5,5-tetrametilimidazoline-1-oxyl-3-oxide (carboxyPTIO) tem sido comumente utilizado como um seqüestrador de óxido nítrico (D'ALESSANDRO et al., 2013), a fim de comprovar seu efeito em sistemas biológicos. A condutividade máxima potencial, obtida nos tratamentos com 200  $\mu\text{M}$  de SNP + 377,9  $\mu\text{M}$  de oxadiazon, 2000  $\mu\text{M}$  de SNP + 546,8  $\mu\text{M}$  de oxyfluorfen, 2000  $\mu\text{M}$  de SNP + 1835,9  $\mu\text{M}$  de clomazone e 200  $\mu\text{M}$  de SNP + 820,3  $\mu\text{M}$  de paraquat e 410,2  $\mu\text{M}$  de diuron, acompanhados ou não de carboxyPTIO, estão apresentadas na Figura 5.

Devido à capacidade de reagir com o NO presente no meio, os tratamentos pré-incubados com SNP + cPTIO apresentaram condutividade máxima potencial estatisticamente semelhante à injúria causada pelos herbicidas isolados, enquanto que a combinação SNP + herbicida resultou na redução do extravasamento de íons, confirmando o efeito protetor do NO, em diferentes níveis, para todos os herbicidas testados. Embora tenham bem caracterizado a ação condicionada pela luz, destruição dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas e conseqüente necrose dos tecidos, esses herbicidas possuem diferentes fatores elicitores do processo oxidativo. Oxadiazon e oxyfluorfen causam a formação de oxigênio singleto no citosol, enquanto clomazone, pela ausência da dissipação do excesso de energia das clorofilas causa a formação de clorofila tripleto e oxigênio singleto nos cloroplastos, bem como diuron. Paraquat, ao interagir com o FS I promove a formação de superóxido (HESS, 2000), o que pode explicar o menor percentual de

proteção, dentre os mecanismos de ação avaliados, dada a possibilidade de reação entre o NO e o  $O_2^{\cdot-}$ , formando  $ONOO^-$ . Além disso, o sinergismo entre os mecanismos de ação do paraquat e do diuron promovem, potencialmente, uma maior quantidade de agentes causadores de estresse.

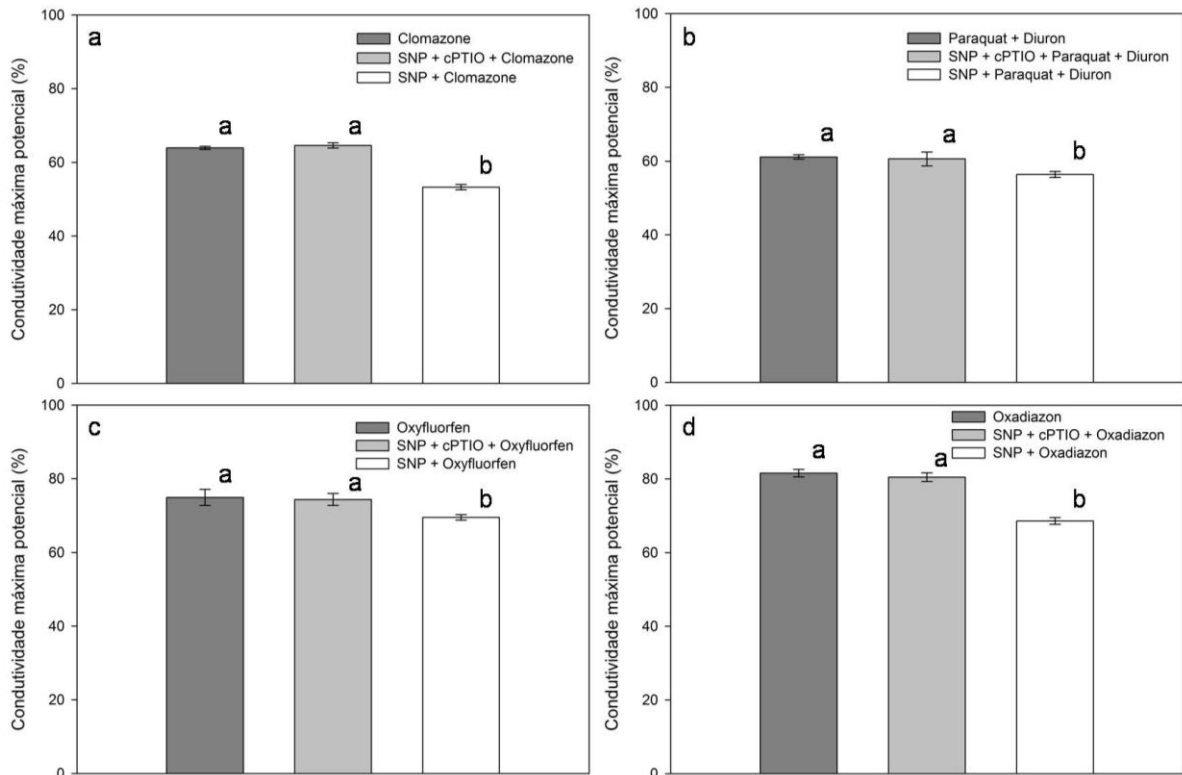


Figura 5 – Condutividade máxima potencial (%) de segmentos foliares da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL expostos ao pré-tratamento com água destilada, nitroprussiato de sódio e/ou cPTIO e incubados por 48 horas com 1835,9; 820,0+410,2; 546,8 e 377,9  $\mu$ M, respectivamente, de (a) clomazone, (b) paraquat + diuron, (c) oxyfluorfen e (d) oxadiazon. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste t ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015.

## Conclusão

Oxadiazon, oxyfluorfen, paraquat + diuron e clomazone apresentaram diferenças quanto a sua atividade herbicida, sendo necessário, respectivamente,

188,9; 273,4; 410,2 + 205,1 e 917,0  $\mu\text{M}$  para a concentração máxima potencial de 50%. O efeito do pré-tratamento dos segmentos foliares com 200  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu o extravasamento de eletrólitos nos segmentos tratados com 2 e 4 vezes a  $\text{CMP}_{50}$  de oxadiazon e paraquat + diuron, enquanto que 2000  $\mu\text{M}$  foi eficiente para as mesmas concentrações de oxyfluorfen. Ambas as concentrações de SNP foram eficientes para clomazone, sendo todos os efeitos, confirmados pelo carboxyPTIO. Nas concentrações de 0,5 vezes a  $\text{CMP}_{50}$ , o pré-tratamento com SNP aumentou o extravasamento de íons, demonstrando certa toxicidade na ausência de estresse.

## Referências

ANDERSON, L.; MANSFIELD, T. A. The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. **Environmental Pollution**, v. 20, n. 2, p. 113-121, 1979.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Understanding the fate of peroxyxynitrite in plant cells from physiology to pathophysiology. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 681-688, 2011.

BELENGHI, B. et al. Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 2, p. 1352-1358, 2007.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Biology and Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 199-208, 1999.

CARO, A.; PUNTARULO, S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. **Free Radical Response**, v. 31 (Supplement), p. 205-212, 1999.

CHOI, J. S. et al. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 65, n. 1, p. 62-72, 1999.

CORNIANI, N. et al. Ação do óxido nítrico nos teores de lipoperóxidos em *Eucalyptus saligna* tratado com oxyfluorfen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA

CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 27., 2010, Ribeirão Preto, SP. **Anais...** Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2010. 1 CD.

COUNCE, P. et al. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

D'ALESSANDRO, S. et al. Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 340, p. 1-7, 2013.

DAYAN F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 182-190, 2011.

DAYAN, F. E. et al. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 634-641, 1997.

DAYAN, F. E. et al. Physiological basis for differential sensitivity to sulfentrazone by sicklepod (*Senna obtusifolia*) and coffee senna (*Cassia occidentalis*). **Weed Science**, v. 44, n.1, p. 12-17, 1996.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H.; MULINEAUX, P. M. **Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 219-236.

DUKE, S. O.; KENYON, W. H. Peroxidizing activity determined by cellular leakage. In: BOGER, P.; SANDMAN, G. **Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds**. Boca Raton: Lewis, 1993. p. 61-66.

DUKE, S. O. et al. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 1991.

DURNER, J. et al. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic gmp, and cyclic adp ribose. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.**, v. 95, n. 17, p. 10328-10333, 1998.

EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway, **Cell Molecular Life Science**, v. 61, n. 2, p. 1401-1426, 2004.



FALK, J. S. et al. Rapid Assay Evaluation of Plant Response to Protoporphyrinogen Oxidase (Protox)-Inhibiting Herbicides. **Weed Technology**, v. 20, n. 1, p. 104-112, 2006.

FERHATOGLU, Y.; BARRETT, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n.1, p. 7-14, 2006.

FERREIRA, L. C. et al. Morphological and physiological alterations induced by lactofen in soybean leaves are reduced with nitric oxide. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 837-847, 2011.

FOYER, C. H. et al. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

GLOMSKI, L. M.; NETHERLAND, M. D. Use of a small-scale primary screening method to predict effects of flumioxazin and carfentrazone-ethyl on native and invasive, submersed plants. **Journal of Aquatic Plant Management**, v. 51, n. 1, p. 45-48, 2013.

GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 4-8, 2005.

HAYAT, S. et al. A. Nitric oxide: Chemistry, biosynthesis, and physiological role. In: HAYAT, S. et al. **Nitric oxide in plant physiology**. Weinheim, John Wiley & Sons, Inc. 2010, Cap.1, p. 1-16.

HESS, F. D. Review Light-dependent herbicides: An overview. **Weed Science**, v. 48, n. 2, p. 160-70, 2000.

HSU, Y.; KAO, C. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 227-238, 2004.

HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide. **Journal Plant Physiology**, v. 160, n. 8, p. 871-879, 2003.

JASID, S. et al. Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. **Plant Science**, v. 176, n. 5, p. 662-668, 2009.

KOO, S. J. et al. Quinclorac-induced electrolyte leakage in seedling grasses. **Weed Science**, v. 42, n. 1, p. 1-7, 1994.

KOSCHNICK, T. J. et al. Documentation of landoltia (*Landoltia punctata*) resistance to diquat. **Weed Science**, v. 54, n. 4, p. 615-619, 2006.

KRUSE, N. D. et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 379-390, 2006.

LESHEM, Y. Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regulation**, v. 18, n. 3, p. 155-169, 1996.

LIAUDET, L. et al. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, n. 1, p. 4809-4814, 2009.

LIU, X.; HUANG, B. Heat stress injury in relation to membrane peroxidation in creeping bentgrass. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 503-510, 2000.

NEILL, S. J. et al. Nitric oxide signalling in plants. **New Phytologist**, v. 159, n. 1, p. 11-35, 2003.

POPOVA, L.; TUAN, T. Nitric oxide in plants: properties, biosynthesis and physiological functions. **Iranian Journal of Science & Technology**, Transaction A, v. 34, n. A3, p. 173-183, 2010.

QIAN, H. et al. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 250-257, 2009.

REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 29., 2012: Gravataí, RS. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Itajaí: Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (SOSBAI). 2012. 188p.

TIMOSSI, P. C.; ALVES, P. L. C. A. Efeitos da deriva de clomazone, aplicado isoladamente ou em mistura com ametryn, sobre características produtivas de laranja hamlin. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 295-304, 2001.

TREZZI, M. M. et al. Eletrolite leakage as a technique to diagnose *Euphorbia heterophylla* biotypes resistant to ppo-inhibitors herbicides. **Planta Daninha**, v. 29, n. 3, p. 655-662, 2011.

VANSTONE, D. E.; STOBBE, E. H. Electrolytic conductivity: A rapid measure of herbicide injury. **Weed Science**, v. 25, n. 4, p. 352-354, 1977.

YANASE, D. et al. A new simple bioassay to evaluate photosynthetic electron-transport inhibition utilizing paraquat phytotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 38, n. 1, p. 92-98, 1990.

## CAPÍTULO II

### ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE ARROZ PRÉ-TRATADAS COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E EXPOSTAS À CLOMAZONE

**Antioxidants in pre-treated rice plants with sodium nitroprusside and exposed to clomazone**

#### **Resumo**

Os carotenóides exercem importante papel na proteção de plantas contra o dano fotooxidativo, assim como o óxido nítrico, capaz de mitigar os efeitos danosos do estresse. Este trabalho teve por objetivo, avaliar o efeito do óxido nítrico em componentes do sistema antioxidante, através do tratamento de sementes, por períodos de embebição de uma e 10 horas em solução de nitroprussiato de sódio (200  $\mu\text{M}$ ) e exposição a 1,7 e 3,4  $\text{L ha}^{-1}$  (p.c.) do herbicida clomazone (360 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ), aplicado em pós-semeadura e no ponto de agulha. O herbicida reduziu os níveis de carotenóides da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL, enquanto que o tratamento das sementes com nitroprussiato de sódio (SNP) aumentou os níveis dos pigmentos e reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, sendo o comportamento, função da dose do herbicida ou nível de estresse causado, bem como do tempo de exposição ao SNP.

**Palavras chave:** clorofila, carotenóides, superóxido dismutase, guaiacol peroxidase

## Abstract

Carotenoids play an important role in plant protection against photo-oxidative damage, as well as the nitric oxide is able to mitigate the deleterious effects of oxidative stress. This study aimed to evaluate the effect of nitric oxide in the antioxidant system components through seed treatment for periods of soaking of one and 10 hours in the sodium nitroprusside solution (200  $\mu\text{M}$ ) and exposure to 1.7 and 3.4  $\text{L h}^{-1}$  of c.p. of herbicide clomazone (360 g a.i.  $\text{L}^{-1}$ ), applied post-seeding and the needle stage. The clomazone reduced levels of carotenoids in the PUITA INTA CL, rice cultivar, while seed treatment with sodium nitroprusside (SNP) increased levels of pigments and reduced the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase, being behavior, herbicide rate function or level of stress caused, and the SNP exposure time.

**Key words:** chlorophyll, carotenoids, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase

## Introdução

O clomazone (2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimethyl-3-isoxazolidinone) é um herbicida inibidor da síntese de precursores dos carotenóides e clorofilas, amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas na cultura do arroz irrigado, podendo ser aplicado em pré-emergência ou em pós-emergência inicial, em associação com outros herbicidas (ANDRES et al., 2013). A ausência de carotenóides interfere no processo da fotossíntese (SCHREIBER et al., 2013), visto que o clomazone bloqueia a formação de isoprenóides cloroplásticos, incluindo pigmentos fotossintéticos, tocoferol e carregadores de elétrons (NORMAN et al., 1990). Além disso, os carotenóides exercem papel protetor nas plantas, dissipando o excesso de energia gerado durante a fotossíntese (HAVAUX; NIYOG, 1990), evitando a produção descontrolada de espécies reativas de oxigênio (EROs), que

podem reagir com macromoléculas em membranas, como os lipídeos, proteínas e DNA (SOUZA et al., 2012), causando a morte das plantas.

Embora seja considerado seletivo para o arroz (MITCHELL; GAGE, 1999), a tolerância ao clomazone é função da dose aplicada, da cultivar (SHERDER et al., 2004), das características do solo e da disponibilidade de água (LEE et al., 2004). A menor taxa de ativação do pré-herbicida pela enzima citocromo P-450 (FERHATOGLU et al., 2005) é apontada como o principal mecanismo de tolerância das plantas, sendo atribuída às características genéticas, o que explica a diferença entre as cultivares (ZHANG et al., 2004). Diversos níveis de injúria são relatados (BOLLICH et al., 2000), visto que, o clomazone pode causar dano e até mesmo, reduzir a densidade da cultura (ANDRES et al., 2013).

Compostos capazes de reduzir a injúria causada por herbicidas são de grande importância para a proteção de plantas. O óxido nítrico (NO) tem sido relatado por conter o dano oxidativo e proteger a célula em diversas situações de estresse (HASANUZZAMAN et al., 2010). Atua detoxificando diretamente as EROs ou ainda, regulando a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD), catalase (CAT) e a glutatona redutase (GR), o que implica na existência de uma interface entre o NO e as EROs (QIAN et al., 2009). O fornecimento exógeno de NO, através de compostos doadores como o nitroprussiato de sódio (SNP) é apontado por reduzir os efeitos deletérios resultantes do estresse oxidativo causado por herbicidas (BELIGNI; LAMATTINA, 1999; BELIGNI; LAMATTINA, 2002; HUNG et al., 2002; SOOD et al., 2012).

Assim o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do óxido nítrico sobre o conteúdo de pigmentos e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, através do tratamento de sementes da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL, por diferentes períodos de embebição em solução de nitroprussiato de sódio (200  $\mu$ M), e exposição às diferentes doses do herbicida clomazone, aplicado em pós-semeadura e no estágio de ponto de agulha.

## Material e métodos

Os experimentos I e II foram conduzidos em área apropriada para o cultivo de arroz irrigado em Formigueiro (latitude 30°4',13,6"S e longitude 53°33'0,06"W), Rio Grande do Sul (RS), Brasil. As principais características físico-químicas do solo encontram-se na tabela 2. As sementes da cultivar Puitá INTA CL foram embebidas em água destilada (testemunha) ou solução contendo 200 µM de nitroprussiato de sódio por uma ou 10 horas. O início do período de embebição foi ajustado de modo que todos os tratamentos foram retirados concomitantemente da solução e imediatamente semeados (350 sementes m<sup>-2</sup>) em solo úmido. As unidades experimentais (6 m<sup>2</sup>) foram pulverizadas com o equivalente a 1,7 (experimento I) e 3,4 L ha<sup>-1</sup> (experimento II) de clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>) em pós-semeadura (24 horas) ou no estágio de ponto de agulha (anterior a emergência das plantas) ou com água destilada, na testemunha.

Tabela 2 – Principais características físico-químicas do solo.

pH água (1:1)	Matéria orgânica (%)	Argila (%)	Textura	P (mg dm <sup>-3</sup> )	K (mg dm <sup>-3</sup> )
5,0	1,8	20	4	3,7	48,0

Para todas as pulverizações, utilizou-se pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub> (HERBICAT, pulverizador pesquisa), equipado com pontas de pulverização 11005, sob pressão de 3,5 kgf cm<sup>-2</sup> e volume de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>. No estágio de três folhas (V<sub>3</sub>) (COUNCE et al., 2000), a parte aérea das plantas foi coletada, lavada em água destilada e as folhas, sem bainha, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e encaminhadas para a criopreservação, no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria, onde as análises bioquímicas foram realizadas.

Para a atividade enzimática e conteúdo protéico, foi utilizado o sobrenadante de 0,5 g de tecido foliar, homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato de potássio

(0,05M, pH 7,8), EDTA 1 mM e Triton X-100 (1%) e centrifugado a 13000 g por 20 minutos a 4°C (ZHU et al., 2004). Os teores de proteína seguiram o método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe nitroblue de tetrazólio (NBT) pela fotorredução de 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade da guaiacol peroxidase (POD) foi mensurada de acordo com Zeraik et al. (2008), onde 50 µL de extrato vegetal foram adicionados à mistura de reação contendo 1,0 ml de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 ml de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A oxidação do guaiacol para tetraguaiacol foi medida através do aumento na absorbância em 470 nm.

As clorofilas (a+b) e carotenóides foram extraídos seguindo o método de Hiscox e Israelslam (1979) e estimados pelo formula de Lichtenthaler (1987), onde 0,05 g de tecido foliar foram incubados (65°C) em dimetilsulfóxido (DMSO), até o completo branqueamento dos tecidos. A absorbância da solução foi medida em 663 e 645 nm para clorofila e 470 nm para carotenóides.

Os tratamentos, organizados em blocos casualizados, com quatro repetições (3,74 m<sup>2</sup> de área útil), foram compostos pelos níveis dos fatores pré-tratamento (testemunha, 200 µM de SNP por uma ou 10 horas) e época de aplicação do clomazone (testemunha, pós-semeadura e ponto de agulha), para cada experimento. Os dados coletados foram analisados quanto a normalidade e homogeneidade das variâncias, transformados quando necessários e submetidos à ANOVA, com as médias separadas pelo teste de Scott-Knott (p=0,05), conforme a significância da interação.

## **Resultados e discussão**

A exposição das plantas de arroz ao clomazone reduziu os níveis de carotenóides, respectivamente, em 4 e 6% nos tratamentos pulverizados, em pós-semeadura e no ponto de agulha, com 1,7 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial (Figura 6a). O dobro da dose reduziu o teor do pigmento em aproximadamente, 20 e 24%, quando



comparado à testemunha (Figura 7a), denotando a injúria causada nas plantas. Contudo, não houve diferença significativa entre as épocas de aplicação do herbicida, em ambos os experimentos. Independentemente da época de aplicação do clomazone, o tratamento das sementes com SNP por uma e 10 horas, respectivamente, aumentou os níveis de carotenóides em 23,7 e 16,2% no experimento com 1,7 L ha<sup>-1</sup> de herbicida (Figura 6b) e 11,7 e 21,3% no experimento com o dobro da dose (Figura 7b).

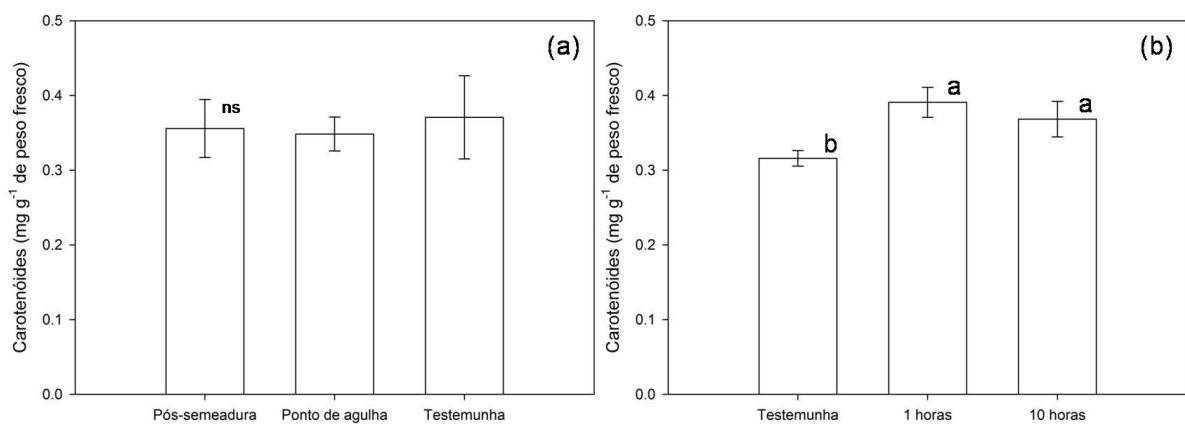


Figura 6 – Níveis de carotenóides em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200 µM de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 1,7 L ha<sup>-1</sup> (p.c.) de clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015.

O pré-herbicida clomazone necessita ser convertido ao metabólito ativo 5-cetoclomazone (DAYAN; WATSON, 2011), para então inibir a 1-deoxi-d-xilulose-5-fosfato sintase (FERHATOGLU; BARRETT, 2006), enzima da rota metileritritol fosfato (MEP) de produção de isoprenóides, sintetizados nos cloroplastos (EISENREICH et al, 2004), culminando na redução nos níveis de caroteno e fitol e por conseguinte, da clorofila (TIMOSSI; ALVES, 2001). No experimento I, os níveis de clorofila a foram aumentados pelo tratamento das sementes com SNP (Figura 8a), independentemente da época de aplicação do herbicida (Figura 8b). No experimento II, houve interação entre os fatores, sendo que os níveis de clorofila a

não foram alterados pelo tratamento das sementes, quando a aplicação do herbicida ocorreu em pós-semeadura. Por outro lado, no ponto de agulha, os níveis foram aumentados 33,7% nas plantas expostas ao SNP por 10 horas (Tabela 3).

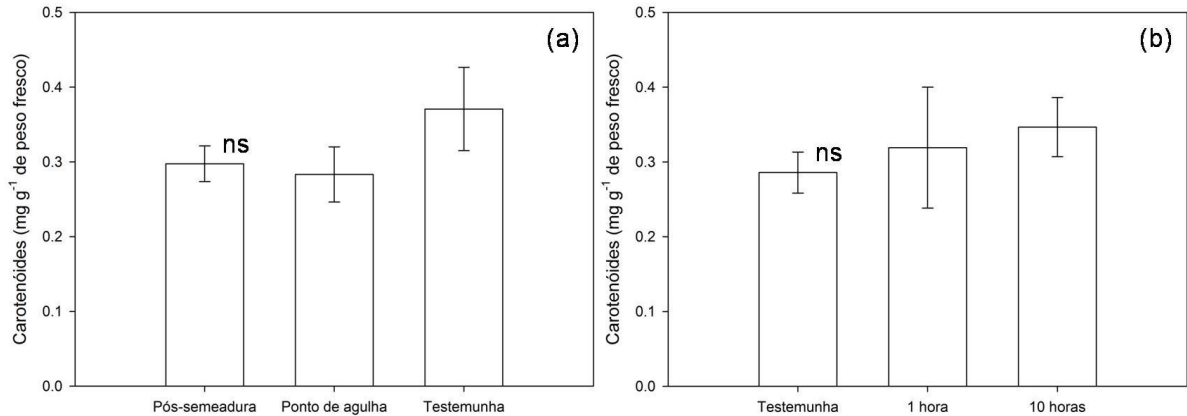


Figura 7 – Níveis de carotenóides em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200  $\mu$ M de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 3,4 L ha<sup>-1</sup> (p.c.) de clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015.

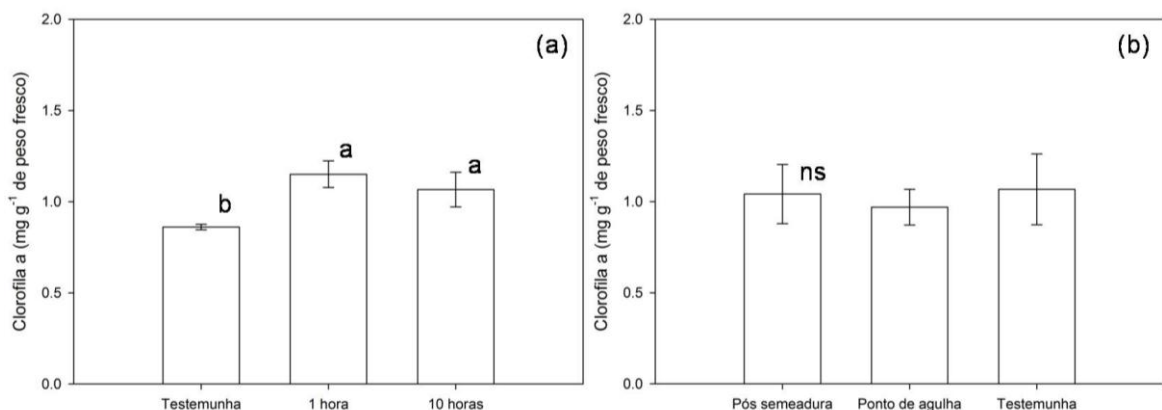


Figura 8 – Níveis de clorofila a em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200  $\mu$ M de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 1,7 L ha<sup>-1</sup> (p.c.) de clomazone (360 g i.a. L<sup>-1</sup>) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015.

Os níveis de clorofila b (Tabela 4) e total (Tabela 5) igualmente foram aumentados pelo tratamento das sementes com SNP em ambos os experimentos, superando, na maioria dos casos, os teores apresentados pela testemunha, sem SNP e herbicida. De maneira geral, a exposição das sementes por uma hora a 200  $\mu\text{M}$  de SNP foi mais efetiva na preservação dos pigmentos das plantas tratadas com 1,7  $\text{L ha}^{-1}$  de clomazone, em pós-semeadura, enquanto que a maior exposição (10 horas) foi efetiva nos tratamentos com 3,4  $\text{L ha}^{-1}$ , aplicados no ponto de agulha, estabelecendo, dessa forma, uma relação entre a concentração absorvida pelas sementes, determinada pelo tempo de exposição, com o nível de injúria causado pelo herbicida.

Tabela 3 – Níveis de clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$  de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com 200  $\mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a 3,4  $\text{L ha}^{-1}$  (p.c.) de clomazone (360 g i.a.  $\text{L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.

Época de aplicação	Nitroprussiato de sódio		
	Sem tratamento	200 $\mu\text{M}$ por 1 hora	200 $\mu\text{M}$ por 10 horas
Pós-semeadura	0,843 $\pm$ (0,162) aA <sup>1</sup>	0,742 $\pm$ (0,075) aB	0,886 $\pm$ (0,103) aB
Ponto de agulha	0,664 $\pm$ (0,096) bB	0,724 $\pm$ (0,074) bB	0,888 $\pm$ (0,134) aB
Testemunha	0,848 $\pm$ (0,131) bA	1,216 $\pm$ (0,096) aA	1,138 $\pm$ (0,149) aA

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

A redução nos teores de clorofila nas plantas tratadas com 3,4  $\text{L ha}^{-1}$  de clomazone, no ponto de agulha e sem SNP, pode ser conseqüência da inibição, pelo herbicida, da formação da cauda fitol que compõe a molécula (SCOTT et al., 1994). Além disso, como pigmentos essenciais em organismos fotossintéticos, os carotenóides têm a função de dissipar o excesso de energia da clorofila durante a fotossíntese, evitando a formação de clorofila tripleto e oxigênio singleto (FOYER et al., 1994). Na ausência desses pigmentos, os tecidos ficam cloróticos e pode ocorrer a destruição dos fotossistemas, inclusive de clorofilas. Entretanto, na maioria dos

tratamentos, o SNP aumentou o teor de clorofilas e carotenóides em relação à testemunha, sem a aplicação de clomazone, indicando, nessas circunstâncias, um aumento na síntese desses pigmentos.

Tabela 4 – Níveis de clorofila b ( $\text{mg g}^{-1}$  de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com  $200 \mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a  $1,7$  e  $3,4 \text{ L ha}^{-1}$  (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.

Época de aplicação	Nitroprussiato de sódio					
	Sem tratamento		200 $\mu\text{M}$ por 1 hora		200 $\mu\text{M}$ por 10 horas	
	$1,7 \text{ L ha}^{-1}$ de clomazone (p.c.)					
Pós-semeadura	0,368 $\pm(0,063)$	$cA^1$	0,725 $\pm(0,052)$	aA	0,496 $\pm(0,037)$	bA
Ponto de agulha	0,376 $\pm(0,019)$	aA	0,473 $\pm(0,106)$	aB	0,410 $\pm(0,019)$	aA
Testemunha	0,371 $\pm(0,061)$	bA	0,630 $\pm(0,087)$	aA	0,552 $\pm(0,152)$	aA
	$3,4 \text{ L ha}^{-1}$ de clomazone (p.c.)					
Pós-semeadura	0,393 $\pm(0,096)$	aA	0,429 $\pm(0,088)$	aB	0,382 $\pm(0,054)$	aB
Ponto de agulha	0,284 $\pm(0,034)$	aA	0,307 $\pm(0,048)$	aB	0,406 $\pm(0,099)$	aB
Testemunha	0,371 $\pm(0,061)$	bA	0,630 $\pm(0,087)$	aA	0,552 $\pm(0,152)$	aA

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

Em plantas de *Vicia faba* tratadas com SNP e expostas a radiação UVB houve redução das injúrias causadas, com aumento do conteúdo de clorofila e rendimento quântico de elétrons no fotossistema II, além de redução do dano oxidativo nas membranas dos tilacóides (SHI et al., 2005). A alga *Chlorella vulgaris*, quando exposta aos herbicidas atrazine e glufosinato, em combinação com óxido nítrico exógeno, apresentou aumento nos teores de clorofila e na atividade de enzimas antioxidantes (QIAN et al., 2009). Segundo Graziano e Lamattina (2005), o NO é capaz de manter a homeostase do ferro e beneficiar o seu transporte interno, promovendo assim, a biossíntese de clorofila e o desenvolvimento de cloroplastos.

Tabela 5 – Níveis de clorofila total ( $\text{mg g}^{-1}$  de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com  $200 \mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a  $1,7$  e  $3,4 \text{ L ha}^{-1}$  (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.

Época de aplicação	Nitroprussiato de sódio					
	Sem tratamento		$200 \mu\text{M}$ por 1 hora		$200 \mu\text{M}$ por 10 horas	
	$1,7 \text{ L ha}^{-1}$ de clomazone (p.c.)					
Pós-semeadura	$2,058 \pm(0,147)$	$cA^1$	$3,170 \pm(0,210)$	$aA$	$2,603 \pm(0,121)$	$bA$
Ponto de agulha	$2,068 \pm(0,051)$	$cA$	$2,590 \pm(0,137)$	$aB$	$2,313 \pm(0,175)$	$bB$
Testemunha	$2,050 \pm(0,138)$	$cA$	$3,265 \pm(0,158)$	$aA$	$2,723 \pm(0,141)$	$bA$
	$3,4 \text{ L ha}^{-1}$ de clomazone (p.c.)					
Pós-semeadura	$2,163 \pm(0,154)$	$aA$	$1,803 \pm(0,198)$	$bB$	$2,110 \pm(0,087)$	$aB$
Ponto de agulha	$1,668 \pm(0,278)$	$bB$	$1,695 \pm(0,185)$	$bB$	$2,220 \pm(0,101)$	$aB$
Testemunha	$2,050 \pm(0,138)$	$cA$	$3,265 \pm(0,158)$	$aA$	$2,723 \pm(0,141)$	$bA$

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

O tratamento onde as sementes foram embebidas com  $200 \mu\text{M}$  de SNP por uma hora e a aplicado de  $1,7 \text{ L ha}^{-1}$  de clomazone, em pós-semeadura, apresentou aumento nos teores de todos os pigmentos, concomitantemente à redução na atividade das enzimas superóxido dismutase (Tabela 6) e guaiacol peroxidase (Tabela 7), apontando para uma possível dissipação do excesso de energia fotossintética pelos pigmentos produzidos, reduzindo a formação de radicais livres que promovem a peroxidação de lipídeos e danos às membranas (CHEN et al., 2009). Contudo, quando as sementes foram tratadas com SNP por 10 horas, a atividade das enzimas foi, respectivamente, aumentada em 59 e 61%, indicando a presença dos substratos superóxido e peróxido de hidrogênio. A ativação de superóxido dismutase e outras enzimas como a ascorbato peroxidase e catalase também ocorreu quando folhas *Vicia faba* foram tratadas com SNP e expostas a radiação UVB (SHI et al., 2005).

A maior disponibilidade de óxido nítrico no meio, ocasionada pelo superior período de embebição pode causar efeito fitotóxico nas plantas. Os efeitos do óxido

nítrico em plantas, a muito, têm sido associados à sua concentração (ANDERSON; MANSFIELD, 1979), sendo considerado agente indutor (LESHEM, 1996) ou mitigador do estresse (HSU; KAO, 2004). O comportamento ambíguo do óxido nítrico, atuando como um potente oxidante e um efetivo antioxidante também foi relatado por Popova e Tuan (2010), apontando a concentração, características da espécie, do ambiente e do estresse elicitor, como condicionantes.

Tabela 6 – Atividade da superóxido dismutase ( $U\ mg^{-1}$  de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com  $200\ \mu M$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a  $1,7\ L\ ha^{-1}$  (p.c.) de clomazone ( $360\ g\ i.a.\ L^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.

Época de aplicação	Nitroprussiato de sódio		
	Sem tratamento	$200\ \mu M$ por 1 hora	$200\ \mu M$ por 10 horas
Pós-semeadura	$14,06 \pm(0,688)$ bA <sup>1</sup>	$11,89 \pm(1,211)$ cB	$20,80 \pm(2,19)$ aA
Ponto de agulha	$14,45 \pm(0,999)$ aA	$13,58 \pm(1,261)$ aA	$13,16 \pm(0,39)$ aB
Testemunha	$13,06 \pm(0,768)$ aA	$11,84 \pm(1,748)$ aB	$12,08 \pm(1,47)$ aB

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

No experimento II, a aplicação de  $3,4\ L\ ha^{-1}$  de clomazone, aumentou a atividade da SOD, independentemente da época de aplicação do herbicida (Figura 9a), enquanto que o tratamento das sementes com SNP reduziu a atividade da enzima, porém não diferindo da testemunha, sem tratamento (Figura 9b). A exposição das sementes ao SNP por uma hora não alterou os níveis de pigmentos e enzimas das plantas do experimento II, enquanto que o maior período de exposição aumentou o nível das clorofilas e carotenóides. Em soja, a adição de nitroprussiato de sódio promoveu a retenção dos pigmentos fotossintéticos e desacelerou a peroxidação de lipídeos nos cotilédones (JASID et al., 2009), assim como, em *Phaseolus vulgaris*, onde o pré-tratamento das folhas com SNP mitigou injúrias no aparato fotossintético, induzido pela radiação UVB (SHI et al., 2005).

Tabela 7 – Atividade da guaiacol peroxidase ( $\text{U mg}^{-1}$  de proteína) em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com  $200 \mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a  $1,7$  e  $3,4 \text{ L ha}^{-1}$  (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Santa Maria, 2015.

Época de aplicação	Nitroprussiato de sódio		
	Sem tratamento	$200 \mu\text{M}$ por 1 hora	$200 \mu\text{M}$ por 10 horas
	1,7 L ha <sup>-1</sup> de clomazone (p.c.)		
Pós-semeadura	14,18 $\pm$ (1,455) bB <sup>1</sup>	11,11 $\pm$ (1,054) cA	21,39 $\pm$ (1,539) aA
Ponto de agulha	16,18 $\pm$ (1,222) aA	12,68 $\pm$ (1,483) bA	11,74 $\pm$ (2,140) bB
Testemunha	13,30 $\pm$ (1,588) aB	7,56 $\pm$ (0,641) bB	7,29 $\pm$ (0,849) bC
	3,4 L ha <sup>-1</sup> de clomazone (p.c.)		
Pós-semeadura	13,42 $\pm$ (1,088) bB	16,90 $\pm$ (1,070) aA	12,36 $\pm$ (0,888) bB
Ponto de agulha	16,02 $\pm$ (2,390) aA	15,94 $\pm$ (0,923) aA	16,50 $\pm$ (0,908) aA
Testemunha	13,10 $\pm$ (1,588) aB	7,56 $\pm$ (0,641) bB	7,29 $\pm$ (0,849) bC

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

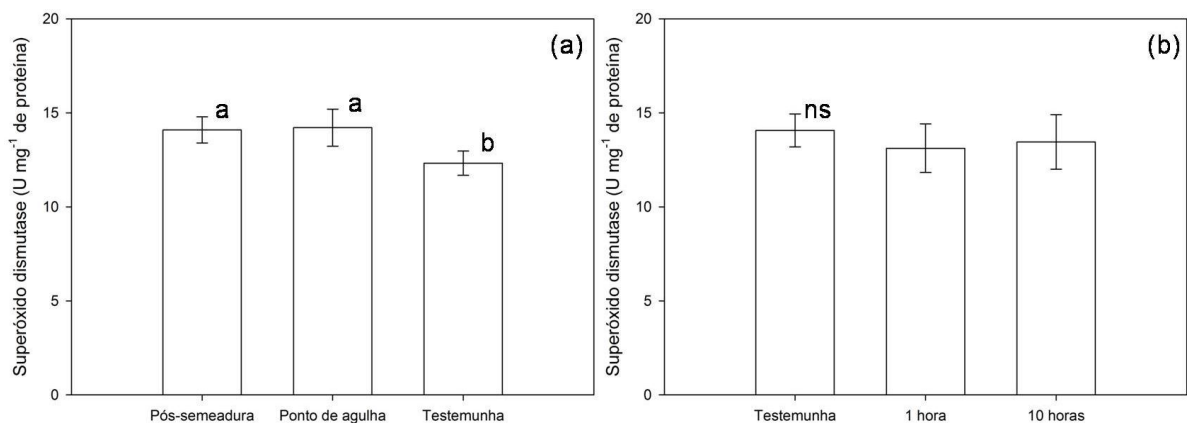


Figura 9 – Atividade da superóxido dismutase em plantas de arroz da cultivar Puitá INTA CL pré-tratadas com  $200 \mu\text{M}$  de nitroprussiato de sódio por uma e 10 horas e expostas a  $3,4 \text{ L ha}^{-1}$  (p.c.) de clomazone ( $360 \text{ g i.a. L}^{-1}$ ) em pós-semeadura e no ponto de agulha. Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ) enquanto que as barras verticais representam o desvio padrão da média. Santa Maria, 2015.

## Conclusão

O herbicida clomazone reduziu os níveis de carotenóides da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL, enquanto que o tratamento das sementes com nitroprussiato de sódio aumentou os níveis dos pigmentos e reduziu a atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, quando as sementes foram embebidas por uma hora em solução de nitroprussiato de sódio e expostas a 1,7 L ha<sup>-1</sup> de clomazone. Nessa mesma circunstância, o tratamento com SNP por 10 horas aumentou a atividade enzimática, indicando uma possível toxicidade. O comportamento foi função da dose do herbicida, ou nível de estresse causado, bem como do tempo de exposição ao SNP.

## Referências

ANDERSON, L.; MANSFIELD, T. A. The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. **Environmental Pollution**, v. 20, n. 2, p. 113-121, 1979.

ANDRES, A.; CONCENÇO, G.; THEISEN, G.; VIDOTTO, F.; FERRERO, A. Selectivity and weed control efficacy of pre- and post-emergence applications of clomazone in Southern Brazil. **Crop Protection**, v. 53, n. 1, p. 103-108, 2013.

BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. **Analytical Biochemistry Journal**, v. 44, n. 11, p. 276-287, 1971.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant, Cell and Environmental**, v. 25, n. 6, p. 737-748, 2002.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Biology and Chemistry**, v. 3, n. 3, p. 199-208, 1999.



BOLLICH, P. K.; JORDAN, D. L.; WALKER, D. M.; BURNS, A. B. Rice (*Oryza sativa*) response to the microencapsulated formulation of clomazone. **Weed Technology**, v. 14, n. 1, p. 89-93, 2000.

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.

CHEN, J.; SHIYAB, S.; HAN, F. X.; MONTS, D. L.; WAGGONER, C. A.; YANG, Z. M.; SU, Y. Bioaccumulation and physiological effects of Mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 1, p. 110-121, 2009.

COUNCE, P. et al. Uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

DAYAN F. E.; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light dependent and light-independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 101, n. 3, p. 182-190, 2011.

EISENREICH, W. et al. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway, **Cell Molecular Life Science**, v. 61, n. 2, p. 1401-1426, 2004.

FERHATOGLU, Y.; AVDIUSHKO, S.; BARRET, M. The basic for safening of clomazone by phorate insecticide in cotton and inhibitors of cytochrome P450s. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 1, p. 59-70, 2005.

FERHATOGLU, Y.; BARRET, M. Studies of clomazone mode of action. **Pesticide Biochemical and Physiology**, v. 85, n. 1, p. 7-14, 2006.

FOYER, C. H. et al. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxidedismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, 309-314, 1977.

GRAZIANO, M.; LAMATTINA, L. Nitric oxide and iron in plants: an emerging and converging story. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 1, p. 4-8, 2005.

HASANUZZAMAN, M. et al. Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. **American Journal of Plant Physiology**, v. 6, n. 6, p. 295-324, 2010.

HAVAUX, M.; NIYOGI, K. K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 15, p. 8762-8767, 1999.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. p. 1132-1334, 1979.

HSU, Y.; KAO, C. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 3, p. 227-238, 2004.

JASID, S.; GALATRO, A.; VILLORDO, J. J.; PUNTARULO, S.; SIMONTACCHI, M. role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. **Plant Science**, v. 176, n. 5, p. 662–668, 2009.

LEE, D. J. et al. Soil characteristics and water potential effects on plant-available clomazone in rice. **Weed Science**, v. 52, n. 2, p. 310-318, 2004.

LESHEM, Y. Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regulation**, v. 18, n. 3, p. 155-169, 1996.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, 350-382, 1987.

MITCHELL, H. R.; GAGE, E. V. Command 3 ME: weed control in southern rice. **Proceedings Southern Weed Science Society**, v. 52, p. 186, 1999.

NORMAN, M. A.; LIEBL, R. A.; WIDHOLM, J. M. Uptake and metabolism of clomazone in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. **Plant Physiology**, v. 92, n. 3, p. 777–784, 1990.

POPOVA, L.; TUAN, T. Nitric oxide in plants: properties, biosynthesis and physiological functions. **Iranian Journal of Science & Technology**, Transaction A, v. 34, n. A3, p. 173-183, 2010.

QIAN, H. et al. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 250-257, 2009.

SCHREIBER, F.; AVILA, L. A.; SCHERNER, A.; MOURA, D. S.; HELGUEIRA, D. B. Plantas indicadoras de clomazone na fase vapor. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p.1817-1823, 2013.

SCOTT, J. E.; WESTON, L. A.; CHAPPELL, J.; HANLEY, K. Effects of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous species, **Weed Science**, v. 42, p. 509-516, 1994.

SHERDER, E. F.; TALBERT, R. E.; CLARK, S. D. Rice (*Oryza sativa*) cultivar tolerance to clomazone. **Weed Technology**, v. 18, n. 1, p. 140-144, 2004.

SHI, S.; WANG, G.; WANG, Y.; ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2005.

SOOD, A. et al. Differential responses of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in *Azolla microphylla* exposed to paraquat and nitric oxide. **Biologia**, v. 67, n. 6, p. 1119-1128, 2012.

SOUZA, R. C.; FERREIRA, D. T. R. G.; VITORINO, H. S.; BARBOSA, G. V. S.; ENDRES, L.; FERREIRA, V. M. Oxidative stress in *Emilia coccinea* (Asteraceae) caused by a mixture of Clomazone + Ametryn. **International Research Journal of Plant Science**, v. 3, n. 5, p. 80-87, 2012.

TIMOSSI, P. C.; ALVES, P. L. C. A. Efeitos da deriva de clomazone, aplicado isoladamente ou em mistura com ametryn, sobre características produtivas de laranjeira hamlin. **Planta Daninha**, v. 19, n. 2, p. 295-304, 2001.

ZERAIK, A. E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

ZHANG, W. et al. Differential tolerance of rice (*Oryza sativa*) varieties to clomazone. **Weed Technology**, v. 18, n. 1, p. 73-76, 2004.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 527-533, 2004.

## CAPÍTULO III

### PROTEÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE ARROZ IRRIGADO PRÉ-TRATADAS COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO E EXPOSTAS A HERBICIDAS

**Protection of nitric oxide in rice plants pre-treated with sodium nitroprusside  
and exposed to herbicides**

#### **Resumo**

O óxido nítrico possui atividade antioxidante, entretanto, os mecanismos pelo qual reduz as injúrias causadas pelo estresse oxidativo são muito específicos e os resultados, provenientes de ensaios conduzidos em condições controladas. Este trabalho teve por objetivo avaliar a proteção do óxido nítrico, fornecido através de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio (0, 200 e 2000  $\mu\text{M}$ ), em plantas de arroz irrigado expostas, em condições de campo, a diferentes níveis de estresse, causado pelos herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen e pela mistura formulada de paraquat e diuron. O óxido nítrico reduziu os danos causados pelos herbicidas nas plantas de arroz, através da redução nos níveis de oxidantes ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e conseqüentemente, de lipídeos peroxidados, o que reduziu a atividade das enzimas antioxidantes.

**Palavras-chave:** Estresse oxidativo, estresse nitrosativo, espécies reativas de oxigênio, peroxidação de lipídeos, superóxido dismutase, guaiacol peroxidase.

## Abstract

Nitric oxide has antioxidant activity, however, the mechanisms by which reduces injuries caused by oxidative stress are very specific and the results from trials conducted under controlled conditions. This study aimed to assess the protection of nitric oxide, supplied through different concentrations of sodium nitroprusside (0, 200 and 2000  $\mu\text{M}$ ) in exposed rice plants under field conditions at different levels of stress, caused by herbicides oxadiazon, oxyfluorfen and the formulated mixture of paraquat and diuron. Nitric oxide reduced the damage caused by herbicides in rice plants by reducing the levels of oxidants ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and therefore, peroxidized lipids, reducing the activity of antioxidant enzymes.

**Key words:** Oxidative stress, nitrosative stress, reactive oxygen species, lipids peroxidation, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase.

## Introdução

Injúrias mecânicas, déficit e excesso hídrico, salinidade, excesso de luz, radiação UV, temperaturas extremas, elementos traço, ozônio, patógenos, herbicidas, dentre outros, são elicitores, que levam à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GOULD et al., 2004) como o oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ), gerados nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (SOOD et al., 2012). Sob condições normais, a concentração de tais espécies é finamente controlada por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (APEL; HIRT, 2004), como parte da rotina celular (MITTLER, 2002). Entretanto, em condições de estresse oxidativo, as EROs podem destruir organelas, danificar membranas e inibir a expressão de genes (FOYER et al., 1994).

Compostos capazes de reduzir a injúria causada por tais estresses são de grande importância para a proteção de plantas. O óxido nítrico (NO) tem sido relatado por conter o dano oxidativo e proteger a célula em diversas situações de estresse (HASANUZZAMAN et al., 2010). É um radical livre gasoso, altamente

reativo, logo, de meia-vida relativamente curta, que pode ser encontrado na forma radicalar ( $\text{NO}^\bullet$ ), catiônica ( $\text{NO}^+$ ) e aniônica ( $\text{NO}^-$ ) (VANDELLE; DELLEDONNE, 2011). Em plantas, está envolvido em diversos processos fisiológicos e bioquímicos, como a regulação do ciclo celular, morfogênese e diferenciação (LIU et al., 2011), resposta de hipersensibilidade e resistência sistêmica adquirida a patógenos, bem como, no aumento da resistência a estresses abióticos (HONG et al., 2008; NEILL et al., 2008). Além disso, é relatado como mensageiro secundário nos processos de defesa (QIAN et al., 2009), exercendo proeminente papel na ativação de diversas respostas a estresses ambientais (DELLEDONE et al., 2001).

Como mitigador do estresse, o NO atua detoxificando diretamente as EROs ou ainda, regulando a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPX), catalase (CAT) e a glutathione redutase (GR), o que implica na existência de uma interface entre o NO e as EROs (QIAN et al., 2009). O fornecimento exógeno de NO, através de compostos doadores como o nitroprussiato de sódio (SNP) é apontado por reduzir os efeitos deletérios resultantes do estresse oxidativo, causado, dentre outras fontes, pela toxicidade de herbicidas como o paraquat e diquat (BELIGNI et al., 1999; BELIGNI; LAMATTINA, 2002; HUNG et al., 2002; SOOD et al., 2012).

A ação destrutiva de bupiridilos foi reduzida pelo pré-tratamento de folhas de *Solanum tuberosum* e *Oryza sativa* com doadores de óxido nítrico (BELIGNI; LAMATTINA, 2002). Quando atrazine e glufosinato foram combinados com SNP, houve substancial redução nas concentrações de malondialdeído (MDA),  $\text{H}_2\text{O}_2$  e outras EROs, concomitante com o aumento nos teores de clorofilas e atividade de enzimas antioxidantes na alga *Chorella vulgaris* (QIAN et al., 2009). Corniani et al. (2010) constataram a redução nos teores de lipoperóxidos provenientes da aplicação de oxyfluorfen, recomendando, por esse motivo, a utilização de NO na eucaliptocultura, de maneira a reduzir o estresse oxidativo gerado pelo herbicida. O pré-tratamento de plantas de soja com SNP reduziu as injúrias causadas pelo herbicida lactofen em folíolos jovens, entretanto, nas doses aplicadas, houve redução do crescimento das plantas (FERREIRA et al., 2011).

Porém, em diferentes sistemas celulares, foi verificada tanto a atividade protetora, quanto tóxica do óxido nítrico, essa última, principalmente quando em concentrações elevadas do composto (FILEP et al., 1997; YOSHIE; OHSHIMA, 1997). De acordo com Ederli et al. (2009), a concentração de NO liberado é

diretamente dependente da concentração de SNP e o efeito pró ou antioxidante depende da produção relativa de NO e  $O_2^{\cdot-}$  (HASANUZZAMAN et al., 2010; HABIB; ALI, 2011). Assim, é possível que a atividade protetora ou tóxica do NO esteja associada também à concentração de EROs nos tecidos, variando de acordo com o nível de estresse produzido. Além disso, as informações disponíveis estão limitadas a condições controladas, existindo a necessidade de inferir sobre a possibilidade de uso de doadores de óxido nítrico em ampla escala, na proteção de cultivos. Na cultura do arroz irrigado, tais mecanismos podem auxiliar no manejo de plantas daninhas, conferindo maior seletividade para herbicidas atualmente subutilizados e importantes para a rotação de mecanismos de ação, com vistas a minimizar o impacto da resistência de plantas daninhas a herbicidas.

Esse trabalho teve por objetivo avaliar a proteção do óxido nítrico, fornecido através de diferentes concentrações de nitroprussiato de sódio, em plantas de arroz irrigado expostas, em condições de campo, a diferentes níveis de estresse, causado pelos herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen e pela mistura formulada de paraquat e diuron.

## **Material e métodos**

A cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL foi cultivada em área apropriada para a produção de arroz irrigado, no município de Formigueiro (latitude 30°4',13,6"S e longitude 53°33'0,06"W), Rio Grande do Sul. Foi utilizada a densidade de semeadura de 350 sementes  $m^{-2}$ , bem como, adotadas as práticas de manejo preconizadas pelas recomendações para a cultura (SOSBAI, 2012), entretanto, sem a aplicação de produtos fitossanitários. No estágio de desenvolvimento de três folhas ( $V_3$ ) (COUNCE et al., 2000), as plantas foram pulverizadas por duas vezes consecutivas, em intervalo de 24 horas, com 0 (água destilada), 200 ou 2000  $\mu M$  de nitroprussiato de sódio.

Após 24 horas da última aplicação de SNP, as plantas foram pulverizadas com o equivalente a 1,0  $L ha^{-1}$  do produto comercial contendo oxadiazon (250 g i.a.  $L^{-1}$ ), oxyfluorfen (240 g i.a.  $L^{-1}$ ) e da mistura formulada de paraquat (200 g i.a.  $L^{-1}$ ) + diuron (100 g i.a.  $L^{-1}$ ), enquanto que a testemunha recebeu apenas água destilada.

Para todas as pulverizações, utilizou-se pulverizador costal pressurizado com CO<sub>2</sub> equipado com pontas de pulverização 11005, sob pressão de 3,5 kgf cm<sup>-2</sup> e volume de calda equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup>. Decorridos três dias da aplicação dos herbicidas, a parte aérea das plantas foi coletada, lavada em água destilada e as folhas, sem bainha, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e encaminhadas para a criopreservação (-80°C), no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade Federal de Santa Maria, onde as análises bioquímicas foram realizadas.

O dano nas membranas foi avaliado por meio do extravasamento de íons para a solução, onde 0,5 g de segmentos foliares frescos (0,25 cm<sup>2</sup>) foram imersos em tubos falcon contendo 30 mL de água destilada por 24 horas, em temperatura ambiente e sob agitação constante e após, aquecidos em banho-maria (75°C) por duas horas. A condutividade eletrolítica da solução, medida ao final do período de incubação e após o resfriamento das amostras, sendo os dados, transformados em porcentagem da condutividade máxima (FALK et al., 2006) e expressos em condutividade máxima potencial (%) (DAYAN et al., 1997).

A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinada conforme Loreto e Velikova (2001), onde aproximadamente 0,3 g de tecido foliar congelado foram homogeneizados em 2 ml de TCA 0,1% (p/v). O homogenato, com 0,5 ml de tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0) e 1 mL de KI (1M) foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos, a 4°C. A concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no sobrenadante foi avaliada pela comparação da absorbância obtida em 390 nm com a curva padrão de calibração.

A peroxidação de lipídeos foi estimada seguindo o métodos de El-Moshaty et al. (1993). Amostras de 0,5 g de tecido foliar congelado foram homogeneizadas em 2 mL de tampão citrato-fosfato (0,2M, pH 6,5) contendo 0,5% de Triton X-100, em almofariz e pistilo. O homogenato foi filtrado e centrifugado por 15 minutos a 20000 g. Ao sobrenadante (1,0 mL), foi adicionado igual volume de TCA (20%, p/v), contendo ácido tiobarbitúrico (0,5%, p/v). A mistura foi aquecida a 95°C por 40 minutos, rapidamente resfriada em gelo por 15 minutos e centrifugada a 10000 g por 15 minutos. A absorbância do sobrenadante, lida em 532 nm, teve subtraído o valor da absorbância em 600 nm. Para o cálculo dos dados foi utilizado o coeficiente de extinção de 155 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

Para a atividade enzimática e conteúdo protéico, foi utilizado o sobrenadante de 0,5 g de tecido foliar, homogeneizado em 3 mL de tampão fosfato de potássio



(0,05M, pH 7,8), EDTA 1 mM e Triton X-100 (1%) e centrifugado a 13000 g por 20 minutos a 4°C (ZHU et al., 2004). Os teores de proteína seguiram o método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima que inibe nitroblue de tetrazólio (NBT) pela fotorredução de 50% (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). A atividade da guaiacol peroxidase (POD) foi mensurada de acordo com Zeraik et al. (2008), onde 50 µL de extrato vegetal foram adicionados à mistura de reação contendo 1,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,5), 1,0 mL de guaiacol (15 mM) e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A oxidação do guaiacol para tetraguaiacol foi medida através do aumento na absorbância em 470 nm.

As clorofilas (a+b) e carotenóides foram extraídos seguindo o método de Hiscox e Israelslam (1979) e estimados pelo fórmula de Lichtenthaler (1987), onde 0,05 g de tecido foliar foram incubados (65°C) em dimetilsulfóxido (DMSO), até o completo branqueamento dos tecidos. A absorbância da solução foi medida em 663 e 645 nm para clorofila e 470 nm para carotenóides.

Os tratamentos, compostos pelos níveis dos fatores concentração de SNP e pelos herbicidas, foram instalados em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições com área útil de 4 m<sup>2</sup>. Os dados, coletados em duplicata, foram analisados quanto à normalidade, homogeneidade das variâncias e transformados, quando necessário. Após a ANOVA, procedeu-se às análises cabíveis, conforme a significância das interações.

## **Resultados e discussão**

Os herbicidas avaliados causaram diferentes níveis de injúria nas plantas, atendendo ao pressuposto de avaliar os mecanismos mitigadores do óxido nítrico em diferentes níveis de estresse. Em ordem crescente de fitotoxicidade estão os herbicidas oxadiazon, oxyfluorfen e a mistura formulada de paraquat + diuron. Esta última causou o extravasamento, para a solução, de aproximadamente 80% dos íons presentes nos tecidos, refletindo a injúria causada pela mistura de herbicidas,

enquanto que o oxyfluorfen, oxadiazon e a testemunha atingiram condutividades médias de 56, 19 e 10%, respectivamente (Tabela 8). A maior condutividade máxima potencial (CMP) causada pelos elicitores, quando comparados à testemunha, sem o pré-tratamento com SNP e a aplicação de herbicidas, é consequência do aumento nos níveis de  $H_2O_2$ , TBARs e redução dos teores de clorofila e carotenóides.

Tabela 8 – Condutividade máxima potencial (%) de folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu M$ )					
	2000		200		0	
Paraquat + Diuron	79,97	$\pm(3,21)$ bA	80,38	$\pm(2,94)$ bA	89,78	$\pm(1,32)$ aA
Oxyfluorfen	46,81	$\pm(9,74)$ bB	59,38	$\pm(3,11)$ aB	62,77	$\pm(14,63)$ aB
Oxadiazon	19,52	$\pm(3,76)$ aC	19,09	$\pm(2,74)$ aC	18,34	$\pm(5,51)$ aC
Testemunha	7,35	$\pm(1,30)$ aD	10,86	$\pm(5,25)$ aC	12,01	$\pm(2,65)$ aC

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

O paraquat é um herbicida não seletivo, que interage com a ferredoxina, competindo com o  $NADP^+$  pelos elétrons transportados ao longo do fotossistema I (FSI), tornando-se um radical livre instável, que retorna rapidamente ao estado iônico pela transferência de energia ao oxigênio molecular, produzindo  $O_2^{\cdot-}$  e conseqüentemente,  $H_2O_2$  e  $OH^{\cdot}$ , que por sua vez, dá início à peroxidação de lipídeos e à rápida degradação das membranas. Enquanto que o diuron compete com a plastoquinona, pelo domínio de ligação na quinona B (QB), interrompendo o fluxo de elétrons no fotossistema II (FSII), resultando em clorofila tripleto e oxigênio singleto (HESS, 2000). O sinergismo, caracterizado pelo aumento na injúria causada pela mistura dos herbicidas tem sido relatado (McDERMOTT, 1988; COSTA et al., 2013).

O oxyfluorfen e o oxadiazon, ao inibirem a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), promovem o acúmulo de protoporfirina IX, composto fotodinâmico que no citoplasma e na presença de luz, converte rapidamente o oxigênio molecular em

oxigênio singleto, mesmo com a inibição de uma pequena quantidade da enzima cloroplástica (DUKE et al., 1991). Com respectivos log Kow de 4,5 e 4,8, ambos os herbicidas são considerados imóveis nas plantas, enquanto que o paraquat e o diuron, em diferentes proporções, são móveis no apoplasto (SENSEMAN, 2007) o que pode contribuir para os diferentes níveis de injúria causados pelos herbicidas, além da absorção diferencial (ACHIREDDY et al., 1984).

O tratamento das plantas de arroz com nitroprussiato de sódio reduziu o dano, contudo, o comportamento do protetor foi específico ao herbicida ou nível de estresse produzido. A concentração de 2000  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu a CMP das plantas tratadas com paraquat + diuron e oxyfluorfen em 11 e 25%, respectivamente, enquanto que o oxadiazon não diferiu da testemunha. Tal redução também ocorreu para os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Tabela 9). A concentração de 200  $\mu\text{M}$  de SNP promoveu a redução da CMP das plantas tratadas com paraquat + diuron.

Tabela 9 – Níveis de peróxido de hidrogênio ( $\mu\text{mol g}^{-1}$  de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu\text{M}$ )					
	2000		200		0	
Paraquat + Diuron	1,81	$\pm(0,15)$ bB <sup>1</sup>	2,22	$\pm(0,14)$ aD	2,25	$\pm(0,08)$ aB
Oxyfluorfen	2,06	$\pm(0,15)$ bB	2,48	$\pm(0,08)$ aC	2,27	$\pm(0,13)$ aB
Oxadiazon	3,08	$\pm(0,23)$ bA	2,93	$\pm(0,17)$ bB	3,31	$\pm(0,05)$ aA
Testemunha	2,99	$\pm(0,07)$ bA	3,32	$\pm(0,20)$ aA	1,90	$\pm(0,23)$ cC

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

A concentração de 2000  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu em 19,5, 9,2 e 6,9% os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nos tecidos pulverizados com paraquat + diuron, oxyfluorfen e oxadiazon, atingindo níveis muito próximos aos encontrados nas plantas que não receberam nenhum tratamento, no caso da mistura formulada. Entretanto, a mesma concentração de SNP causou um aumento nos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas plantas que não

receberam a aplicação de herbicidas. O peróxido de hidrogênio é produto da dismutação do superóxido, catalisada pela enzima superóxido dismutase e sua reatividade é inferior a de outras EROs (MITTLER, 2002), entretanto, ao reagir com metais, na reação de Haber-Weiss, produz radical hidroxila, um potente oxidante (VAN BREUSEGEM et al., 2001).

A peroxidação de lipídeos também foi reduzida em plantas tratadas com 2000  $\mu\text{M}$  de SNP e expostas à mistura de paraquat + diuron e oxadiazon, por outro lado, os níveis de TBARs foram maiores nas plantas expostas a tal concentração, porém sem a aplicação de herbicidas (Tabela 10). Os níveis de MDA não diferiram significativamente da testemunha sem NO, contudo, foram menores nas plantas tratadas com 2000  $\mu\text{M}$  de SNP e oxyfluorfen. De acordo com Popova e Tuan (2010) o NO pode interromper a cadeia de peroxidação de lipídeos, limitando o dano, enquanto que sozinho, pode agir como uma espécie reativa de nitrogênio e dar início a reações em cadeia, causando injúrias à célula.

Tabela 10 – Níveis de TBARs (nmol de MDA  $\text{mg}^{-1}$  de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu\text{M}$ )					
	2000		200		0	
Paraquat + Diuron	0,673	$\pm(0,015)$ bA	0,731	$\pm(0,037)$ aA	0,753	$\pm(0,025)$ aA
Oxyfluorfen	0,579	$\pm(0,047)$ aB	0,574	$\pm(0,007)$ aB	0,594	$\pm(0,053)$ aB
Oxadiazon	0,191	$\pm(0,014)$ bC	0,221	$\pm(0,018)$ bC	0,302	$\pm(0,014)$ aC
Testemunha	0,211	$\pm(0,006)$ aC	0,158	$\pm(0,006)$ bD	0,167	$\pm(0,011)$ bD

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

A peroxidação de lipídeos tem início com a remoção de um hidrogênio do grupo metil, posicionado próximo à insaturação da cadeia, dando origem a um radical lipídico peroxidado, o qual reage com outros lipídios da membrana, formando uma reação em cadeia, tendo como produto final etano (HESS, 2000), pentano e

malondialdeído (MDA) (MEROTTO JR; VIDAL, 2001). Segundo Beligni e Lamattina (1999) o óxido nítrico pode reagir com os radicais alcoxil ( $LO^{\cdot}$ ) e peroxil ( $LOO^{\cdot}$ ), produzidos na fase de iniciação e propagação e assim, parar a cadeia de peroxidação de lipídeos.

Além disso, o NO pode reagir com o  $O_2^{\cdot-}$ , produzindo peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), uma espécie reativa de nitrogênio. De acordo com Beckman et al. (1990) e Botti et al. (2010), o peroxinitrito é formado em uma reação controlada por difusão, entre quantidades estequiométricas de NO e  $O_2^{\cdot-}$ , sendo limitada pela disponibilidade dos precursores (QUIJANO et al., 2005). De acordo com Pacher et al. (2007) a taxa dessa reação é, pelo menos, de 3 a 8 vezes mais rápida do que a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$ , em  $H_2O_2$ , pela SOD. Houve redução nos níveis de peróxido de hidrogênio e na atividade da superóxido dismutase (Tabela 11) nas plantas pré-tratadas com 2000  $\mu$ M de SNP, indicando uma possível redução nos teores de  $O_2^{\cdot-}$ , substrato da SOD, exceto para as plantas pulverizadas com oxyfluorfen, onde a SOD não diferiu da testemunha (sem SNP).

De acordo com SOOD et al. (2012) o mecanismo citoprotetor do NO contra a injúria causada por paraquat em *Azolla microphylla* pode ser a detoxificação das EROs pela reação entre NO e  $O_2^{\cdot-}$ , formando  $ONOO^{\cdot-}$ , que segundo Hasanuzzaman et al. (2010), é menos tóxico do que os peróxidos, limitando o dano. Além disso, o peroxinitrito pode reagir com o  $H_2O_2$ , produzindo ânion nitrito e oxigênio (MARTINEZ et al., 2000). Sakamoto et al. (2003) e SMALLWOOD et al. (2007) sugerem a detoxificação enzimática do peroxinitrito, no cloroplasto, pelas peroxirredoxinas PrxIIe e 2-Cys-Prx.

Por outro lado, espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito, podem ser citotóxicas, reagindo direta ou indiretamente com o DNA, proteínas e outras moléculas (ASADA, 1999), levando a mudanças na estrutura e função desses compostos, tornando o peroxinitrito um efetor da sinalização celular mediada por NO (VANDELLE; DELLEDONE, 2011). Nesse aspecto, a nitração da tirosina, na relação planta-patógeno, pode explicar o motivo pelo qual, mesmo em altas concentrações, o peroxinitrito não é tóxico para as células (DELLEDONE et al., 2001). Contudo, o exato mecanismo que determina a ação tóxica ou citoprotetora do  $ONOO^{\cdot-}$ , endógeno ou produzido pela reação do NO fornecido exogenamente, com o superóxido proveniente do estresse oxidativo, ainda é desconhecido (ARASIMOWICZ-JELONEK; FLORYSZAK-WIECZOREK, 2011).

Tabela 11 – Atividade da enzima superóxido dismutase ( $\text{U mg}^{-1}$  de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu\text{M}$ )					
	2000		200		0	
Paraquat + Diuron	78,31	$\pm(6,11)$ bD	77,77	$\pm(5,04)$ bC	125,14	$\pm(5,22)$ aB
Oxyfluorfen	133,27	$\pm(6,97)$ bA	153,49	$\pm(6,26)$ aA	131,55	$\pm(9,94)$ bA
Oxadiazon	92,70	$\pm(7,05)$ bC	140,53	$\pm(4,94)$ aB	134,29	$\pm(4,75)$ aA
Testemunha	117,82	$\pm(5,79)$ aB	65,14	$\pm(5,10)$ bD	74,88	$\pm(5,16)$ bB

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

O tratamento com 2000  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu a atividade da superóxido dismutase, nas plantas pulverizadas com paraquat + diuron, a níveis muito próximos da testemunha sem SNP e herbicidas. Contudo, nestas últimas, os níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e TBARs foram aumentados, indicando efeito citotóxico do NO. Sob severas condições de estresse e conseqüentemente de EROs, o NO pode interromper a cadeia de peroxidação de lipídeos, limitando o dano, enquanto que sozinho, pode agir como uma espécie reativa de nitrogênio e dar início à reações em cadeia, causando injúrias à célula (POPOVA; TUAN, 2010).

O controle enzimático dos níveis de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é preferencial nos organismos, devido ao fato do  $\text{OH}^{\cdot}$  exercer sua ação deletéria muito rapidamente. Dentre os componentes de desintoxicação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e a guaiacol peroxidase (POD) são as enzimas mais importantes (MOLLER et al., 2007; BHATT; TRIPATHI, 2011). A atividade da POD foi superior nas plantas pulverizadas com herbicidas (Tabela 12), sinalizando a necessidade de desintoxicação do estresse causado por estes, entretanto, não foi alterada pelas concentrações de SNP, exceto para as combinações de 200  $\mu\text{M}$  com paraquat + diuron e 2000  $\mu\text{M}$  com oxyfluorfen, onde a atividade foi reduzida, em concordância com a redução nos teores do substrato  $\text{H}_2\text{O}_2$ , nesses tratamentos.

Tabela 12 – Atividade da enzima guaiacol peroxidase ( $\text{U mg}^{-1}$  de proteína) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu\text{M}$ )								
	2000		200		0				
Paraquat + Diuron	102.85	$\pm(7.46)$	aA <sup>1</sup>	53.26	$\pm(4.88)$	bC	117.64	$\pm(14.97)$	aB
Oxyfluorfen	104.53	$\pm(1.58)$	bA	150.66	$\pm(10.79)$	aA	141.98	$\pm(4.81)$	aA
Oxadiazon	70.84	$\pm(7.57)$	aB	73.52	$\pm(6.26)$	aB	75.22	$\pm(5.41)$	aC
Testemunha	40.47	$\pm(8.84)$	aC	33.26	$\pm(7.43)$	aD	30.05	$\pm(3.61)$	aD

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.

Paraquat e diuron, acompanhados de oxyfluorfen, causaram redução nos teores de clorofilas a (Figura 10), b, total e carotenóides (Tabela 13). Não houve interação entre herbicidas e as concentrações de nitroprussiato de sódio para a clorofila a, enquanto que os teores dos demais pigmentos foram aumentados por 200 e 2000 mM, nas plantas tratadas com oxadiazon e na testemunha, sem a aplicação de herbicidas. Qian et al. (2009) também verificaram a redução no conteúdo de clorofila a, b e total, de algas expostas a atrazine. De acordo com Foyer et al. (1994), herbicidas que bloqueiam o fluxo fotossintético de elétrons causam aumento da energia de excitação, que é transferida da clorofila tripleto, para o oxigênio ou dissipada através da ressonância dos carotenóides, e estes são apontados como o principal mecanismo de dissipação do excesso de energia do  $^1\text{O}_2$  (TRIPATHY; OELMÜLLER, 2010). Quando tais estratégias são insuficientes para dissipar o excesso de energia, ocorre a destruição dos pigmentos.

Em concordância com o observado neste trabalho, Ferreira et al. (2010) relataram que o uso de doadores de óxido nítrico protegeu plantas de soja tratadas com herbicidas, reduzindo a disponibilidade de espécies reativas de oxigênio, substrato essencial para a atividade das enzimas SOD, CAT e POD. Significante redução nos níveis de EROs também foi encontrada em algas tratadas com atrazine e glufosinato, em função da concentração de SNP (QIAN et al., 2009), de modo que a redução da atividade da SOD e POD se justifica, assim como, a menor disponibilidade de radicais livres para a peroxidação de lipídeos (SOOD et al., 2012).

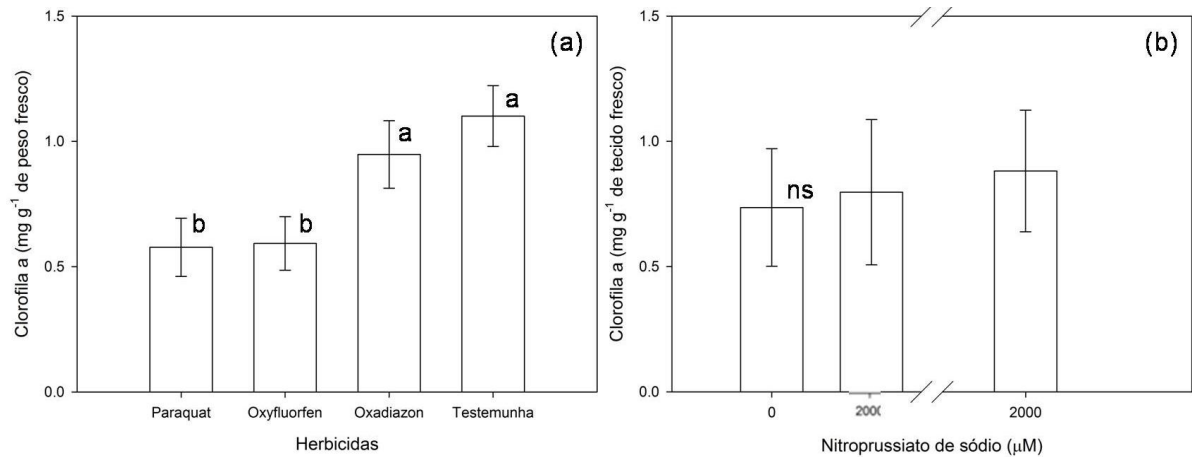


Figura 10 – Níveis de clorofila a ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL. Santa Maria, 2015. Barras verticais correspondem ao desvio padrão da média.

Tabela 13 – Níveis de clorofila b, total e carotenóides ( $\text{mg g}^{-1}$  de peso fresco) em folhas da cultivar de arroz irrigado Puitá INTA CL pré-tratadas com nitroprussiato de sódio e expostas a herbicidas. Santa Maria, 2015.

Herbicidas	Nitroprussiato de sódio ( $\mu\text{M}$ )								
	2000		200		0				
----- Clorofila b -----									
Paraquat + Diuron	0,167	$\pm(0,027)$	aB	0,167	$\pm(0,022)$	aC	0,191	$\pm(0,048)$	aB
Oxyfluorfen	0,200	$\pm(0,015)$	aB	0,146	$\pm(0,029)$	aC	0,170	$\pm(0,023)$	aB
Oxadiazon	0,312	$\pm(0,032)$	aA	0,236	$\pm(0,021)$	bB	0,213	$\pm(0,047)$	bA
Testemunha	0,340	$\pm(0,043)$	aA	0,330	$\pm(0,022)$	aA	0,250	$\pm(0,023)$	bA
----- Clorofila total -----									
Paraquat + Diuron	1.45	$\pm(0.22)$	aB1	1.33	$\pm(0.24)$	aC	1.45	$\pm(0.30)$	aB
Oxyfluorfen	1.39	$\pm(0.14)$	aB	0.99	$\pm(0.16)$	aC	1.16	$\pm(0.20)$	aB
Oxadiazon	2.38	$\pm(0.26)$	aA	1.85	$\pm(0.19)$	bB	1.67	$\pm(0.21)$	bA
Testemunha	2.45	$\pm(0.16)$	aA	2.50	$\pm(0.06)$	aA	1.98	$\pm(0.24)$	bA
----- Carotenóides -----									
Paraquat + Diuron	0.30	$\pm(0.03)$	aB1	0.27	$\pm(0.02)$	aC	0.30	$\pm(0.06)$	aB
Oxyfluorfen	0.33	$\pm(0.03)$	aB	0.25	$\pm(0.03)$	bC	0.31	$\pm(0.02)$	aB
Oxadiazon	0.48	$\pm(0.03)$	aA	0.39	$\pm(0.01)$	bB	0.35	$\pm(0.05)$	bA
Testemunha	0.50	$\pm(0.02)$	aA	0.49	$\pm(0.02)$	aA	0.41	$\pm(0.04)$	bA

<sup>1</sup>Médias acompanhadas por letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p=0,05$ ). Os valores entre parênteses representam o desvio padrão da média.



Dada a inter-relação existente entre o NO e as EROs (SOOD et al., 2012), altos níveis de SNP e a ausência de quantidades significativas de EROs, podem resultar em dano oxidativo, visto a natureza de espécie reativa de nitrogênio do óxido nítrico (SHI et al., 2005). A pulverização de plantas de arroz irrigado com 2000  $\mu\text{M}$  de SNP reduziu o dano causado pelos herbicidas mais fitotóxicos paraquat + diuron e oxyfluorfen enquanto que a concentração de 200  $\mu\text{M}$  mitigou o estresse causado por oxadiazon, menos tóxico. A redução dos níveis de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um intermediário entre as espécies reativas  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e  $\text{OH}^{\cdot}$  aponta como possibilidade, nas circunstâncias do experimento, a ação do NO sobre o radical superóxido ou ainda, sobre a peroxidação de lipídeos, dada a redução nos níveis de TBARs onde a produção de  $^1\text{O}_2$  é predominante, devido ao mecanismo de ação do herbicida.

## Conclusão

O óxido nítrico reduziu os danos causados pelos herbicidas nas plantas de arroz, através da redução nos níveis de peróxido de hidrogênio e conseqüentemente, de lipídeos peroxidados, exigindo maiores concentrações de SNP em níveis maiores de injúria nas plantas.

## Referências

ACHHIREDDY, N. R.; KIRKWOOD, R. C.; FLETCHER, W. W. Absorption, translocation, and metabolism in rice (*Oryza sativa*) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*). **Weed Science**, v. 32, n. 6, p. 727-731, 1984.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ARASIMOWICZ-JELONEK, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Understanding the fate of peroxyxynitrite in plant cells from physiology to pathophysiology. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 681-688, 2011.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 601-639, 1999.

BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel. **Analytical Biochemistry Journal**, v. 44, n.11, p. 276-287, 1971.

BECKMAN, J. S. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, 1990.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant, Cell and Environmental**, v. 25, n. 6, p. 737-748, 2002.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide**, v. 3, n. 3, p. 199-208, 1999.

BHATT, I.; TRIPATHI, B. N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 850-859, 2011.

BOTTI, H. et al. Distance-dependent diffusion-controlled reaction of  $\cdot\text{NO}$  and  $\text{O}_2^-$  at chemical equilibrium with  $\text{ONOO}^-$ . **Journal Physical and Chemistry B**, v. 114, n. 49, p. 16.584-16.593, 2010.

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.

COSTA, N. V. et al. Directed-spray application of paraquat and diuron in physic nut plants. **Planta Daninha**, v. 31, n. 4, p. 987-996, 2013.

COUNCE, P. et al. Uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

DAYAN, F. E. et al. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. **Weed Science**, v. 45, n. 5, p. 634-641, 1997.

DELLEDONNE, M. et al. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13.454-13.459, 2001.

DUKE, S. O. et al. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides, **Weed Science**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 1991.

EDERLI, L. et al. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 42-48, 2009.

FALK, J. S. et al. Rapid assay evaluation of plant response to protoporphyrinogen oxidase (protox)-inhibiting herbicides. **Weed Technology**, v. 20, n. 1, p. 104-112, 2006.

FERREIRA L. C. et al. Nitric oxide reduces oxidative stress generated by lactofen in soybean plants. **Pesticide Physiology and Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 47-54, 2010.

FILEP, J. G. et al. Nitric oxide cooperates with hydrogen peroxide in inducing DNA fragmentation and cell lysis in murine lymphoma cells. **Biochemical Journal**, v. 321, p. 897-901, 1997.

FOYER, C. H. et al. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 92, n. 4, p. 696-717, 1994.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxidedismutase I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GOULD, K. S. et al. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? **Plant, Cell and Environmental**, v. 26, n. 11, p. 1851-1862, 2003.

HABIB, S.; ALI, A. Biochemistry of nitric oxide. **Indian Journal Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 3-17, 2011.

HASANUZZAMAN, M. et al. Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. **American Journal of Plant Physiology**, v. 6, n. 6, p. 295-324, 2010.

HESS, F. D. Review light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, v. 48, n. 2, p. 160-70, 2000.

HISCOX, J. D.; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, n. p. 1132-1334, 1979.

HONG, J. K. et al. Nitric oxide function and signalling in plant disease. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 147-154, 2007.

HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, n. 8, p. 871-879, 2003.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987.

LIU, X. et al. Nitrite, sodium nitroprusside, potassium ferricyanide and hydrogen peroxide release dormancy of *Amaranthus retroflexus* seeds in a nitric oxide-dependent manner. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2011.

LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1781-1787, 2001.

MARTINEZ, G. R. et al. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ( $1\Delta_g O_2$ ) and nitroxyl ( $NO^-$ ). **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10.307-10.312, 2000.

McDERMOTT, A. P. Evaluation of the synergistic action of the addition of diuron to paraquat for post-emergent weed control. In: PROCEEDINGS OF AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, p. 147-142, 1988. Disponível em: [http://www.assct.com.au/media/pdfs/1988\\_pa\\_ag21.pdf](http://www.assct.com.au/media/pdfs/1988_pa_ag21.pdf). Acesso em 13 jul de 2015.

MEROTTO JUNIOR, A.; VIDAL, R. A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R.A., MEROTTO JUNIOR, A. **Herbicidologia**. Porto Alegre, 2001. Cap. 8, p.69-86, 2001.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MOLLER, I. M. et al. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

NEILL, S. et al. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 165-176, 2008.

PACHER, P. et al. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

POPOVA, L.; TUAN, T. Nitric oxide in plants: properties, biosynthesis and physiological functions. **Iranian Journal of Science & Technology**, Transaction A, v. 34, n. A3, p. 245-255, 2010.

QIAN, H. et al. The effect of exogenous nitric oxide on alleviating herbicide damage in *Chlorella vulgaris*. **Aquatic Toxicology**, v. 92, n. 4, p. 250-257, 2009.

QUIJANO, C. et al. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 39, n. 6, p. 728-741, 2005.

REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 29., 2012: Gravataí, RS. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Itajaí: Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado (SOSBAI). 2012. 188p.

SAKAMOTO, A. et al. Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, v. 33, n. 5, p. 841-851, 2003.

SENSEMAN, S. A. **Herbicide handbook**. 9. ed. Lawrence: WSSA, 2007. 458 p.

SHI, S. Y. et al. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2005.

SMALLWOOD, H. S. et al. Identification of a denitrase activity against calmodulin in activated macrophages using high-field liquid chromatography—FTICR mass spectrometry. **Biochemistry**, v. 46, n. 37, p. 10.498-10.505, 2007.

SOOD, A. et al. Differential responses of hydrogen peroxide, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in *Azolla microphylla* exposed to paraquat and nitric oxide. **Biologia**, v. 67, n. 6, p. 1119-1128, 2012.

TRIPATHY, A. C.; OELMÜLLER, R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 12, p. 1621-1633; 2012.

VALDERRAMA, R. et al. Nitrosative stress in plants. **FEBS Letters**., v. 581, n. 3, p. 453-461, 2007.

VAN BREUSEGEM, F. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n. 3, p. 405-414, 2001.

VANDELLE, E.; DELLEDONNE, M. Peroxynitrite formation and function in plants. **Plant Science**, v. 181, n. 5, p. 534- 539, 2011.

YOSHIE, Y.; OHSHIMA, H. Nitric oxide synergistically enhances DNA strand breakage induced by polyhydroxyaromatic compounds, but inhibits that induced by the Fenton reaction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 342, n. 1, p. 13-21, 1997.

ZERAIK, A. E. et al. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 1008.

ZHU, Z. et al. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Plant Science**, v. 167, n. 3, p. 527-533, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com exceção do paraquat, os demais herbicidas utilizados nesse trabalho são apontados por apresentar algum nível de seletividade para cultivares de arroz irrigado. Contudo, nas circunstâncias dos experimentos, produziram algum tipo de injúria na cultivar Puitá INTA CL, quantificada através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação de lipídeos e extravasamento de eletrólitos, assim como a redução nos níveis de pigmentos.

O tratamento das plantas com nitroprussiato de sódio, um doador de óxido nítrico, reduziu, na maioria dos casos, a injúria causada pelos herbicidas, através da redução nos níveis de  $H_2O_2$ , peroxidação de lipídeos e extravasamento de eletrólitos, além de aumentar a síntese de clorofilas e carotenóides e alterar o perfil da atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase.

Os resultados encontrados apontam para a existência de uma inter-relação direta entre a origem das espécies reativas de oxigênio e o nível de estresse, com a concentração de nitroprussiato, sendo que, quanto maiores os níveis de estresse, maiores são as concentrações de SNP necessárias para reduzir os danos. Este efeito é válido também para diferentes períodos de exposição. Entretanto, na ausência de espécies reativas de oxigênio, o óxido nítrico pode exercer efeito citotóxico nas plantas. A formação de peroxinitrito é uma possível rota de toxicidade, contudo, tal espécie de nitrogênio também é relatada como componente em cascatas de sinalização do estresse.

O efeito mitigador do óxido nítrico, nas condições adversas do campo, sem controle de temperatura e luminosidade, por exemplo, confirmam o seu potencial como protetor de plantas, a fim de reduzir os impactos causados pelo estresse.