

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

## **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NA VARIEDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR SP80-3280 QUANDO SUBMETIDA A DIFERENTES TRATAMENTOS COM MATURADORES**

\*Fabiana Manarelli<sup>1</sup>; Ana Paula Flavio da Silva<sup>1</sup>; Charlene Raquel de Almeida<sup>1</sup>; Ronaldo da Silva Viana<sup>2</sup>; Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune<sup>3</sup>

### **RESUMO**

Com o objetivo de avaliar a atividade antioxidante enzimática em variedade de cana-de-açúcar tratada com maturador, foi instalado experimento em campo na fazenda pertencente à usina Cosan S/A Raízen, (ano 2011). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições. A variedade utilizada foi a SP80-3280 e os tratamentos constataram de: testemunha, 2-chloroethylphosphonic acid, 2-chloroethylphosphonic acid + glifosato, sulfometuron metil + glifosato, sulfometuron metil, glifosato, MTD, MTD + glifosato e trinexapac-etil. As amostragens foram feitas aos 30 e 45 dias após a aplicação (DAA). Foi determinada a atividade antioxidante das enzimas: peroxidase (PO), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD). Conclui-se que maturadores químicos influenciam no acúmulo de sacarose na planta causando estresse, mas o aparato antioxidante foi eficiente na eliminação das espécies reativas.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar, maturador, estresse oxidativo, metabolismo antioxidante.

### **SUMMARY**

In order to evaluate the antioxidant enzyme activity in a variety of sugar cane treated with maturing, field experiment was installed on the farm belonging to the plant Cosan S/A Raízen (2011). The experimental design was randomized in blocks with three replications. The variety was SP80-3280 and the treatments were: control, 2-chloroethylphosphonic acid, 2-chloroethylphosphonic acid + glyphosate, glyposate + sulfometuron methyl, sulfometuron methyl, glyphosate, MTD, MTD + trinexapac-ethyl and glyphosate. The samples were taken at 30 and 45 days after application (DAA). Was determined the activity of enzymes: peroxidase (PO), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD). It is concluded that chemical ripeners influence the accumulation of sucrose in the plant causing stress, but the antioxidant apparatus was efficient in the elimination of reactive species.

**Key-words:** sugar cane, ripeners, oxidative stress, antioxidant metabolism.

<sup>1</sup>Graduando(a) Tecnologia em Biocombustíveis, Fatec, Avenida Prestes Maia, nº 1764, CEP: 16052-045, Araçatuba, SP. <sup>2</sup>Docente do Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Fatec – Araçatuba, SP.

<sup>3</sup>Docente do Curso de Odontologia, FOA-Unesp, Rua José Bonifácio, nº1193, CEP: 16015-050, Araçatuba, SP. \*E-mail: manarelli5@hotmail.com



## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos houve uma grande expansão na área cultivada com cana-de-açúcar no Brasil, sendo o montante que será colhido e destinado à atividade sucroalcooleira na safra 2012, está estimada em 8.567,2 mil hectares, distribuídos em todos estados produtores (CONAB, 2012). Esta cultura é eficiente por utilizar os recursos disponíveis para seu desenvolvimento e produtividade e também por possuir mecanismo fotossintético do tipo C4 (PROCÓPIO *et al.*, 2004).

A crescente industrialização agrícola, em um cenário onde há a necessidade de se adaptar os produtos agrícolas aos padrões internacionais de qualidade, viabilizando sua ampla comercialização, força o produtor a aplicar uma grande quantidade de insumos para obtenção de alta produtividade e que seja economicamente viável (CENA, 1996). Dentro do complexo sistema de produção da indústria açucareira, a maturação da cana-de-açúcar é um dos aspectos mais importantes, pois é dele que depende o fornecimento de matéria prima para o funcionamento contínuo da usina durante a safra. Portanto, com a utilização de técnicas para aumentar a qualidade tecnológica da matéria prima, por exemplo, a aplicação de maturadores vegetais (ALMEIDA *et al.*, 2005), é possível se obter dois resultados positivos: a antecipação de corte e o aumento do percentual de sacarose, quando consideramos a cana em fase de desenvolvimento vegetativo. Os maturadores agem alterando a morfologia e a fisiologia da planta podendo levar a modificações qualitativas e quantitativas na produção. Podem atuar promovendo a diminuição do crescimento da planta, precocidade de maturação e aumento na produtividade (SBCPD, 2007), pois aumentam o teor de sacarose (POL%), melhoram o período útil de industrialização (PUI), inibindo o florescimento e reduzindo a isoporização, sem afetar a brotação da soqueira (CASAGRANDE, 1991). Porém, tais substâncias podem levar a uma perturbação da homeostase celular, podendo gerar estresse oxidativo e este ocasionar uma cascata de eventos danosos em relação à integridade e manutenção da célula. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante enzimática em variedade de cana-de-açúcar em resposta a aplicação de maturadores.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado na fazenda Santo Antônio Ubasá, pertencente à usina Cosan S/A Raízen, unidade da Barra, localizada no município de Igarçu do Tietê, Estado de São Paulo. A área apresentava um ambiente de produção A, topografia semiplana e um Latossolo Vermelho Ferríco Estrófico. O clima predominante da região é o Aw (Köppen), seco definido, com temperatura média anual de 21,6<sup>o</sup> C, umidade relativa média de 70 %. A média pluvial anual é próxima de 1.344 mm

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com três repetições, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Cada parcela foi composta de sete linhas espaçadas de 1,40 m entre si, por 10 m de comprimento. As linhas laterais foram utilizadas como bordadura, sendo as amostras colhidas das cinco linhas centrais com área útil de 70 m<sup>2</sup>. Os tratamentos foram constituídos pela variedade SP80-3280 que

recebeu aplicação dos tratamentos com maturadores: testemunha sem aplicação, 2-chloroethylphosphonic acid ( $0,67 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a.), 2-chloroethylphosphonic acid ( $0,67 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a.) + glifosato ( $0,15 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a.), sulfometuron metil ( $0,02 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a) + glifosato ( $0,15 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a), sulfometuron metil ( $0,35 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a), glifosato ( $0,35 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a), MTD ( $1 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a), MTD ( $1 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a) + glifosato ( $0,15 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a) e trinexapac-etil ( $0,8 \text{ L ha}^{-1}$  de i.a).

A aplicação dos maturadores químicos foi realizada utilizando-se pulverizador com  $\text{CO}_2$  pressurizado, com uma barra de 6 m de comprimento, em forma de T, com seis pontas AXI 11002 jato plano espaçados em 0,5 m, possibilitando a aplicação simultânea em duas linhas e sendo a pressão utilizada foi de 40 libras/pol<sup>2</sup>. A aplicação iniciou-se às 08h00min e terminou às 11h00min, observando-se pouca ocorrência de ventos, com a temperatura ao redor de 25 a 30°C e a umidade relativa entre 60-80%.

Foram realizadas duas amostragens das folhas +3 das plantas de forma aleatória, aos 30 e 45 dias após a aplicação (DAA). As amostras foram processadas uma a uma, com o auxílio de almofariz e pistilo, e a adição de nitrogênio líquido à amostra. Depois de triturado, o extrato vegetal foi transferido para tubos *ependorf* com tampa e armazenados em nitrogênio líquido para posterior obtenção do extrato bruto (EB), sendo este, através da ressuspensão do material vegetal (300 mg), adicionando-se 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, suplementado com 1mM de ascorbato. Após centrifugação por 20 min. a  $10.000 \times g$  em centrífuga refrigerada ( $\pm 5^\circ\text{C}$ ), o sobrenadante foi coletado e realizado quatro alíquotas em tubos *ependorf* e armazenado em nitrogênio líquido para determinações das atividades enzimáticas específicas de: PO, CAT, APX e SOD (Peixoto *et al.*, 1999).

A atividade de PO foi determinada através da diluição (1:25) de 100  $\mu\text{L}$  de EB, adicionando-se 4,9 mL de solução tampão fosfato de potássio 25 mM pH 6,8 contendo 20 mM de pyrogallol e 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Peróxido de Hidrogênio). Após a incubação por 1 min., paralisou-se a reação com 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e a leitura de absorbância feita a 420 nm. A atividade específica da enzima foi calculada usando-se o coeficiente extinção molar:  $2,47 \text{ mM/cm}$ .

A CAT foi determinada espectrofotometricamente a 25°C, contendo no meio de reação 1mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 e adicionando-se 3,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 30%, preparado imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 12,5  $\mu\text{L}$  de EB e seguindo-se a decomposição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 1 min., fazendo-se a leitura em 30" e 60", por alterações na absorbância a 240 nm. A atividade específica da enzima foi calculada usando-se o coeficiente extinção molar:  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Para determinação da APX, a mistura de reação consistiu de 50  $\mu\text{L}$  de ascorbato (cinco mM), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1 mM) e 1.340  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 60  $\mu\text{L}$  EB e a atividade da enzima foi determinada observando-se a decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 1min., seguindo a leitura em 30" e 60", por alterações na absorbância a 290 nm. A atividade específica da enzima foi calculada usando-se o coeficiente extinção molar:  $39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

Na avaliação de atividade de SOD, considerou-se a capacidade da enzima em inibir a foto redução do NBT (azul de nitrotetrazólio cloreto). A determinação ocorreu pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de EB a uma solução contendo: 13 mM de metionina, 75  $\mu\text{M}$  de NBT, 100 mM de EDTA e 2  $\mu\text{M}$  de riboflavina em

3,0 mL de tampão fosfato de potássio 5 mM, pH 7,8. A reação foi iniciada pela iluminação dos tubos, em câmara composta por tubos fluorescentes (15 W), a 25°C. Após 15 min. de incubação, o final da catálise foi estabelecido pela interrupção da luz. O composto azul formado (formazana) pela foto redução do NBT foi determinado pela leitura em espectrofotômetro a 560 nm.

A concentração de proteínas solúveis totais foi realizada de acordo com Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados valores das atividade antioxidantes enzimáticas, expressas em mmol/min./mg de proteína.

**Tabela 1. Resultados para atividade antioxidante enzimática em plantas adultas de cana-de-açúcar coletadas após 30 dias da aplicação dos tratamentos**

Tratamentos	CAT	APX	PO	SOD
testemunha	4.27479 a	2.05041 a	10.59291 b	4.47889 c
2-chloroethylphosphonic acid	3.65191 a	1.35851 a	7.95690 b	8.02607 abc
2-chloroethylphosphonic acid + glifosato	3.73664 a	1.81010 a	37.57000 ab	5.68684 bc
sulfometuron metil + glifosato	4.91779 a	2.97771 a	13.20267 ab	9.73717 ab
sulfometuron metil	2.59418 a	2.50823 a	5.01871 b	9.52541 ab
glifosato	4.43330 a	3.07442 a	45.09435 a	7.76074 abc
MTD	3.18913 a	2.11622 a	6.62048 b	5.25460 bc
MTD + glifosato	7.77600 a	2.63278 a	5.96946 b	11.72031 a
trinexapac-etil	7.83471 a	1.63795 a	8.72251 b	6.27905 bc

**Tabela 2. Resultados para atividade antioxidante enzimática em plantas adultas de cana-de-açúcar coletadas após 45 dias da aplicação dos tratamentos**

Tratamentos	CAT	APX	PO	SOD
testemunha	3,54929 a	1,13331 bcd	16,99991 a	8,23435 a
2-chloroethylphosphonic acid	4,2067760 a	1,34905 ab	6,89871 b	9,59347 a
2-chloroethylphosphonic acid + glifosato	3,72681 a	1,72353 a	9,67530 ab	9,83231 a
sulfometuron metil + glifosato	4,48972 a	0,67208 de	2,73789 b	12,79559 a
sulfometuron metil	1,92904 a	0,77757 cde	8,51269 b	17,58184 a
glifosato	1,78987 a	0,61100 e	6,30569 b	11,02887 a
MTD	2,07911 a	0,74051 cde	8,24263 b	12,92287 a
MTD + glifosato	2,40159 a	1,19926 bc	9,54823 ab	11,43074 a
trinexapac-etil	4,26543 a	0,91358 bcde	7,15187 b	12,96530 a

Para os resultados da primeira amostragem 30 DAA, observa-se que para as atividades das enzimas CAT e APX não houve diferença entre os tratamentos quando comparados com a testemunha. Já para a enzima PO houve um aumento considerável no tratamento com glifosato quando comparado com os outros tratamentos e a testemunha. Entretanto os resultados da atividade da SOD foram maiores em todos os tratamentos, quando comparados com o tratamento testemunha.

O aumento observado na atividade de PO, está de acordo com Marriot *et al.* (1978) que constataram que aumentos na atividade peroxidases podem indicar o aumento na biossíntese de lignina, que pode atuar como uma barreira contra infecção microbiana, e também podem promover aumentos na concentração de produtos de oxidação de fenólicos. Em experimentos de Bowler *et al.* (1992), os autores verificaram ser a SOD uma enzima que pode interferir na concentração de  $H_2O_2$ , sendo representante do mecanismo de defesa central dos organismos vivos contra fatores exógenos, portanto a atividade desta enzima elevada, induz disfunções e morte celular. De acordo com Azevedo (1998), reação catalisada por esta enzima é muito importante para a decomposição ou consumo de radicais livres. A enzima SOD é amplamente distribuída em organismos aeróbios e consiste na primeira reação do mecanismo antioxidante contra fatores exógenos em plantas.

Nos resultados das amostragens aos 45 DAA, não houve diferença significativa nas atividades de SOD e CAT comparando os tratamentos com o tratamento testemunha. Já para PO a maior atividade se dá no tratamento testemunha e para APX isto ocorre com o tratamento 2-chloroethylphosphonic acid + glifosato. A APX e a CAT pertencem a duas diferentes classes de enzimas de limpeza do  $H_2O_2$ , isto devido às suas diferentes afinidades. Então, enquanto a APX seria responsável pela modulação refinada das espécies reativas de oxigênio (EROs) para a sinalização, a CAT seria responsável pela remoção do excesso de EROs gerado durante o estresse (MITTLER, 2002). Porém deve-se levar em consideração a importância desta enzima, pois em situações de estresse oxidativo, a APX atua em compartimentos celulares que não possuem CAT, e a mesma está presente nos peroxissomos, portanto isto justifica sua baixa atividade nos tratamentos.

Na segunda amostragem, aos 45 DAA, observa-se que o aparato antioxidante enzimático foi eficiente na eliminação das espécies reativas que são inicialmente produzidas, quando planta é submetida a um fator estressante. A cana-de-açúcar é uma planta que possui eficiência na recuperação contra fatores estressantes (PROCÓPIO *et al.*, 2004).

## CONCLUSÕES

A aplicação de maturadores causa estresse na planta em início de safra e não a longo prazo, pois, a cana-de-açúcar possui um aparato antioxidante eficiente para eliminação destas espécies que são gerados em função da aplicação de maturadores que são exógenos e de origem sintética.

## LITERATURA CITADA

ALMEIDA, J. C. V.; LEITE, C. R. F.; SOUZA, J. R. P. Efeitos de maturadores nas características tecnológicas da cana-de-açúcar com e sem estresse hídrico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 4, p. 441-448, 2005.

AZEVEDO, R. A., ALAS, R. M., SMITH, R. J., LEA, P. J., 1998. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum** v.104, p.280–292.

BOWLER, C; VAN MONTAGUM, M.; INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.43, p.83-116, 1992.

CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 157p.

CENA. Plano Diretor de Pesquisa. Piracicaba: Universidade de São Paulo/CENA - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 1996. 48p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2012**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento - Conab 2012. 19 p.

LOWRY, O. H; ROSBROUGH, N. J; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **Journal Biology. Chemistry**, p.193-265. 1951.

MARRIOT, J.; BEEN, B. O.; PERKINS, C. The aethiology vascular atreaking in cassava toots after harvest:association with water loss from wounds. **Plant Physiology**, v. 44, p.38-42, 1978.

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

PEIXOTO, P. H.P; CAMBRAIA, J; SANT'ANNA, R; MOSQUIM, P. R; MOREIRA, M. A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** 11:137-143, 1999.

Sociedade Brasileira de Ciência das Plantas Daninhas. **Boletim informativo da Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**. Aldo Merotto Junior (Ed.) Minas Gerais: Embrapa, v.15, n.3, 2007.

PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; VARGAS, L. Manejo e controle de plantas daninhas em cana-de-açúcar. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. (Eds.) **Manual de manejo e controle de plantas daninhas**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p.397-452.