

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

*Efeitos de tiocarbamato e carbofurano na
degradação do ácido indol - 3 - acético.*

CÉSAR VITÓRIO FRANCO

Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán

Tese de Mestrado

1979

Empréstimo Proibido



0.225.062-8

UFSC-BU

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Prof. Dr. Nelson Duran, pela eficiência e dedicação com que realizou a orientação deste trabalho.
- Ao fr. Odorico Durieux, do Colégio S. Antônio de Blumenau pela ajuda nas correções gramaticais.
- À Lúcia e Maricilda pela amizade e ajuda que me ofereceu.
- À Sônia M. de Toledo pela valiosa colaboração recebida nos estudos com compostos isotópicos.
- Ao Prof. Dr. Guisepe Cilento por ter cedido seu laboratório e materiais, indispensáveis a realização da meu trabalho.
- Ao Prof. Olímpio Scalco do Departamento de Química da UFSC (Florianópolis) pelo apoio que me deu.
- A cada colega do grupo, por estarem sempre pronto a prestar a sua valiosa colaboração.
- À Robert Deuber do Instituto Agronômico de Campinas e Stauffer do Brasil pelo material cedido.
- Ao CNPQ, FINEP, FAPESP e CAPES - PíCD pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais,
por permitirem uma existência e
educação em um excelente clima
de amor e tranquilidade.

LISTA DAS ABREVIÇÕES USADAS

<u>Abreviação</u>	<u>Nome</u>
AMO 1618	2-isopropil-4-dimetil-5-metil fenil-1-piperidinecarboxilato cloro metileno.
AS	Antraceno-2-sulfonato, sal de sódio
DABCO	1,4-diazobiciclo (2,2,2) octano
DBAS	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
DPAS	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato
HRP	Peroxidase do rabanete
IA	Indol - 3 - carboxialdeído
IAA	ácido indol - 3 - acético
Me ₂ SO	dimetil sulfóxido
t-BuOK	terc-butóxido de potássio
t-RNA	ácido ribonuclêico de transferência

RESUMO

Os herbicidas tiocarbamatos estimulam o metabolismo do ácido indol-3-acético por peroxidase, o que pode ser detectado pelo aumento de formação de indol-3-carboxialdeído e aumento de quimioluminescência. A peroxidase nativa e o composto II de peroxidase foram alterados durante a interação com tiocarbamatos. Estudos dependentes de tempo mostraram que a peroxidase incubada com tiocarbamatos diminui a formação de indol-3-carboxialdeído e a quimioluminescência, mas não o consumo de oxigênio. Isto é indicativo de que o tiocarbamato interage com o intermediário oxidado e não altera a atividade da peroxidase. O indol-3-carboxialdeído liga-se covalentemente ao t-RNA e sugeriu-se que a atividade tenha sido precedida por uma modificação de t-RNA, induzida por indol-3-carboxialdeído excitado. Foi observada inibição desta ligação quando em presença de tiocarbamato. Provavelmente este é o modo pelo qual age este tipo de herbicida a nível celular nas plantas.

Os inseticidas carbofuranos inibem o consumo de oxigênio, a formação de produtos e a geração de estados excitados. Estes inseticidas agem como inibidores competitivos e são concomitantemente degradados.

Estudos de emissão fotônica, absorção ótica e medidas de consumo de oxigênio mostram-se como métodos rápidos e reprodutíveis para estudos de interação de defensivos agrícolas em sistemas enzimáticos in vitro.

ABSTRACT

The herbicide thiocarbamate stimulates the metabolism of indole-3-acetic acid by peroxidase as measured by enhancement of both indole-3-carboxaldehyde formation and chemiluminescence. Native peroxidase and peroxidase compound-II were altered during the interaction with thiocarbamate. A time dependent study showed that peroxidase incubated with thiocarbamate decreases the indole-3-carboxaldehyde formation and the chemiluminescence but not the oxygen consumption. This presumably indicates that the thiocarbamate interacts with an oxidized intermediate and not by altering the peroxidase activity. Indole-3-carboxaldehyde was able to covalently add to t-RNA and it was tentatively postulated that the auxin activity was preceded by a modification of t-RNA induced by the excited indole-3-carboxaldehyde. An inhibition of this binding in the presence of thiocarbamate was observed. Probably this is the mode of action of this type of herbicides at cellular level in plants.

Oxygen uptake, product formation and excited state generation in the presence of the insecticide carbofuran were inhibited. These insecticides acted as competitive inhibitors and concomitantly were degraded.

The photon emission, together with both absorption and oxygen measurement, show this to be a rapid and reproducible method to study herbicide and insecticide interaction with enzymatic systems in vitro.

Í N D I C E

	<u>Pág.</u>
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Generalidades	1
I.2. Metabolismos e ação dos herbicidas tiocarba- matos.....	5
I.2.1. Metabolismos em plantas	6
I.2.2. Metabolismos em solos	7
I.2.3. Ação dos herbicidas tiocarbamato	9
I.3. Metabolismo do inseticida carbofurano	10
I.4. Ação do tiocarbamato EPTC na atividade enzi- mática da peroxidase e crescimento de plantas	13
I.5. Ação de carbofuranos na degradação enzimática de IAA	15
I.5.1. Estudos <u>in vivo</u>	15
I.6. Alterações enzimáticas na peroxidase do raba- nete (HRP) em presença de carbofuranos fe- nólicos	17
I.7. Objetivo da tese	18
II. PARTE EXPERIMENTAL	22
II.1. Material	22
II.2. Aparelhagem	24
II.3. Métodos	24

	<u>Pag.</u>
II.3.1. Preparação de solução tampão	24
II.3.2. Solução de ácido indol - 3 - acético	25
II.3.3. Solução de tiocarbamatos e carbofu- ranos	25
II.3.4. Solução de peroxidase (HRP)	25
II.3.5. Solução de corantes (Aceptores xan- tênicos)	25
II.3.6. Preparação de AS, DBAS e DPAS	26
II.3.7. Preparação de composto I e composto II de peroxidase	26
II.3.8. Determinação de grupos SH	26
II.3.9. Determinação de marcação em t - RNA e HRP	27
III. INTERAÇÃO DE HERBICIDAS TIOCARBAMATO COM O SISTEMA IAA/HRP/O ₂	28
III.1. Resultados	28
III.1.1. Otimização das condições experimen- tais para o sistema IAA/HRP/O ₂	28
III.1.2. Consumo de oxigênio	28
III.1.3. Formação de indol - 3 - carboxialdei- do	29
III.1.4. Geração de estados excitados	33
III.1.5. Efeito de catalase, superóxido dis- mutase (SOD), benzoato e DABCO na emissão do sistema IAA/VERNOLATE ...	40
III.1.6. Reação com intermediário de peroxi- dase	40

FIGURAS

	<u>Pág.</u>
Fig. III.1. Tempo de indução causado por molinate após a segunda adição de IAA	30
Fig. III.2 Aumento na formação de IA causada por concentrações de molinate a pH = 5,6.	31
Fig. III.3. Aumento na formação de IA causado por concentrações de molinate a pH = 3,8.	32
Fig. III.4. Aumento na emissão causado por concentrações de vernolate	34
Fig. III.5. Aumento na emissão causado por concentrações de molinate	35
Fig. III.6. Supressão de fluorescência de rosa-bengala quando em presença de concentrações de molinate	38
Fig. III.7. Comportamento de DBAS no sistema IAA/HRP/ VERNOLATE/ Mn ⁺⁺ em relação aos sistemas IAA/HRP/DBAS e IAA/ HRP/ VERNOLATE	41
Fig. III.8. Comportamento de D AS no sistema IAA/HRP/ VERNOLATE/ Mn ⁺⁺ em relação aos sistemas IAA/HRP/D AS e IAA/ HRP/ VERNOLATE	42
Fig. III.9. Formação de estados excitados na ausência ou presença de molinate com diferentes períodos de incubação	43

Fig. III.10. Variação da absorbância em função do tempo, do sistema IAA/HRP/O ₂ a pH = 3,8 a 400 nm e 420 nm na ausência e presença de molinate	45
Fig. III.11. Variação da absorbância em função do tempo, do sistema IAA/HRP/O ₂ a pH = 5,6 a 400 nm e 420 nm na ausência e presença de molinate	46
Fig. III.12. Espectros de absorção de HRP e compostos I e II obtidos quimicamente..	48
Fig. IV. 1. Inibição no consumo de oxigênio causado por concentrações de carbofurano fenol	60
Fig. IV. 2. Inibição no consumo de oxigênio causado por concentrações de ceto carbofurano fenol	61
Fig. IV. 3. Consumo de oxigênio na degradação enzimática de ceto carbofurano fenol na presença e ausência de HRP	62
Fig. IV. 4. Inibição na formação de estados excitados causado por concentrações de carbofurano fenol	64
Fig. IV. 5. Efeito da adição retardada de carbofurano fenol na formação de estados excitados	65

Fig. IV. 6. Comportamento do ceto carbofurano fenol na emissão fotônica do sistema IAA

TABELAS

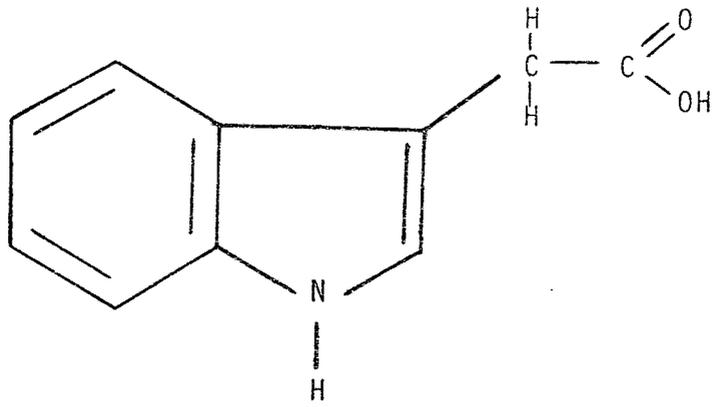
Tabela III.1. Supressão de fluorescência causada pela interação tiocarbamato rosa bengala	37
Tabela III.2. Aumento de quimioluminescência do sistema IAA/HRP/VERNOLATE/O ₂	39
Tabela III.3. Aumento de emissões fotônicas do sistema CETO CARBOFURANO/HRP/O ₂	68

I. INTRODUÇÃO

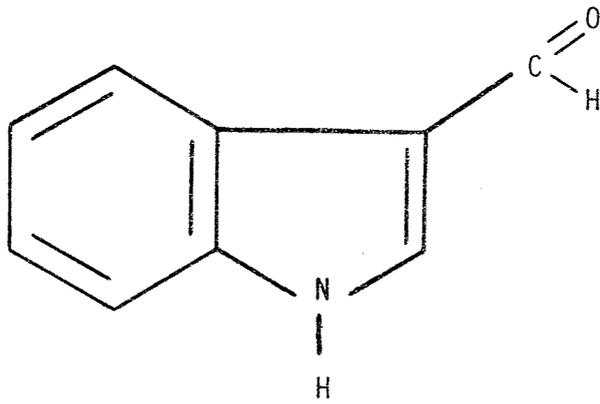
I.1. Generalidades

A existência de um sistema enzimático capaz de catalizar a degradação oxidativa do hormônio responsável pelo crescimento de plantas, o ácido indol - 3 - acético (IAA) tem sido verificada de há muitos anos (HINMAN e LANG , 1965), e os detalhes da destruição da enzima tem sido objeto de muitos estudos. O consumo de oxigênio na oxidação de IAA catalisada por peroxidase (uma hemoproteína) foi intensamente estudado (KENTEN, 1955) e sabe-se que esta reação é estequiométrica consumindo 1 mol de O_2 e liberando 1 mol de CO_2 por mol de IAA oxidado (RAY e THIMANN, 1956). Dos produtos finais desta degradação enzimática foram identificados como sendo os mais importantes o indol - 3 - carboxialdeído e o 3 - metileneoxindol (HINMAN e LANG, 1965).

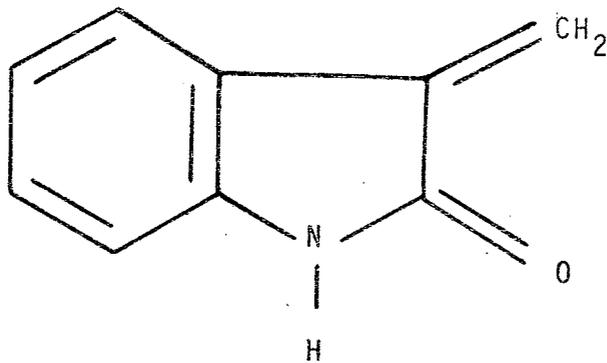
Peroxidases são enzimas de origem animal ou vegetal capazes de catalisar a oxidação de uma variedade de compostos orgânicos por peróxido (caráter peroxidativo) ou por oxigênio (caráter oxidativo). Peroxidases de origem vegetal contêm um grupo prostético ou ferriprotoporfirínico IX, ao passo que peroxidase de origem animal não contêm este grupo prostético, mas contêm um grupo heme modificado (DUNFORD e



ÁCIDO INDOL - 3 - ACÉTICO (IAA)

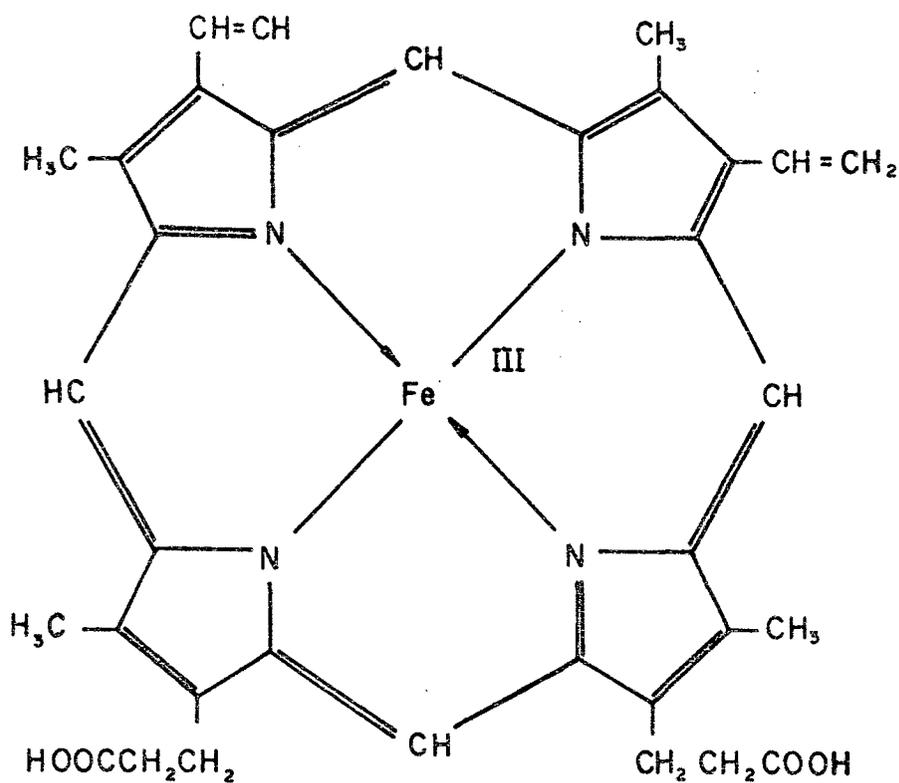


INDOL - 3 - CARBOXIALDEÍDO (IA)



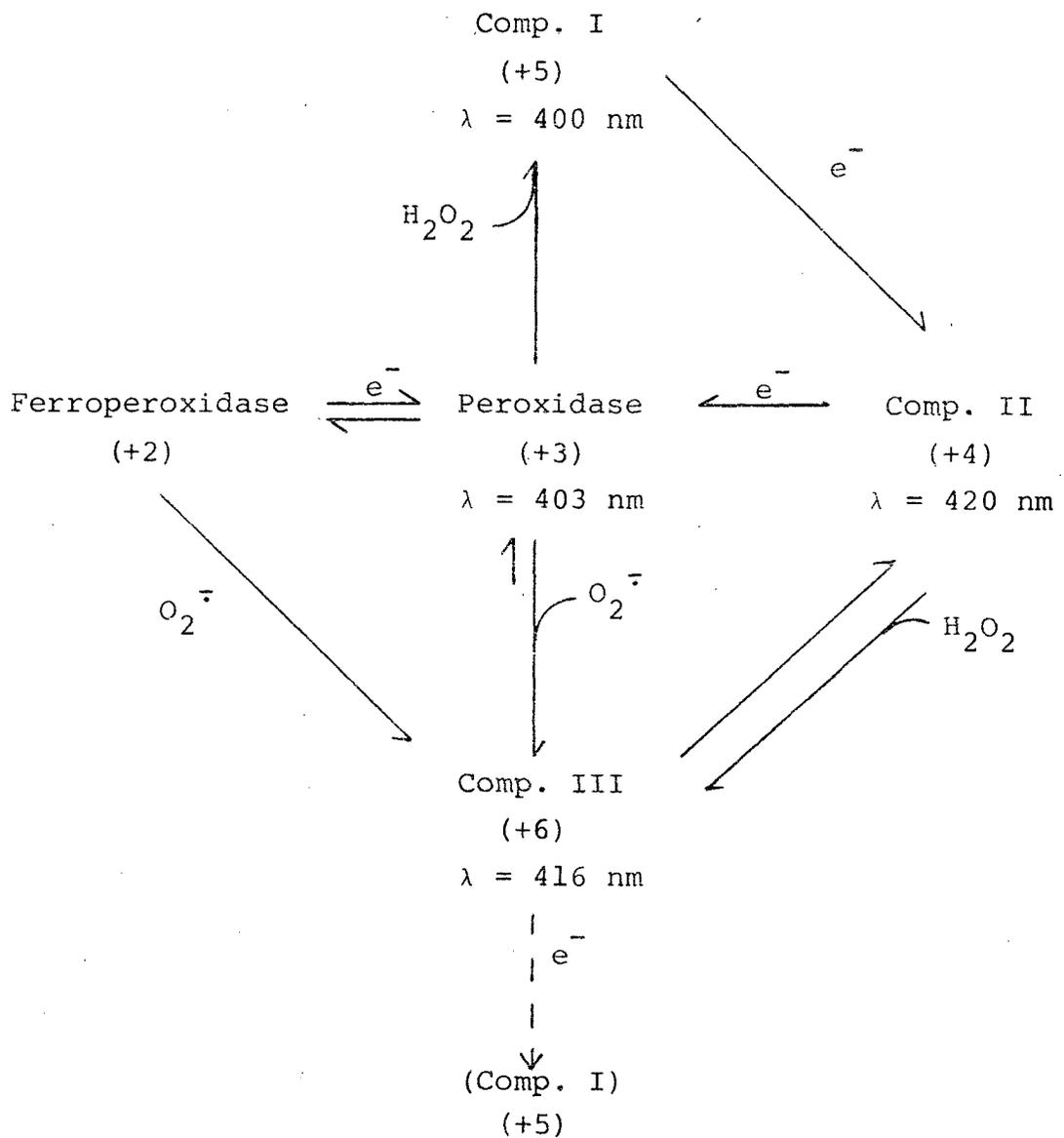
3 - METILENEOXINDOL

STILLMAN, 1976).



Mudanças na região visível da peroxidase foram observado durante a degradação de IAA sob condições aeróbicas (FOX e PURVES; 1965) e três distintas fases foram observadas na reação entre o IAA e a peroxidase. A oxidação de IAA ocorre após o tempo de indução de alguns segundos, durante o qual a

enzima se converte numa hemoproteína de cor verde, chamada de P - 670 e rapidamente convertida a composto II. A oxidação de IAA continua até quase ao fim da segunda fase da reação. A última fase é a restauração do composto II à forma de enzima nativa (YAMAZAKI e YAMAZAKI, 1973). O esquema seguinte mostra possíveis formas para a peroxidase que aparecem durante reações peroxidase oxidase.



A promoção do crescimento de plantas por certos inseticidas e a inibição do crescimento por herbicidas, levaram pesquisadores a estudar a interação destes compostos na degradação enzimática da auxina IAA. Estudos in vivo mostraram progressiva inibição de crescimento e aumento na atividade peroxidativa da peroxidase em plantas tratadas com herbicida tiocarbamato. A atividade foi determinada pela verificação do consumo de H_2O_2 em micromoles por minuto, quando em presença de peroxidase extraída de plantas, tratadas com EPTC (S - etil dipropiltiocarbamato) (HARVEY e col., 1975). Inseticidas carbofurano e seus metabolitos promovem o crescimento das plantas, quando estas são tratadas com IAA, ao mesmo tempo que inibem a degradação enzimática de IAA in vivo e in vitro. Interferências nas mudanças espectrais induzidas por IAA também foram encontradas quando em presença destes compostos. (LEE e CHAPMAN, 1977; LEE, 1975; LEE, 1977).

I.2. Metabolismos e ação dos herbicidas tiocarbamato

Tem-se dado alguma atenção ao estudo do metabolismo de herbicidas tiocarbamato. Experiências com compostos radiativos (^{14}C e ^{35}S) revelaram de forma bastante significativa a presença dos metabolitos e sua localização nas diversas partes da planta.

I.2.1. Metabolismos em plantas

O herbicida tiocarbamato EPTC degrada-se em plantas de alfafa (Medicago sativa) para CO_2 . A mesma degradação também é encontrada em sementes de diversas espécies de plantas, sendo que as sementes se mostram mais resistentes a este herbicida do que as próprias plantas. Nestes estudos foi utilizada a técnica de marcação. ^{35}S foi incorporado no ácido cistêmico, cistina, metionina, sulfona metionina e dois compostos não identificados, enquanto que o ^{14}C foi incorporado na frutose, glucose e diversos amino ácidos (FANG e YU, 1958; NALEWAJA e col., 1964). A presença de amino ácido contendo ^{35}S sugere a quebra entre o átomo de enxofre e o grupo etila (FANG, 1975).

Os seguintes tiocarbamatos, Molinate (S - etil - hexahidro - 1H - azepine - 1 carbotioato), Cicloate (S - etil N - etilciclohexil - tiocarbamato) e CDEC (2 - cloroalil dietil - ditiocarbamato) degradaram-se completamente para $^{14}\text{CO}_2$. Cicloate, após o terceiro dia de aplicação, degradou-se e o ^{14}C foi incorporado na glicina, asparagina, prolina, alanina, valina, leucina, fenilalanina, sucrose e celulose (GRAY, 1969; ANTOGNINI e col., 1970; FANG, 1975).

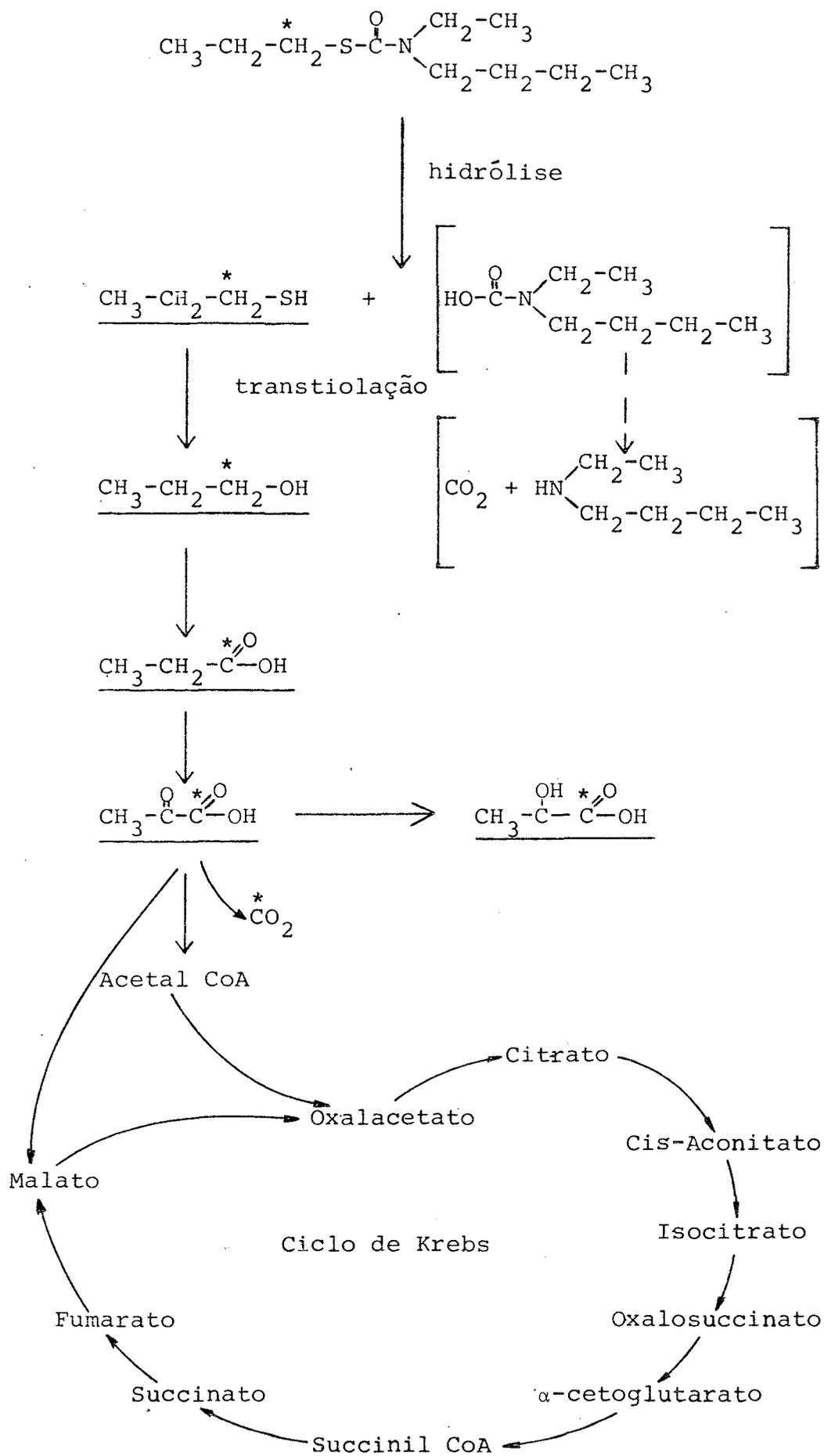
Fang (1975) propôs para herbicidas tiocarbamato uma quebra hidrolítica na ligação éster ou amida, gerando produtos como tiol, CO_2 e dialquil amina, podendo ocorrer a hidro

xilação dos grupos alquilas, oxidação do átomo de enxôfre e alquilação (FANG, 1975). O esquema da página seguinte foi proposto por Fang para a degradação de Pebulate (S - propil butiletil - tiocarbamato). As energias de ligação e estabilidade do grupo sainte favorecem a fissão éster em relação à quebra da amida aliada ao fato de que os tiocarbamatos possuem moderada reatividade à hidrólise.

Recentes pesquisas acusaram a presença de sulfóxidos de EPTC, pebulate e butilate (S - etil diisobutil - tiocarbamato) em metabolitos de plantas e animais (HUBBELL e CASIDA, 1977; CASIDA e col., 1975). Estes achados não favorecem o roteiro da degradação (proposto por Fang) de tiocarbamato iniciado por hidrólise. Sulfoxidação apresenta aumento da reatividade de tiocarbamato em reações com fissão de éster, por polarização do carbono da carbonila; aumentando sua eletrofilidade, enquanto decresce a basicidade do grupo sainte. O ânion sulfenate, partindo dos sulfoxidos, tem uma baixa basicidade em relação ao íon mercaptídeo, devido à deslocalização de carga negativa (DUTKA e col., 1978).

I.2.2. Metabolismos em solos

Devido a sua alta volatilidade, os herbicidas tio-



carbamatos se mantêm no solo por tempo bastante curto. Outros fatores, como a degradação por microorganismos e reações químicas, ajudam a diminuir o tempo de permanência destes compostos no solo (FANG, 1975). Solos autocalvados são menos eficientes na degradação de tiocarbamatos do que solos normais, mas desconhece-se qualquer microorganismo de solos capaz de degradar herbicidas tiocarbamatos (GRAY e WEIERICH, 1968; FANG, 1975). Baseado em estudos de plantas e animais, Fang sugere a hidrólise com a quebra do éster formando mercaptano, CO_2 e amina.

I.2.3. Ação dos herbicidas tiocarbamato

O mecanismo de ação de herbicidas tiocarbamato a nível celular e molecular ainda não é bem entendido e acredita-se que estes atuam em diferentes sítios.

Estudos feitos sobre a respiração fotossintética de cereais tratados com EPTC mostraram que a respiração foi afetada levemente na concentração de 10^{-4}M , ao passo que na concentração de 10^{-3}M se constatou uma inibição de 75%. Aplicações a estágios diferentes de crescimento indicam que a ação fitotóxica do herbicida afeta o crescimento de plantas no estágio em que a inibição fotossintética não é importante (ASHTON e col., 1977).

Cereais tratados com EPTC sofrem, além da inibição de crescimento, inibição também da síntese de RNA em seus tecidos, antagonizada pela auxina sintética (2,4 - dicloro fenoxi) ácido acético (2,4 - D). Este aumenta a síntese total de RNA (BESTE e SCHREIBER, 1972). O mesmo efeito foi encontrado em plantas tratadas com molinate, sendo antagonizado pelo ácido giberélico (GA) (CHEN e col., 1968) .

EPTC, na concentração de 10^{-3} M, inibe severamente a fosforilação oxidativa em mitocôndrias de couve, indicando que estas são mais susceptíveis à ação de EPTC (LOTLICAR e col., 1968). Foi também demonstrado que EPTC exerceu um efeito desacoplante na fosforilação oxidativa de células livres Nitrobacter agilis. O EPTC aparentemente não afeta o transporte de elétrons, desde que a atividade de oxidase NADH_2 não tenha sido afetada pela adição de $1,57 \times 10^{-3}$ M deste herbicida (WINELY e SAN CLEMENTE, 1971).

I.3. Metabolismo do inseticida carbofurano

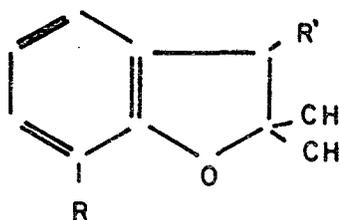
Conhecido como inseticida de largo espectro de ação, o carbofurano (Niagar 1024) é aplicado em plantações de algodão, produzindo mortalidade de 80 a 100% nas seguintes es

pécies: Aphis gossypii, Bucculatrix thuberiella, Estigmene acrea, sendo inefetivo contra Tretranyehus cinnabarinus (REYNOLDS, 1967).

Tanto carbofurano como seus derivados são altamente eficientes como inseticidas de contato. A atividade inseticida e a ação anticolinesterase do carbofurano são de interesse devido a sua semelhança com o inseticida baygon. Assim, no carbofurano, a interação isopropil aniônica é fixada na posição pela fusão do anél dimetil furano (METCALF e FUKUTO, 1965).

Usando carbofurano marcado na posição ^{14}C - anél e ^3H - anél em folhas de algodão, encontraram-se vários metabolitos de carbofurano. As folhas foram homogenizadas, extraídas e passadas por coluna cromatográfica a intervalos de 1,2,4,6,8 e 12 dias. Após 8 dias verificou-se um aumento de compostos polares. Estes metabolitos polares são obviamente formados na folha a partir do carbofurano, que é de baixa polaridade (METCALF e col., 1968). O mesmo comportamento foi observado em outros carbamatos metabolizados por oxidação e hidrólise (DOROUGH e CASIDA, 1964; METCALF e col., 1966). O Carbofurano, nos estágios iniciais de isolamento, foi recuperado rapidamente até total desaparecimento depois do oitavo dia.

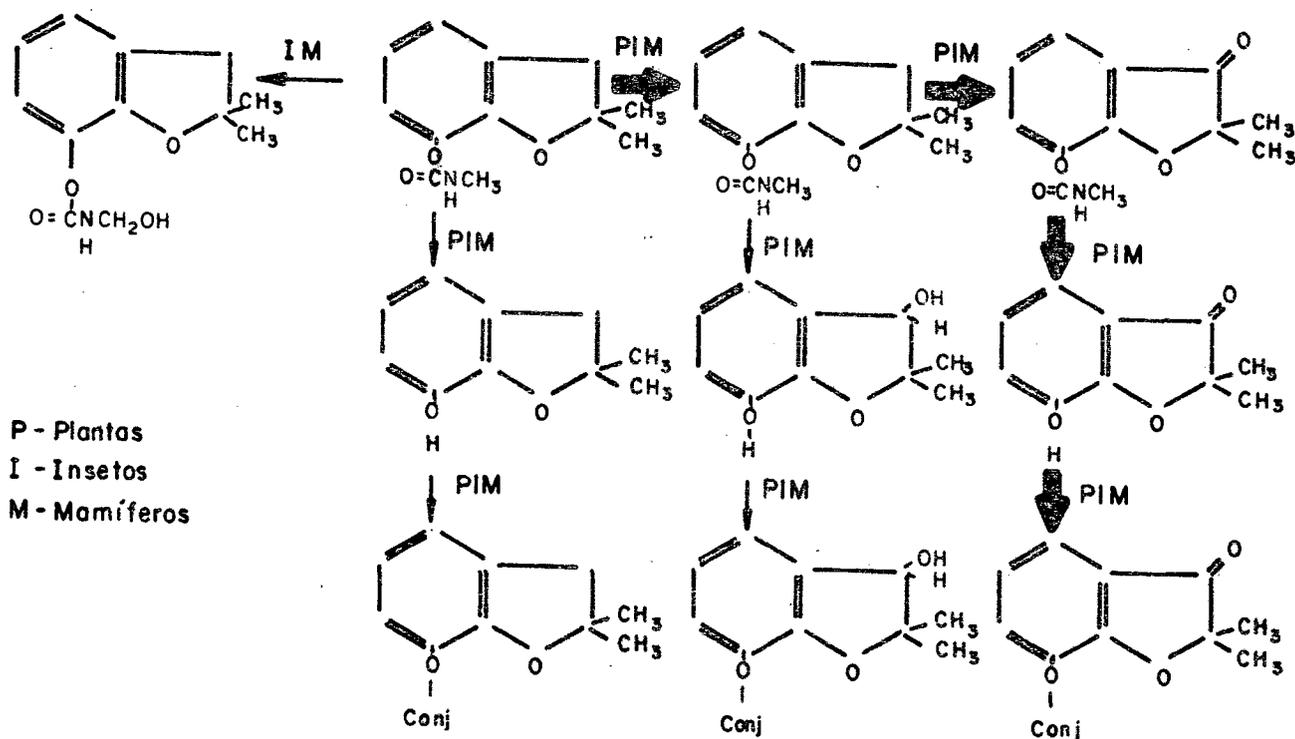
Os seguintes metabolitos foram encontrados no experimento de Metcalf:



- R = OCONHMe , R' = H Carbofurano
 R = OCONHMe , R' = OH Hidroxicarbofurano
 R = OCONHMe , R' = O Cetocarbofurano
 R = OH , R' = H Carbofurano Fenol
 R = OH , R' = OH Hidroxicarbofurano Fenol
 R = OH , R' = O Cetocarbofurano Fenol

O metabolito ceto carbofurano é hidrolíticamente instável, e não se acumula em grandes quantidades na planta. Compostos como o hidroxí carbofurano foram encontrados em forma de conjugação. (METCALF e col., 1968). Estes conjugados mostraram atividade anticolinesterase através da técnica de cresol vermelho no plasma sanguíneo (OONNITHAN e CASIDA, 1966). Uma pequena quantidade de conjugado de carbofurano fenol foi encontrado após hidrólise. O conjugado com hidróxi carbofurano foi aparentemente considerado mais estável do que conjugados fenólicos, sendo somente uma pequena quantidade de aglicone liberada por tratamento enzimático. A especificidade de β - glucosidase indicam que estes conjugados são glucosídeos. Com emprêgo de espectrome

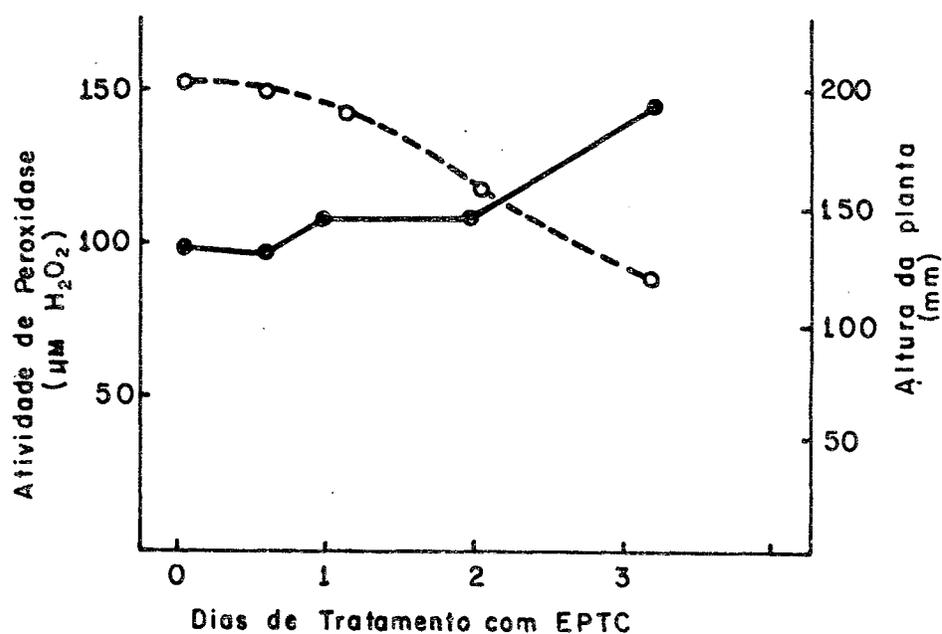
tria de massa e infravermelho, identificou-se o ceto carbofurano fenol e seus conjugados glucosídeos. Estudos feitos em insetos e mamíferos mostraram metabolitos similares (METCALF e col., 1968). O seguinte esquema dá uma visão do caminho seguido pelo carbofurano ao ser metabolizado:



I.4. Ação do tiocarbamato EPTC na atividade enzimática da peroxidase e crescimento de plantas

Cereais tratados com EPTC tiveram a cor de suas folhas alteradas para um verde escuro semelhante ao de plantas

tratadas com mutagênicos ou com retardantes de crescimento AMO 1618 (Mc CUNE e GALSTON, 1959; HALEVY, 1963). Após este tratamento, observa-se um progressivo aumento na atividade de peroxidase. No primeiro dia de tratamento não houve inibição do crescimento, porém no segundo dia o aumento na atividade de peroxidase acarretou inibição de crescimento, sendo bastante acentuada no terceiro dia de tratamento. O presente gráfico mostra a inibição de crescimento (linhas interrompidas) versus aumento na atividade de peroxidase (linhas contínuas).



Aplicações de hormônios estimulam o crescimento de sementes não tratadas com EPTC, mas quando tratadas com este herbicida, somente o GA estimula o crescimento, contra atacando o efeito de EPTC. O IAA não produz o mesmo efeito. Tanto o GA como o IAA não antagonizaram a estimulação da atividade de peroxidase por este herbicida.

O antídoto N,N - dialil - 2,2 - dicloroacetamida (R-25788) bloqueia completamente a estimulação da atividade de peroxidase por ação de EPTC e reduz fortemente a inibição de crescimento. Ao se aplicar o antídoto sem o herbicida, a atividade de peroxidase é inibida de 20 a 30%. In vitro R - 25788 não altera a atividade de peroxidase. (HARVEY e col.,1975).

I.5. Ação de carbofuranos na degradação enzimática de IAA

I.5.1. Estudos in vivo

Cereais tratados só com carbofurano fenol e hidroxicarbofurano fenol não sofreram alterações no crescimento, ao passo que, ao serem tratados com um destes compostos e a auxina IAA, sofreram significativo aumento no crescimento em relação a cereais só tratados com IAA. Tratando cereais com

IAA marcado na posição (IAA - 1 - ^{14}C) e inseticidas carbofurano e seus metabolitos, constatou-se que estes compostos inibem a degradação enzimática de IAA in vivo. Os resultados foram obtidos em função da quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ liberado, e podem ser vistos na tabela abaixo (LEE, 1975):

Composto	$^{14}\text{CO}_2$ liberado cpm	%Inibição
Carbofurano	6900	38
Carbofurano fenol	1448	87
Hidroxi carbofurano	12086	0
Hidroxi carbofurano fenol	4290	62
Ceto carbofurano	11477	0
Ceto carbofurano fenol	9574	14
Controle	11143	

Estudos sobre a degradação enzimática de IAA e sua interação com carbofurano e seus metabolitos mostraram que o carbofurano fenol é um forte inibidor desta degradação, concordando com os resultados de experiências feita in vivo.

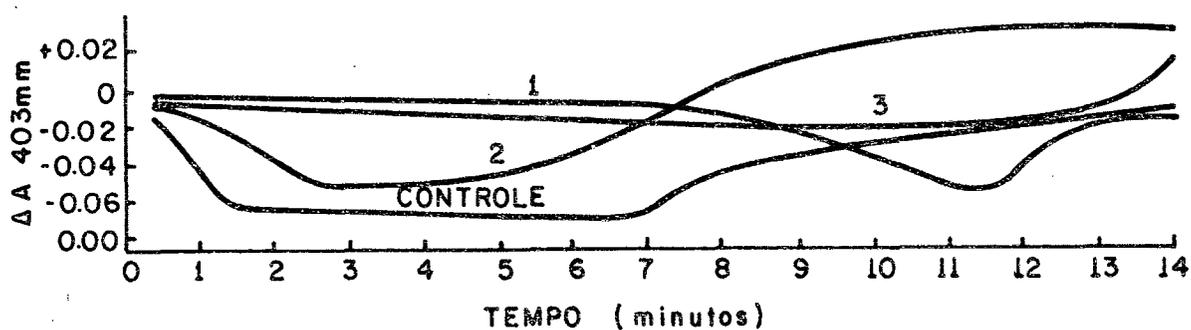
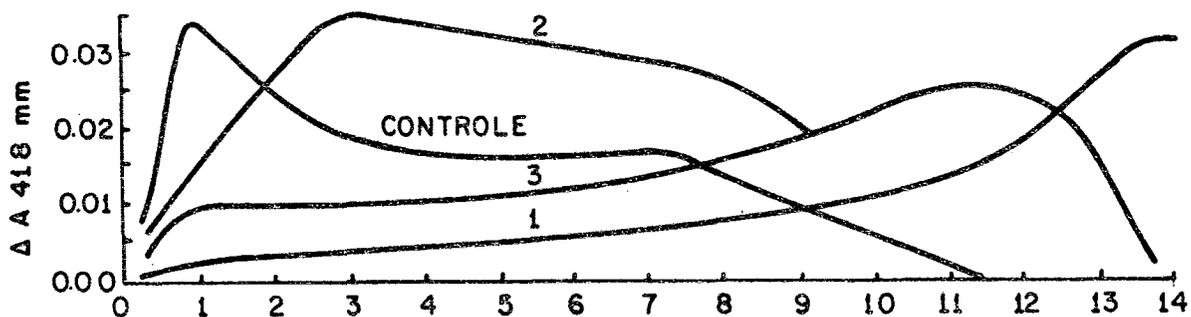
A cinética de formação de produtos na degradação de

IAA foi seguida a 261 nm. A introdução de carbofurano fenol e hidroxí carbofurano fenol causa inibição no sistema. Esta inibição não é persistente, indicando que estes compostos não são estáveis no sistema. Essa instabilidade foi confirmada ao ser constatada a degradação de carbofurano fenol pela técnica de UV a 202 nm. Ao contrário destes inibidores, o ceto carbofurano fenol apresenta inibição persistente sobre o sistema, o que, segundo Lee, é indicação de que o composto possui grande estabilidade junto ao sítio de ligação da peroxidase. (LEE e CHAPMAN, 1977). Mas, conforme resultados de experiências feitas em nosso laboratório e que serão discutidas nesse trabalho, este inibidor também sofre decomposição. Introduzindo ceto carbofurano fenol e carbofurano fenol no sistema a diferentes tempos, observa-se que estes inibem em todos os estágios da reação (LEE e CHAPMAN, 1977).

I.6. Alterações enzimáticas na peroxidase do rabanete (HRP) em presença de carbofuranos fenólicos

Metabolitos fenólicos de carbofurano foram testados e mostraram que interferem com as mudanças induzidas pelo IAA na absorção visível de HRP conforme se vê na figura seguinte.

Sob condições específicas, realiaram - se estudos com a cinética diferencial de HRP a 420 nm e a 403 nm. Na lin



ha de controle vê-se claramente a formação de composto II de peroxidase (420 nm) e o desaparecimento de peroxidase nativa (403 nm). Após o oitavo minuto, grande parte de peroxidase volta a seu estado nativo. Carbofurano fenol interferiu violentamente nas mudanças induzidas por IAA (linha 1) provocando um tempo de indução de oito minutos, sendo verificado semelhante efeito com o hidroxí carbofurano fenol, apenas com o tempo de indução menor (linha 2). Em contraste, os efeitos com ceto carbofurano fenol foram bem diferentes (linha 3). O tempo de in-

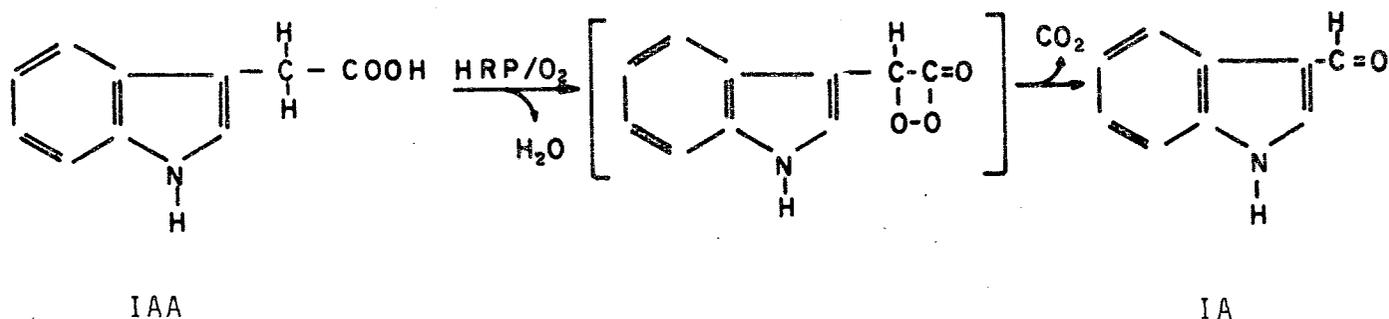
dução a 403 nm persiste por todo o tempo da experiência, sendo confirmado após a varredura do espectro de absorção por toda a região visível. O aumento a 420 nm indica formação de certa quantidade de composto II quando em presença deste metabolito, mas é considerado insignificante, se comparado com outras linhas.

A destruição da atividade enzimática de HRP para a degradação de IAA e sua recuperação após a reconstituição da holoenzima e aprotéina, em nada mudaram a inibição da degradação de IAA, reforçando a idéia de que não somente o grupo heme foi envolvido na degradação de IAA, mas foi também requerida a participação do apoenzima. Mudanças conformacionais no HRP não afetaram a relação inibidor - IAA (LEE, 1977).

I.7. Objetivo da tese

Como vimos anteriormente, a degradação oxidativa da auxina IAA forma como produtos principais o indol 3 - carboxialdeído e o 3 - metileneoxindol. Estudos recentes têm demonstrado que a oxidação do IAA por HRP sob condições aeróbicas produzem uma espécie eletronicamente excitada (VIDIGAL e col., 1979). Isto é observado nas emissões e nos danos fotoquímicos provocados no grupo heme (VIDIGAL e col., 1975). Estudos

efetuados com o modelo feniltioéster em $\text{Me}_2\text{SO}/t - \text{BuOK}$ sugerem que a espécie emitente é o indol - 3 - carboxialdeído (DURÂN e col., 1976). Este composto é esperado de uma quebra de um hipotético dioxetano intermediário e também por analogia com a oxidação de isobutanal catalisada por peroxidase (FARIA OLIVEIRA e col., 1978; BECHARA e col., 1979).



Obteve-se transferência de energia para aceptores emissivos tais como eosina e rosa bengala; no caso da eosina foi até possível obter o espectro de fluorescência num espectro fluorímetro convencional (VIDIGAL e col., 1979).

Os estudos cinéticos de Lee foram baseados na formação de produtos como vimos anteriormente. Poucas informações são obtidas, se não forem correlacionados as cinéticas de consumo de oxigênio com a formação de produtos. A geração de estado eletronicamente excitado por processo enzimático também poderia fornecer bastante informação.

Estudos cinéticos com tiocarbamatos in vitro ainda .

não foram realizados.

Logo, acompanhando as cinéticas de consumo de oxigênio, de formação de indol - 3 - carboxialdeído (IA) e de emissão de estados excitados, muitas informações poderão ser tiradas do sistema, quando nele for introduzido um determinado defensivo agrícola.

II. PARTE EXPERIMENTAL

II.1 Material

Drogas	Procedência
Acetato de sódio	Riedel - de Haëneg Seelze Hannover.
Acetona	Carlo Erba.
Ácido acético	Carlo Erba.
Ácido clorídrico	J. T. Baker Chemical Co.
Ácido fosfórico	J. T. Baker Chemical Co.
Ácido indol - 3 - acético	Merck.
Ácido tricloro acético	Carlo Erba.
Benzoato de sódio	Aldrich Chemical Co.
Butilate	Stauffer do Brasil.
Catalase	Sigma Chemical Co.
Carbofurano fenol	Research Triangle Park.
Ceto carbofurano fenol	Research Triangle Park.

Drogas	Procedência
5' - 5 - ditio - bis - (2 - ácido nitro benzóico)	Calbiochem.
2 - ¹⁴ C - ácido indol - 3 - acético	Nuclear England Co.
Eosina amarela	Merck.
Etanol	Aldrich Chemical Co.
Fluoresceína	BDH Co.
Fosfato dibásico de potássio	May e Baker ltda.
Fosfato monobásico de potássio	Carlo Erba.
Molinate	Stauffer do Brasil.
p - cresol	Carlo Erba.
Peroxidase do rabanete (HRP)	Sigma Chemical Co.
Peróxido de hidrogênio	Merck.
Rosa bengala	Fisher Scientific Co.
Sulfato de manganês	J. T. Baker Co.
Superóxido dismutase	Sigma Chemical Co.
t - RNA de E. coli cepa W	Sigma Chemical Co.
Tetracloroeto de carbono	Merck.
1,4 - diazobicyclo (2,2,2) octano	Aldrich Chemical Co.
Vernolate	Stauffer do Brasil.

II.2. Aparelhagem

As medidas de consumo de oxigênio foram feitas num monitor biológico da "Yellow Springs Instruments", modelo 53.

Os espectros na região ultravioleta e visível foram obtidos num espectrofotômetro registrador Zeiss DMR 21, sendo utilizadas celas de 1 cm de caminho ótico.

Dependendo da intensidade, as emissões foram medidas num contador de cintilação líquidas Beckman LS - 100C, com o circuito de coincidência desligado, ou num contador de fótons Hamamatsu TV- C -767 (INABA e col., 1975).

A intensidade espectral de fluorescência foi medida num espectrofluorímetro "Aminco - Bowman", sem efetuar correções para o comprimento de onda ou flutuação de intensidade da fonte de excitação.

Os valores de pH foram lidos num potenciômetro Mettler, tipo E - 388.

II.3. Métodos

II.3.1. Preparação de solução tampão

A preparação dos tampões foi feita segundo GOMORI

(GOMORI, 1975).

II.3.2. Solução de ácido indol - 3 - acético

A solução de ácido indol - 3 - acético foi preparada em etanol e estocada protegida de luz.

II.3.3. Solução de tiocarbamatos e carbofuranos

A solução de tiocarbamatos e carbofuranos foram preparadas em etanol.

II.3.4. Solução de peroxidase (HRP)

As soluções estoque de HRP foram preparadas pela dissolução de massa adequada em meio tamponado ou água. A concentração de HRP foi determinada experimentalmente $\epsilon_{403} = 103\ 000\ \text{cm}^{-1}\ \text{M}^{-1}$.

II.3.5. Soluções de corantes (Aceptores xantênicos)

Com exceção de fluoresceína, que foi preparada em meio básico, todos os xantênicos foram preparados em água destilada, e usados dentro de 12 horas.

II.3.6. Preparação de AS, DBAS e DPAS

DBAS e AS foram preparados por sulfonação de DBA e antraceno, de acordo com o método descrito por BATTEGAY e BRANDT (1923); DPAS foi preparado por sulfonação de DPA segundo o método de ÉTIENNE e col., (1949). As concentrações de DBAS, DPAS e AS foram determinadas experimentalmente $\epsilon_{382} = 8940 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $\epsilon_{375} = 5040 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ e $\epsilon_{360} = 4558 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. respectivamente.

As soluções eram preparadas em água com 2% de etanol.

II.3.7. Preparação de composto I e composto II de peroxidase

A amostra de HRP foi extensivamente dialisada em água bidionizada e pentadestilada, obtendo-se resistividade igual a $1,22 \times 10^5 \Omega$. O composto I foi obtido pela adição de H_2O_2 na proporção de 1,1 : 1,0 molar para H_2O_2 :peroxidase (ROMAN e DUNFORD, 1976). A medida de condutividade foi feita em uma ponte de condutividade Beckman RC 16 B2. Composto II foi preparado a partir de composto I segundo Hewson e Dunford (1976).

II.3.8. Determinação de grupos SH

A determinação de grupos SH foi feita, tomando-se

uma alíquota de 0,5 ml do meio da reação e adicionando-se a uma mistura consistindo de 0,1 ml de fosfato tampão pH = 8,0, 1,5 ml de água destilada e 0,165 ml de reagente de Ellman's. A presença de SH é verificada pelo aumento na absorbância a 425 nm. O reagente de Ellman's é preparado pela dissolução de 39,6 mg de 5',5 - ditio - bis (2 - ácido nitro benzóico) em 10 ml de uma solução tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0 (STONIER e YANG, 1973).

II.3.9. Determinação de marcação em t-RNA e HRP

Faz-se reagir 2 - ¹⁴C - IAA (12,5 µM) em presença de HRP (2,0 µM) e t - RNA (500 µg/ml) em tampão acetato (0,05 M) a pH = 3,8. Após 15 minutos à temperatura ambiente, a reação é terminada com a adição de 1 volume de fenol saturado com tampão. Centrifuga-se, e a primeira fase é tratada com ácido tricloro acético (TCA) 10%, precipitando-se o t - RNA. O HRP é precipitado tratando-se a segunda fase com TCA. A contagem foi determinada em um contador de cintilação líquida BECKMAN LS - 250, utilizando-se de um cocktail padrão PPO - POPOP tolueno (BEDNAR e col., 1976; KEF-FORD e col., 1963).

III. INTERAÇÃO DE HERBICIDA TIOCARBAMATO COM O SISTEMA IAA/ HRP/O₂

III.1. Resultados

III.1.1. Otimização das condições experimentais para o sistema IAA/HRP/O₂

Procurou-se determinar as melhores condições para o sistema de degradação enzimática de IAA. Estas condições foram adequadas para a medida do consumo de oxigênio, formação de indol - 3 - carboxialdeído e emissão de moléculas excitadas. Em sistemas onde se usou vernolate (S - propil dipropil-tiocarbamato) e butilate, requereu-se 10% de acetona para sua solubilização, ao passo que com molinate não foi necessário.

III.1.2. Consumo de oxigênio

Os herbicidas vernolate, butilate e molinate não alteraram marcadamente o consumo de oxigênio na presença de 12,5 μM de IAA, 0,5 μM de HRP e na presença ou na ausência de 50 μM de Mn^{++} em 0,05 M de tampão acetato a pH = 3,8 e pH =

5,6. As concentrações dos tiocarbamatos variaram de 50 μM a 1,5 mM. Não foi tampouco observado efeito ao ser incubado HRP e tiocarbamato por três dias.

A velocidade do consumo de oxigênio na reação de HRP e IAA permanece constante. Esta reação obedece aparentemente à cinética de ordem zero. Uma vez que se atingiu o estado estacionário, a relação molar de consumo de oxigênio para IAA adicionado foi de 0,5 para $\text{pH} = 3,8$. A uma segunda adição de IAA na solução, após ter-se estabilizado reinicia-se o consumo de oxigênio (Fig. III.1.). Se a segunda adição for precedida de molinate, se verificará tempo de indução, e sua duração tem relação direta com a quantidade de molinate. Verifica-se por esta experiência que a velocidade de consumo de oxigênio foi dependente da quantidade de molinate, mas não do consumo total de oxigênio.

III.1.3. Formação de indol - 3 - carboxialdeído

A análise cinética de formação de indol - 3 - carboxialdeído foi realizada a dois valores distintos de pH . (Fig. III.2. e Fig. III.3.) e foi seguido na banda de absorção de 310 nm.

Estas duas cinéticas se diferenciam na altura da curva em que a $\text{pH} = 3,8$ é maior, indicando maior formação de

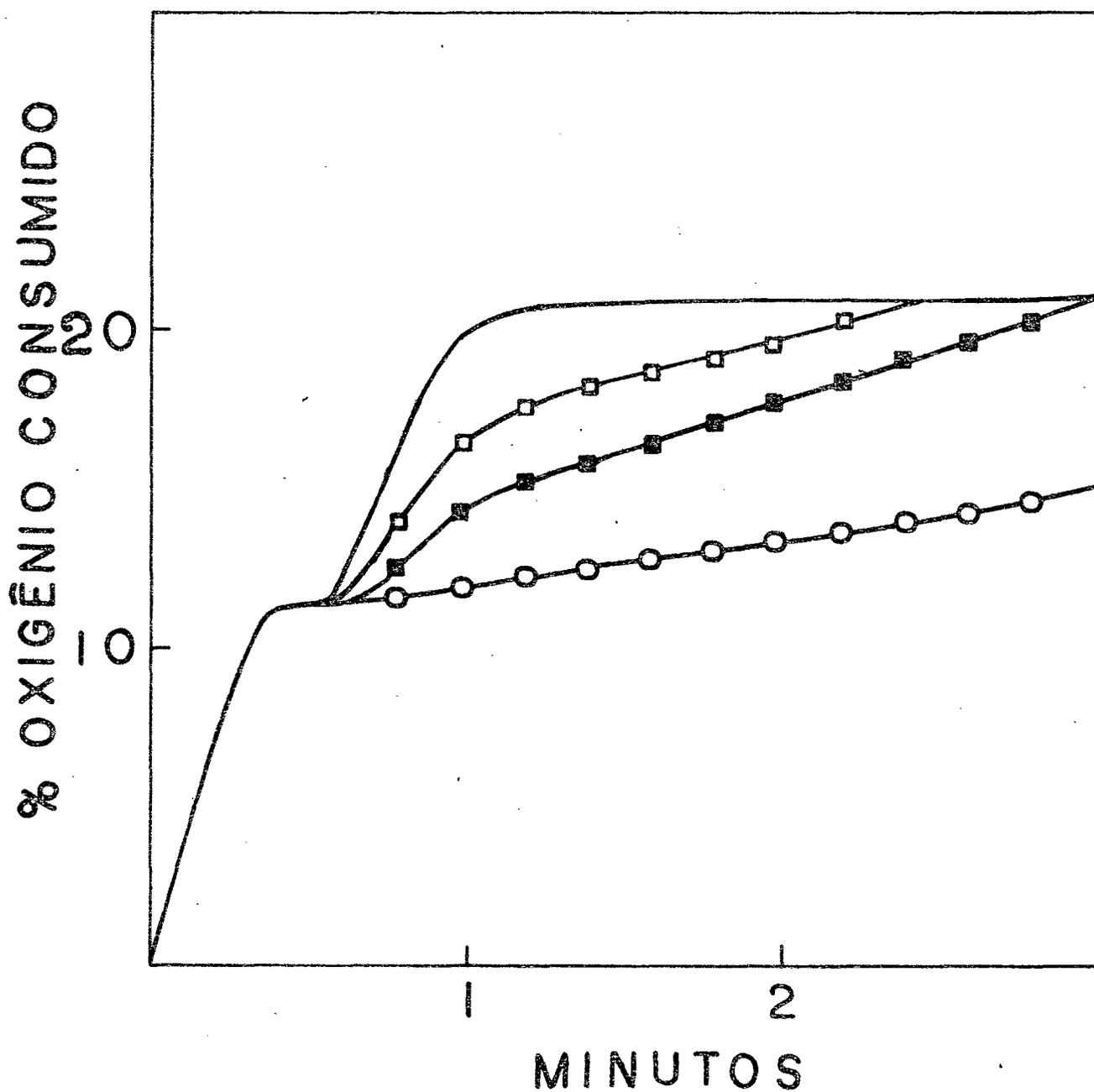


Fig.III.1. Tempo de indução causado por molinate após a segunda adição de IAA ($12,5 \mu\text{M}$) em tampão acetato ($0,05 \text{M}$) a $\text{pH} = 3,8$ a 25°C . A concentração da enzima foi de $2,0 \mu\text{M}$ e de molinate: (\square) $1,0 \text{mM}$, (\blacksquare) $2,0 \text{mM}$, (\circ) $3,0 \text{mM}$ e (—) $0 \mu\text{M}$.

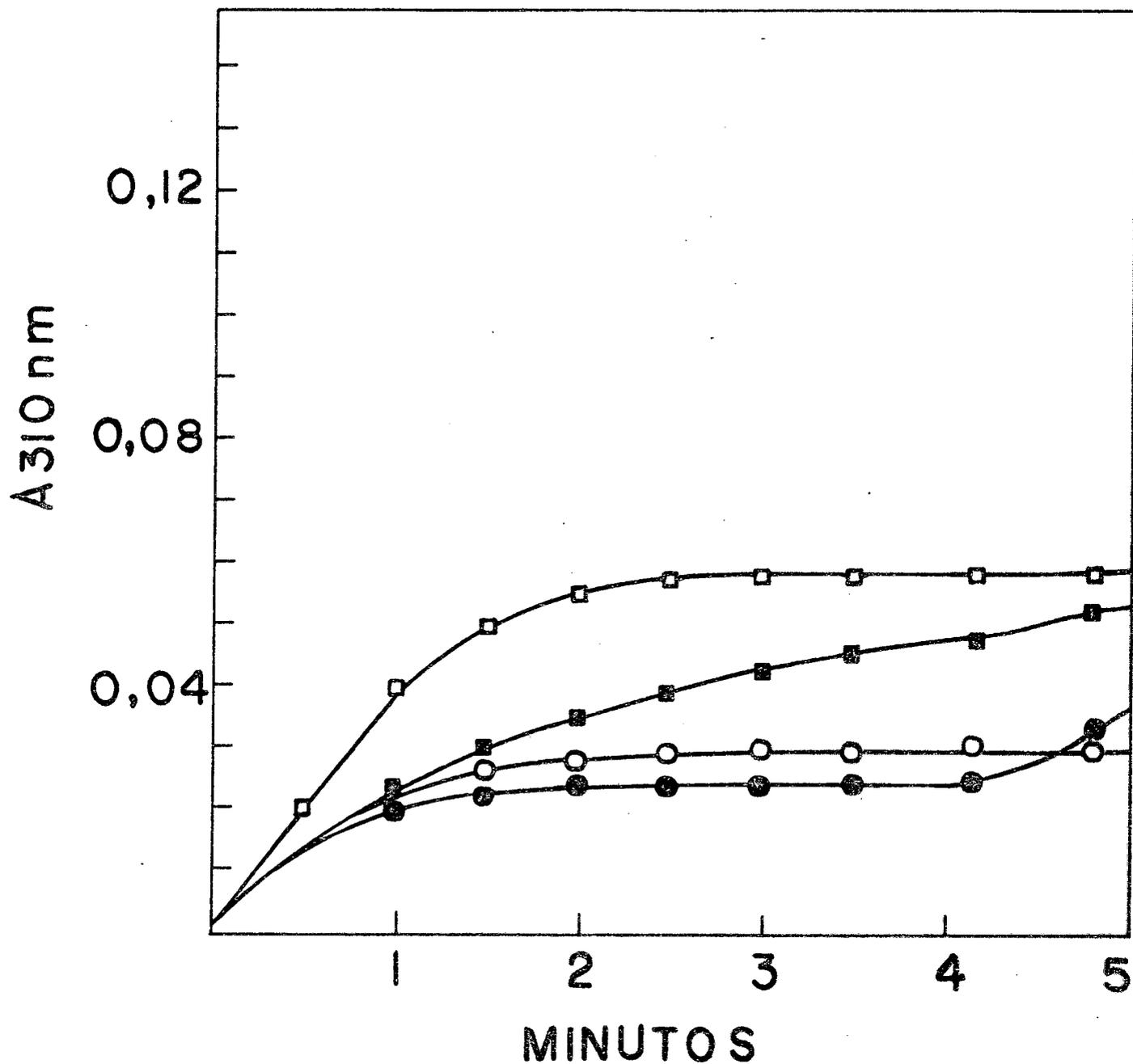


Fig.III.2. Aumento na formação de IA causado por concentrações de molinate. A concentração dos reagentes foi: IAA ($12,5 \mu\text{M}$), HRP ($2,0 \mu\text{M}$) em tampão acetato ($0,05 \text{M}$) a $\text{pH} = 5,6$ a 25°C . As concentrações de molinate foram: (\square) 2mM , (\blacksquare) 4mM , (\square) 6mM e (\bullet) 0mM .

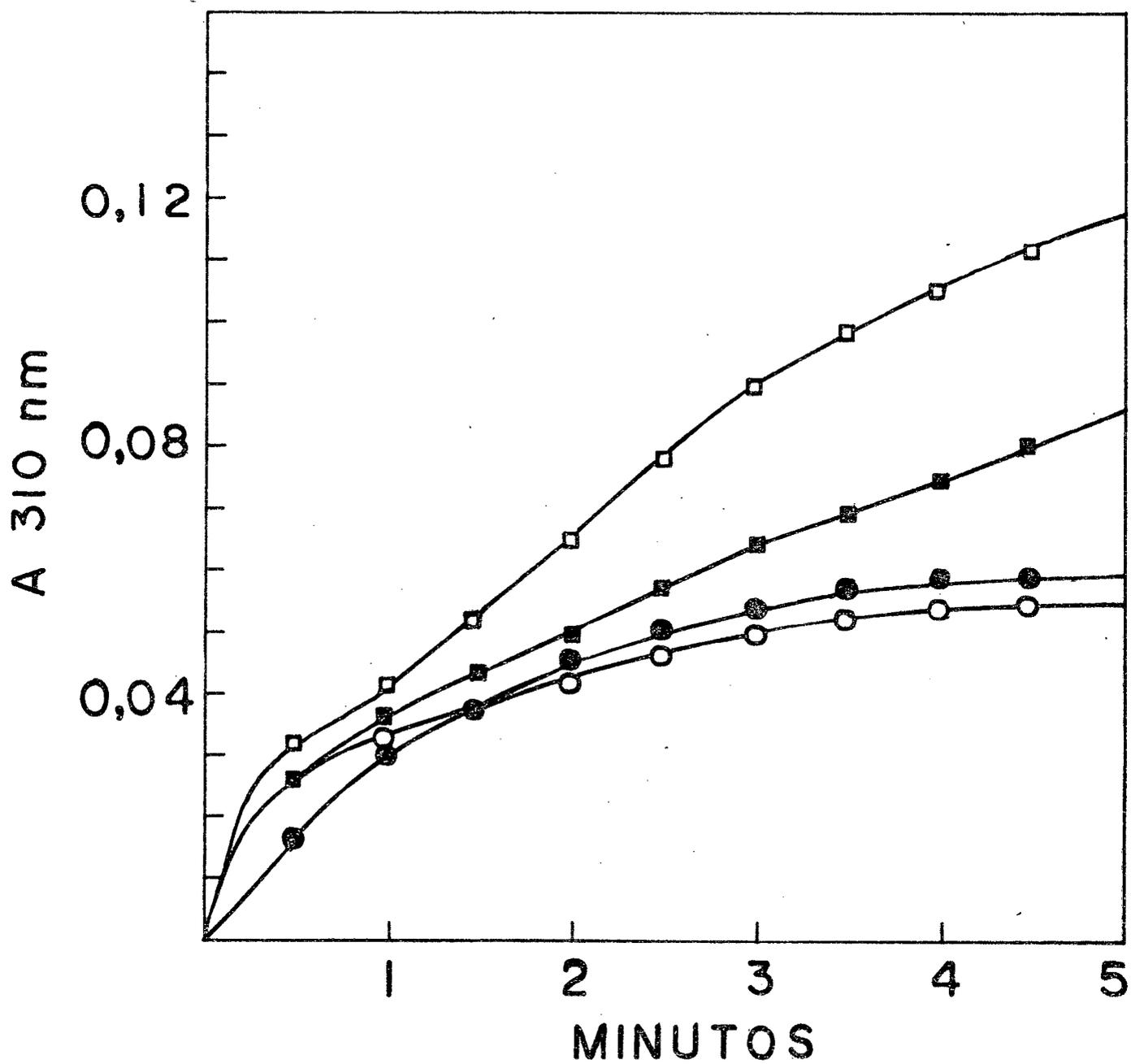


Fig.III.3. Aumento na formação de IA causado por concentrações de moli-nate. O pH do meio foi de 3,8 e as concentrações as mesmas da fig. III.2.

IA como produtos da degradação enzimática.

Os resultados vistos mostram de que a concentração de IA aumenta com o aumento da concentração de molinate. Os mesmos resultados podem ser observados com vernolate e butilate. A pH = 5,6 onde IA não é o maior produto, pequeno efeito foi observado.

Durante três dias foi observada a cinética de formação de IA. Verificou-se, através da incubação de HRP e tio carbamato, diminuição na formação de IA.

III.1.4. Geração de estados excitados

A emissão fotônica do sistema IAA/HRP/O₂, como foi visto anteriormente, é originária de IA (DURÁN e col., 1976).

Os resultados obtidos com a técnica de absorção (aparecimento de IA) e consumo de oxigênio, são confirmados pelos estudos sobre emissão de espécies excitadas. A fig. III. 4. mostra o aumento de emissão quando se aumenta a concentração de molinate. O mesmo efeito pode ser visto com butilate e vernolate, sendo o último bem mais eficiente (Fig. III.5.). A força iônica do tampão exerce importante papel no aumento de estados excitados. Efeitos de tiocarbamatos também são

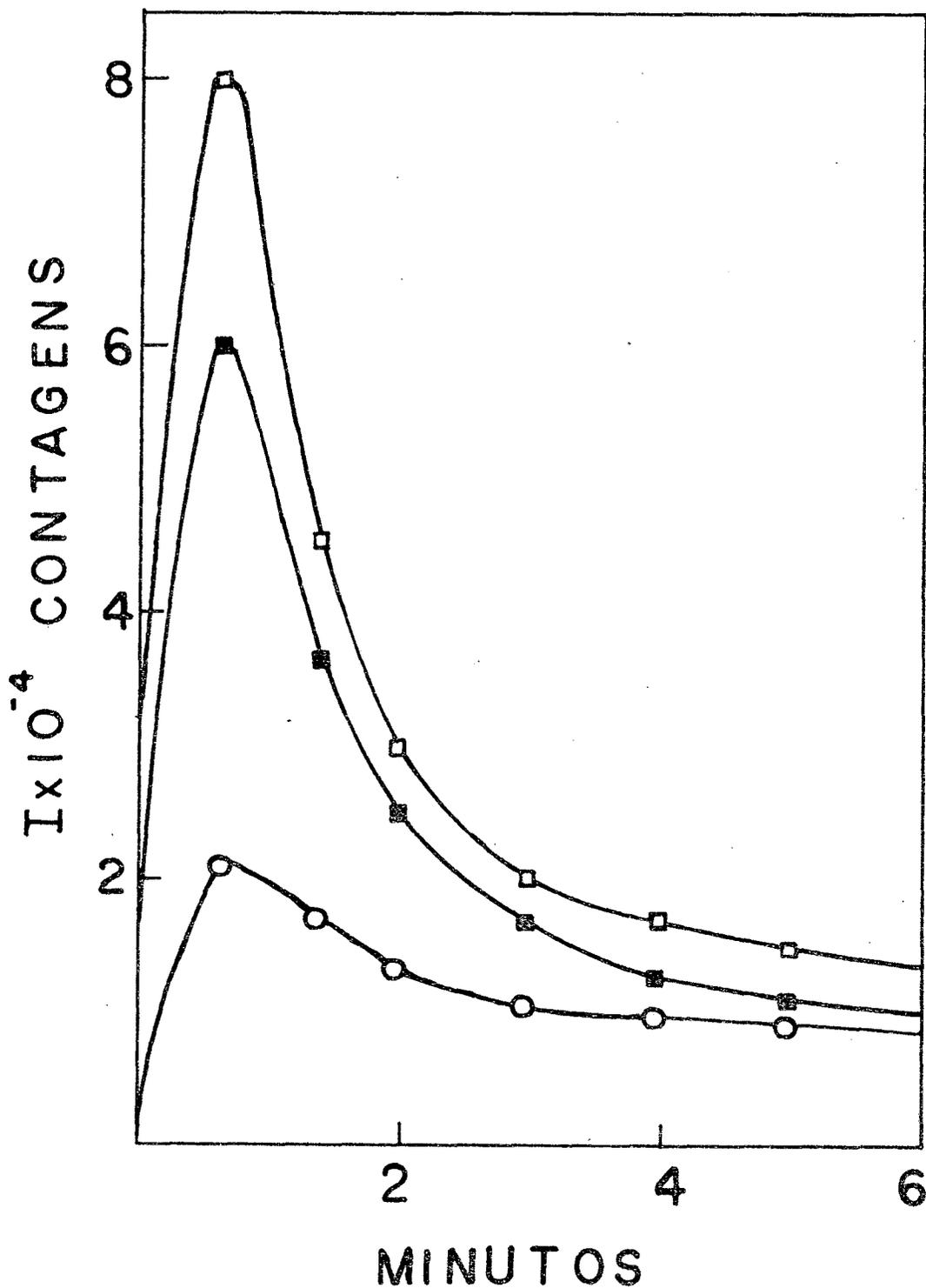


Fig.III.4

Aumento na emissão causado por concentrações de vernolate. A concentração dos reagentes foi: IAA ($1,25 \times 10^{-4} \text{M}$), HRP ($5,0 \times 10^{-7} \text{M}$) Mn^{++} ($5,0 \times 10^{-5} \text{M}$) em tampão acetato ($0,05 \text{M}$) a $\text{pH} = 3,8$ em 10% de acetona para melhor solubilização de vernolate (■) 0,5 mM, (□) 1,0 mM e (○) 0,0 mM.

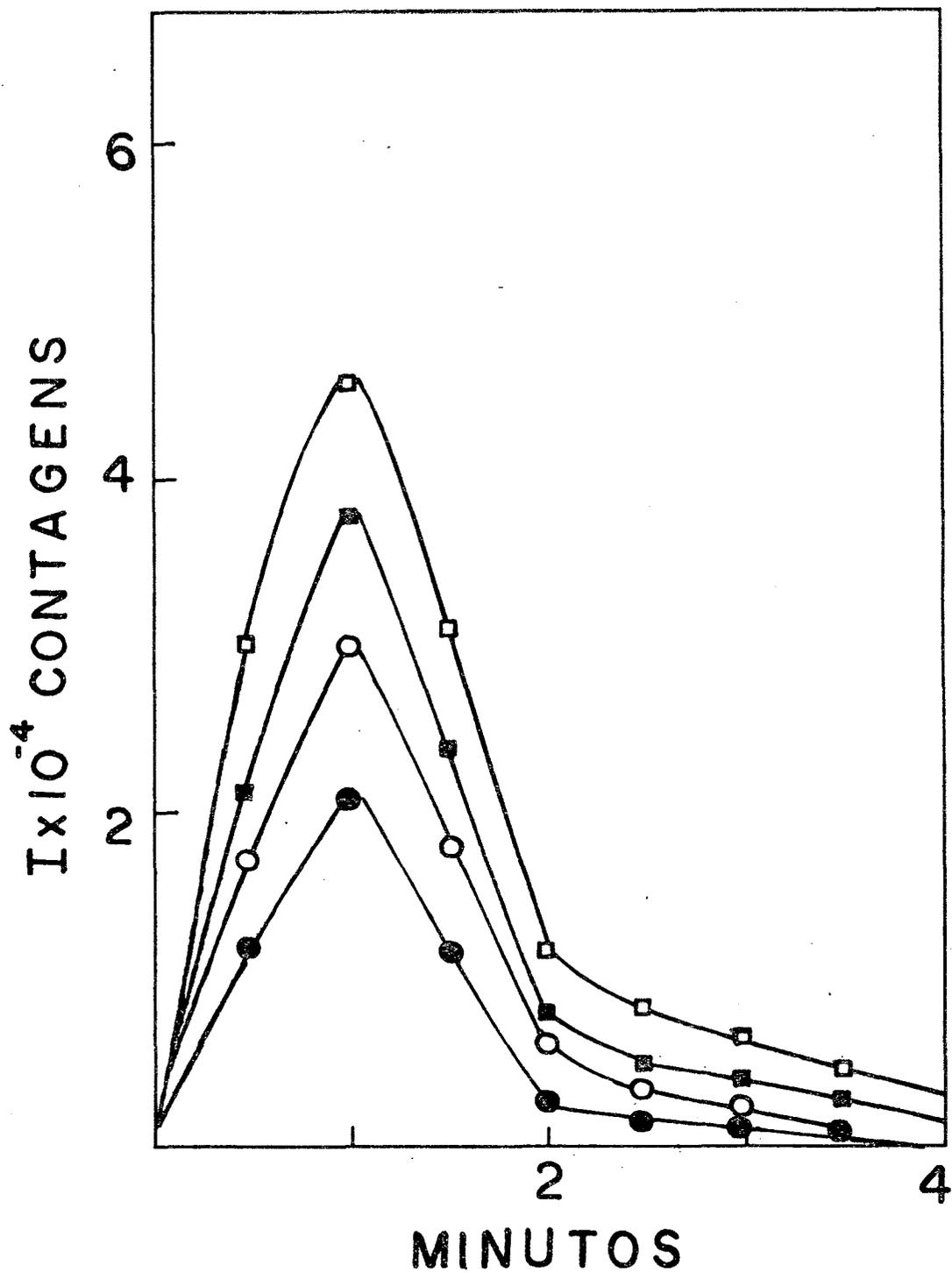


Fig. III.5. Aumento na emissão causado por concentrações de molinate. A concentração dos reagentes é a mesma da fig. III.2. com excessão das concentrações de molinate que foram: (-○-) 2,0 mM, (-◻-) 4,0 mM, (-□-) 6,0 mM e (-●-) 0 mM.

vistos a pH = 5,6, porém em menores proporções.

Supressão de emissão ocorre no sistema IAA/HRP/O₂ quando em presença de corantes e tiocarbamatos. Os últimos interagem com os corantes xantênicos, suprimindo a fluorescência, conforme se vê na tabela III.1. Esta inibição é proporcional à concentração de herbicida e é linear à concentrações acima de 1,5 mM, podendo-se observar a supressão de fluorescência até 50 µM (Fig. III.6.). Correções podem ser efetuadas para se verificar a emissão real do sistema IAA/HRP/O₂ quando em presença de tiocarbamatos e corantes xantênicos. O incremento de emissão no sistema IAA na ausência e presença de vernolate pode ser visto na tabela III.2. Em presença de 1,0 mM de vernolate a emissão é aumentada 1,5 vezes em relação ao sistema IAA sem o herbicida, a pH = 3,8.

Aceptores antracênicos e xantênicos aumentam a emissão do sistema IAA, e isto é indicativo de que as emissões de IAA são de formação singlete e triplete, e que foi amplificada em presença destes aceptores. Os mesmos efeitos foram observados a pH = 5,6. Em presença de vernolate a emissão é aumentada até 3,4 vezes em relação ao sistema IAA/ACCEPTOR ANTRACÊNICO. Corantes xantênicos interagem fortemente com vernolate, interferindo nas medidas de fluorescência, e a avaliação dos efeitos não pode ser feita com clareza.

O comportamento de DBAS e DPAS em presença de vernolate no sistema IAA nos dá indicação sobre a formação de al

Tabela III.1. Supressão de fluorescência causada pela interação tiocarbamato-rosa bengala.

	Controle ^a + herbicida	Controle + rosa bengala ^b + herbicida	Intensidade corrigida controle + rosa bengala ^c + herbicida	Supressão de fluorescência em % rosa bengala + herbicida
Vernolate	22 000	486 000	1 429 412	66
Molinate	15 000	851 000	1 025 301	17
Butilate	27 000	394 000	1 313 300	70

a) Controle 14 500 contagens/20 seg.

b) Controle + rosa bengala 1 048 000 contagens/20 seg.

c) $\lambda_{\text{máx}}$ emissão = 550 nm $\lambda_{\text{máx}}$ exc = 530 nm.

O meio é composto de HRP (1,0 μM), IAA (0,25 mM) e Mn^{++} (10 μM) em tampão acetato (0,05 M) a pH = 3,8 a 25°C (10% acetona para melhor solubilidade). A concentração dos herbicidas e rosa bengala foi de 1,0 mM e 50 μM respectivamente. As medidas foram efetuadas num contador de fótons Hamamatsu TV-C-767 (INABA e col., 1975).

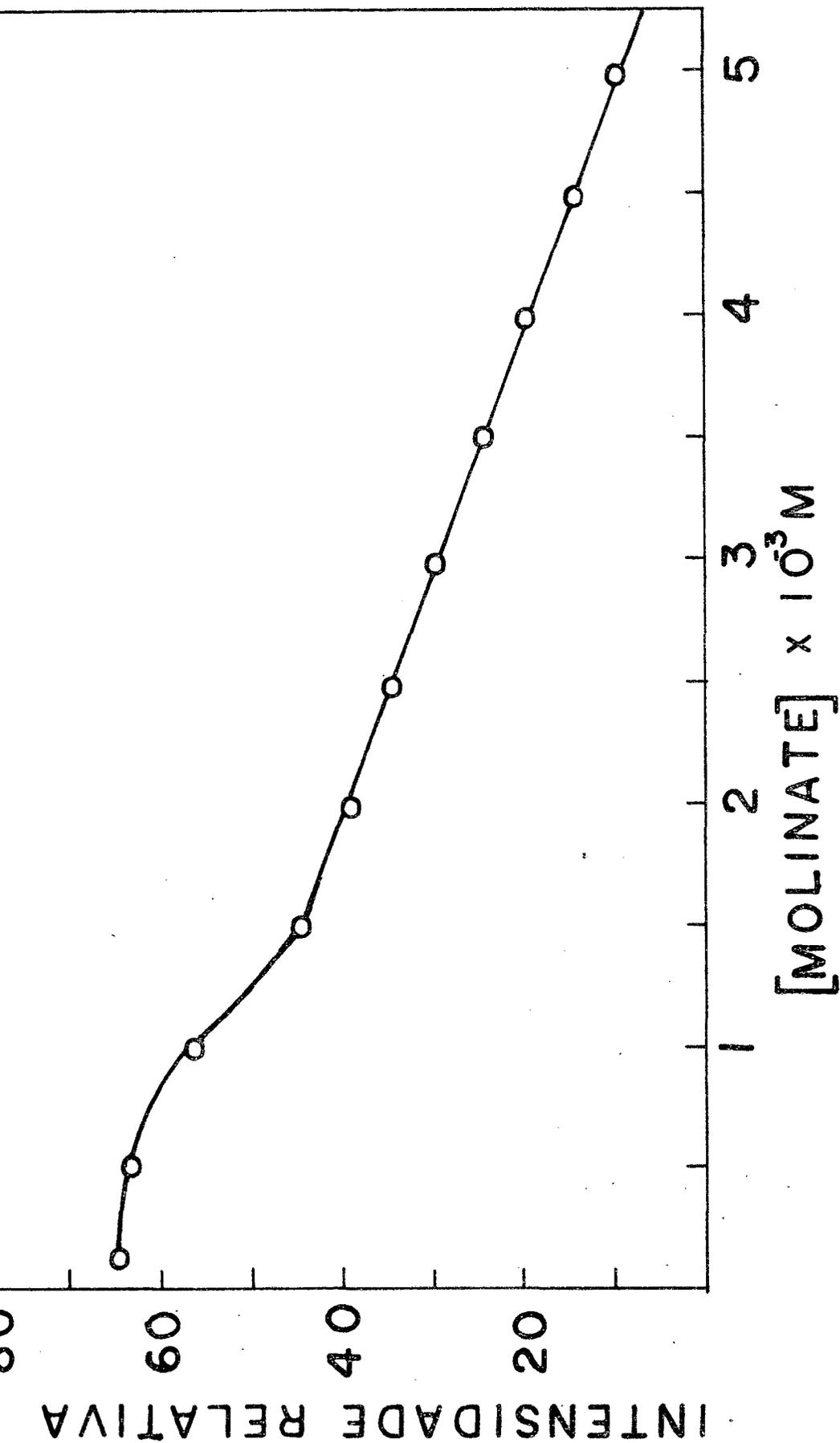


Fig. III.6. Supressão de fluorescência de rosa bengala quando em presença de concentrações de molinate. A concentração de rosa bengala foi de 50 μ M em tampão acetato (0,05M) e pH = 3,8 a 25 \circ C.

Tabela III.2. Aumento de quimioluminescência do sistema IAA/HRP/vernolate/O₂.

Os constituintes desta reação são o IAA (0,25 mM) Mn⁺⁺ (10 μM) e HRP (1 μM) em 0,05 M de tampão acetato a pH = 3,8 e 25°C. Os aceptores emissivos de quimioluminescência foram usados na presença de 50 μM de aceptores e 1 mM de vernolate (em 10% de acetona para solubilização).

ACEPTORES	INTENSIDADE counts/20 seg	+ VERNOLATE	RELAÇÃO ^a
CONTROLE	14500	22000	1,5
+ AS	18000	31000	1,7
+ DPAS	19000	51000	2,6
+ DBAS	16000	55000	3,4
+ FLUORESCEÍNA	1540000	2750000 ^b	1,8
+ EOSINA	1307000	1970000 ^b	1,5
+ ERITROSINA B	2064000	2300000 ^b	1,1
+ ROSA BENGALA	731000	1152941 ^b	1,6

a) Relação Controle - VERNOLATE - ACCEPTOR/CONTROLE - ACCEPTOR.

b) Valores corrigidos a partir da supressão de fluorescência dos aceptores por tiocarbamatos.

guma espécie excitada em outras fases da reação (Fig. III.7. e Fig. III.8.).

A fig. III.9. mostra a formação de estados excitados na ausência ou na presença de molinate (2,0 mM), com diferentes períodos de incubação. O aumento de emissão por molinate foi perdendo intensidade à medida que se passou o tempo de incubação, sendo este efeito uma confirmação do que foi verificado pela técnica de UV. Como já vimos anteriormente, o mesmo efeito não foi verificado com consumo de oxigênio.

III.1.5. Efeito de catalase, superóxido dismutase (SOD), benzoato e DABCO na emissão do sistema IAA/VERNOLATE

A fim de verificar se as espécies $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ e $^1\text{O}_2$ teriam alguma participação no efeito de aumento de foton emissão causado por tiocarbamatos, foram feitos estudos em presença de captadores destas espécies como SOD, catalase, benzoato e DABCO, e os resultados mostraram ausência destas espécies com ou sem vernolate no sistema.

III.1.6. Reação com intermediário de peroxidase

Os intermediários de peroxidase durante o ciclo ca

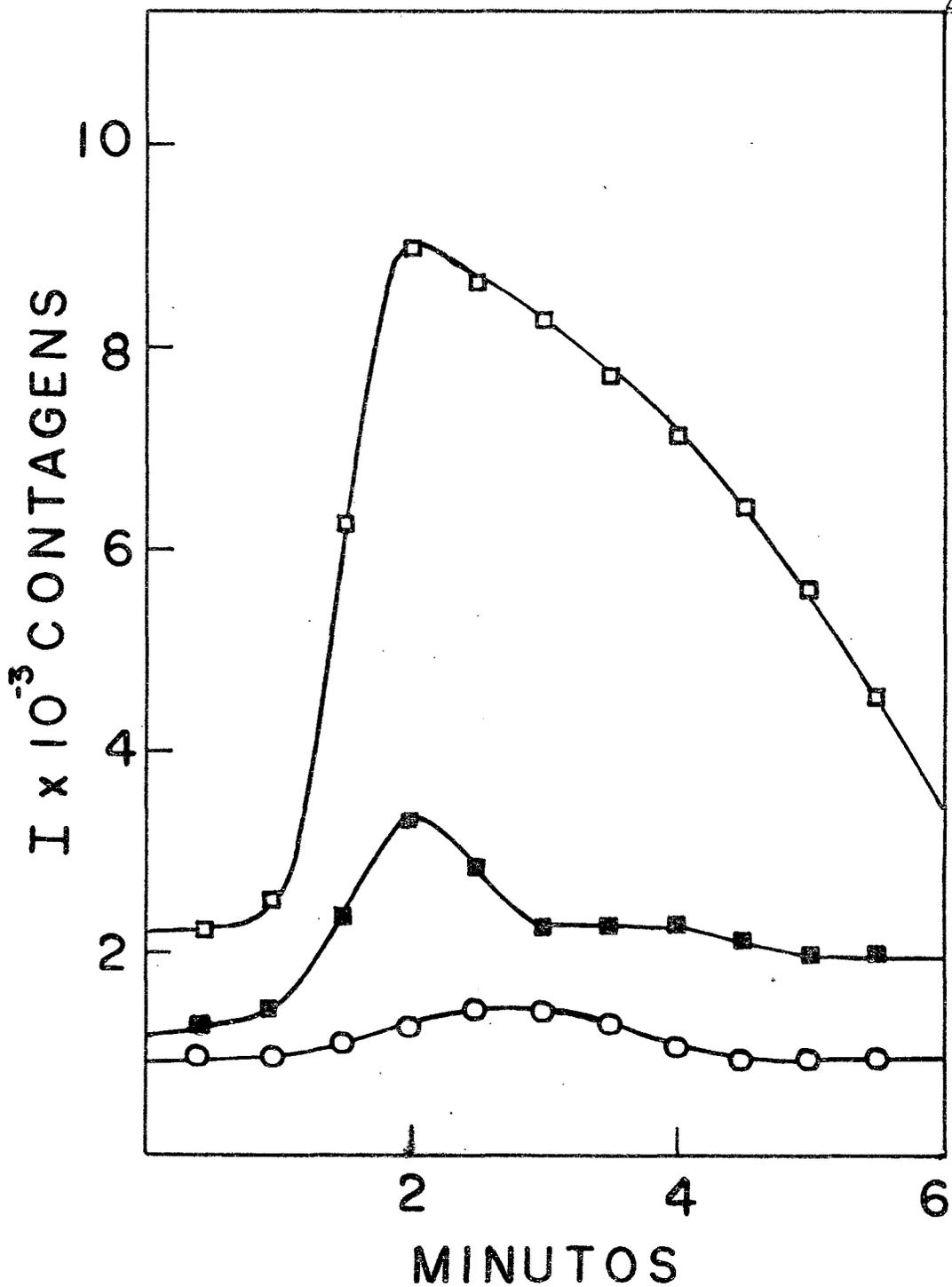


Fig.III.7. Comportamento de DBAS no sistema IAA ($1,25 \times 10^{-4} \text{ M}$) / HRP ($5,0 \times 10^{-7} \text{ M}$) / VERNOLATE ($1,0 \text{ mM}$) / Mn^{++} ($50 \mu\text{M}$) (\square) em relação aos sistemas IAA/HRP/DBAS (\blacksquare) e IAA/HRP/Vernolate (\circ). As medidas foram feitas num contador de fótons Hamamatsu TV - C - 767 (INABA e col., 1975). DBAS foi usado na concentração de $50 \mu\text{M}$.

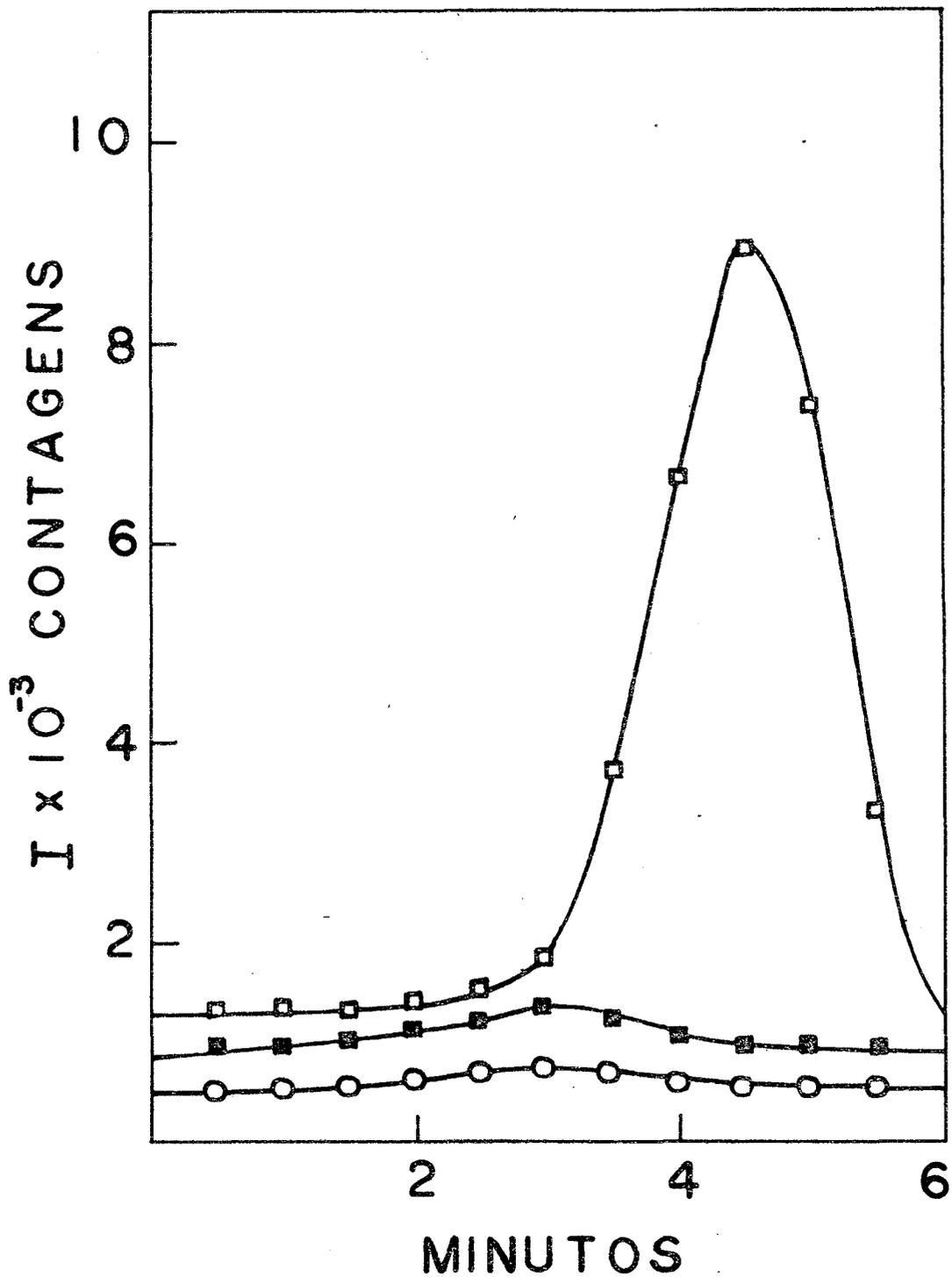


Fig. III.8. Comportamento do DPAS no sistema IAA/HRP/VERNOLATE/Mn⁺⁺ (-□-) em relação aos sistemas IAA/HRP/DPAS (-●-) e IAA/HRP/VERNOLATE (-○-). As condições são as mesmas do sistema da figura anterior. DPAS foi usado na concentração de 50 μ M.

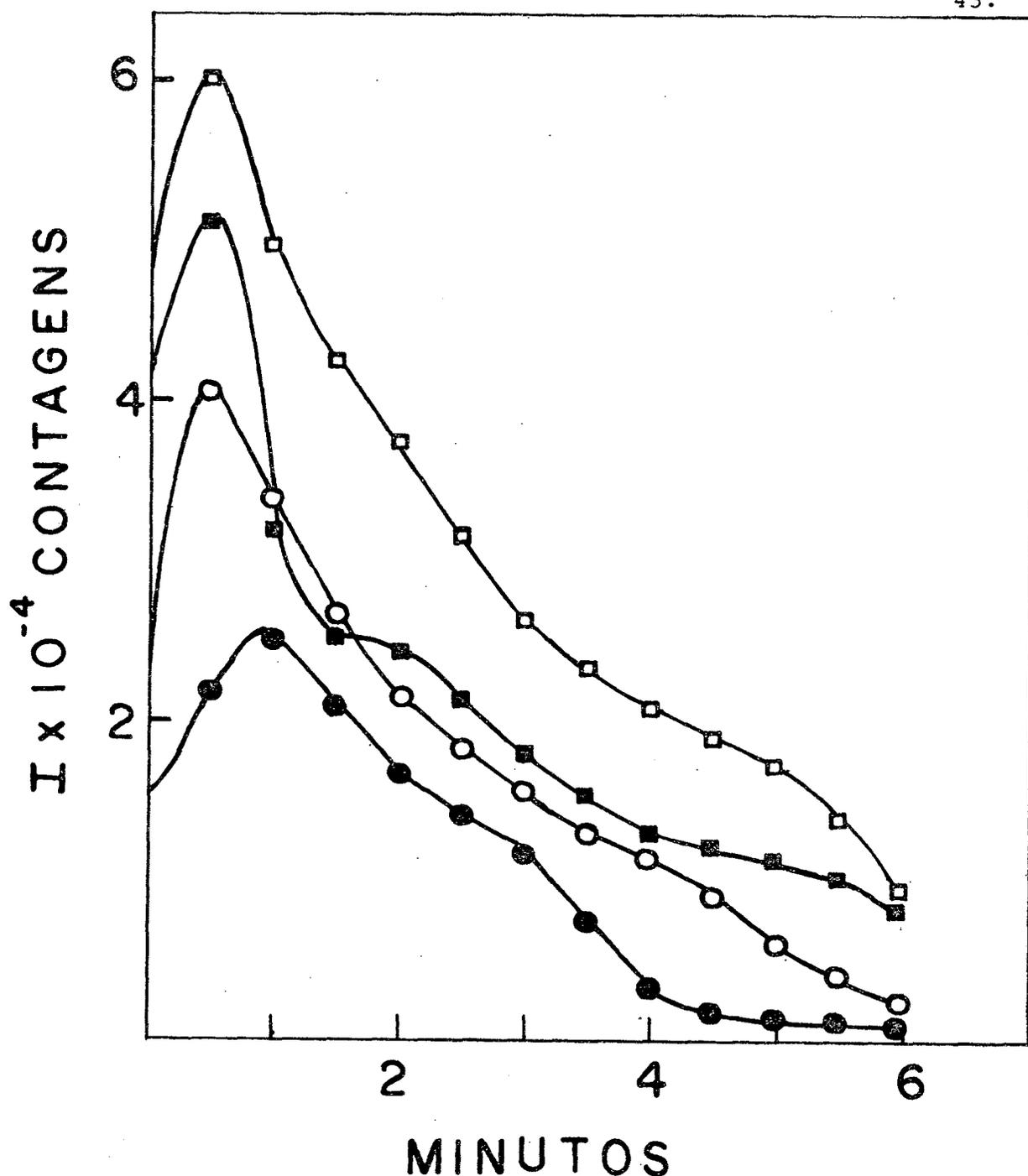


Fig. III.9. Formação de estados excitados na ausência ou presença de molinate (2,0 mM) com diferentes períodos de incubação. Os reagentes são os mesmos da fig. III.2. a pH = 3,8. (●) Controle sem molinate. Tempo de incubação: (□) 0 horas, (■) 48 horas e (○) 72 horas após a introdução de molinate.

talítico foram seguidos espectrofotometricamente a 400 e 420 nm, e estes comprimentos de onda refletem as seguintes situações:

- 1) alterações a 400 nm correspondem a mudanças na concentração de HRP nativa.
- 2) alterações a 420 nm correspondem a mudanças na concentração de HRP - composto II (HRP - II).

Estas variações podem ser vistas a pH = 3,8 e a pH = 5,6 respectivamente (NAKAJIMA e YAMAZAKI, 1979). Molinate altera fortemente a banda da enzima férrica a 400 nm e acelera a degradação de peroxidase a pH = 3,8. Efeitos a pH = 5,6 não foram significantes, porém, ao se formar HRP - II, houve a formação de tempo de indução de quase 1 minuto, ao passo que a pH = 3,8 o efeito foi mínimo, provavelmente devido à alta velocidade neste pH (Fig. III.10. e Fig. III.11.).

Após o fim da reação, a enzima fica espectralmente alterada, mais a pH = 3,8 do que a pH = 5,6, sendo estes efeitos incrementados em presença de molinate.

Composto I de peroxidase preparado quimicamente, em concentrações equivalentes de HRP e H_2O_2 , quando em presença

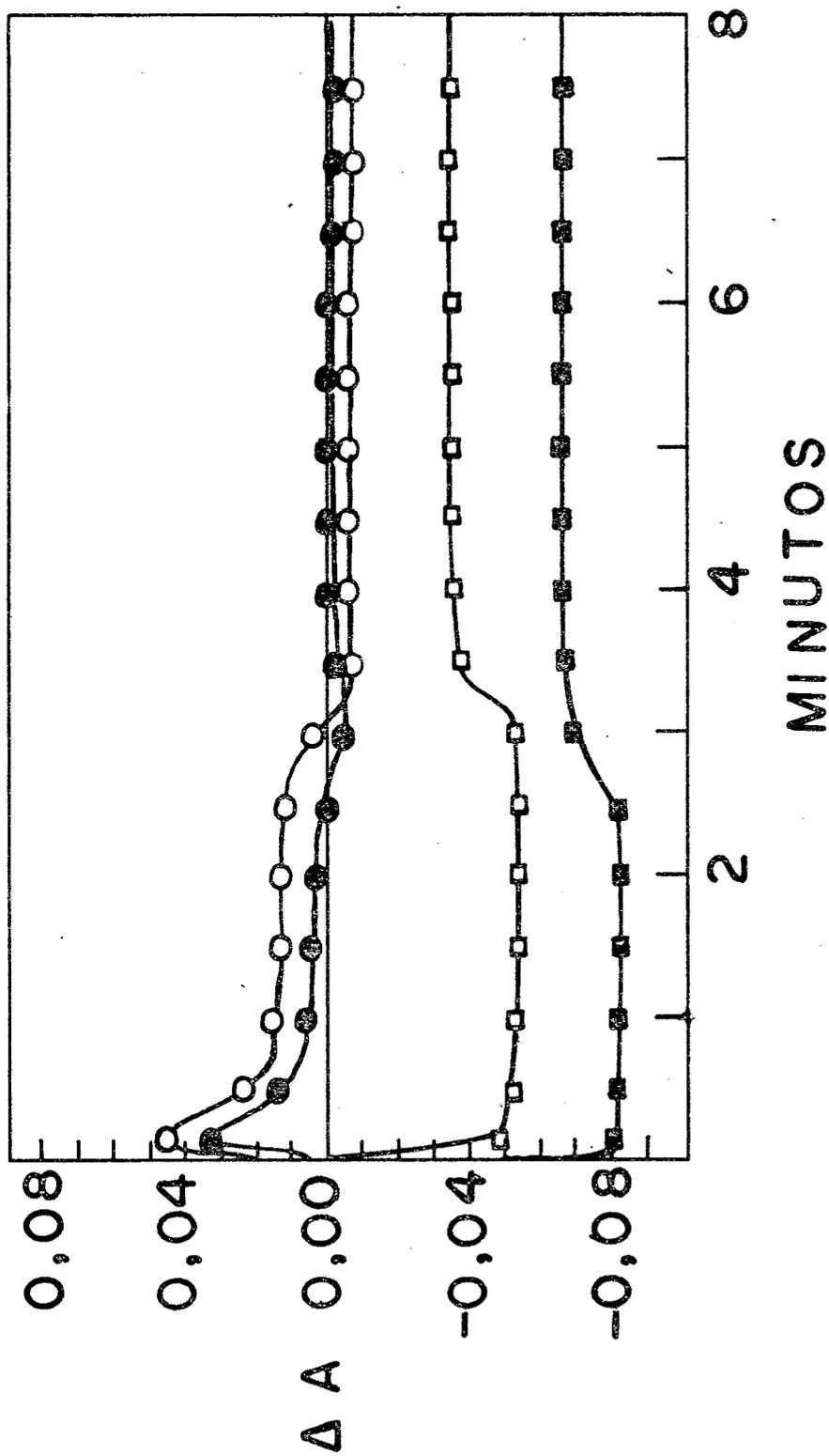


Fig. III.10. Variação da absorvância em função do tempo, do sistema IAA/HRP/O₂ a pH = 3,8 a 400 nm (○) e 420 nm (●); em presença de molinate 4,0 mM a 400 nm (□) e 420 nm (■). As concentrações são as mesmas usadas na experiência da fig. III.2.

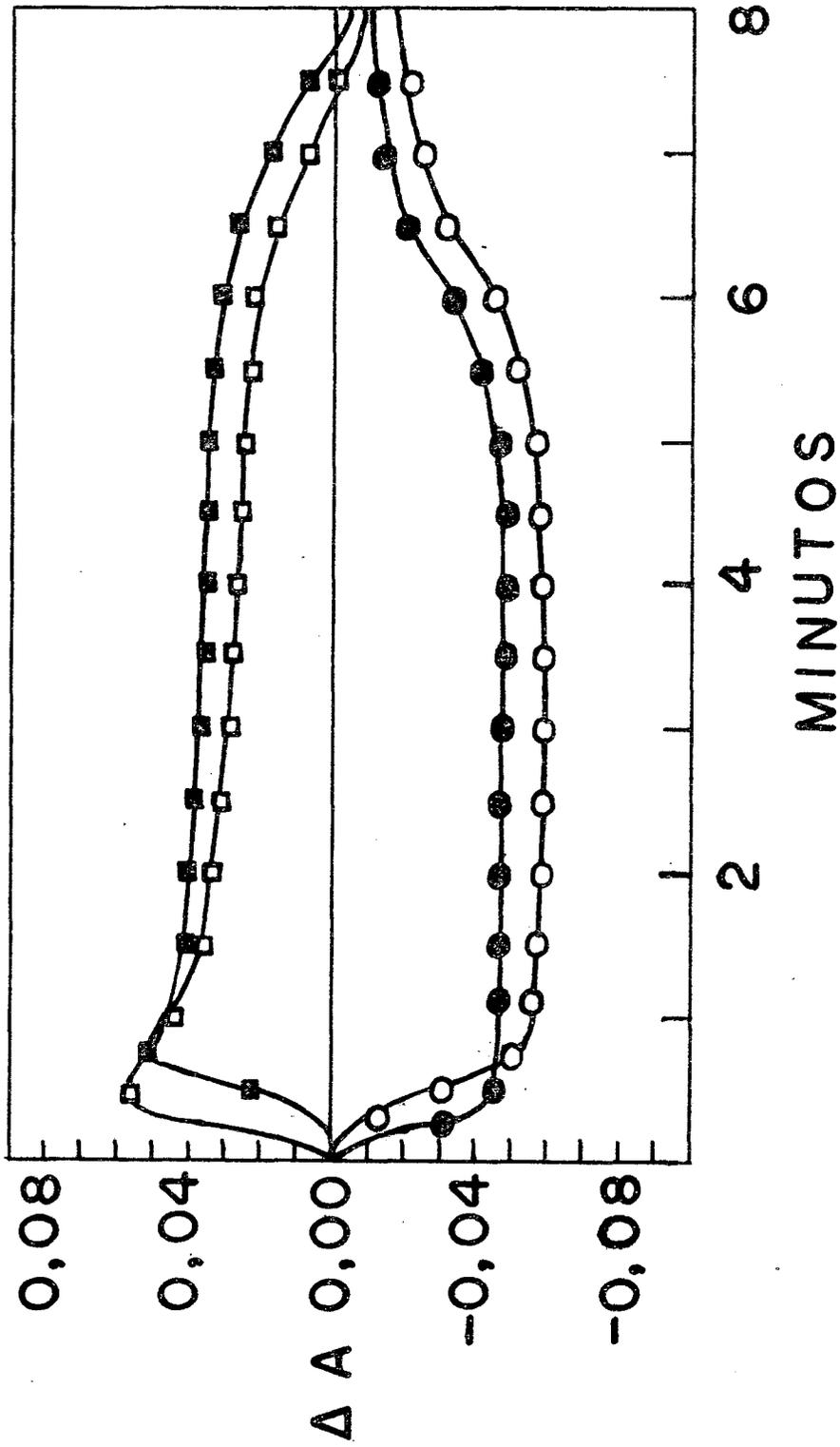


Fig. III.11. Variação da absorvância em função do tempo, do sistema IAA/HRP/O₂ a pH = 5,6 a 400 nm (○) e 420 nm (●); em presença de molinate 4,0 mM a 400 nm (□) e 420 nm (■). As concentrações são as mesmas usadas na experiência da fig. III.2.

de molinate (2,0 mM) torna-se instável, passando imediatamente para composto II (fig. III.12.). Repetindo-se a mesma experiência, mas com o composto II preparado quimicamente, este permanece inalterado, indicando forte tendência redutora de molinate sobre o composto I de peroxidase.

III. 1.7. Detecção de metabolitos de tiocarbamatos

Da interação de tiocarbamatos com os sistema peroxidase são produzidos derivados mercaptos detectados pelo método de Stonier e Yang, (1973).

III. 1.8. Interação IA - t - RNA

Sabe-se que o IA - ^{14}C , em seu estado excitado, se liga ao t - RNA, causando modificações conformacionais neste (DURÁN e col., 1979). Nossos resultados mostraram que em presença de molinate (5,0 mM) o número de IA - ^{14}C ligado ao t - RNA diminui 50 % em relação ao controle.

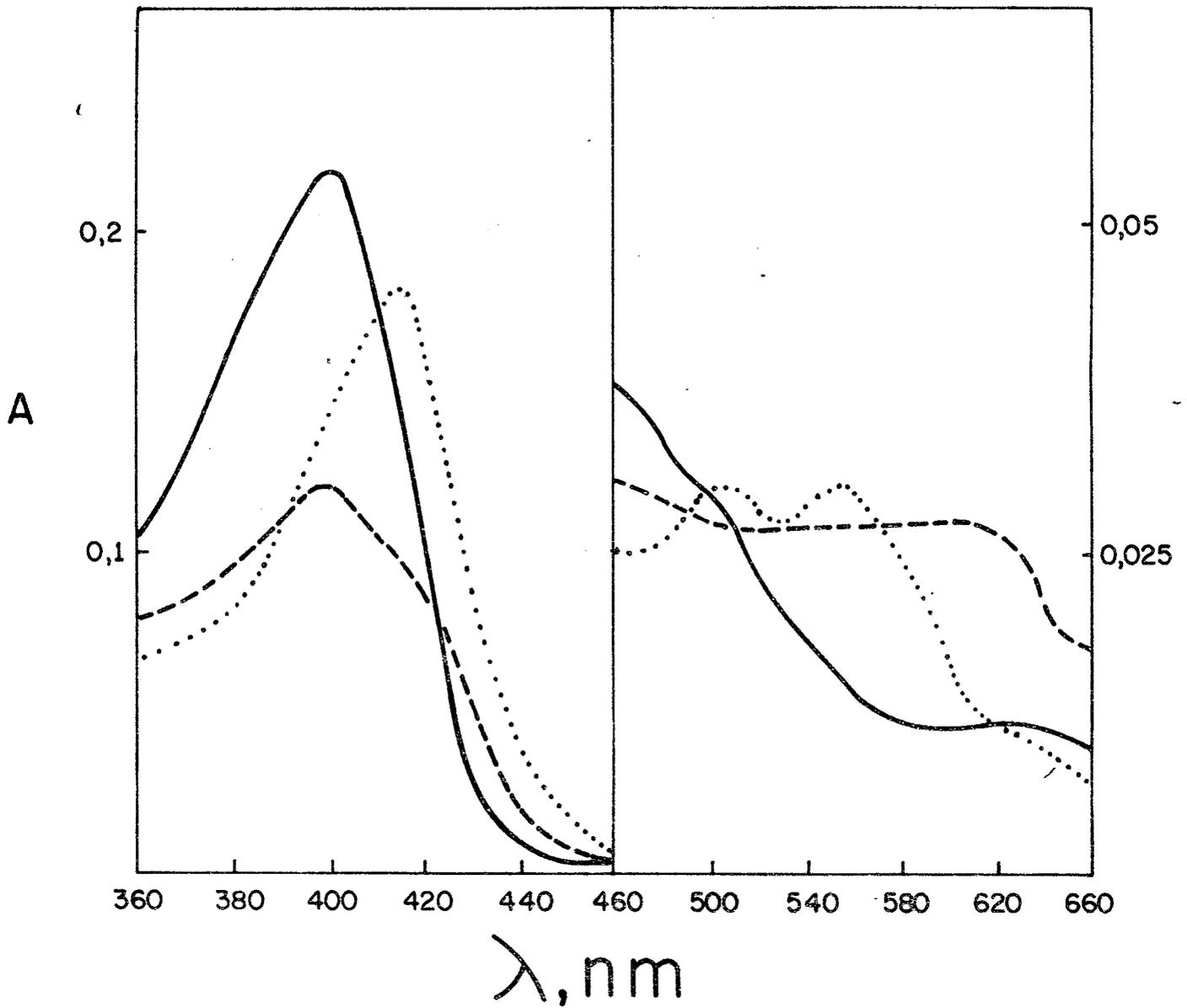


Fig.III.12. Espectro de absorção de HRP (—), composto I (-----) e composto II (.....) obtidos quimicamente.

III.1.9. Interação IA - HRP

Verificamos que o IA - ^{14}C em seu estado excitado se liga na enzima de maneira eficiente se comparado com as ligações no t - RNA. Em presença de molinate, estas ligações são aumentadas 30% em relação ao controle.

III.2. DISCUSSÃO

O mecanismo de ação de herbicidas não é totalmente esclarecido (MORELAND e col., 1969). Tiocarbamatos alteram de maneiras várias o metabolismo normal das plantas. EPTC inibe a síntese de lipídeos (52%); RNA (28%) e fotossíntese (21%) a concentração de 10^{-4} M. Concentração de 10^{-3} M inibe a respiração em 76%, e os outros processos acima citados, em 94% (ASHTON e col., 1977). Numerosos outros efeitos têm sido observados, como por exemplo, inibição da fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas, redução na densidade das cutículas e parcial inibição na síntese de proteínas e ácidos ribonuclêicos (ASHTON, 1963; WILIKINSON e HARDCASTLE, 1969; MORELAND e col., 1969).

Cereais tratados com EPTC foram estudados e tiveram as folhas de cor verde escura semelhante à das que foram tratadas com mutantes ou com retardantes de crescimento. Estes retardantes de crescimento dão aumento na atividade de peroxidase, aumento que pode ser reduzido por tratamento de hormônios (HALEVY, 1963).

Tratando-se sementes de cereais com o mesmo herbicida, observou-se um estímulo na atividade de peroxidase nos primeiros dias após o tratamento. Este estudo foi feito, ex traíndo-se ambas as peroxidases, as livres e as iônicamente

ligadas, e medindo sua atividade em micromoles de H_2O_2 consumido por minuto. O mesmo estudo mostrou que o aumento na atividade de peroxidase foi paralelo com a inibição de crescimento. Os efeitos de EPTC no crescimento e, na atividade foram anulados pelo antídoto de herbicidas (N,N - dialil-2,2 dicloroacetamida), mas não pelo ácido indol-3 - acético ou ácido giberélico (HARVEY e col., 1975).

Nossos resultados in vitro mostraram que os herbicidas tiocarbamatos não aumentam a atividade de peroxidase, mas que devem interagir com algum estágio da oxidação. No caso pH = 3,8, onde o IA é o maior produto (MORITA e col., 1967), o consumo de oxigênio é mais rápido do que a formação de IA, e a emissão, indicando a acumulação de um intermediário como produto da oxidação de IAA. Este intermediário foi determinado como sendo uma espécie de hidroperóxido que reage com a enzima férrica para formar o composto I. A concentração de hidroperóxido alcança a metade da concentração inicial de IAA ao final do consumo de oxigênio, decrescendo lentamente (NAKAJIMA e YAMAZAKI, 1979). A acumulação deste intermediário sugere a formação de uma espécie excitada fora da enzima (VIDIGAL e col., 1979). Estas sugestões foram comprovadas por estudos mecanísticos (NAKAJIMA e YAMAZAKI, 1979; MORISHIMA e OGAWA, 1979).

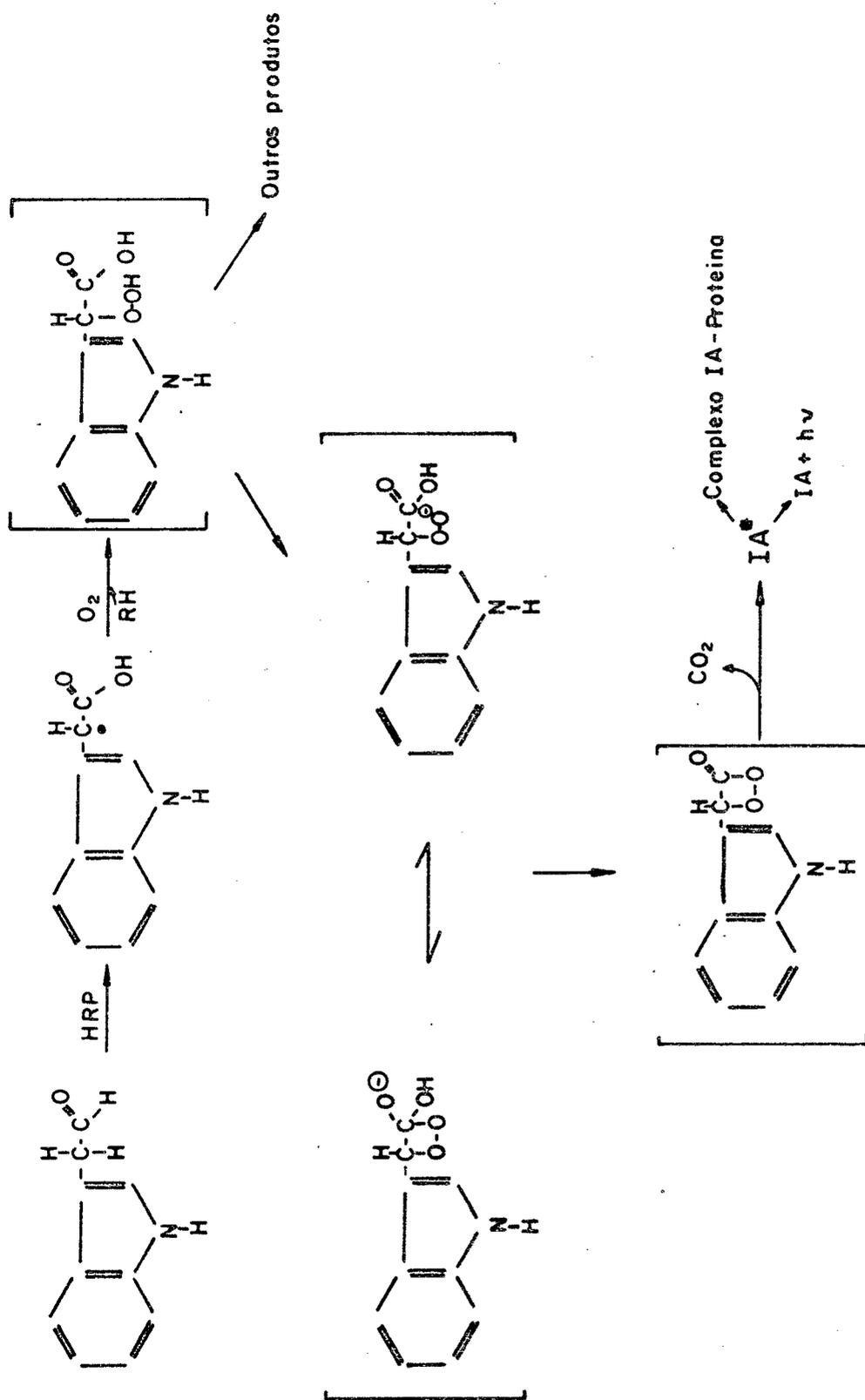
A fig. III.1. mostra que o tiocarbamato não afeta marcadamente o consumo de oxigênio, mas interage com um intermediário oxidado, indicando que o tiocarbamato não

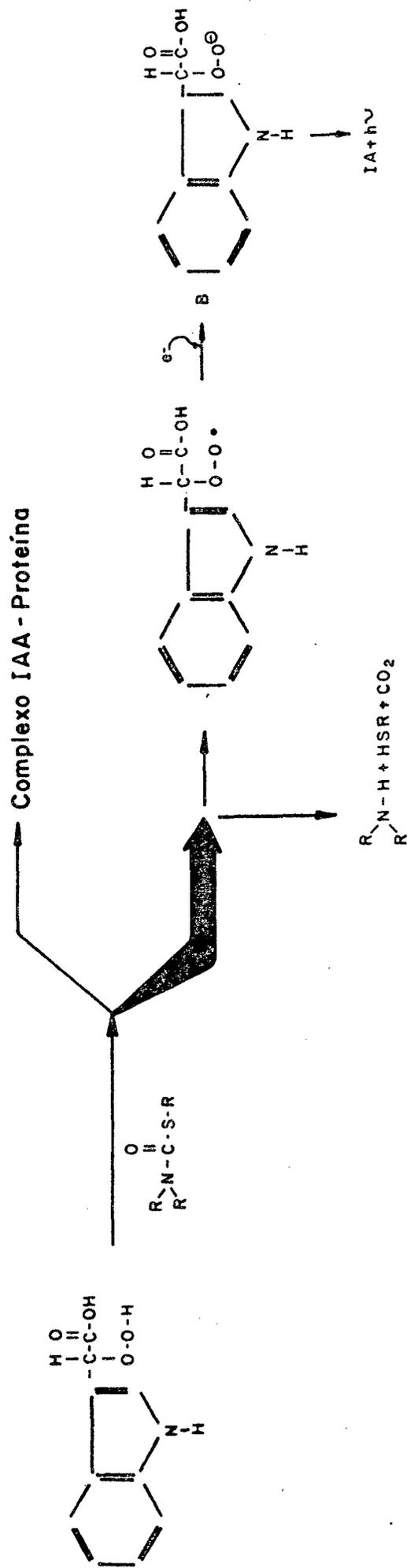
age no primeiro estágio da oxidação de IAA. O tiocarbamato age possivelmente no estado estacionário da formação de indolhidroperóxido, induzindo à formação de maiores quantidades de IA e concomitantemente altas quantidades de aldeídos excitados eletronicamente, acompanhado de sua auto-decomposição em compostos mercaptos e possivelmente aminas.

A geração de estados excitados IA via oxidação enzimática de IAA, é vista no esquema III.1. (VIDIGAL e col., 1975; DURÁN e col., 1976; DURÁN e col., 1977) e a desnaturação da proteína que, como visto na fig. III.10, é bem acentuada na ferri-peroxidase a pH = 3,8. Alí se percebe que a desnaturação é proporcional ao aumento de formação de IA em seus estados excitados, e a não alteração no consumo de oxigênio se deve a que o tiocarbamato interage com o intermediário hidroperóxido, catalisando a formação de dioxetano (Esquema III.2.) e aumentando a possibilidade de IA vir a ligar-se em algum sítio da enzima.

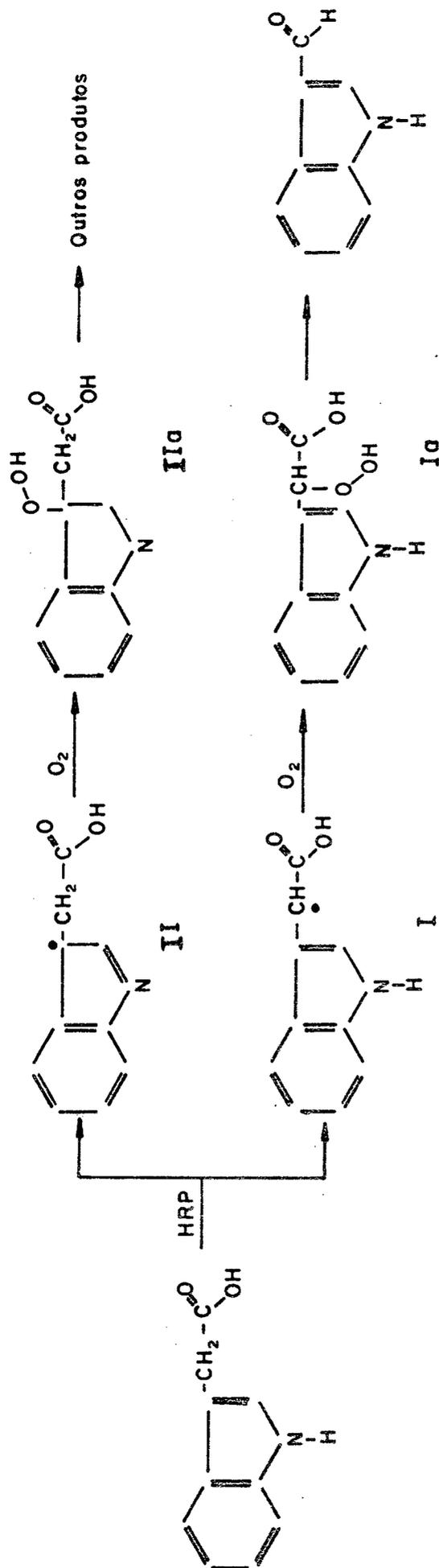
Outra possibilidade seria a da formação de dois intermediários hidroperóxidos (Esquema III.3.), um via α - oxidação (I), e outro via oxidação no carbono - 3 do anél indólico (II), este último sugerido por Yamazaki (1973). Dada a possibilidade de se formar estes dois intermediários hidroperóxidos, o tiocarbamato bloquearia a formação do intermediário II preferivelmente.

O fato de o tiocarbamato aumentar o número de IA





Esquema III.2



Esquema III.3.

ligado a enzima, enquanto reduz as ligações ao t - RNA, po de explicar em parte a ação de tiocarbamatos em plantas. Houve consideráveis debates concernetes ã ação fisiológica da oxidação enzimática de IAA (WRIGHT e col., 1973). Acredita-se que este é um hormônio em potencial e que sua oxidação serve como um mecanismo destrutivo necessário para evitar o sobre - crescimento fisiológico, quando houver con centrações muito alta deste hormônio na planta (RAY, 1958; GALSTON e DAVIES, 1969; MORGAN, 1964; PILET e FREGATA , 1963).

In vivo, o aumento na atividade de peroxidase foi paralelo ã inibição do crescimento. Isto indica um provã - vel aumento do metabolismo de IAA, o qual possivelmente, virã a produzir descontroladamente grandes quantidades de estados excitados de IA. Em consequência haverá fortes modificações a níveis de DNA e RNA (VIDIGAL e col., 1979; FALJONE e col., 1978; MENEGHINI e col., 1978) as quais refletem como um inibidor de crescimento de plantas.

Bednar e col. (1979) sugeriu que a ativação de auxinas por peroxidase poderia ser o mecanismo molecular en volvido na correlação positiva observada entre atividade de peroxidase e crescimento em plantas. Foi observado que a peroxidase pode produzir derivados de auxina reativos ca pazes de se ligar a nucleófilos celulares como o t - RNA.

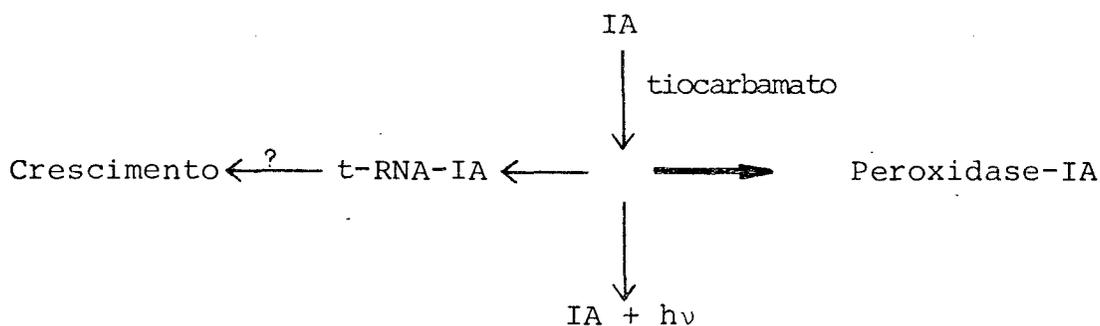
Sabe-se de que o IA em seu estado excitado se

liga ao t - RNA, produzindo efeitos conformacionais (DURÁN e col., 1979). A ligação de IA ao t - RNA poderia ser uma maneira de controlar o crescimento em plantas, como foi sugerido por Kobayashi e col., (1972).

Nossos experimentos em ligação de IA excitado com t - RNA na presença ou ausência de tiocarbamato mostraram que o herbicida diminui a fotoligação no escuro, conforme observado por Durán e col., (1979), possivelmente em resposta a uma maior ligação de IA excitado na peroxidase.

Como a fotoligação no escuro de IA com t - RNA possivelmente é indicação da função da auxina no crescimento da planta (KOBAYASHI e col., 1972), o efeito de tiocarbamato seria a nível de ácido nucléico, interferindo o tiocarbamato nesta fotoligação, que aparentemente agiria como regulador molecular de crescimento e diferenciação in vivo.

Este e outros fatos (CILENTO, 1979) indicam que moléculas eletronicamente excitadas geradas em sistemas biológicos são importantes em processos normais e fisiológicos e que, aparentemente, em presença de herbicidas poderiam ter importante papel na regulação de crescimento.



Esquema III.4

IV. INTERAÇÃO DE METABOLITOS DE INSETICIDA CARBOFURANO FENOL COM O SISTEMA IAA/HRP/O₂

IV.1. Resultados

IV.1.1. Condições experimentais para o sistema IAA/HRP/O₂

Para o estudo com os metabolitos de carbofuranos no sistema de degradação enzimática de IAA, foram usadas as mesmas concentrações citadas no estudo de Lee e Chapman (1977). Os metabolitos mostraram-se bons inibidores, em relação aos demais, o carbofurano fenol e ceto carbofurano fenol.

IV.1.2. Consumo de oxigênio

IV.1.2.1. Carbofurano fenol

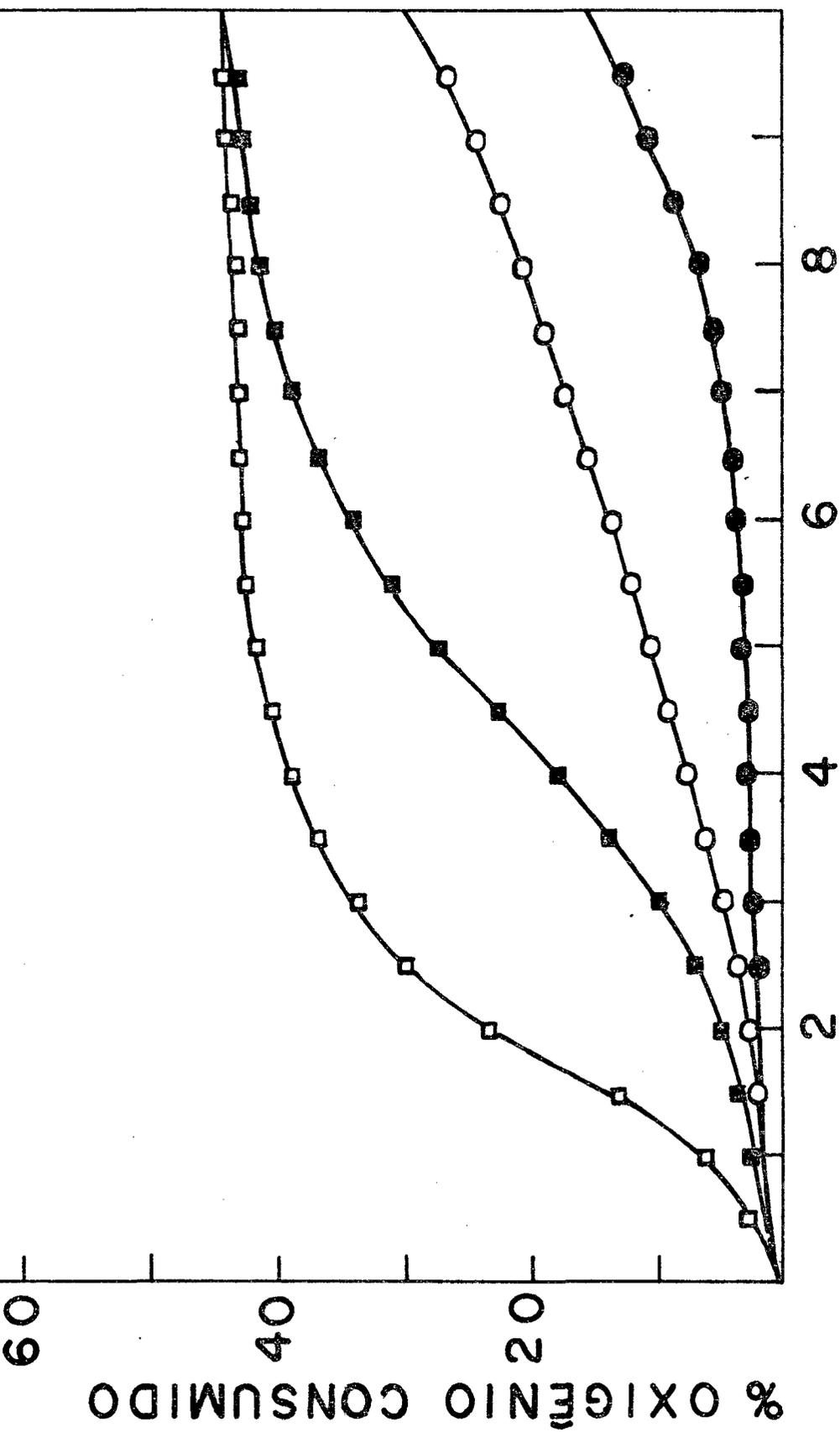
Carbofurano fenol inibe o consumo de oxigênio. Este efeito é visto pela produção de um tempo de indução cuja extensão é proporcional à concentração de inibidor. A con

centração de 5 μM o tempo de indução chega a atingir 7 minutos, enquanto que, à concentração de 1 μM , não passa de 2 minutos, sendo em seguida recuperada a velocidade de consumo de oxigênio até ao nível de consumo sem inibidor (Controle) (Fig.IV.1.).

IV. 1.2.2. Ceto carbofurano fenol

Ceto carbofurano fenol inibe o consumo de oxigênio em concentrações acima de 13 μM (Fig. IV.2.). Nesta inibição, após curto tempo de indução, a velocidade de degradação de IAA não atinge o nível de degradação do controle, persistindo o efeito inibidor, ao contrário do que se verificou com o ceto carbofurano fenol. A eficiência desta inibição diminui com o aumento da concentração do inibidor, e em concentrações acima de 40 μM não se verifica aumento de inibição do consumo de oxigênio, o que nos levou a suspeitar de uma possível oxidação do ceto carbofurano fenol.

A oxidação enzimática de ceto carbofurano fenol foi confirmada ao se verificar que o sistema ceto carbofurano fenol/HRP/ O_2 consome oxigênio (Fig. IV.3.), agindo como um substrato de peroxidase. Os resultados mostraram que este composto pode oxidar-se na ausência de peroxidase, só que menos eficientemente (autooxidação).



MINUTOS

Fig. IV.1. Inibição no consumo de oxigênio causado por concentrações de carbofurano fenol. A concentração dos reagentes foi: IAA (0,2 mM), HRP ($3,0 \times 10^{-9}$ M), Mn^{++} (0,1 mM) e p - cloro fenol (0,1 mM) em tampão fosfato (25 mM) a pH = 5,9 a 25 °C. As concentrações de inibidor foram: (■) 1 μM, (○) 2 μM, (●) 5 μM e (□) 0 .

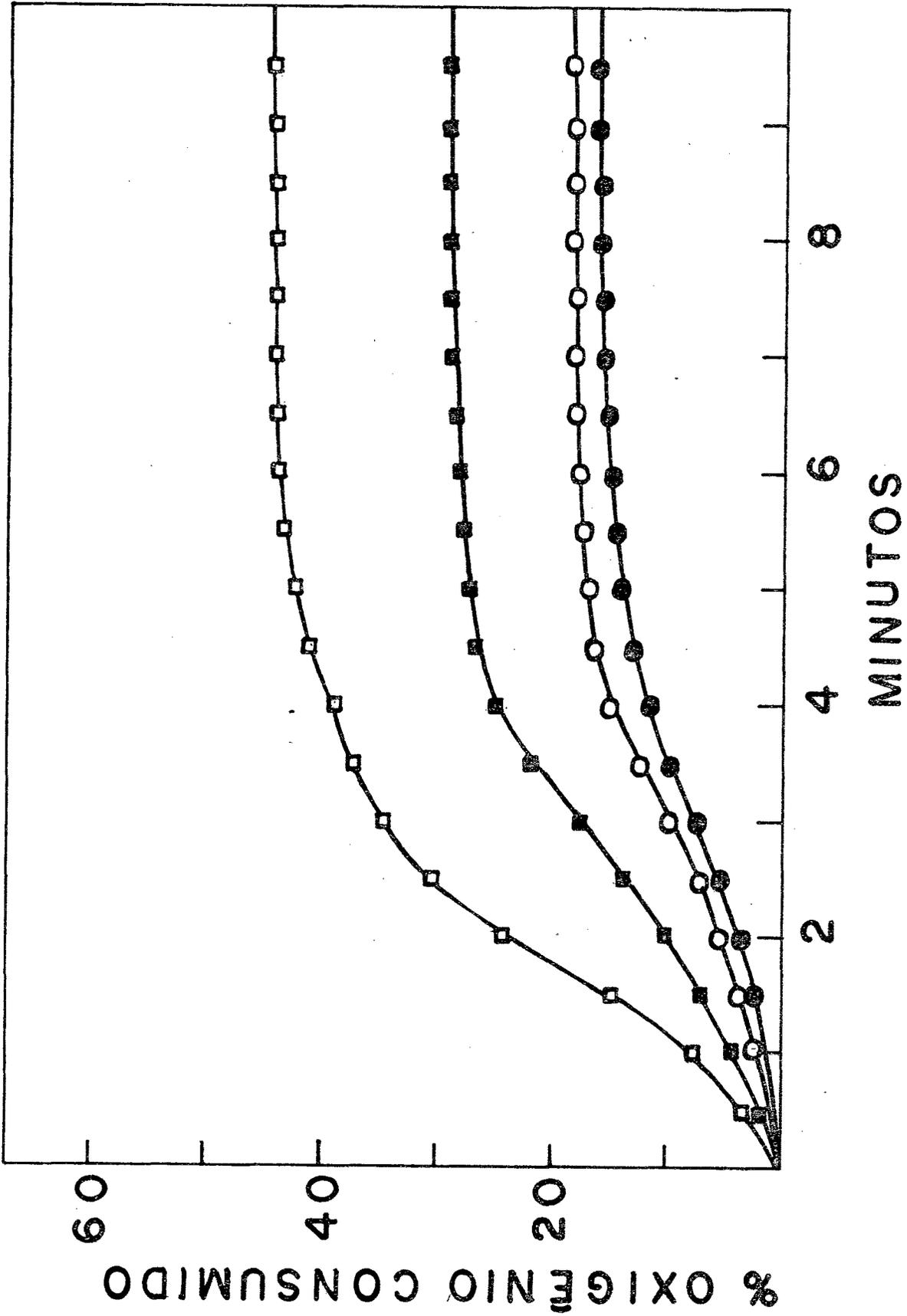


Fig. IV.2. Inibição no consumo de oxigênio causado por concentrações de ceto carbofurano fenol. A concentração dos reagentes foram as mesmas da fig. IV.1. e as concentrações do inibidor foram: (●) 13 μM , (○) 26 μM , (◻) 40 μM e (-○-) 0.

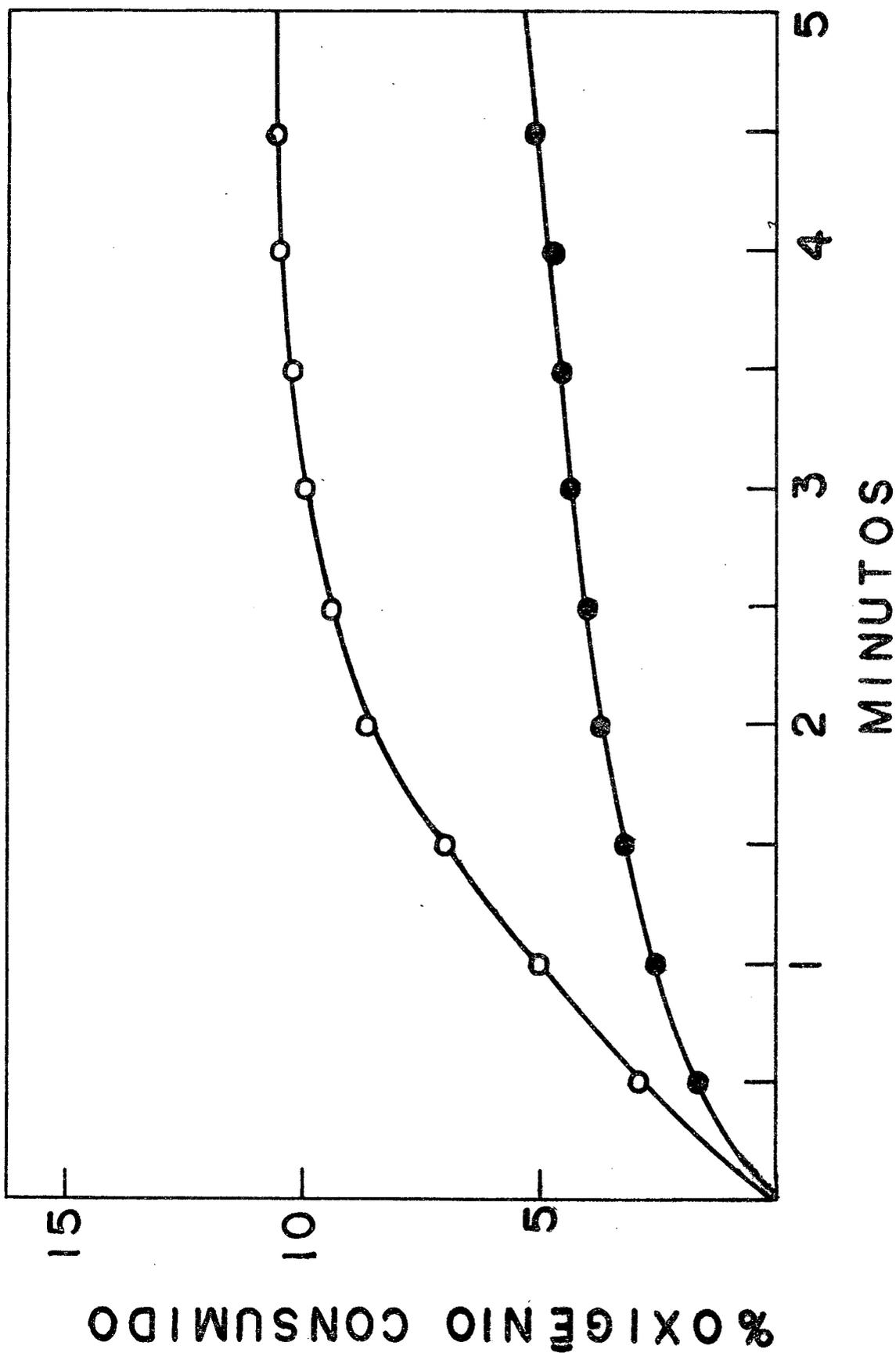


Fig. IV.3. Consumo de oxigênio na degradação enzimática de ceto carbofurano fenol com (-o-) $3,0 \times 10^{-9}$ M de HRP e (•) sem HRP. A concentração do substrato foi de $200 \mu\text{M}$ em tampão fosfato (25 mM) a $\text{pH} = 5,9$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

IV.1.3. Formação de produtos

A formação de produtos na degradação enzimática de IAA foi acompanhada a 262 nm em presença dos inibidores, e os resultados foram idênticos aos de Lee e Chapman (1977) relatados no presente trabalho.

IV.1.4. Geração de estados excitados

IV.1.4.1. Carbofurano fenol

A inibição do sistema IAA por carbofurano fenol também foi observada por emissão fotônica (Fig. IV.4.) e confirmaram os resultados obtidos no estudo com consumo de oxigênio. A adição de inibidor a diferentes tempos após a adição de IAA, mostraram a rápida interação IAA - enzima (Fig. IV.5.).

IV.1.4.2. Ceto carbofurano fenol

A fig. IV.6. mostra inibições causadas por diversas concentrações de ceto carbofurano fenol. Em con-

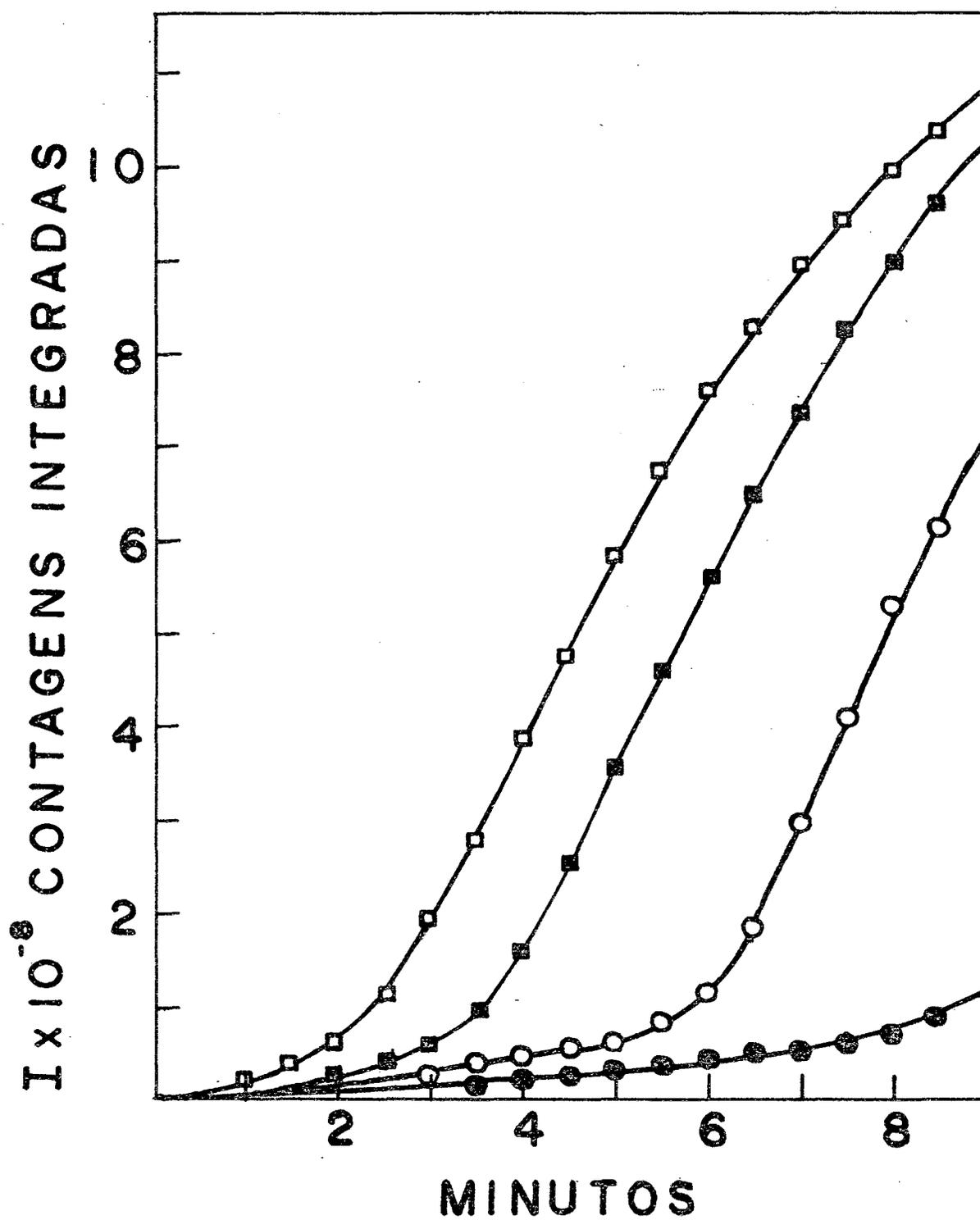


Fig. IV.4. Inibição na formação de estados excitados causado por concentrações de carbofurano fenol. As concentrações são as mesmas da fig. IV.1.

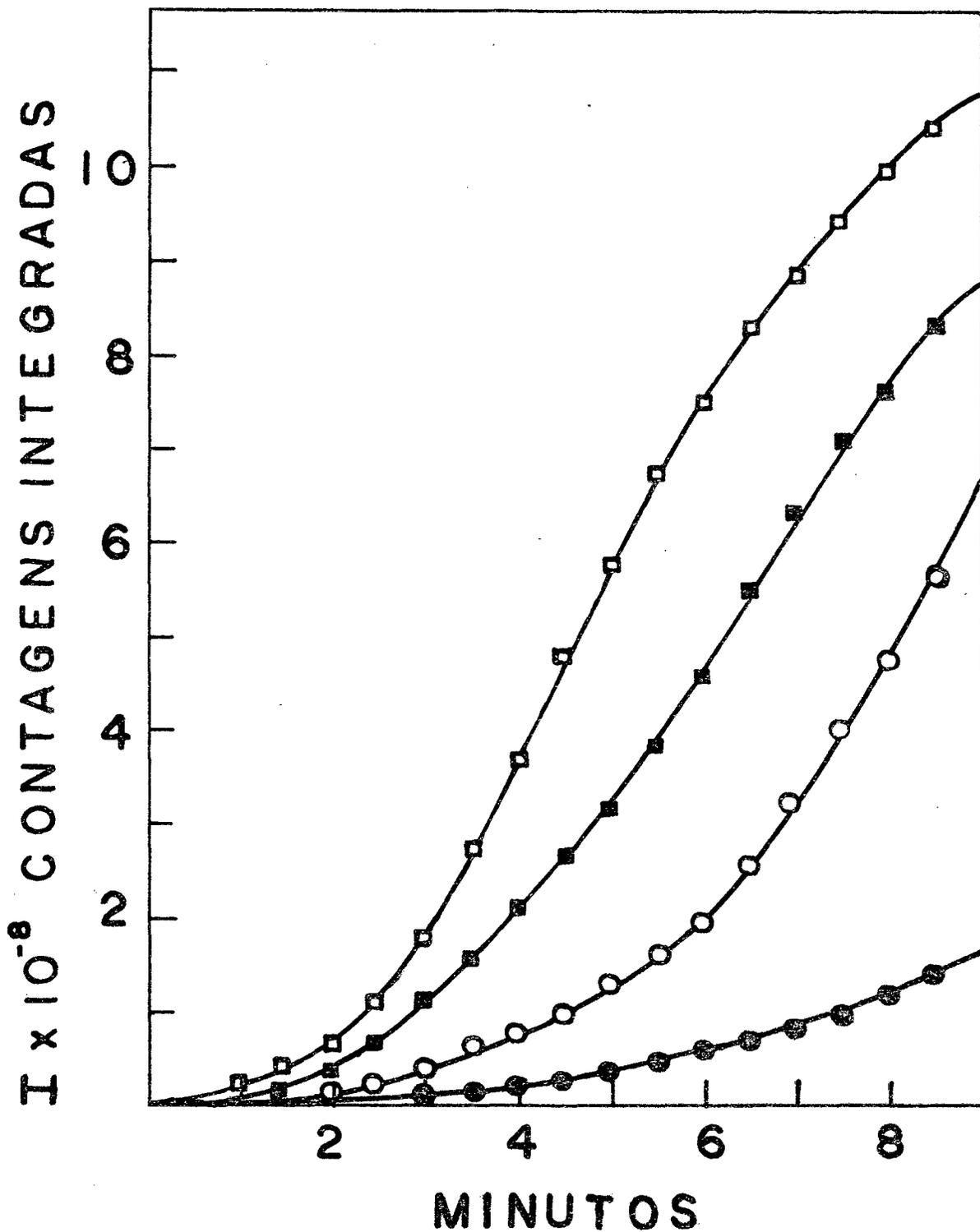


Fig. IV.5. Efeito da adiçãõ retardada de carbofurano fenol na formaçãõ de estados excitados. As concentrações sãõ as mesmas da fig. IV.I. e o carbofurano fenol (2,0 μ M) foi adicionado (\bullet) 60s, (\circ) 30s, (\blacksquare) 10s e (\square) degradaçãõ enzimática sem inibidor.

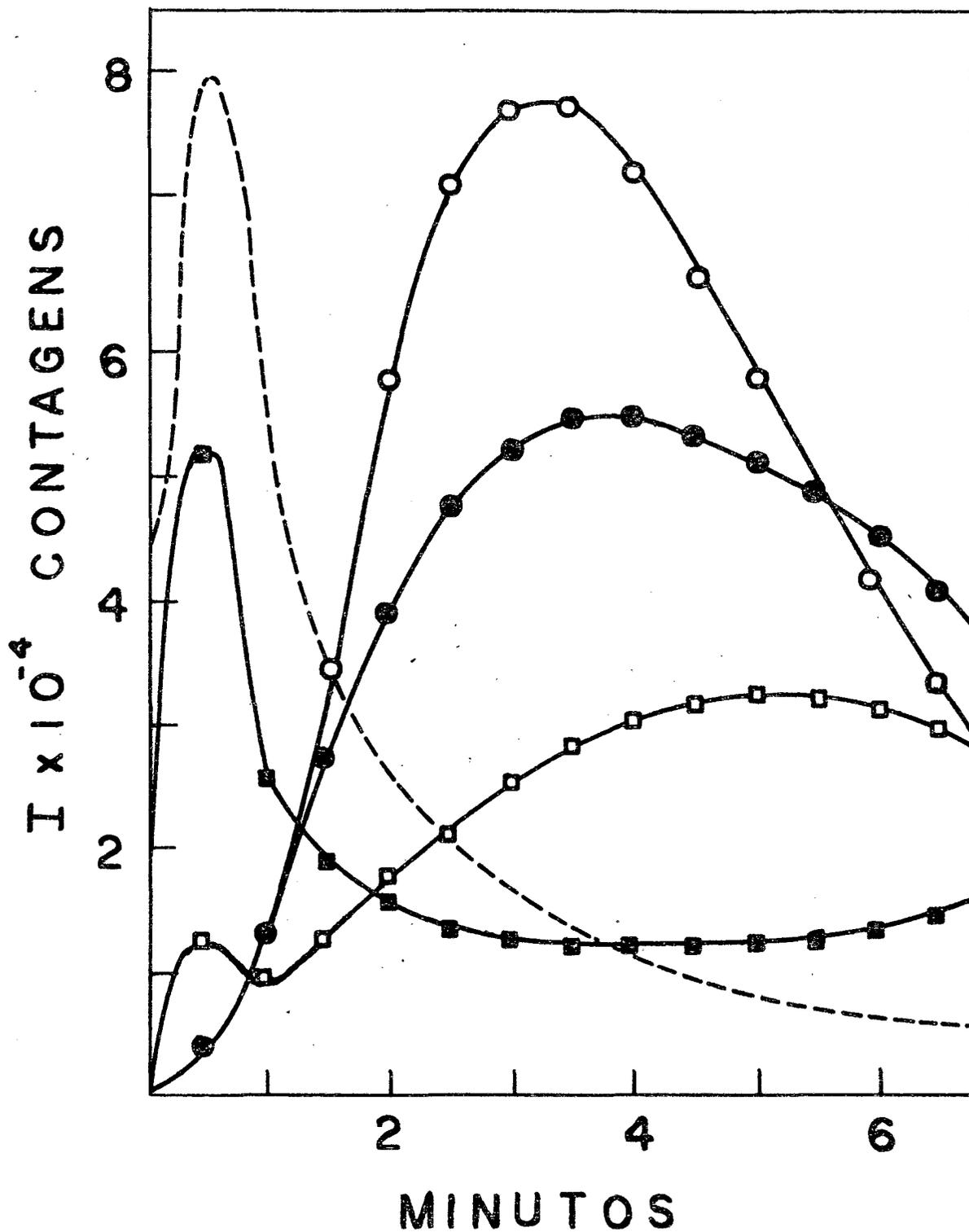


Fig. IV.6. Comportamento do ceto carbofurano fenol na emissão fotônica do sistema IAA. A concentração dos reagentes é a mesma da fig. IV.1. (●) 40 μM , (■) 200 μM , (□) 800 μM de ceto carbofurano, (----) emissões fotônicas do sistema ceto carbofurano fenol (200 μM)/HRP/ O_2 . Controle (IAA/HRP/ O_2) (○)

centrações abaixo de 200 μM não se observam alterações na cinética de emissão, ao contrário do que se observa em concentrações superiores a este valor.

A alteração que se verifica na cinética, indica a formação de uma outra espécie excitada, cujo aumento é proporcional ao aumento da concentração do inibidor. A suspeita de que esta nova espécie excitada seja um produto da oxidação do ceto carbofurano fenol visto no consumo de oxigênio, foi confirmada ao se verificar que o sistema ceto-carbofurano fenol/HRP/ O_2 emite eficientemente nos três primeiros minutos da reação, conforme pode ser visto na fig. IV.6. (linha tracejada).

A tabela IV.1. mostra o incremento de emissão quando o sistema ceto carbofurano fenol/HRP/ O_2 se encontra em presença de aceptores. O aumento de emissões é maior quando em presença de aceptores antracênicos do que xantênicos.

IV.1.5. Modificações causadas no espectro de absorção de peroxidase.

Composto I de peroxidase preparado quimicamente, quando em presença de carbofurano fenol e ceto carbofurano fenol, ambos a concentração de 10 μM , torna-se instável,

Tabela IV.1.1. Aumento de emissões fotônicas do sistema ceto carbofurano/HRP/O₂.

Aceptor	Emissão Inte- grada a 60 s	λ exc.	λ Fluor.	Energ. Singl. Kcal/mol	Energia Triplete Kcal/mol
Controle	19 718				
Antraceno 2-sulfonato	117 212	380	425	68	42,5
9,10 - Dibromo antraceno 2- sulfonato	94 690	403	435	66	40,2
9,10 - Difenil antraceno 2- sulfonato	94 000	403	440	65	40,6
Fluoresceína	9 397	500	550	52	45,2
Eosina	29 439	513	565	51	43,2
Rosa Bengala	28 616	560	618	46	39,5
Eritrosin B	24 486	530	570	46	39,5

Os constituintes desta reação são ceto carbofurano fenol (200 μ M), HRP ($3,0 \times 10^{-9}$ M), em 25 mM de tampão fosfato a pH = 5,9 e 25°C. Todos os aceptores estão na concentração de 5,0 μ M.

passando imediatamente para peroxidase nativa. Repetindo-se a mesma experiência, mas com o composto II preparado quimicamente, quando em presença deste metabolito, torna-se instável, passando imediatamente a peroxidase nativa.

IV.2. DISCUSSÃO

Inseticidas carbofuranos e seus metabolitos inibem a degradação enzimática de IAA (LEE, 1975). Verificou-se que, destes compostos, o carbofurano fenol e o ceto carbofurano fenol são inibidores mais eficientes em relação aos demais, e os mesmos resultados foram constatados in vitro utilizando-se da técnica de UV (LEE e CHAPMAN, 1977).

Estudos com carbofurano fenol e ceto carbofurano fenol mostraram que a degradação enzimática de IAA é inibida quando o grupo prostético da peroxidase é retirado da enzima, mas que pode ser recuperada a atividade quando o grupo prostético for restituído por himina bovina. Logo, é preciso ter não só o grupo himina para a degradação de IAA, mas é absolutamente necessária a parte prostética.

Nossos estudos sobre consumo de oxigênio e emissão fotônica do sistema INIBIDOR/IAA/HRP/O₂, mostraram que o carbofurano fenol inibe a degradação enzimática de IAA e que esta inibição não é persistente a pequenas concentrações, sinal de que o inibidor é instável. Semelhantes resultados foram constatados com os inibidores fenólicos, como por exemplo, escopoletina e ácido ferúlico (SIRIOIS e MILLER, 1972; GELINAS, 1973).

Devido à natureza parcialmente competitiva, a inibição da degradação de IAA por carbofurano fenol foi incompleta, ocorrendo desta maneira uma degradação lenta durante o período de indução. Logo, com o decréscimo na concentração do inibidor, que se degrada durante o período de indução, (LEE,1977) ocorre um aumento na velocidade de degradação de IAA, até que esta velocidade atinja o nível do controle, que é o da degradação sem o inibidor.

A rápida interação IAA - enzima foi constatada pela adição retardada de carbofurano fenol (Fig. IV.5.), necessitando-se de maiores concentrações para que este metabolismo possa competir com o IAA pelo sítio da enzima.

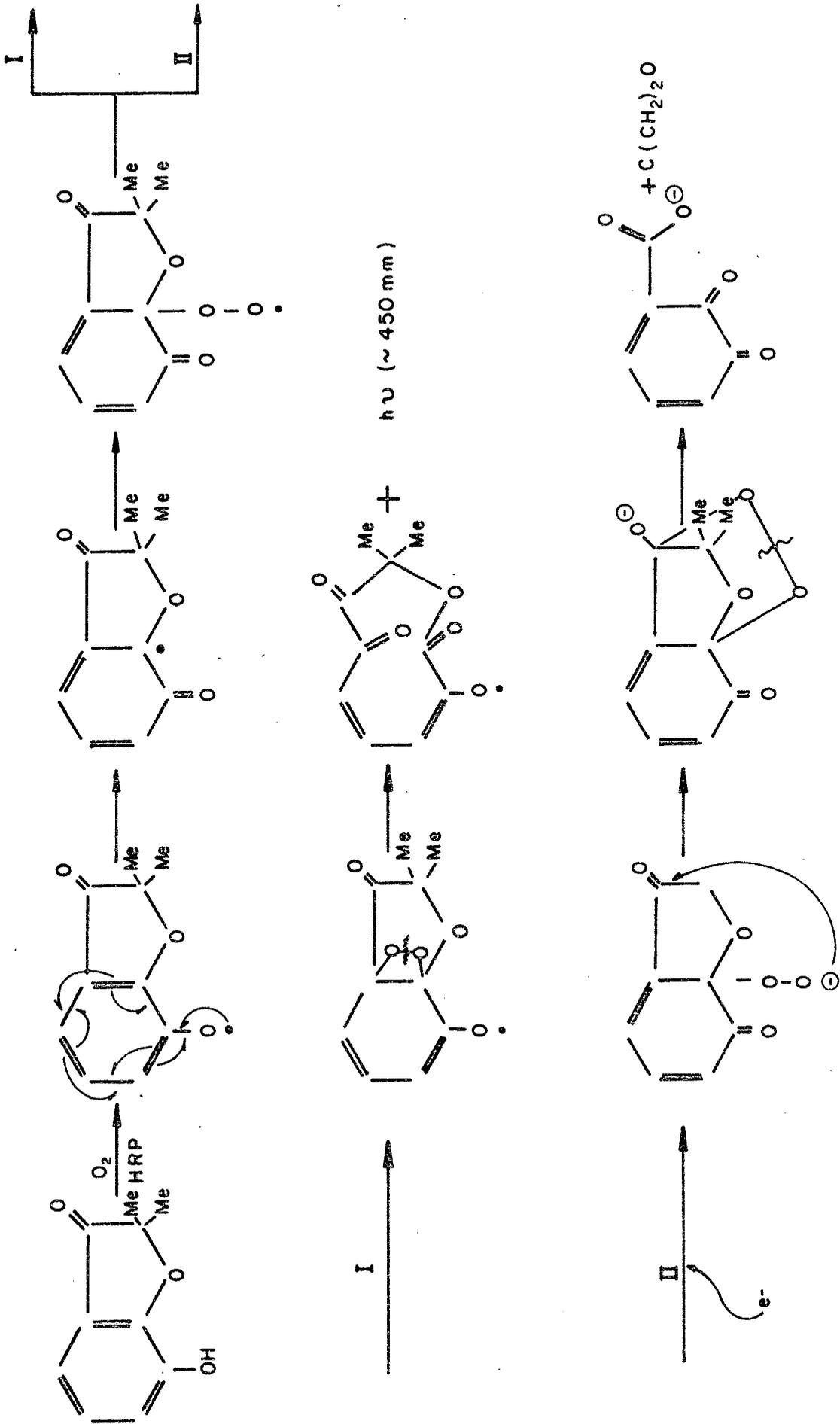
Baseados nos resultados obtidos pela técnica de UV, Lee e Chapman (1977) classificaram o ceto carbofurano fenol como um composto estável, diferente de outros inibidores fenólicos conhecidos, não se degradando, portanto, na reação de oxidase de IAA. No entanto, nossas experiências com consumo de oxigênio e emissão fotônica, mostraram que o ceto carbofurano fenol também se degrada, consumindo oxigênio e emitindo considerável quantidade de energia. Aceptores antracênicos aumentam muito eficientemente estas emissões, cuja maior banda de emissão se situa em algum valôr abaixo de 500 nm. (possivelmente seria emissão de um grupo carbonílico).

O ceto carbofurano fenol compete como o IAA pelo sítio de ligação, e isto é claramente visto na Fig. IV.6:

Alí, a inibição causada ao sistema IAA é normal até o aparecimento de uma segunda curva de emissão, indicando a existência de um outro substrato, o ceto carbofurano fenol, que compete pelo sítio da enzima. Com aumento na concentração de ceto carbofurano fenol e conseqüente aumento das emissões, verifica-se paralelamente inibição das emissões provenientes do sistema IAA, até predominar a emissão do sistema ceto carbofurano fenol.

A técnica de UV leva ao erro de se considerar o ceto carbofurano fenol um inibidor persistente, porquanto a degradação enzimática de IAA em presença deste inibidor, não atinge o nível de controle, mesmo a baixas concentrações; e isto nos leva a suspeitar que parte da enzima é destruída ou modificada pela energia fotônica da espécie proveniente da degradação enzimática do ceto carbofurano fenol. Isto mostra que tanto o consumo de oxigênio, como o estudo de formação de estados excitados, dão maior informação que simplesmente um estudo de UV na formação de produtos.

Estudos feitos com cinética diferencial de HRP a 400nm mostraram que o tempo de indução persiste por toda a duração da experiência e que o aumento a 420 nm é insignificante se comparado com a cinética de outros inibidores fenólicos (LEE, 1977), o que reforça nossa idéia de que a enzima é destruída pela energia fotônica. Mudanças espectrais são observadas quando a peroxidase é irradiada por luz do mesmo comprimento de onda que a emitida pela degradação enzi-



Esquema IV.I.

mática de IAA (VIDIGAL e col., 1975).

Um possível mecanismo para a degradação enzimática de ceto carbofurano fenol e possíveis produtos formados é sugerido no esquema IV.1. Das duas possibilidades apresentadas para a ciclização, a segunda é menos indicada para explicar as emissões fotônicas, pois a ciclização em anéis de cinco membros envolvem menos energia, não justificando as emissões observadas.

Por este trabalho fica demonstrado que por uma combinação de estudos sobre consumo de oxigênio, formação de produutos e formação de estados excitados, obteremos maiores informações acerca de processos enzimáticos onde ocorrem α -oxidação.

V. COMENTÁRIOS

O estudo de processos enzimáticos, capazes de produzir moléculas eletronicamente excitadas, tem permitido determinar os possíveis mecanismos em processos biológicos. O tema central desta tese está baseado nos métodos e técnicas desenvolvidas nesta nova área.

O sistema enzimático escolhido foi o de metabolismo de auxinas, onde o ácido indol - 3 - acético desempenha importante papel no crescimento de plantas. Este sistema modelo permite estudar in vitro o efeito de inibidores ou catalisadores de interesse biológico como por exemplo os defensivos agrícolas como os tiocarbamatos e carbofuranos, que são o motivo central desta tese.

Através de estudos de consumo de oxigênio, formação de produtos, o indol - 3 - aldeído, e formação de estados excitados, chegou-se às seguintes conclusões:

Tiocarbamatos

- (i) Não alterou o passo oxidativo do processo enzimático, mas se interaciona com o intermediário indol-hidroperóxido. Logo não altera o consumo de oxigênio, mas sim a formação de produto. Foram propostos mecanismos possíveis.

- (ii) São decompostos em tioles, CO_2 e possivelmente aminas.
- (iii) Transformam o composto I para composto II de peroxidase.
- (iv) Os tiocarbamatos diminuem a fotoligação no escuro de indol - 3 - aldeído no t - RNA, processo que aparentemente é importante no crescimento de planta. Sugere-se que este seja o mecanismo dos herbicidas tiocarbamato a nível celular: a diminuição de ligação ao t - RNA acarretaria inibição do cres-cimento.
- (v) O método de emissão fotônica dá informação rápida do comportamento de tiocarbamatos sobre processos α - oxidativos em plantas e pré-correlaciona com os outros métodos, consumo de oxigênio e formação de produto. Tendo em vista a baixa concentração de tiocarbamato usados e a sensibilidade dos aparelhos disponíveis, este poderia ser aplicado em têmos analíticos.
- (vi) Tiocarbamatos reagem rapidamente com corantes xantênicos a pH adequado, observado através de supressão de fluorescência dos xantênicos. Poderia ser um método potencial de detecção de tiocarbamatos em meios aquosos.

Carbofuranos

- (i) São inibidores competitivos do sistema enzimático IAA/HRP/O₂
- (ii) Os carbofuranos estudados são degradados durante a reação enzimática. O ceto carbofurano fenol na sua degradação produz um produto eletronicamente excitado.
- (iii) Os carbofuranos transformam o composto I e composto II para enzima nativa.
- (iv) O método de emissão fotônica mostrou-se muito sensível para o estudo dos carbofuranos e poderia ter uma potencialidade analítica.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTOGNINI, J.; GRAY, R.A. e MENN, J.J. (1970) "Proc. Selective Weed Control in Beetcrops;" 2nd Int. 1, 293
- ASTHON, F.M. (1963) Weeds 11, 295
- ASTHON, F.M.; WILLERS, O.T. de; GLENN, R.K. e DUKE, W.B. (1977) Pest. Biochem. Physiol. 7, 122
- BATTEGAY, M e BRANDT, Ph. (1923), Bull. Soc. Chim. Fr., 33 1667
- BECHARA, E.J.H.; FARIA DE OLIVEIRA, O.M.M.; DURÁN, N.; De BAPTISTA, R.C. e CILENTO, G. (1979) Photochem. Photobiol., 30, 101
- BEDNAR, T.W.; LINSMAIER-BEDNAR e KING, C.M. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 761
- BESTE, C.E. e SCHREIBER, M.M. (1972) Weed Sci. 20, 8
- CASIDA, J.E.; KIMMEL, E.C.; LAY, M.; OHKAWA, H.; RODEBUSCH, J.E. GRAY, R.A.; TSENG, C.K.; TILLES, H. (1975) Environ. Qual. Saf. Suppl. Vol. 3, 675

- CHEN, T.M.; SEAMAN, D.E. e ASHTON, F.M. (1968) Weed Sci. 16,
28
- DOROUGH, H.W. e CASIDA, J.E. (1964) J. Agr. Food. Chem. 12,
294
- DUNFORD, H.B. e STILLMAN, J.S. (1976) Coordination Chem. Rev.
19, 187
- DURÁN, N.; ZINNER, K.; DE BAPTISTA, R.C.; VIDIGAL, C.C.C.; e
CILENTO, G. (1976) Photochem. Photobiol., 24, 383
- DURÁN, N.; ZINNER, K.; VIDIGAL, C.C.C. e CILENTO, G. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1146
- DURÁN, N.; De MELLO, M.P.; De TOLEDO, S.M.; HAUN, M.; FALJONI,
A e CILENTO, G. (1979) Arch. Biol. Med. Exp. 12, 266
- DUTKA, F.; MÁRION, A.F.; KÖMIVES, T. e HULESCH, A. (1978)
Proc. 18 th Hung. Ann. Meet. Biochem. 107
- ËTIENNE, A.; LEPELEY, J.E. e HEYMÈS, R. (1949) Bull. Soc.
Chim. Fr. 835
- FALJONI, A.; HAUN, M.; HOFFMANN, M.E.; MENEGHINI, R.; DURÁN, N
e CILENTO, G. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comun. 80, 490

- FANG, S.C. e YU, T.C. (1959) West. Weed Control Conf. Res. Prog. Rep. 91
- FANG, S.C.; GEORGE, M. e FREED, V.H. (1964) J. Agr.Food.Chem. 12, 37
- FANG, S.C. (1975) " Herbicides Chemistry, Degradation and Mode of Action" 2nd ed., Marcel Dekker, New York, N.Y.
- FARIA DE OLIVEIRA, O.M.M.; HAUN, M.; DURÁN, N.; O'BRIEN, P.J. O'BRIEN, C.R.; BECHARA, E.J.H. e CILENTO, G. (1978) J. Biol. Chem. 243, 4707
- GELINAS, D.A. (1973) Plant Physiol. 51, 967
- GALSTON, A.W. e DAVIES, P.J. (1969) P.J. Sciences, N.Y. 163, 1288
- GOMORI, G. (1965) Em " Methods Enzymology, 1, 138
- GRAY, R.A. e WEIERICH, A.J. (1968) Proc. 9th Brit. Weed Control Conf. 94
- GRAY, R.A. (1969) Weed Sci. Soc. Am. Abstr., 174
- CHEN, S.Y.; SCUPHAN, I. e CASIDA, J.E. (1979) J. Agric. Food Chem., 4, 709

- HALEVY, A.H. (1963) Plant. Physiol. 38, 731
- HARVEY, B.M.R.; CHANG, F.Y. e FLETCHER, R.A. (1975) Can. J. Bot. 53, 225
- HEWSON, W.D. e DUNFORD, H.B. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6043
- HINMAN, R.L. e LANG, J. (1965) Biochemistry 4, 144
- HUBBELL, J.P. e CASIDA, J.E. (1977) J. Agr. Fod. Chem. 25, 404
- INABA, H.; SHIMIZU, Y. e TSUJI, Y. (1975) Jpn. J. Appl. Phys. 14, 23
- KEFFORD, N.P.; SAWHNEY, R.K. e GALSTON, A.W. (1963) Acta. Chem. Scan. 17, 313
- KENTEN, R.H. (1955) Biochem. J. 59, 110
- KOBAYASHI, K. e YAMAKI, T. (1972) Plant Cell Physiol. 13, 49
- LEE, T.T. e CHAPMAN R.A. (1977) Phytochemistry 16, 35
- LEE, T.T. (1975) Life Sci. 18, 205
- LEE, T.T. (1977) Plant Physiol. 59, 372
- LOTLIKAR, D.D.; REMMERT, L.F. e FREED, V.H. (1968) Weed Sci., 16, 161

- Mc CUNE, D.C. e GALSTON, A.W. (1959) Plant Physiol. 34, 416
- MENEGHINI, R.; HOFFMAN, M.E.; DURÁN, N.; FALJONI, A. e CILENTO, G. (1978) Biochim. Biophys. Acta 518, 177
- METCALF, R.L. e FUKUTO, T.R. (1965) J. Agr. Food Chem. 13, 220
- METCALF, R.L.; FUKUTO, T.R.; COLLINS, C.; BORCK, K.; BURK, J.; REYNOLDS, H.T. e OSMAN, M.F. (1966) J. Agr. Food Chem. 14, 579
- METCALF, R.L.; FUKUTO, T.R.; COLLINS, C.; BORCK, K.; AZIZ, A.E. S.; MUNOZ, R. e CASSIL, C.C. (1968) J. Agr. Food Chem. 16, 300
- MORELAND, D.E.; MALHOTRA, S.S.; GREENHAGEN, R.D. e SHOKRAII, E.H. (1969) Weed Sci. 17, 556
- MORGAN, P.A. (1964) Plant Physiol. 39, 741
- MORISHIMA, I. e OGAWA, S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 2814
- MORITA, Y.; KOMINATO, Y. e SHIMIZU, K. (1967) Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ. 28, 1
- MOSELISES, S.P. e HALEVY, A.H. (1962) Am. J. Bot. 49, 405
- NAKAJIMA, R. e YAMAZAKI, I. (1979) J. Biol. Chem., 254, 872

- NALEWAJA, J.D.; BEHRENS, R. e SCHMID, A.R. (1964) Weeds. 12,
269
- OONNITHAN, E.S. e CASIDA, J.E. (1966) Bull. Environ.Contam.
Toxicol. 1, 59
- PILET, P.E. e FREGATA, M. (1963) Rev. Gen. Bot. 70, 752
- RAY, P.M. e THIMANN, K.V. (1956) Arch. Biochem.Biophys. 64,
175
- RAY, P.M. (1958) Ann. Rev. Plant Physiol. 9, 81
- ROMAN, R. e DUNFORD, H.B. (1972) Biochemistry 11, 2076
- SIROIS, J.C. e MILLER, R.W. (1972) Plant Physiol. 49, 1012
- STONIER, T. e YANG, H. (1973) Plant Physiol. 51, 391
- VIDIGAL, C.C.C.; ZINNER, K.; DURÁN, N.; BECHARÀ, E.J.H. e CI-
LENTO, G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 138
- VIDIGAL, C.C.C.; FALJONI-ALARIO, A; DURÁN, N.; ZINNER K.
SHIMIZU, Y.e CILENTO, G. (1979) Photochem. Photobiol.,30
195
- WILKINSON, R.E. e HARDCASTLE, W.S. (1969) Weed Sci. 17, 335
- WINELY, C.L. e SAN CLEMENTE, C.L. (1971) Can. J. Microbiol.
17, 47

WRIGHT, B.J.; DOWSETT, J.R.; RUBERY, P.H.; BAILLIE, A.C. e
CORBETT, J.R. (1973) Pestic. Sci. 785

YAMAZAKI, H. e YAMAZAKI, I. (1973) Biochem. Biophys. 154,
147

Os resultados conseguidos durante a realização deste trabalho foram referidos nas seguintes publicações e apresentações:

PUBLICAÇÕES

1. C. Franco, N. Durán e S.M. De Toledo "Herbicide-Plant Interaction: Thiocarbamates Effect on Indole-3-acetic acid metabolism". Submetido a Phytochemistry.
2. C. Franco e N. Durán - "Insecticide-Plant Interaction: Carbofurans effect on Indole-3-acetic acid Metabolisms". Submetido a Phytochemistry.

APRESENTAÇÕES

1. C. Franco e N. Durán, "Estudos em Fotobioquímica: Interação do Sistema Indol-3-acético/peroxidase/O₂ com defensivos agrícolas e sua importância com os inibidores de Estados Excitados", VIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Abril de 1979, Caxambú, Minas Gerais, Brasil.
2. C. Franco e N. Durán, "Interação de Herbicidas Tiocarbamatos com o Sistema Enzimático IAA/HRP/O₂", 1º Encontro Regional de Química, Novembro de 1979, São Carlos, Brasil.

SEMINÁRIOS NO INSTITUTO DE QUÍMICA, UNICAMP

GRUPO Q. BIOLÓGICA

1. C. Franco - "Interação de Herbicidas com o Sistema Ácido Indol-3-acético/Peroxidase", apresentado em 24/10/79.
2. C. Franco - "Tiocarbamatos e Geração de Estados Bioenergizados no Sistema Ácido Indol-3-acético/Peroxidase".