



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LARISSA MOREIRA ROCHA

**ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E NO PERFIL PROTEICO DE SEMENTES DE
FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*) EXPOSTAS AO GLIFOSATO**

FORTALEZA

2024

LARISSA MOREIRA ROCHA

ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS E NO PERFIL PROTEICO DE SEMENTES DE
FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*) EXPOSTAS AO GLIFOSATO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo.

Co-orientador: Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R574a Rocha, Larissa Moreira.
Alterações citológicas e no perfil proteico de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) expostas ao glifosato / Larissa Moreira Rocha. – 2024.
51 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2024.

Orientação: Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo.

Coorientação: Prof. Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.

1. Agrotóxico. 2. Herbicida. 3. Estresse oxidativo. 4. Desenvolvimento vegetal. I. Título.

CDD 570

LARISSA MOREIRA ROCHA

ALTERAÇÕES CITOLOGICAS E NO PERFIL PROTEICO DE SEMENTES DE
FEIJÃO-DE-CORDA (*Vigna unguiculata*) EXPOSTAS AO GLIFOSATO

Monografia apresentada ao Curso de Ciências
Biológicas do Departamento de Biologia da
Universidade Federal do Ceará, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marina Duarte Pinto Lobo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Luiz Carlos Pereira Almeida Filho (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ticiane Monteiro Abreu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Felipe Domingos de Sousa
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Ao Meu Senhor e Meu Deus, que tudo faz,
tudo pode, tudo É; e a Minha Mãezinha, que
cuida de mim em todo tempo.

Aos meus pais, Rosineide e Francisco, que
fazem o possível e o impossível por mim.

Com todo o amor que tenho.

AGRADECIMENTOS

Ao **Meu Deus lindo e fiel**, que nunca me desamparou e que cuidou de cada detalhe, muito melhor do que eu podia imaginar. A Ele que foi e é a minha fortaleza e alegria, a certeza da vitória, o consolo e o alívio, a proteção e amparo, o cuidado e a providência. Ao que tudo me confiou e a quem eu confiei tudo. Ao **Meu Doce Salvador Jesus**, que tudo passou e, a cada dia, passa comigo, mesmo eu, em minha imensa pequenez. Ao **Divino Espírito Santo**, que em todo tempo me conduz. A **Minha Mãezinha cuidadosa**, que do céu intercede por esta filha e me é tão fiel. E aos Santos e Anjos de Deus, a quem confio minha proteção e intercessão. Desejo agradecê-los em cada um de meus dias até o céu, louvando e bendizendo a Deus, porque toda honra e glória é Dele.

Aos meus pais, **Rosineide Moreira e Francisco Pessoa**, lindos, amáveis, compreensivos, cuidadosos, esforçados, que são meu exemplo pra tudo nessa vida, meu apoio e minha base, em que posso confiar e jamais fraquejarei. Muito obrigada, eu os amo infinitamente. Farei tudo para honrá-los em cada dia de minha vida. Obrigada por todo o imensurável amor e esforço, sei que continuarão sempre a fazer o que podem (e às vezes, o que não podem) por mim. Obrigada por entregarem a mim um lar, minha fé e os valores que me fazem chegar onde estou e onde ainda chegarei. Criaram alguém muito emotiva e acredito que já saibam que escrevi essas poucas palavras com muitas lágrimas. Amo vocês (de novo)!

A minha professora, orientadora e amiga, **Marina Duarte Pinto Lobo**. Obrigada por partilhar toda sua alegria, seu afeto, seu cuidado e sua fé. Deus não erra, Ele providencia tudo, e sua presença e orientação foram cuidado Dele em minha vida. Sou grata por, sempre da forma mais leve, ensinar, corrigir e me instigar, por sugerir o caminho mais seguro, coerente e generoso. Sempre a terei como referência e guardarei seus sorrisos e seus pequenos atos de cuidado no dia a dia, comigo e cada um daqueles que estão ao seu redor. Obrigada, Professora. Saiba que terá sempre um lugar no meu coração.

Ao meu co-orientador, supervisor, corretor, editor, revisor, professor de bioquímica e amigo, **Luiz Carlos Pereira Almeida Filho**. Obrigada pelo cuidado, por, muito mais que cumprir o papel que em teoria lhe cabe, nos orientar verdadeiramente, elucidar os caminhos futuros, se preocupar com cada vírgula e ponto, nos ensinar com desejo que sejamos competentes e caminhemos para nos tornar bons profissionais, por dizer que os períodos estão longos, e este realmente está, mas mantereí assim mesmo. Que alegria é saber

que temos um Luiz, que sabe conversar, que é generoso e humano, que nos cativou e conquistou nosso respeito. O registro ficou todo no plural, porque, ao agradecer, sei que este é o sentimento de cada um daqueles que passam pelo Bioprospec. Obrigada, Luizinho, sei que ainda recorrerei a você muitas vezes.

Ao meu parceiro de vida, de todos os dias, de perto e de longe, **Rubinho Bezerra**. Que, com todas as suas virtudes, sempre esteve ao meu lado, sendo meu apoio em todas as minhas tentativas e meu alívio nos dias mais difíceis. Aquele que oferece o ombro amigo, o amor e o cuidado. Que em meio aos dias sempre corridos, permite que alguns minutos sejam de calma (e risadas). Que se preocupa, cuida de mim e me impulsiona. Que é um dos meus principais intercessores nesta terra, torcendo e rezando por mim todos os dias. Amo você. Obrigada por todo o amor, desejo retribuí-lo sempre.

A minha irmã feia, **Letícia Moreira**, e as mais lindas e amáveis sobrinhas que existem no mundo, **Antonella e Pietra Rocha**. Os dias de trabalho e estudos não são os mais fáceis ao lado delas: uma parte porque, em sua inocência, me tiram a atenção e me concentrar fica muito difícil, e maior parte porque eu as amo muito e desejo sempre parar o que estou fazendo para ter mais 5 minutos de amor (do nosso jeitinho) com elas. Amo vocês, obrigada por alegrarem meu coração e enchê-lo de amor.

A minha grande amiga, **Miquelvia Santos**, a quem tenho tanto a agradecer. Que, em meio a todo o egoísmo deste mundo, decidiu partilhar comigo as oportunidades que hoje me trouxeram onde estou. Que trilhou comigo estes quase 5 anos de graduação, com alegria, bondade, companheirismo e muita ajuda, sempre. Sei que o Senhor cuidou para que nossos caminhos se cruzassem no passado e que seguissem lado a lado no futuro. Espero que, em um futuro não tão distante, sejamos as mais novas Professoras Doutoradas da Universidade Federal do Ceará. Sou imensamente grata por sua amizade, amo você.

A minha querida amiga, **Ana Letícia Souza**, que desde a infância partilha comigo todas as besteiras que nos deixam felizes e é minha fiel escudeira. Que reza por mim, torce comigo, me aconselha e muitas vezes é a quem recorro quando necessito de um norte. Obrigada por partilhar as alegrias de minhas conquistas comigo e por ser sinônimo de Larissa feliz! Sua amizade é valiosa para mim, amo você, amiga melhor amiga.

Ao **Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec)** e a **Professora Érika Mota**, sempre acolhedora, serena, comprometida e atenciosa com cada um ao seu redor. E aos meus amigos frutos de lá, **Victor, Mariana, Vinícius e Klyssman**, que partilharam os dias comigo, tornando o trabalho frutífero e leve, sempre colaborando

com meu aprendizado e construindo o conhecimento juntos. Obrigada pelo apoio, ajuda e, especialmente, pela amizade e alegria. Foi uma graça poder caminhar com vocês.

A **Profa. Ticiano Monteiro Abreu**, por aceitar compor minha banca avaliadora, por agregar em minha formação, por sugerir cuidadosamente cada correção e por partilhar comigo, mesmo que sem saber, sua fé. E ao **Dr. Felipe Domingos de Sousa** por, além de aceitar compor a banca, contribuir de forma tão significativa para a elaboração desta pesquisa, através do **Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), da Universidade de Fortaleza**.

Ao **Laboratório Integrado de Botânica (LIB)**, em especial, ao **Dr. Rafael Guimarães**, que contribuiu com esta pesquisa e me orientou sempre com disposição.

Aos meus colegas de turma, que estiveram presentes e firmes desde o primeiro semestre. Em meio aos diferentes caminhos que cada um percorreu, fico grata por saber que não estive sozinha e que pudemos nos apoiar e contribuir com a formação um do outro. Obrigada também por em um tempo tão atípico, nos primeiros semestres em meio a uma pandemia, terem sido parte de muitas lembranças boas e alegres. Em especial, agradeço a minha amiga **Lua Silva** que, com seu jeitinho, ganhou um espaço no meu coração. Obrigada por me acolher.

E a todos os meus familiares e amigos, que rezam, torcem e se orgulham de mim. Obrigada por esperarem o melhor, por se alegrarem em cada pequena conquista minha, por me incentivarem a buscar e ser mais. Eu os amo e a presença de cada um na minha vida é valiosa!

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições, órgãos e unidades:

Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Departamento de Biologia, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

Núcleo de Biologia Experimental (NUBEX), Universidade de Fortaleza, Fortaleza, Ceará.

“Porque onde está o teu tesouro, lá também
está teu coração” - Mt 6, 21

RESUMO

Nas últimas décadas, a crescente utilização de agrotóxicos na produção de alimentos tem ocasionado a contaminação de seres vivos e a acumulação nos segmentos bióticos e abióticos dos ecossistemas, gerando uma série de transtornos e modificações no ambiente. Assim, há uma grande necessidade de entender como esses interagem com os sistemas biológicos, para então avaliar seus efeitos em organismos não alvos. Deste modo, este projeto visou avaliar as consequências do glifosato (N-fosfometilglicina), principal herbicida utilizado no Brasil, no processo germinativo de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Para tanto, sementes de feijão foram incubadas em diferentes concentrações de glifosato (1; 2,5; 5 e 10 mM) e em água destilada, como controle negativo, para germinarem. Decorrido o período necessário, a taxa de germinação foi avaliada e os valores, expressos como a média. Os resultados demonstraram que as sementes germinadas em maior concentração de glifosato testado (10 mM) apresentaram reduzida taxa de germinação, que decresceu à medida que a concentração do herbicida foi elevada. A pesquisa seguiu com o controle e os tratamentos 2,5 e 10 mM. Em busca de modificações citológicas, explantes de diferentes partes das plântulas foram submetidos à rotina histológica e as lâminas obtidas, visualizadas em microscópio óptico de luz, em que foi observado o desenvolvimento tardio ocasionado pela exposição ao glifosato. Além disso, as plântulas obtidas foram submetidas a extração de proteínas e analisadas por Espectrometria de Massas, das quais foram identificadas mais de vinte proteínas subexpressas e superexpressas relacionadas às respostas ao estresse e ao desenvolvimento vegetal. Ainda, testes de estresse oxidativo - catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e malondialdeído (MDA) - foram feitos para identificar enzimas antioxidantes presentes, bem como sua atividade, que demonstraram maior quantidade de CAT no grupo controle, associada ao desenvolvimento natural da planta, menor nível de SOD no tratamento com 10 mM, que corrobora com a redução do crescimento observada, e resultados similares para todos os dados obtidos no teste de MDA. Os resultados demonstram que o glifosato é capaz de alterar a germinação das sementes do feijão-de-corda, corroborando com a hipótese de que o herbicida pode afetar organismos não alvo tanto a nível citológico quanto no perfil proteico.

Palavras-chave: agrotóxico, herbicida, estresse oxidativo, desenvolvimento vegetal.

ABSTRACT

In recent decades, the increasing use of pesticides in food production has caused contamination of living beings and accumulation in the biotic and abiotic segments of ecosystems, generating a series of disorders and changes in the environment. Thus, there is a great need to understand how these compounds interact with biological systems, in order to evaluate their effects on non-target organisms. Thus, this project aimed to evaluate the consequences of glyphosate (N-phosphonomethylglycine), the main herbicide used in Brazil, on the germination process of cowpeas (*Vigna unguiculata*). For this purpose, cowpeas seeds were incubated in different concentrations of glyphosate (1; 2.5; 5 and 10 mM) and in distilled water, as a negative control, to germinate. After the necessary period, the germination rate was evaluated and the values were expressed as the average. The results showed that seeds germinated at the highest concentration of glyphosate tested (10 mM) had a reduced germination rate, which decreased as the herbicide concentration was increased. The research continued with the control and treatments of 2.5 and 10 mM. In search of cytological changes, explants from different parts of the seedlings were subjected to routine histology and the slides obtained were viewed under an optical light microscope, in which the delayed development caused by exposure to glyphosate was observed. In addition, the seedlings obtained were subjected to protein extraction and analyzed by Mass Spectrometry, from which more than twenty underexpressed and overexpressed proteins related to stress responses and plant development were identified. Furthermore, oxidative stress tests - catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) - were performed to identify the antioxidant enzymes present, as well as their activity, which demonstrated a higher amount of CAT in the control group, associated with the natural development of the plant, a lower level of SOD in the treatment with 10 mM, which corroborates the reduction in growth observed, and similar results for all data obtained in the MDA test. The results demonstrate that glyphosate is capable of altering the germination of cowpea seeds, corroborating the hypothesis that the herbicide can affect non-target organisms both cytologically and in the protein profile.

Keywords: pesticide, herbicide, oxidative stress, plant development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1	Uso de agrotóxico no Brasil entre 2012 e 2014	15
Figura 2	Estrutura química do glifosato	18
Figura 3	(A) Cultivo de feijão-de-corda, (B) Vagem e feijão-de-corda	24
Tabela 1	Taxa de germinação, valores em triplicata e média das taxas	31
Gráfico 1	Comparação estatística entre a média de germinação do controle e dos tratamentos	31
Figura 4	Placas da germinação das sementes. Controle (linha 1), concentração 2,5 mM (linha 2) e 10 mM (linha 3)	31
Figura 5	Tabela das micrografias obtidas a partir das sementes germinadas de <i>Vigna unguiculata</i> expostas ao glifosato	33
Tabela 2	Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, classificadas pela razão da abundância normalizada entre os valores do controle e dos tratamentos	35
Gráfico 2	Razão da abundância normalizada entre os valores do controle e dos tratamentos	36
Tabela 3	Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, classificadas pelas respectivas funções na fisiologia vegetal	40
Gráfico 3	Dados obtidos pelos ensaios de estresse oxidativo: CAT, SOD e MDA ...	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPA	Ácido Aminometilfosfônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DTT	Ditiotreitól
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
EPSPS	Enzima 5-Enolpiruvilshiquimato-3-Fosfato Sintase
ERA	Avaliação de Risco Ambiental
FAOSTAT	Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HSP	Proteínas de Choque Térmico
IAA	Iodoacetamida
IARC	Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-MS ^E	Espectrometria de Massas
LEA	Proteínas de Embriogênese Abundante Tardia
LMR	Limites Máximos de Resíduos
LOX	Lipoxigenase
MDA	Malondialdeído
NBT	Azul de Nitrotetrazólio
NUBEX	Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
RuBP	Ribulose 1,5-bifosfato
SOD	Superóxido Dismutase
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
TEP	1,1,3,3 – Tetraetoxipropano

U	Unidade de Enzima
UNIFOR	Universidade de Fortaleza
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Uso de Agrotóxicos.....	15
1.2 Classificação do Glifosato.....	18
1.3 Histórico do Glifosato.....	20
1.4 Impactos Ambientais do Glifosato.....	21
1.5 Efeitos em Organismos Não Alvo.....	22
1.6 Feijão-de-Corda.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Germinação das Sementes.....	28
3.2 Processamento Histológico.....	28
3.3 Análise do Perfil Proteico.....	28
3.4 Testes de Estresse Oxidativo.....	30
3.4.1 Catalase.....	30
3.4.2 Superóxido Dismutase.....	30
3.4.3 Malondialdeído.....	31
3.5 Análise Estatística.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1 Germinação das Sementes.....	32
4.2 Análise Histológica.....	33
4.3 Análise do Perfil Proteico.....	35
4.4 Estresse Oxidativo.....	41
4.4.1 Catalase.....	41
4.4.2 Superóxido Dismutase.....	42
4.4.3 Malondialdeído.....	43
5 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Uso de Agrotóxicos*

O termo “agrotóxico” é amplamente conhecido no mundo inteiro, devido a sua utilização em larga escala. No Brasil, o termo foi reconceituado pela Lei Federal nº 14.785, de 27 de Dezembro de 2023, como:

Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens ou na proteção de florestas plantadas, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Brasil, 2023).

Dentre a extensa gama de produtos classificados como agrotóxicos, pode-se incluir aqueles que possuem diferentes alvos biológicos, como inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumigantes, algicidas, avicidas, nematocidas, moluscicidas e acaricidas, além daqueles considerados reguladores de crescimento (Silva; Fay, 2004).

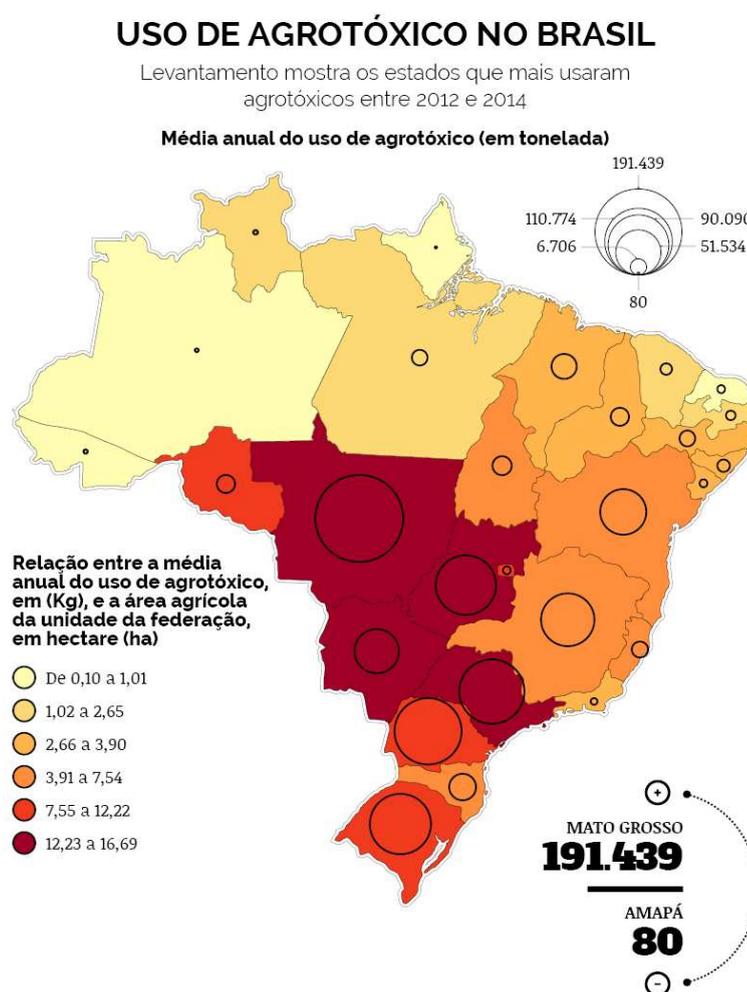
A agricultura, sendo a base da economia de diversos países, passou por diversas adaptações para o aumento da produção e a segurança na qualidade dos cultivos. Pesticidas e herbicidas ganharam popularidade devido à forte necessidade de conter a fome de bilhões de seres humanos. Assim sendo, a agricultura tradicional é extremamente dependente de agrotóxicos, uma vez que o objetivo é produzir alimentos em larga escala, o uso dessas substâncias é uma ferramenta a mais para assegurar a proteção contra baixas produtividades ou mesmo perdas de culturas.

Em países desenvolvidos, a aplicação de agrotóxicos é considerada a espinha dorsal na proteção de plantas, o que contribui para a industrialização da produção agrícola moderna (Magarey *et al.*, 2019; Nishimoto, 2019). De acordo com a avaliação da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), o uso de agroquímicos está aumentando no continente americano e asiático, dentro destes se destacam os países com maior uso médio de pesticidas, em relação a quantidade de terras aráveis, desde 1990 (FAOSTAT, 2022).

Nas últimas décadas, o Brasil expandiu em 190% o mercado de agrotóxicos, classificando-se como o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, em primeiro lugar no

ranking de consumo desde 2008 (Rigotto; Vasconcelos; Rocha, 2014). Com um crescimento de 392% no consumo anual entre 2003 e 2021, o país atingiu 720 mil toneladas consumidas somente em 2021. O uso por hectare também aumentou significativamente, alcançando 10,9 kg ha⁻¹, mais que triplicando a quantidade utilizada em 2003 (Figura 1). Em vista disso, e considerando que o Brasil possui a exportação de produtos agrícolas como carro-chefe na economia, o consumo brasileiro superou o dos Estados Unidos em 1,57 vezes, onde foram registradas 457 mil toneladas (Paz *et al.*, 2023).

Figura 1 - Infográfico sobre o uso de agrotóxico no Brasil entre 2012 e 2014.



Fonte: Repórter Brasil. Uso de agrotóxico no Brasil entre 2012 e 2014 baseado na relação entre a média anual do uso destes produtos, em Kg, e a área agrícola de cada estado, ou unidade da federação, em hectare (ha). A Região Centro-Oeste lidera este parâmetro, seguida do estado de São Paulo.

Segundo Lykogianni *et al.* (2021), entre os diferentes indicadores de uso de pesticidas, como “o uso de pesticidas por área de terras agrícolas” da *Food and Agriculture*

Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT) ou o consumo de pesticidas, que descreve as vendas de pesticidas em kg por hectare, tendem a ser ilusórios ao considerar seu uso sustentável, tendo em vista que não levam em consideração seu impacto ambiental ou as propriedades toxicológicas.

Embora o Brasil seja o líder mundial do uso de agrotóxicos, não existem evidências suficientes que permitam concluir que os diversos compartimentos ambientais brasileiros estejam contaminados ou em processo de contaminação. Com essa lacuna de informações sobre a qualidade de nosso ambiente, cria-se um panorama de incertezas no que diz respeito à saúde pública e à proteção do meio ambiente. Cenários internacionais indicam que muitas regiões agrícolas apresentam um nível de contaminação bastante elevado (Gomes; Barizon, 2014).

O agronegócio tem se expandido no Nordeste do Brasil, centrado em monocultivos, e tem ensejado consequências sobre a produção agrícola associadas à contaminação ambiental e humana, promovendo impactos à saúde, ocasionando mortes, intoxicações agudas e efeitos crônicos devido ao uso de agrotóxicos, dentre outros agravos (Araújo; Oliveira, 2016).

De acordo com McDougall (2018), dentre os pesticidas com maior volume de vendas estão, em primeiro lugar, herbicidas, seguidos de inseticidas e fungicidas. Dentre as substâncias utilizadas como agrotóxicos, o glifosato talvez seja o agrotóxico mais famoso do mundo. E é, com certeza, o mais vendido (ABRASCO, 2019).

A partir de 1985, impulsionados pela preocupação com o comércio e o uso dos pesticidas de forma segura, foi estabelecido o “Código Internacional de Conduta sobre Gestão de Pesticidas” (FAO, 1985), determinado pela FAO, juntamente com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e organizações semelhantes. Apesar da maioria dos países seguirem este código, é permitido que se adapte em cada região, sendo rigorosamente regulamentado na União Europeia e bem mais flexível na legislação brasileira (Phillips, 2018).

Uma recente pesquisa realizada pela OMS e pela FAO, relatou que cerca de 65% dos países não proíbem ou restringem o uso de pesticidas altamente perigosos (OMS; FAO, 2019). Em contrapartida, há questões que tangem a segurança dos alimentos para o consumidor e a avaliação de risco ambiental (ERA) que afetam diretamente os seres-vivos e a saúde da população destes países.

No setor alimentício, a legislação sobre Limites Máximos de Resíduos (LMR) e as tolerâncias de importação devem garantir que os produtos agrícolas atendam aos critérios de segurança exigidos. Apesar da realidade dos mercados nacionais, bem como da certificação destes produtos, não ser clara, iniciativas legislativas como essas têm incentivado países com setores agrícolas significativos, como o Brasil, a aprimorar sua regulamentação (Sarkar *et al.*, 2021).

Outro ponto importante na regulamentação da utilização de agrotóxicos pautam-se nas limitações da ERA, que negligenciam efeitos da mistura de componentes químicos, bem como as alterações na dinâmica, fraquezas na ecotoxicologia e omissão das interações ecológicas (Topping *et al.*, 2020). Além disso, a avaliação não leva em consideração os efeitos adversos que podem acontecer após a utilização em larga escala temporal.

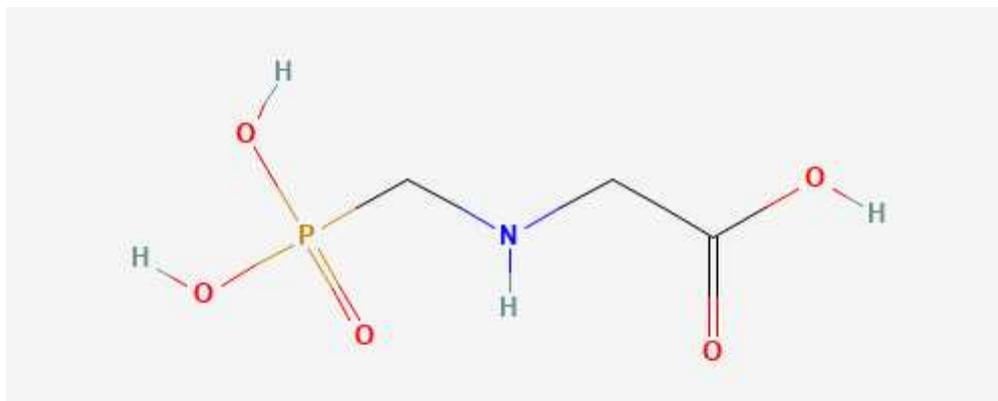
Atualmente, a ERA considera apenas uma única cultura e um único produto, ignorando o fato de que, na prática, os organismos não alvo são expostos a uma mistura de vários pesticidas sistêmicos durante uma temporada de cultivo (Brühl; Zaller, 2019). Além disso, a ERA não leva em conta os efeitos indiretos, como a redução de plantas não alvo, que repercute em um inteiro desequilíbrio no ecossistema (Hahm *et al.*, 2014). Isso subestima a real situação dos processos agrícolas, camuflando o risco concreto para a biodiversidade na paisagem resultante do uso de pesticidas.

1.2 Classificação do Glifosato

O glifosato, [N-(fosfometil)glicina], um herbicida de amplo espectro, é um composto orgânico, de forma molecular $C_3H_8NO_5P$ e baixo peso molecular (169.05 Da) (Richmond, 2018). Pertence ao grupo químico das glicinas substituídas, sendo sintetizado a partir da substituição de um hidrogênio amínico do aminoácido glicina, pelo radical metilfosfônico (Maggi *et al.*, 2020).

Em relação à sua estrutura química, o glifosato é um zwitterion, ou seja, possui uma carga positiva e uma carga negativa, sendo eletricamente neutro, com funções fosfonato, carboxilato e amina (Figura 2). Isto proporciona a capacidade de quelar a metais trivalentes e quadrivalentes. Por ser do grupo dos organofosforados, possui elevada polaridade e liga-se covalentemente aos átomos de carbono e fósforo, conferindo ao glifosato alta adsorção, alta solubilidade em água, insolubilidade em solventes orgânicos e compatibilidade com outras substâncias químicas (Singh; Kumar, 2017; Williams *et al.*, 2000).

Figura 2 - Estrutura química do glifosato.



Fonte: PubChem. Representação plana da estrutura química do glifosato, semelhante a estrutura do aminoácido glicina, sendo que um hidrogênio amínico foi substituído pelo radical metilfosfônico ($C_3H_5O_3P$).

O mecanismo de ação do glifosato é considerado sistêmico, já que é absorvido pela planta e se transloca através dela, não seletivo, pois atua tanto em seu alvo, as ervas daninhas, quanto em outras plantas, e pós-emergente, agindo em indivíduos já germinados (Bai; Ogbourne, 2016; Chiarello *et al.*, 2019). Tanto em plantas como em animais, o glifosato é metabolizado de forma pouco eficaz, sendo excretado minimamente alterado. Cerca de apenas 1% de seu volume é metabolizado no organismo, via hidrólise, originando o ácido aminometilfosfônico (AMPA), o principal metabólito do glifosato (Chiarello *et al.*, 2019; OMS; FAO, 2005).

Pelo seu tamanho molecular, o glifosato, ao ser absorvido pelas folhas e folhagens de plantas em crescimento, pode atuar como inibidor de determinadas proteínas, uma vez que pode se encaixar em sítios específicos presentes na superfície das enzimas, causando inibição ou mau funcionamento enzimático. É desta forma que o glifosato atua como um inibidor da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), na via do shiquimato, que sintetiza os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. Atualmente, entende-se que a inibição da EPSPS desregula a via do shiquimato, resultando em fluxo descontrolado de carbono, esgotando estoques de compostos necessários para a fixação do carbono, causando uma perturbação geral do metabolismo de organismos que apresentam essa via em suas células (Duke, 2020).

1.3 Histórico do Glifosato

O glifosato foi descoberto em 1950, quando o químico suíço, Henri Martin, da farmacêutica Cilag, sintetizou a molécula. Posteriormente, foi patenteada pela Monsanto, empresa multinacional de agricultura e biotecnologia, que a partir de 1970 desenvolveu herbicidas à base de glifosato, comercializados sob o nome comercial *Roundup*TM (ABRASCO, 2019). Inicialmente, foi usado pela *Stauffer Chemical* para quelar metais e não por seu potencial herbicida, no entanto, foi reconhecido que o glifosato ao se ligar ao manganês, altera uma enzima essencial à via biossintética da formação de aminoácidos, mudando a perspectiva de sua utilização (Richmond, 2018).

Além disso, o aumento na quantidade de vendas do glifosato ocorreu a partir da introdução de safras comerciais geneticamente modificadas, *Roundup Ready*TM, ainda na década de 1990. Isto tornou possível usar o glifosato para o controle de ervas daninhas tanto antes, quanto durante o crescimento da safra, assim como após a colheita (Richmond, 2018). Desta forma, sementes transgênicas resistentes ao glifosato foram, e ainda são, amplamente comercializadas.

Dado o conhecimento de seu efeito inibitório, as aplicações comerciais do glifosato foram expandidas, tendo em vista sua ação herbicida potencial e seletiva contra plantas indesejadas, além de, em teoria, não prejudicar os animais (Richmond, 2018). Assim, a partir dos anos 2000, com a expiração da patente da Monsanto, o glifosato passou a ser o princípio ativo de mais de 2 mil produtos de diferentes empresas. Somente no Brasil, mais de 100 agrotóxicos contêm essa substância e, em 2022, mais de 266 mil toneladas de glifosato foram comercializadas, estando em primeiro lugar como ingrediente ativo mais vendido há anos (IBAMA, 2024).

Concomitante ao extenso número de formulações contendo glifosato está a aparente segurança do herbicida, encoberta pelo mercado quando se leva em consideração o elevado volume de vendas. No entanto, nos últimos anos, surgiram controvérsias quanto aos reais impactos provocados pelo herbicida tanto na saúde humana quanto no meio ambiente, o que incentivou diversas pesquisas com este enfoque. Assim, desde 2015, o glifosato foi tema de debates em instituições internacionais: a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC), da OMS, classificou-o como “provável causador” de câncer, sendo contraposto no ano seguinte por um painel também da OMS e da FAO que o considerou seguro quando usado

de forma limitada. Em 2018, a Bayer, uma das principais empresas responsáveis pela comercialização do glifosato, enfrentou processos judiciais e indenizações milionárias por pessoas que alegaram ter desenvolvido câncer devido à exposição ao glifosato. Já em 2019, após modificações de diferentes regulamentações pelo mundo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permitiu o uso do herbicida no Brasil, afirmando que ele não possui características mutagênicas ou carcinogênicas, abrindo consultas públicas sobre o tema que ainda está em discussão (ABRASCO, 2019; Richmond, 2018).

1.4 Impactos Ambientais do Glifosato

Embora o uso de agrotóxicos como o glifosato tenha contribuído expressivamente para o aumento da produtividade agrícola sem que fosse necessário expandir as áreas cultiváveis, contribuindo para a segurança alimentar global (McDougall, 2018), existe uma necessidade crescente de práticas agrícolas sustentáveis. Essas práticas buscam minimizar os potenciais impactos negativos do herbicida sobre a saúde humana e o meio ambiente, para que se garanta o equilíbrio ecológico e a integridade das redes alimentares (Tudi *et al.*, 2021).

Há uma séria preocupação quanto aos efeitos do herbicida no ambiente, pois este, ao afetar toda uma cadeia alimentar, pode induzir diversas mudanças indesejadas. Assim, a adoção de certas práticas agrícolas sustentáveis pelos agricultores, a fim de manter as interações entre os componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas para obter o equilíbrio ecológico e salvar as redes alimentares, faz-se uma verdadeira ferramenta neste contexto (Tudi *et al.*, 2021).

O glifosato, após a aplicação por pulverização, persiste no solo, onde se fixa fortemente e é lentamente liberado dependendo da composição e das condições do solo, da água, das precipitações e do tipo de cultivo, fazendo com que sua meia vida possa variar de dias a meses. Ademais, os graves efeitos ecotoxicológicos em organismos não alvo podem se tornar mais fortes ao longo do tempo em áreas naturais vizinhas a locais com práticas agrícolas intensivas, já que essas áreas não alvo são submetidas frequentemente a derivas de herbicidas (Vereecken, 2005; Henderson *et al.*, 2010).

Estudos indicam que tanto o glifosato quanto seu principal produto de decomposição, o AMPA, são amplamente disseminados no ambiente, sendo encontrados em sedimentos, solos, rios e águas subterrâneas (Battaglin *et al.*, 2014; Sanchís *et al.*, 2012). Isto se deve a decomposição do herbicida no ambiente, que é produto da ação dos microrganismos

presentes no solo, permitindo que tanto o glifosato, quanto seu subproduto, o AMPA, liguem-se ao solo e, à medida com que são degradados, quebrem-se, liberando fosfato, amônia e dióxido de carbono (Richmond, 2018).

Por sua polaridade, o glifosato e o AMPA são capazes de dissolverem-se em corpos hídricos, seja de forma direta, pelo escoamento da água aos rios, córregos e oceanos, ou indireta, através de sua disseminação pelo ar atmosférico. A meia-vida destes compostos variam, chegando a cerca de 90 dias (Henderson *et al.*, 2010). Embora a concentração de glifosato nas águas subterrâneas seja geralmente baixa, condições de forte precipitação podem aumentar a lixiviação do solo, levando a uma contaminação mais significativa (Sanchís *et al.*, 2012). Isto pode levar, até mesmo, a efeitos adversos à saúde humana, ressaltando as possíveis implicações na segurança alimentar ao considerar a exposição crônica a substâncias lipossolúveis e bioacumulativas (Lykogianni *et al.*, 2021).

1.5 Efeitos em Organismos Não Alvo

A relação entre meio ambiente e agrotóxicos é extremamente complexa, pois produtos químicos aplicados no ambiente poderão resultar em algum impacto, seja nos componentes abióticos, como solo e água, já mencionados, ou nos bióticos que ali coexistem. Assim, há implicações negativas da utilização de pesticidas sobre os organismos não alvo, sejam estas espécies vegetais, animais, como os polinizadores, ou na própria saúde humana, que não devem passar despercebidas.

Uma das apreensões dos pesquisadores é a biotransformação do glifosato em metabólitos eletrofílicos que, por sua vez, podem reagir com *hotspots* de aminoácidos nucleofílicos, como cisteínas e lisinas em proteínas, causando interrupções na bioquímica de proteínas, bem como a catálise enzimática, a regulação de enzimas, a regulação pós-traducional e o balanço redox, além de interações proteína-proteína dentro da célula (Ford *et al.*, 2017).

Quanto ao efeito metabólico do glifosato em plantas, estudos já comprovaram sua interferência na fisiologia de diferentes espécies vegetais. Os processos afetados variam desde a produção de espécies reativas de oxigênio, prejuízo na taxa fotossintética, redução na síntese de clorofila, alterações hormonais, diminuição do aporte nutricional, até distúrbios no metabolismo de lignina e carbono (Serra *et al.*, 2013; Reddy *et al.*, 2004; Ahsan *et al.*, 2008). Estudos já comprovaram que o herbicida também é capaz de dificultar a síntese de alanina, no

ciclo C2 da fotorrespiração vegetal, pois, ao competir com a glicina, resulta na perda de glutamato, essencial para esta via metabólica (Vivancos *et al.*, 2011). Resultados obtidos por Ferreira *et al.* (2023), no estudo do manejo de ervas daninhas com o glifosato, sugerem que este produziu efeitos letais ou subletais nas espécies vegetais testadas, algumas das quais foram muito sensíveis, apresentando alta redução de crescimento, mesmo com $\frac{1}{4}$ da dose usada nas lavouras.

Por atuar como um quelante de metais, o glifosato consegue reduzir o nível de nutrientes minerais vitais para a planta que atuam, em grande parte, como cofatores enzimáticos ou constituintes biomoleculares (Singh *et al.*, 2020). Desta forma, a perturbação nos níveis nutricionais, atrelada a superacumulação de espécies reativas de oxigênio (EROs), leva a um conseqüente estresse oxidativo nos organismos, sejam eles vegetais ou animais.

As EROs são produzidas naturalmente pelo metabolismo celular, sendo fundamental para diversos processos fisiológicos, como a diferenciação celular, a fosforilação de proteínas, a ativação de fatores de transcrição, entre outros (Hrycay; Bandiera, 2015; Rajendran *et al.*, 2014). Contudo, se acumuladas, tem a capacidade de danificar estruturas celulares (Gaschler; Stockwell, 2017). Além disso, as EROs são responsáveis por causar peroxidação lipídica, danificando as membranas celulares fosfolipídicas. Este processo gera diferentes produtos, sendo o malondialdeído (MDA), o principal, os quais causam desordens no fluxo de íons, danos ao DNA e, até mesmo, morte celular. Com o objetivo de conter ou evitar tais impactos, enzimas antioxidantes são sintetizadas, como a superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Eckl; Bresgen, 2017).

Com relação aos demais organismos, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), classifica o glifosato na categoria IV de toxicidade quando inalado, assim como sugere uma baixa toxicidade oral e dérmica aguda. Relata-se que o herbicida é capaz de se bioacumular em animais, decompondo-se a depender do ambiente, como já mencionado (Singh *et al.*, 2020). Além disso, os estudos referentes aos efeitos do herbicida abrangem desde microrganismos, como algumas bactérias, até grandes vertebrados, como mamíferos e o próprio ser humano, demonstrando ser prejudicial em diferentes sistemas fisiológicos.

Dentre os exemplos do impacto do glifosato em espécies não alvo pode-se ressaltar a redução da abundância relativa de Acidobacteria, filo relacionado à rizosfera,

devido ao uso excessivo em culturas resistentes ao glifosato. Esse grupo está envolvido nos processos biogeoquímicos, podendo alterar a disponibilidade de nutrientes na rizosfera e interferir no crescimento de plantas (Newman *et al.*, 2016). Em minhocas do gênero *Eisenia*, o herbicida, em efeitos de longo prazo, reduziu a fertilidade dos casulos, extinguindo a população local da área estudada (Santadino *et al.*, 2014), no entanto, na dose recomendada, não causa prejuízo a atividade reprodutiva desses indivíduos (Santos *et al.*, 2012).

Em macroalgas (*Nitella microcarpa* var. *wrightii*), enquanto a associação de glifosato e Roundup dificultou o processo de fotossíntese, o AMPA teve efeito estimulante, além disso, o uso excessivo afetou a distribuição espaço-temporal da espécie no ecossistema (Oliveira *et al.*, 2016). Em bagres prateados (*Rhamdia quelen*), três formulações do herbicida foram testadas em ensaios enzimáticos no fígado e plasma, resultando no aumento em equivalentes ao MDA, na redução da catalase e no aumento da SOD em determinadas formulações e concentrações (Murussi *et al.*, 2016).

Em abelhas (*Apis mellifera*), foi analisado o efeito toxicológico sobre o comportamento do apetite. Cronicamente, observou-se uma redução na sensibilidade ao néctar em adultas jovens e baixo desempenho de aprendizagem, já de forma aguda, a aprendizagem associativa foi prejudicada, embora a busca por néctar não tenha sido afetada. Deve-se notar que, caso insetos polinizadores, como as abelhas, carreguem consigo glifosato junto ao néctar, podem contaminar os demais indivíduos e trazer efeitos a longo prazo (Herbert *et al.*, 2014). Além disso, quanto à navegação, as abelhas demonstraram atraso no tempo de voo até a colmeia, bem como voos indiretos, demonstrando interferência em seu aparato cognitivo (Balbuena *et al.*, 2015).

O uso indevido dos agrotóxicos na agricultura, que permeia aplicações descontroladas de pesticidas, descarte inadequado, falta de equipamentos de proteção e uso de produtos ilegais e falsificados, gera diversos casos de exposição às substâncias presentes (Zikankuba *et al.*, 2019). Geralmente, estas circunstâncias podem causar, aos seres humanos afetados, vômitos, dermatite, confusão mental, dores de cabeça, além de efeitos a longo prazo, como problemas renais e efeitos no sistema reprodutivo (Debnath; Khan, 2017).

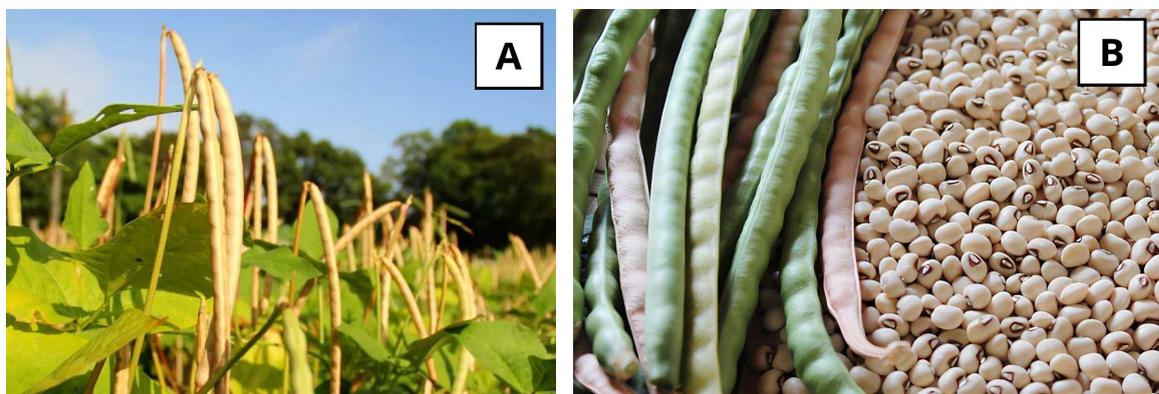
A IARC baseia suas avaliações em publicações científicas e avaliações regulatórias, em que estão inclusos os estudos patrocinados pela própria indústria, essenciais para produtos que necessitam de regulamentação. Embasado nisso, a agência discutiu o

potencial carcinogênico do glifosato em humanos, em especial, em casos de linfomas não-Hodgkin. Os resultados em estudos base não demonstraram o padrão observado nos pacientes acometidos, levando a IARC a concluir como “evidência limitada” em humanos, no entanto, apoiada em indícios suficientes de carcinogenicidade em animais, além de evidências significativas na genotoxicidade e estresse oxidativo (IARC, 2017). Considerando diferentes pesquisas e, ainda, as discussões mais atuais, as controvérsias quanto a este tópico permanecem e tal efeito ainda deve ser elucidado.

1.6 Feijão-de-Corda

O feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), conhecido também como feijão-caupi, é uma Dicotiledônea, pertencente à família *Fabaceae*, sendo o gênero *Vigna* pantropical, com centenas de espécies catalogadas. Além disso, quanto a sua composição, o grão de feijão-de-corda contém aproximadamente 25% de proteína e entre 50 e 67% de carboidrato (Devi; Kushwaha; Kumar, 2015) (Figura 3).

Figura 3 - (A) Cultivo de feijão-de-corda, (B) Vagem e feijão-de-corda.



Fonte: (A) Revista Natural, (B) Embrapa Amazônia Oriental. (A) Representação da cultura de feijão-de-corda em campo, em que as vagens ainda se apresentam em desenvolvimento. (B) Vagem fechada com sementes e grãos de feijão-de-corda.

Por possuir uma boa fonte de energia, proteína, vitaminas, minerais e fibras alimentares, é considerada uma leguminosa árida socioeconomicamente importante, garantindo a segurança alimentar e nutricional para milhões de pessoas em países em desenvolvimento (Devi; Kushwaha; Kumar, 2015; Lunardi *et al.*, 2019). Durante o processo germinativo do feijão, enzimas metabólicas como as proteases são ativadas, levando a liberação de aminoácidos e peptídeos e, conseqüentemente, promovendo a síntese de novas proteínas (Gulewicz *et al.* 2008).

O feijão-de-corda é altamente resiliente a condições adversas, como os ambientes quente, secos e com solos pobres (Boukar *et al.*, 2018). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil, cerca de 80 milhões de hectares de áreas agrícolas são destinados ao cultivo do feijão-de-corda, com destaque para a região Nordeste que possui aproximadamente 11 milhões de hectares (IBGE, 2017). No estado do Ceará, a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima que o feijão deverá registrar uma produção total que ultrapassa 3,3 milhões de toneladas na temporada 2023/2024, sendo que, apenas na segunda safra, deve-se registrar uma colheita de 462,8 mil toneladas para o feijão-de-corda (CONAB, 2024).

Dessa forma, o feijão-de-corda representa um alimento básico para as populações de baixa renda da região nordeste do Brasil, apresentando ciclo curto com tolerância à seca e capacidade de crescer em solos pouco férteis. Assim sendo, dada a importância deste cultivo, atentar-se para seu controle de qualidade bem como de seu desenvolvimento normal é necessário e torna-se um alvo necessário para o estudo científico.

Diante do exposto, tendo em vista o uso intensivo do glifosato e a crescente preocupação com seus impactos, é fundamental dar seguimento aos estudos sobre os efeitos desse herbicida em organismos não alvo, como o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Assim, analisar as consequências citológicas, através de metodologias que avaliem desde a bioquímica até a histologia e proteômica desta espécie base, é de suma importância para entender como esse herbicida pode agir. Além disso, torna-se mais um estudo elucidativo para ampliar a segurança e viabilidade das pesquisas, avaliando possíveis riscos ambientais e à saúde humana associados ao uso prolongado deste agrotóxico.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

Avaliar as consequências da exposição de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) ao glifosato, a nível citológico e proteômico.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Expor as sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) em diferentes tratamentos para germinação;
- Realizar análises estruturais, em microscopia de luz, dos segmentos de feijão-de-corda expostos ao glifosato;
- Identificar e quantificar, por Espectrometria de Massas (LC-MS^E), as proteínas presentes e diferencialmente expressas nas plântulas de feijão-de-corda expostas a glifosato;
- Relacionar as proteínas super ou subexpressas após exposição ao glifosato com seu o papel biológico e envolvimento na resposta à exposição ao agrotóxico;
- Avaliar a resposta ao estresse oxidativo das plântulas de feijão-de-corda expostas a glifosato.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Germinação das Sementes

As sementes de feijão foram incubadas em diferentes concentrações de glifosato (1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM) e água destilada, como controle, por 30 minutos. Em seguida, foram dispostas em placas de Petri contendo papel de filtro embebido com as mesmas soluções de origem. Um total de 30 sementes foram utilizadas para cada concentração e a unidade amostral foi definida com uma placa contendo 10 sementes. Os experimentos foram conduzidos em triplicata por 70 horas. Decorrido esse período, foi realizada a contagem e os valores de germinação foram expressos como a média da triplicata.

3.2 Processamento Histológico

A partir de cada tratamento, foram selecionadas 3 sementes para análises histológicas. As sementes foram fixadas em solução Karnovsky por cerca de 24 horas, após isso, passaram por desidratação seriada em Álcool Etílico, 99%, 90% e 80%, sendo 1 hora para cada solução e armazenadas em Etanol (70%). As sementes germinadas/plântulas passaram por corte a mão livre, dos quais foram selecionados a raiz, o hipocótilo e a parte do cotilédone de maior contato com este último, em que se espera encontrar maior movimentação proteica e de reserva. Os cortes foram dispostos em microtubos de polipropileno de acordo com o tratamento, em que ficaram em solução de pré-infiltração e de infiltração em parafina por 24 horas cada uma, a vácuo.

O material infiltrado foi emblocado em Histoiresina, em que a razão utilizada com o endurecedor foi de 15:1 em cada bloco, e concluída decorridas 24 horas. Os blocos foram cortados em micrótomo a 4 µm de espessura. Após isso, as lâminas foram coradas em Azul de Toluidina, submersas por cerca de 15 minutos, e lavadas em água destilada, por 10 minutos. Os cortes histológicos foram visualizados em Microscópio de Óptico.

3.3 Análise do Perfil Proteico

Para o preparo da solução tampão de extração, de 250 mL, foram utilizados o Tris-HCl 100 mM, ditioneitol (DTT) 1 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 0,5 mM. As sementes de uma das placas de Petri de cada tratamento do processo germinativo foram pesadas e a quantidade de solução tampão utilizada foi o triplo da massa de sementes obtida.

A maceração foi feita com a massa e o tampão previamente calculados, com o auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi armazenado e deixado na mesa agitadora por 30 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 10.000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, dos quais 15 mL foram utilizados para determinação da concentração de proteínas solúveis por meio da metodologia descrita por Bradford (1976) e, em seguida, análise por Espectrometria de Massas no Núcleo de Biologia Experimental da Universidade de Fortaleza (NUBEX-UNIFOR).

As frações proteicas, obtidas como acima descrito, foram inicialmente submetidas à digestão com tripsina. Com esta finalidade, as amostras foram tratadas com 0,2% da solução do surfactante RapiGest SF (Waters, Milford, USA), em uma solução de NH₄HCO₃ 50 mM, adicionados a 100 µg de fração proteica. A mistura foi incubada a 80 °C, por 15 min. Em seguida, foram adicionados às amostras 5 µL de ditionitrotol (DTT) 100 mM, para abertura das proteínas, o que facilita o acesso para alquilação e digestão. Após agitação, os tubos foram colocados em chapa aquecedora a 60 °C. Após incubação de 30 min, foram adicionados 5 µL de iodoacetamida (IAA) 300 mM à mistura, para alquilação das cisteínas e, mais uma vez, foi dado um vortex. As amostras foram então colocadas em local escuro, à temperatura ambiente, para que a reação de alquilação ocorresse por 30 min. Decorrido esse tempo, 1 µg da enzima tripsina (Promega) foi adicionado às amostras e a reação de digestão ocorreu em estufa, a 37 °C, por aproximadamente 16 h. Por fim, a amostra foi centrifugada a 13000 x g, por 30 min, a 6 °C, e o sobrenadante transferido para frascos apropriados para análise por espectrometria de massas, denominados *vials*. Aos frascos contendo as proteínas digeridas foram adicionados peptídeos trípticos da proteína fúngica álcool-desidrogenase (ADH; UniProt: P00330) ou peptídeos trípticos da proteína rábica fosforilase B (PhospB; UniProt: P00489), para serem utilizadas como proteínas padrão conhecidas e essenciais para quantificação absoluta de cada amostra (Geromanos *et al.*, 2011; Mbeunkui; Goshe, 2011).

A aquisição de dados de espectrometria de massas foi realizada através de um espectrômetro de massas MicroESI-Q-TOF, acoplado a um sistema de cromatografia nanoUPLC. Para coleta, processamento, análise de dados e busca no banco de dados adequado, foram utilizados os programas MassLynx v4. 1 e Progenesis. Os bancos de dados UniProtKB/Swiss-Prot 57.1 e UniProtKB/TrEMBL 40.1 foram utilizados e as condições de pesquisa foram baseadas na taxonomia da espécie em estudo. Da lista final de proteínas identificadas com confiança ($0,05 \geq p \geq 0,95$), aquelas que apresentaram razão (entre controle *versus* tratamentos com glifosato) igual ou superior a 1,5 foram consideradas

superexpressas (*up-regulated*) e aquelas que apresentaram razão igual ou inferior 0,5 foram consideradas subexpressas (*down-regulated*). Proteínas com razões de expressão entre os valores acima estabelecidos foram consideradas sem expressão diferencial (*unchanged*).

3.4 Testes de Estresse Oxidativo

Para a extração proteica, foi utilizada solução tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8). As sementes de uma das placas de Petri de cada tratamento do processo germinativo foram pesadas e a quantidade de solução tampão utilizada foi o dobro da massa de sementes obtida. A maceração foi realizada com o auxílio de almofariz e pistilo. O material macerado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e mantido sob refrigeração para análise de catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e malondialdeído (MDA).

3.4.1 Catalase

O protocolo descrito por Beers e Sizer (1952) foi utilizado, com algumas modificações. Em cubetas de quartzo, adicionou-se 2 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 12,5 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM) e, imediatamente antes da leitura a 240 nm, pipetou-se 10 µL do sobrenadante das amostras. As absorbâncias foram observadas durante 6 minutos e a variação entre o primeiro e o último minuto foi considerada, tomando-se cuidado para que a formação de bolhas não atrapalhasse a leitura. A atividade da catalase foi dada como mM de H₂O₂ decomposto por minuto. Uma curva-padrão com peróxido de hidrogênio foi construída para interpolação das absorbâncias.

3.4.2 Superóxido Dismutase

O ensaio foi realizado de acordo com Rodrigues *et al.* (2012) com modificações. Em microplaca de 96 poços, 60 µL do sobrenadante foi adicionado a um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,8), EDTA (1 mM), Triton X-100 (0,25%) e L-metionina (130 mM) e água destilada. Na ausência de luz, adicionou-se na placa 20 µL de azul de nitrotetrazólio (NBT, 750 µM) e 20 µL de riboflavina (100 mM). A reação ocorreu por 5 min no escuro e a leitura inicial das absorbâncias a 630 nm foi feita para obter-se o branco da reação. Depois disso, a placa foi posicionada em uma câmara acoplada com luz fluorescente (32 W) a uma distância de ± 20 cm. A cada 5 min de reação realizou-se uma nova leitura das absorbâncias, até completar-se 15 min de reação. O resultado foi

expresso em U/mg de proteína, onde uma unidade de enzima (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir 50% da fotorredução do NBT.

3.4.3 Malondialdeído

Em microtubos de polipropileno, 75 μ L do sobrenadante de cada tratamento, bem como do grupo controle, foram adicionados com 50 μ L de ácido tricloroacético (TCA 10% m/v; 1 M) e 125 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67% m/v; 1 M). Uma curva-padrão com diluições seriadas (0, 1,5; 3, 6, 9, 12, 15 nmol) de 1,1,3,3 – tetraetoxipropano (TEP, 0,06 mM) foi construída. As amostras e a curva foram colocadas em banho-maria (95° C por 1 hora), resfriadas, centrifugadas a 10.000 \times g por 10 min a 4°C. O conteúdo dos microtubos centrifugados foi coletado, disposto em microplaca de 96 poços e a absorbância foi lida a 532 nm. O resultado foi expresso como nmol de MDA/g de tecido.

3.5 Análise Estatística

Os valores médios e seus respectivos desvios padrão foram calculados a partir de triplicatas biológicas. A significância estatística da diferença entre as médias foi testada usando ANOVA unidirecional, seguida por um teste multivariado de Tukey, para taxa de germinação, CAT e MDA, e Dunnet, para SOD, usando o programa GraphPadPrism® versão 8.0.2. Valores de $p < 0,045$ foram considerados para indicar significância estatística. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) para as variáveis com distribuição normal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Germinação das Sementes

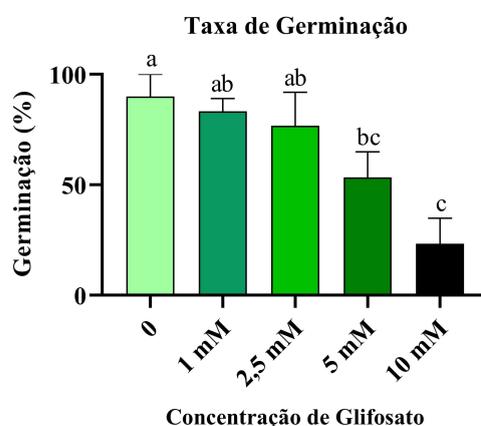
Após a exposição das sementes às diferentes concentrações do herbicida, foi possível observar que as sementes expostas à maior concentração de glifosato testado (10 mM) apresentaram uma média de germinação de apenas 23% (Tabela 1). Verificou-se uma taxa decrescente entre os valores (1 mM, 2,5 mM, 5 mM e 10 mM) e, em dados estatísticos, apresentando diferença significativa quando comparado as duas menores concentrações (1 mM e 2,5 mM), valores de 83% e 77% de sementes germinadas, respectivamente. Os valores observados no grupo controle e 1 mM de glifosato não apresentaram alterações expressivas (Gráfico 1).

Tabela 1 - Taxa de germinação do feijão-de-corda.

Tratamento	Taxa de Germinação			Média
Controle	100%	90%	80%	90%
1 mM	90%	80%	80%	83%
2,5 mM	80%	60%	90%	77%
5 mM	60%	40%	60%	53%
10 mM	30%	30%	10%	23%

Valores representados em triplicata e média das taxas obtidas para cada tratamento.

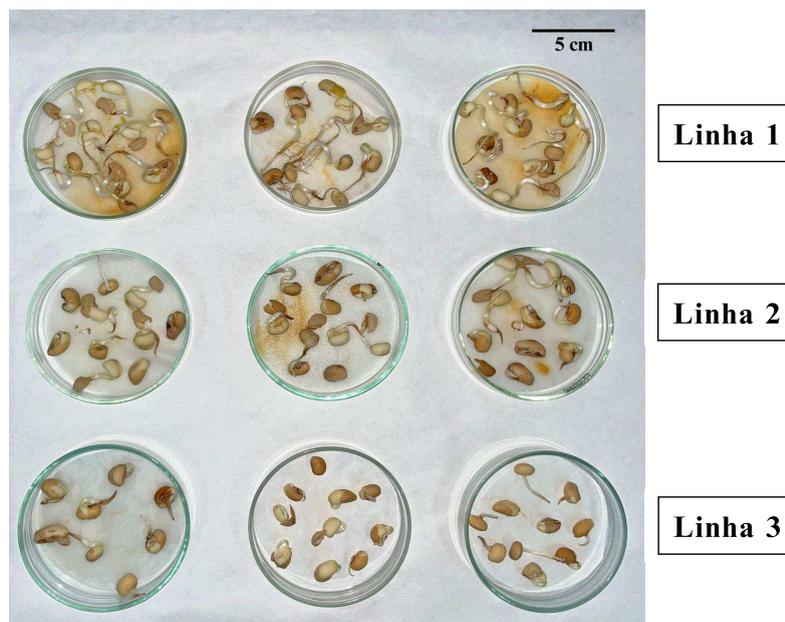
Gráfico 1 - Comparação estatística entre a média de germinação dos tratamentos.



Fonte: dados da pesquisa. Letras mostram equivalência entre as taxas conforme ANOVA comparando todos os grupos (a, b e c), sendo controle e 2,5 mM diferente de 10 mM. Valores dados em média, barras representam desvio padrão (DP).

Além disso, pode-se observar que o nível de desenvolvimento das plântulas do controle e das concentrações 2,5mM e 10mM foram visivelmente diferentes, apresentando distinção principalmente nas raízes, algumas já em processo de necrose, e nos hipocótilos, alguns já evidenciando parte aérea, como pode ser observado na Figura 4.

Figura 4 - Foto das placas da germinação das sementes.



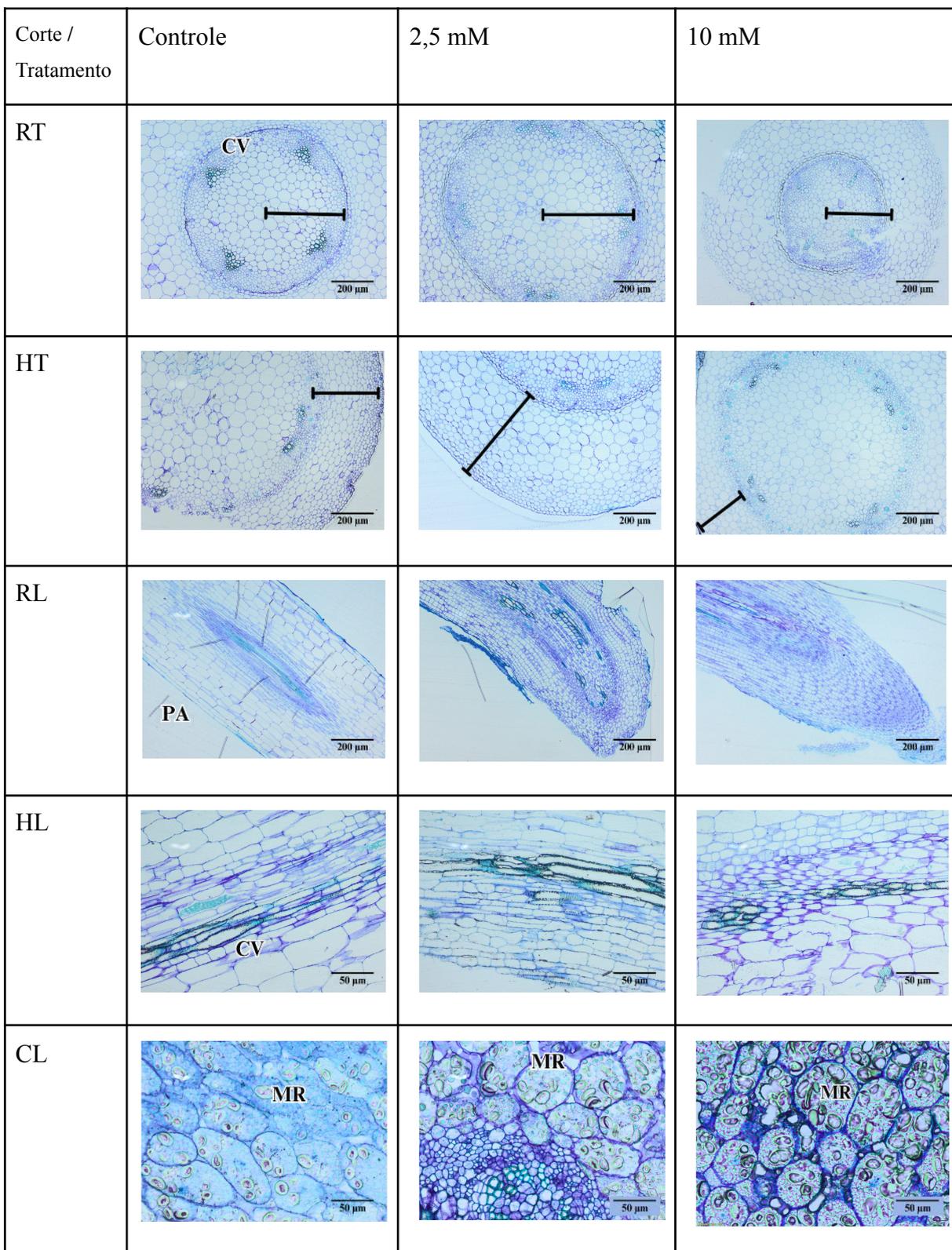
Fonte: produzido pelo autor. Controle (linha 1), concentração 2,5 mM (linha 2) e 10 mM (linha 3). Sementes germinadas e desenvolvidas em maior quantidade no controle, comparadas aos tratamentos com glifosato.

A partir destes resultados, considerando taxa de germinação, dados estatísticos e análises morfológicas das sementes, a pesquisa seguiu com a amostra controle e os tratamentos 2,5 mM e 10 mM de glifosato para os experimentos posteriores.

4.2 Análise Histológica

A partir destes resultados, considerando taxa de germinação, dados estatísticos e análises morfológicas das sementes, a pesquisa seguiu apenas com a amostra controle e os tratamentos 2,5 mM e 10 mM de glifosato para os experimentos posteriores. 4.2. Análise Histológica As fotomicrografias da raiz, do hipocótilo e do cotilédone de cada tratamento, obtidas a partir de rotina histológica, demonstraram o desenvolvimento tardio ocasionado pela exposição ao glifosato (Figura 5). A histologia dos cortes confirmou o atraso no crescimento das plântulas de feijão de corda, sendo este observado mais significativamente à medida que a concentração de herbicida testada aumentou.

Figura 5 - Prancha histológica das micrografias obtidas a partir das sementes germinadas de *Vigna unguiculata* expostas ao glifosato.



Fonte: produzido pelo autor. RT - Raiz Transversal, HT - Hipocótilo Transversal, RL - Raiz Longitudinal, HL - Hipocótilo Longitudinal, CL - Cotilédone Longitudinal, CV - Célula Vascular, PA - Pelo Absorvente e MR - Molécula de Reserva.-

Os cortes transversais da raiz e do hipocótilo apresentaram variação no diâmetro, em maior escala no tratamento controle e 2,5 mM, e reduzido na concentração de 10 mM. Além disso, há clara diferenciação das células do procâmbio, em que há o primórdio do feixe vascular nas plântulas mais desenvolvidas e o aspecto pouco diferenciado das células na maior concentração testada.

Nos cortes longitudinais do hipocótilo e da raiz é possível identificar as células vasculares mais alongadas no controle e no tratamento 2,5 mM, enquanto em 10 mM, as células aparentam fazer parte do meristema fundamental, pois há pouca ou nenhuma diferenciação. Na raiz do controle nota-se o aparecimento da zona pilífera, com pêlos absorventes laterais, não observados nos tratamentos com glifosato.

O cotilédone, por ser um tecido de armazenamento de nutrientes durante a fase germinativa, demonstrou grande concentração de moléculas de reserva na maior concentração do herbicida testada, a qual é gradativamente reduzida à medida que a concentração de glifosato testada também diminui. Esta análise reforça o desenvolvimento tardio, já que é possível inferir a mobilização de reserva dos cotilédones para os tecidos em crescimento nas plântulas, o que explica a menor quantidade no controle enquanto há maior quantidade nos tratamentos.

O desenvolvimento tardio ou reduzido das plantas, observado nas fotomicrografias, pode estar relacionado a um possível decréscimo da produção e da translocação da auxina para as raízes, além do menor teor de giberelinas, fitormônios diretamente envolvidos no crescimento vegetal. Vale ressaltar que o glifosato é capaz de interromper a produção de corismato e de triptofano, importantes precursores da auxina, e promover a oxidação desta molécula, tornando-a inativa, impedindo as reações metabólicas (Bertoncelli *et al.*, 2018).

4.3 Análise do Perfil Proteico

Na análise por espectrometria de massas, foram identificadas mais de vinte proteínas, assim como algumas isoformas, e pôde-se observar tanto a sub quanto a superexpressão de algumas enzimas (Tabela 2, Gráfico 2), relacionadas a mobilização de reserva e ao estresse oxidativo, bem como, moléculas de sinalização (Tabela 3), possibilitando um melhor entendimento a respeito do impacto causado pelo glifosato no desenvolvimento das células vegetais. Dentre as proteínas identificadas, destacam-se, por seu padrão de expressão, as proteínas de embriogênese abundante tardia, as proteínas de choque térmico, as lipoxigenases, a rubisco e a tubulina.

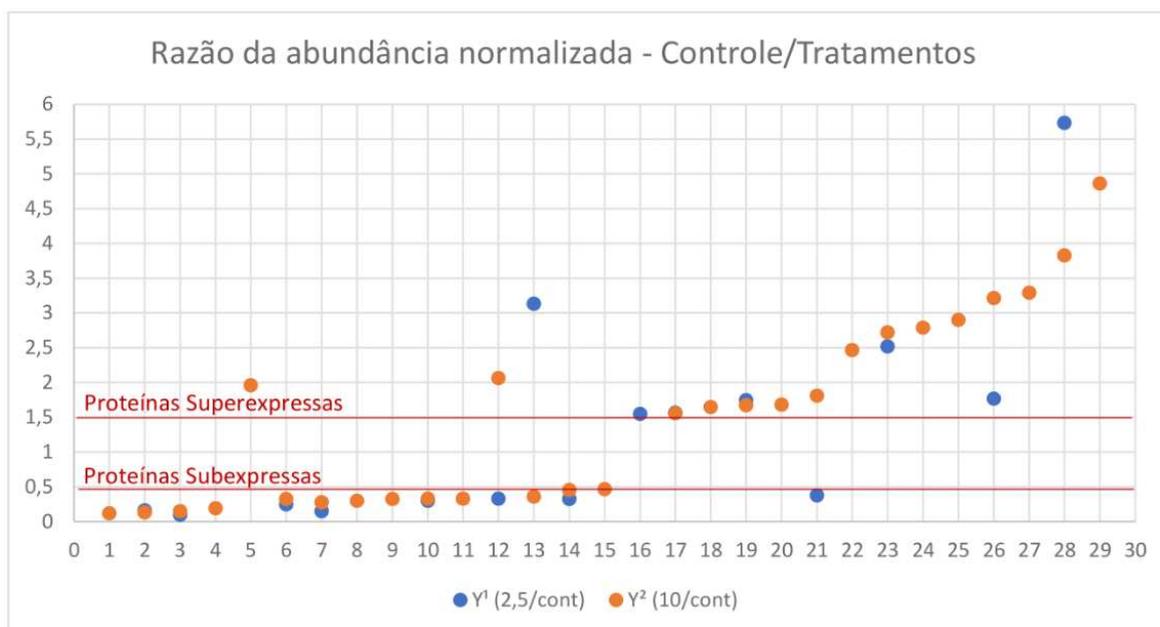
Tabela 2 - Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas.

Razão da abundância normalizada - Controle/Tratamentos			
Proteína (X)		Y ¹ (2,5/cont)	Y ² (10/cont)
1	Proteína 1A associada ao corpo oleoso		0,122500822
2	Cianato hidratase	0,164302355	0,134124349
3	Proteína de armazenamento de sementes 11-S	0,100727371	0,152752089
4	Dobra de rocambole tipo RmlC		0,194067496
5	Dobra de rocambole tipo RmlC		1,963076624
6	Alérgeno tipo Bet v I	0,249680047	0,328597442
7	Embriogênese tardia abundante proteína D-29- <i>like</i>	0,150023064	0,281307648
8	Barril alfa-beta responsivo ao estresse		0,300059386
9	Repetição semelhante à hemopexina		0,326488097
10	Inibidor de Kunitz tipo ST1	0,29996272	0,330315127
11	Lipoxigenase		0,330508014
12	Lipoxigenase	0,330326753	2,067052313
13	Proteína abundante em embriogênese tardia LEA	3,133628535	0,361561728
14	Ribulose bisfosfato carboxilase cadeia grande	0,328536317	0,457193069
15	Glutaredoxina 3		0,467941198
16	Álcool desidrogenase	1,550261462	
17	Bainha fibrosa tipo proteína de ligação a CABYR	1,569401449	1,558641339
18	Proteína A de choque térmico 1/8		1,648822741
19	Desidrogenase/redutase de cadeia curta	1,749833671	1,676681564
20	Nucleosídeo difosfato quinase		1,682704777
21	Lectina de leguminosa	0,379400777	1,811508699
22	Anexina		2,470658894
23	Desidrogenase/redutase de cadeia curta	2,520797852	2,723104432
24	Proteína da família HSP20		2,790521896
25	Gama-tionina		2,901478855
26	Repetição semelhante à hemopexina	1,77127128	3,215898968
27	Vicilina (fragmento)		3,292692036

28	Tubulina/FtsZ	5,735859815	3,829499971
29	Peptidil-prolil cis-trans isomerase		4,865647079

Proteínas classificadas pela razão da abundância normalizada entre os valores do controle e dos tratamentos. Dados usados para elaboração do Gráfico 1. Eixo X - nome e numeração da proteína, Y¹ - razão entre abundância normalizada de 2,5 mM e controle e Y² - razão entre abundância normalizada de 10 mM e controle.

Gráfico 2 - Razão da abundância normalizada entre os valores do controle e dos tratamentos.



Fonte: dados da pesquisa. Eixo X - numeração da proteína, Y¹ - razão entre abundância normalizada de 2,5 mM e controle e Y² - razão entre abundância normalizada de 10 mM e controle. Valores abaixo de 0,5 foram consideradas proteínas subexpressas e acima de 1,5, superexpressas.

As Proteínas de Embriogênese Abundante Tardia (LEA) são altamente hidrofílicas com propriedades antioxidantes e de ligação a íons metálicos, funcionando na estabilização proteica e de membrana, no tamponamento, na hidratação da planta e na interação de DNA e RNA. São muito importantes tanto na proteção das células contra o estresse abiótico quanto no crescimento e desenvolvimento normal das plantas (Chen *et al.*, 2019). Na análise por espectrometria de massas, foi identificado o grupo de proteínas LEA, em que se obteve superexpressão no tratamento 2,5 mM do herbicida e subexpressão na maior concentração, assim como, o subgrupo de LEA D-29-like, com padrão de expressão inferior em ambos os tratamentos. Dessa forma, a interferência do glifosato na síntese dessas proteínas colabora com a suscetibilidade do organismo às alterações ambientais e compromete diretamente seu desenvolvimento.

Em plantas, Proteínas de Choque Térmico (HSP) são reguladas positivamente pelo estresse e atuam como chaperonas moleculares para proteger outras proteínas dos danos induzidos por este processo. Embora as HSPs tenham sido caracterizadas pela primeira vez devido à sua resposta a altas temperaturas, atualmente sabe-se que estas são produzidas em estágios específicos do ciclo celular, sendo, além de biomoléculas responsivas ao estresse, participantes no crescimento e desenvolvimento da planta (Haq *et al.*, 2019). Os dois grupos identificados na análise foram superexpressos em 10 mM, o que possibilita inferir que, devido a maior concentração do herbicida, a capacidade dessas proteínas de reagir ao estresse foi estimulada, para que a sobrevivência da planta fosse garantida a partir da integridade de suas biomoléculas.

As Lipoxigenases (LOXs) são uma família de enzimas que catalisam a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados para produzir hidroperóxidos. Estas proteínas estão relacionadas com a mobilização de lipídios de reserva durante a germinação das sementes e também desempenham um papel importante na produção de componentes protetores durante o estresse abiótico (Lončarić *et al.*, 2021). Foram identificadas diferentes isoformas deste grupo durante a análise, sendo subexpressa em 10 mM em uma destas formas e, na outra, sub expressa em 2,5 mM mas superexpressa na maior concentração de glifosato. Estes resultados devem ser analisados detalhadamente para que sejam elucidados, no entanto, pode se atrelar a pouca mobilização de reserva nos tratamentos com o herbicida à inibição do crescimento das plântulas e da germinação das sementes observada durante as fases experimentais iniciais.

A Rubisco, RuBP carboxilase/oxigenase, é responsável por catalisar a adição de CO₂ à ribulose 1,5-bifosfato (RuBP), para formar duas moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (3PGA), como o passo inicial da fixação do carbono inorgânico através do Ciclo de Calvin-Benson-Basham (Mao *et al.*, 2022). Esta enzima está presente nos cloroplastos de células fotossintetizantes das plantas, sendo encontrada majoritariamente em folhas, mas também presentes em caules e flores. Os dados obtidos demonstraram subexpressão da rubisco nos dois tratamentos com o herbicida, que deve estar relacionada ao desenvolvimento tardio das sementes e à ausência de parte aérea, caulinar e foliar, em que há a síntese e a ação dessa enzima.

A tubulina é o principal constituinte dos microtúbulos, que se formam a partir da adição de dímeros de GTP-tubulina à extremidade do microtúbulo. Sugere-se que, em resposta ao estresse abiótico e biótico, a produção de EROs é aumentada e seus alvos em

células vegetais são vários processos bioquímicos e fisiológicos, bem como organelas celulares, em que se pode destacar os microtúbulos e a reorganização do citoesqueleto de tubulina (Baranova *et al.*, 2016). A proteína foi superexpressa nas duas concentrações de glifosato testadas, permitindo a associação entre este padrão de expressão e o possível estresse sofrido durante a fase germinativa.

No tratamento com 2,5 mM, foram identificadas subexpressas, oito proteínas, dentre estas, uma das isoformas da LEA, a LOX e a rubisco, já mencionadas. Assim, relaciona-se às demais ao metabolismo redox - Cianato Hidratase, ao armazenamento - Proteína de Armazenamento de Sementes 11-S, e à defesa ou resposta ao estresse - Alérgeno do Tipo Bet v I e Inibidor de Kunitz ST1-like, sendo essa última, uma inibidora de proteases, uma das classes mais importantes na defesa de plantas por seus efeitos antinutricionais (Schenkluhn *et al.*, 2010). Além destes, ainda em estudo, relacionado à interação proteína-carboidrato, possivelmente associado à defesa vegetal, foi identificada a Lectina de Leguminosa (Katoch; Tripathi, 2021).

Ademais, seis proteínas foram encontradas superexpressas no tratamento com 2,5 mM, incluindo a LEA e a Tubulina, já destacadas. O restante pode ser relacionado também ao metabolismo redox - Álcool Desidrogenase, bem como sua isoforma, Desidrogenase/Redutase de Cadeia Curta, a regulação celular - Bainha fibrosa tipo proteína de ligação a CABYR e ainda sem total elucidação em organismos vegetais - Repetição Semelhante à Hemopexina.

Já no tratamento com 10 mM, uma gama maior de proteínas foi tanto sub quanto superexpressa. Com um padrão de expressão menor que no grupo controle, foram identificadas, além das LEAs, LOX e rubisco, já relatadas, proteínas relacionadas à nutrição - Proteína Associada ao Corpo Oleoso 1A e Proteína de Armazenamento de Sementes 11-S, ao metabolismo redox - Cianato Hidratase e Glutarredoxina 3, e com uma função não completamente elucidada no metabolismo vegetal - Repetição Semelhante à Hemopexina e Dobra de rocambole tipo RmlC (apenas uma das isoformas). Quanto à defesa vegetal, foram obtidas o Alérgeno do Tipo Bet v I, Inibidor de Kunitz ST1-like e Barril Alfa-beta Responsivo ao Estresse, sendo esta última, descrita na literatura quanto a defesa contra fungos patogênicos, além de responsiva a estresses como sal, frio e calor, seca e congelamento (Wang *et al.*, 2024).

Na maior concentração de glifosato testada, foram identificadas superexpressas, as HSPs e tubulina já descritas, bem como uma das isoformas da LOX, além de mais dez proteínas. Estas dividem-se em relação à função na regulação celular - Bainha fibrosa tipo

proteína de ligação a CABYR e Peptidil-prolil Cis-trans Isomerase, no metabolismo energético - Quinase de Difosfato de Nucleosídeo, no metabolismo redox - Desidrogenase/Redutase de Cadeia Curta, no armazenamento - Vicilina, e na defesa e resposta ao estresse - Anexina e Gama-tionina, além daquelas que ainda necessitam de estudos complementares - Lectina de Leguminosa, Dobra de rocambole tipo RmlC, Repetição Semelhante à Hemopexina.

Tabela 3 - Proteínas identificadas por Espectrometria de Massas, classificadas pelas respectivas funções na fisiologia vegetal.

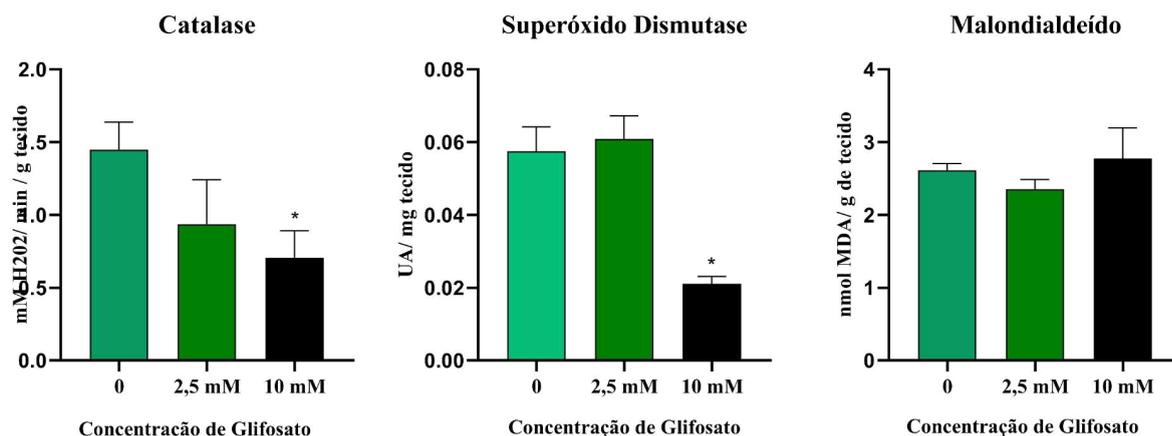
Proteômica das Sementes Germinadas Expostas ao Glifosato			
Função	Proteínas Expressas	2,5 mM	10 mM
Armazenamento e nutrição	Proteína de armazenamento de sementes 11-S	-	-
	Vicilina	*	++
	Proteína 1A associada ao corpo oleoso	*	-
Defesa e resposta ao estresse	Alérgeno tipo Bet v I	-	-
	Gama-tionina	*	++
	Inibidor de Kunitz tipo ST1	-	-
	Proteína abundante embriogênese tardia D-29	-	-
	Proteína abundante embriogênese tardia LEA	++	-
	Proteína A de choque térmico 1/8	*	+
	Proteína da família HSP20	*	++
	Anexina	*	+
Metabolismo redox	Barril alfa-beta responsivo ao estresse	*	-
	Glutaredoxina 3	*	-
	Álcool desidrogenase	+	*
	Desidrogenase/reductase de cadeia curta	+	+
Regulação e funções celulares	Cianato hidratase	-	-
	Bainha fibrosa tipo proteína de ligação a CABYR	+	+
	Tubulina/FtsZ	+++	++
Fotossíntese e metabolismo de energia	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	*	+++
	Rubisco	-	-
Sinalização e comunicação intercelular	Nucleosídeo difosfato quinase	*	+
	Lipoxigenase	* / -	- / +
Sem total elucidação	Dobra de rolo de gelatina tipo RmlC	*	- / +
	Repetição semelhante à hemopexina	+	++
	Lectina de leguminosas	-	+

Valores representados pelos símbolos: - proteínas subexpressas, + proteínas superexpressas, * proteína não detectada no tratamento.

4.4 Estresse Oxidativo

Os dados obtidos sobre o estresse oxidativo foram processados e analisados estatisticamente, a partir disso, gráficos foram elaborados para melhor interpretação dos dados (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Dados obtidos pelos ensaios de estresse oxidativo: CAT, SOD e MDA.



Fonte: dados da pesquisa. Asteriscos mostram diferença significativa, conforme ANOVA unilateral seguida de Tukey (CAT e MDA) e Dunnett (SOD) para comparação com controle. Valores dados em média (DP).

4.4.1 Catalase

Os níveis de CAT demonstraram redução à medida que a concentração de glifosato aumentou, deste modo, o grupo controle apresentou a maior atividade da enzima (1,4483 mM H₂O₂/ min /g tecido), seguido dos tratamentos com 2,5 mM (0,9364 mM H₂O₂ / min / g tecido) e 10 mM (0,7060 mM H₂O₂/ min/ g tecido). Estatisticamente, há diferença significativa entre a atividade das sementes germinadas na ausência do herbicida e aquele que recebeu maior dose.

A catalase está presente em diferentes compartimentos celulares, incluindo peroxissomos, mitocôndrias e citosol, no entanto, apesar da atividade já conhecida nestes locais, maior parte da atividade significativa da enzima se encontra nos cloroplastos (Mhamdi *et al.*, 2010). Essas estruturas, porém, surgem apenas após a diferenciação de proplastídeos a plastídeos, sendo posterior ao estágio de embrião na planta, o que resultaria, deste modo, em uma maior quantidade, ou maior atividade, em folhas do que em sementes (Shackira *et al.*, 2022).

Além disso, o aumento da CAT é essencial para a sobrevivência de plantas que estão sob estresse, sendo os organismos com deficiência desta enzima, mais propensos a sofrer com as EROs. Estudos também relataram a presença de diferentes isoformas da

enzima, Cat1, Cat2 e Cat3, que caracterizam diferentes estágios de desenvolvimento e especificidade tecidual nas plantas, o que a torna uma enzima antioxidante versátil (Sharma; Ahmad, 2014).

Desta forma, tendo em vista que a literatura corrobora com o estresse oxidativo proporcionado pelo glifosato, pode-se associar os resultados obtidos, não a ausência de estresse, mas ao atraso no desenvolvimento das plantas tratadas com o herbicida. Assim, o grupo controle, com estruturas fotossintetizantes diferenciadas e com cloroplastos em funcionamento, apresentou maior atividade antioxidante frente aos tratamentos, os quais não apresentaram esta via de defesa completamente ativa.

4.4.2 Superóxido Dismutase

Os resultados obtidos revelaram o maior índice de SOD no tratamento com 2,5 mM de glifosato (0,060891 UA/ mg tecido), seguido do grupo controle (0,057469 UA/ mg tecido) e do tratamento com 10 mM (0,021034 UA/ mg tecido). Há diferença estatística apenas entre o grupo controle e aquele com maior exposição ao glifosato, a variação entre o grupo com menor concentração do herbicida e o controle não foi significativa.

Dentre as principais enzimas antioxidantes, encontra-se a SOD, que desempenha um papel importante na desintoxicação de EROs. Esta enzima é capaz de converter os radicais superóxido (O_2^-) em H_2O_2 (Ahsan *et al.*, 2008). Embora em espécie diferente, um estudo que analisou a atividade da SOD em tartarugas expostas ao glifosato manteve um padrão semelhante, apresentando redução da atividade da enzima a medida que a exposição ao herbicida aumentou (Héritier *et al.*, 2017). Uma das explicações possíveis é a sensibilidade da enzima a quantidade de H_2O_2 presente no meio, que é capaz de alterar seu funcionamento natural e sua ação já conhecida contra esta molécula (Héritier *et al.*, 2017).

Pode-se relacionar a maior quantidade de SOD e de CAT ao desenvolvimento vegetal, considerando esta uma via de mão dupla. EROs estão presentes em todo o ciclo celular e é necessário que sejam rapidamente neutralizadas para que não haja dano e a célula possa desenvolver-se normalmente. Baseado na taxa germinativa obtida na pesquisa, é possível associar, direta ou indiretamente, o não crescimento vegetal, ou a forma tardia deste, à redução de enzimas antioxidantes, que contribuem para que o desenvolvimento normal aconteça. Assim, relacionando os resultados, uma menor quantidade de CAT levaria a uma taxa mais elevada de H_2O_2 no meio, que afetaria a sensibilidade da SOD e reduziria seu padrão de atividade na célula.

4.4.3 Malondialdeído

Os níveis de MDA determinados demonstraram pouca variação entre os tratamentos, sendo obtidos, em média, 2,6122 nmol de MDA/ g tecido no grupo controle, seguido da pequena variação nos tratamentos com 2,5 mM (2,3555 nmol de MDA/ g tecido) e 10 mM (2,7748 nmol de MDA/ g tecido). Não houve diferença significativa entre os grupos.

Os radicais livres podem reagir com grande parte das moléculas celulares, incluindo os lipídeos de membrana. A peroxidação lipídica ocorre, então, devido a este processo e gera diversos subprodutos, dentre eles o MDA. Estudos anteriores relataram que a exposição ao glifosato elevou a peroxidação lipídica, trazendo claro dano celular ao organismo estudado (Samanta *et al.*, 2014). Em plantas, a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em resposta a condições ambientais adversas é amplamente utilizada como um indicador confiável da produção de radicais livres celulares, sendo o MDA a principal molécula presente, frequentemente empregada em diversos estudos científicos (Samanta *et al.*, 2014).

Esperava-se encontrar diferença significativa neste teste, fosse associada ao desenvolvimento vegetal e a quantidade constitutiva, fosse pela exposição ao estresse durante o processo germinativo. No entanto, tendo em vista a semelhança estatística entre os diferentes tratamentos, sugere-se que a quantidade de TBARS no feijão-de-corda exposto ao glifosato, provavelmente, atingiu apenas os níveis basais produzidos pela planta. Entende-se desta forma ao considerar que os resultados foram analisados em comparação ao grupo controle, o qual não foi exposto a nenhum tipo de estresse, apresentando a taxa natural de MDA. Assim, apesar das pequenas variações, não foi possível notar interferência direta do herbicida neste ensaio.

5 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o glifosato, em diferentes concentrações, provoca uma alteração significativa no processo de germinação das sementes do feijão-de-corda, corroborando com a hipótese de que o herbicida é capaz de afetar organismos não alvo em nível citológico e proteômico. A histologia dos cortes confirmou o atraso no crescimento das plântulas, sendo este observado mais significativamente à medida que a concentração de herbicida testada aumentou. Na análise proteômica, pôde-se observar a alteração no perfil proteico de proteínas, incluindo aquelas responsivas ao estresse e associadas ao desenvolvimento vegetal normal. Por fim, os testes de estresse oxidativo demonstraram alteração nos níveis de CAT E SOD entre os grupos e resultados similares para todos os dados obtidos no teste de MDA.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO (Brasil). **Entenda o que é o glifosato, o agrotóxico mais vendido do mundo**. 2019. Disponível em: <<https://abrasco.org.br/entenda-o-que-e-o-glifosato-o-agrotoxico-mais-vendido-do-mundo/>>. Acesso em: 15 set. 2024.
- AHSAN, Nagib; LEE, Dong-Gi; LEE, Ki-Won; *et al.* Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 1062–1070, 2008.
- ARAÚJO, Isabelle Maria Mendes de ; OLIVEIRA, Ângelo Giuseppe Roncalli da Costa. AGRONEGÓCIO E AGROTÓXICOS: IMPACTOS À SAÚDE DOS TRABALHADORES AGRÍCOLAS NO NORDESTE BRASILEIRO. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117–129, 2016.
- BAI, Shahla Hosseini ; OGBOURNE, Steven M. Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19, p. 18988–19001, 2016.
- BALBUENA, M. S.; TISON, L.; HAHN, M.-L.; *et al.* Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 17, p. 2799–2805, 2015.
- BARANOVA, Ekaterina ; CHRISTOV, Nikolai Kirilov; KURENINA, L. V.; *et al.* Formation of atypical tubulin structures in plant cells as a nonspecific response to abiotic stress. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 6, n. 22, p. 987–992, 2016.
- BATTAGLIN, W.A.; MEYER, M.T.; KUIVILA, K.M.; *et al.* Glyphosate and Its Degradation Product AMPA Occur Frequently and Widely in U.S. Soils, Surface Water, Groundwater, and Precipitation. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 275–290, 2014.
- BEERS, Roland F. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **J Biol chem**, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952, n. 1, 1952.
- BERTONCELLI, Douglas Junior; ALVES, Guilherme Augusto Cito; FURLAN, Felipe Favoretto; *et al.* Efeito do Glifosato no cultivo in vitro de *Cattleya nobile* Rchb. F. **Revista Ceres**, v. 65, n. 2, p. 165–173, 2018.
- BOUKAR, Ousmane; BELKO, Nouhoun; CHAMARTHI, Siva; *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, 2018.
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of protein-dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. Lei nº 14.785, de 23 de Dezembro de 2023.

BRÜHL, Carsten A. ; ZALLER, Johann G. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, 2019.

CHEN, Yongkun; LI, Canhui; ZHANG, Bo; *et al.* The Role of the Late Embryogenesis-Abundant (LEA) Protein Family in Development and the Abiotic Stress Response: A Comprehensive Expression Analysis of Potato (*Solanum Tuberosum*). **Genes**, v. 10, n. 2, p. 148, 2019.

CHIARELLO, Marilda; JIMÉNEZ-MEDINA, María Luisa; MARÍN SAÉZ, Jesús; *et al.* Fast analysis of glufosinate, glyphosate and its main metabolite, aminomethylphosphonic acid, in edible oils, by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 9, p. 1376–1384, 2019.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Nova estimativa para a produção de grãos na safra 2023/2024 está em 297,54 milhões de toneladas**. CONAB. Disponível em:

<<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5579-nova-estimativa-para-a-producao-de-graos-na-safra-2023-2024-esta-em-297-54-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 15 set. 2024.

DEBNATH, Mrittika ; KHAN, Mohidus Samad. Health Concerns of Pesticides. **Pesticide Residue in Foods**, p. 103–118, 2017.

DEVI, Chingakham Basanti; KUSHWAHA, Archana ; KUMAR, Anil. Sprouting characteristics and associated changes in nutritional composition of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6821–6827, 2015.

DUKE, Stephen O. Glyphosate: Uses Other Than in Glyphosate-Resistant Crops, Mode of Action, Degradation in Plants, and Effects on Non-target Plants and Agricultural Microbes. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, p. 1–65, 2020.

ECKL, Peter M. ; BRESGEN, Nikolaus. Genotoxicity of lipid oxidation compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 244–252, 2017.

FAOSTAT. **Pesticides use, pesticides trade and pesticides indicators**. [s.l.]: FAO ;, 2022. Disponível em:

<<https://openknowledge.fao.org/items/fe5e9454-8c11-4f34-9d00-15746cb2054c>>. Acesso em: 15 set. 2024.

FERREIRA, María Florencia; TORRES, Carolina; BRACAMONTE, Enzo; *et al.* Glyphosate affects the susceptibility of non-target native plant species according to their stage of development and degree of exposure in the landscape. **Science of The Total Environment**, v. 865, p. 161091, 2023.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). E. International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. *In*: **FAO**. [s.l.: s.n.], 1985. Disponível em: <<https://www.fao.org/4/x5562E/X5562e0a.htm>>. Acesso em: 15 set. 2024.

FORD, Breanna; BATEMAN, Leslie A.; GUTIERREZ-PALOMINOS, Leilani; *et al.* Mapping Proteome-wide Targets of Glyphosate in Mice. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 2, p. 133–140, 2017.

GASCHLER, Michael M. ; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419–425, 2017.

GEROMANOS, Scott J ; DONGRE, Ashok R. ; OPITECK, Gregory J ; *et al.* Method of analyzing differential expression of proteins in proteomes by mass spectrometry.

GIRAUD, Marie-France; LEONARD, Gordon A.; FIELD, Robert A.; *et al.* RmlC, the third enzyme of dTDP-L-rhamnose pathway, is a new class of epimerase. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 5, p. 398–402, 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802738/>>. Acesso em: 21 ago. 2024.

GOMES, Marco Antonio Ferreira ; BARIZON, Robson Rolland Monticelli. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011**. 1. ed. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2014.

GULEWICZ, Piotr; MARTÍNEZ-VILLALUENGA, Cristina; FRIAS, Juana; *et al.* Effect of germination on the protein fraction composition of different lupin seeds. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 830–844, 2008.

HAHM, Tae-Shik; PARK, Sung-Jin ; MARTIN LO, Y. Effects of germination on chemical composition and functional properties of sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 4, p. 1643–1647, 2009.

HAQ, Saeed ul; KHAN, Abid; ALI, Muhammad; *et al.* Heat Shock Proteins: Dynamic Biomolecules to Counter Plant Biotic and Abiotic Stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 21, p. 5321, 2019.

HENDERSON, A. M.; GERVAIS, J. A.; LUUKINEN, B.; *et al.* Glyphosate Technical Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, 2010.

HERBERT, Lucila T; VÁZQUEZ, Diego E; ARENAS, Andrés; *et al.* Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. **The Journal of experimental biology**, v. 217, n. Pt 19, p. 3457–64, 2014.

HÉRITIER, Laurent; DUVAL, David; GALINIER, Richard; *et al.* Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 12, p. 3343–3350, 2017.

HRYCAY, Eugene G. ; BANDIERA, Stelvio M. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. **Advances in Pharmacology**, v. 74, p. 35–84, 2015.

IARC. **Some Organophosphate Insecticides and Herbicides**. [s.l.]: International Agency for Research on Cancer, 2017. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/549>>. Acesso em: 15 set. 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da Produção Agrícola. 2017. Disponível em:
<https://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_a_%5Bmensal%5D/Fasciculo_Indicadores_IBGE/2017/estProdAgr_201710.pdf>.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Ibama. Disponível em:
<<https://www.gov.br/ibama/pt-br/assuntos/quimicos-e-biologicos/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 15 set. 2024.

KATOCH, Rajan ; TRIPATHI, Ankur. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, v. 46, n. 4, 2021.

LONARDI, Stefano; MUÑOZ-AMATRIÁIN, María; LIANG, Qihua; *et al.* The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **The Plant Journal**, v. 98, n. 5, p. 767–782, 2019.

LONČARIĆ, Melita; STRELEC, Ivica; MOSLAVAC, Tihomir; *et al.* Lipoxygenase Inhibition by Plant Extracts. **Biomolecules**, v. 11, n. 2, p. 152, 2021.

LYKOGIANNI, Maira; BEMPELOU, Eleftheria; KARAMAOUNA, Filitsa; *et al.* Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. **Science of The Total Environment**, v. 795, p. 148625, 2021.

MAGAREY, Roger D; KLAMMER, Sarah SH; CHAPPELL, Thomas M; *et al.* Eco-efficiency as a strategy for optimizing the sustainability of pest management. **Pest Management Science**, v. 75, n. 12, p. 3129–3134, 2019.

MAGGI, Federico; LA CECILIA, Daniele; TANG, Fiona H.M.; *et al.* The global environmental hazard of glyphosate use. **Science of The Total Environment**, v. 717, p. 137167, 2020.

MAO, Yuwei; CATHERALL, Ella; DÍAZ-RAMOS, Aranzazú; *et al.* The small subunit of Rubisco and its potential as an engineering target. **Journal of Experimental Botany**, v. 74, n. 2, p. 543–561, 2022.

MBEUNKUI, Flaubert ; GOSHE, Michael B. Investigation of solubilization and digestion methods for microsomal membrane proteome analysis using data-independent LC-MSE. **PROTEOMICS**, v. 11, n. 5, p. 898–911, 2011.

MCDUGALL, Phillips. **Evolution of the Crop Protection Industry since 1960**. [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em:
<<https://croplife.org/wp-content/uploads/2018/11/Phillips-McDougall-Evolution-of-the-Crop-Protection-Industry-since-1960-FINAL.pdf>>.

MHAMDI, Amna; QUEVAL, Guillaume; CHAOUCH, Sejir; *et al.* Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–4220, 2010.

MURUSSI, Camila R.; COSTA, Maiara D.; LEITEMPERGER, Jossiele W.; *et al.* Exposure to different glyphosate formulations on the oxidative and histological status of *Rhamdia quelen*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 445–455, 2015.

NEWMAN, Molli M.; HOILETT, Nigel; LORENZ, Nicola; *et al.* Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. **Science of The Total Environment**, v. 543, p. 155–160, 2016.

NISHIMOTO, Ray. Global trends in the crop protection industry. **Journal of Pesticide Science**, v. 44, n. 3, p. 141–147, 2019.

OLIVEIRA, Régis de Campos ; BOAS, Lucas Kortz Vilas ; BRANCO, Ciro Cesar Zanini. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpavar.wrightii*(Charophyceae). **Phycologia**, v. 55, n. 5, p. 577–584, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) ; ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Global situation of pesticide management in agriculture and public health**. [s.l.: s.n.], 2019. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=tGe_DwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR3&ots=MCvhmVZubN&sig=tF3R8XuPhP58piw3Rwjel9ld64Q&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 15 set. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) ; ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO). **Pesticide Residues in Food - 2005**. [s.l.: s.n.], 2005. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=AX6zDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR6&ots=ZXvgxqg415&sig=4t5frjztYenuKnPU0nmhPdczbE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 15 set. 2024.

PAZ, Juliana Vieira; REZENDE, Vanessa; GAMEIRO, Augusto; *et al.* **Agrotóxicos no Brasil: entre a produção e a segurança alimentar**. *Jornal da USP*. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/artigos/agrotoxicos-no-brasil-entre-a-producao-e-a-seguranca-alimentar/#:~:text=Em%202021%2C%20o%20consumo%20atingiu>>. Acesso em: 15 set. 2024.

PHILLIPS, Dom. **Toxic garbage will be sold here’: Outcry as Brazil moves to loosen pesticide laws**. [s.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <<https://www.theguardian.com/world/2018/jun/26/toxic-garbage-will-be-sold-here-outcry-as-brazil-moves-to-loosen-pesticide-laws>>. Acesso em: 15 set. 2024.

RAJENDRAN, Peramaiyan; NANDAKUMAR, Natarajan; RENGARAJAN, Thamaraiselvan; *et al.* Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

REDDY, Krishna N.; RIMANDO, Agnes M. ; DUKE, Stephen O. Aminomethylphosphonic Acid, a Metabolite of Glyphosate, Causes Injury in Glyphosate-Treated, Glyphosate-Resistant Soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5139–5143, 2004.

RICHMOND, Martha E. Glyphosate: A review of its global use, environmental impact, and potential health effects on humans and other species. **Journal of Environmental Studies and Sciences**, v. 8, n. 4, p. 416–434, 2018.

RIGOTTO, Raquel Maria; VASCONCELOS, Dayse Paixão e ; ROCHA, Mayara Melo. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, 2014.

RODRIGUES, Fabrício Ávila; DEBONA, Daniel; RIOS, Jonas Alberto; *et al.* Biochemical Changes in the Leaves of Wheat Plants Infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v. 102, n. 12, p. 1121–1129, 2012.

SAMANTA, Palas; PAL, Sandipan; MUKHERJEE, Alope Kumar; *et al.* Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 107, p. 120–125, 2014.

SANCHÍS, Josep; KANTIANI, Lina; LLORCA, Marta; *et al.* Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 7, p. 2335–2345, 2011.

SANTADINO, Marina; COVIELLA, Carlos ; MOMO, Fernando. Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 225, n. 12, 2014.

SANTOS, M. J. G.; FERREIRA, M. F. L.; CACHADA, A.; *et al.* Pesticide application to agricultural fields: effects on the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 8, p. 2113–2122, 2012.

SARKAR, Swagata; GIL, Juliana; KEELEY, James; *et al.* **The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food**. [s.l.: s.n.], 2021.

SCHENKLUHN, Leif; HOHNJEC, Natalija ; NIEHAUS, Karsten; *et al.* Differential gel electrophoresis (DIGE) to quantitatively monitor early symbiosis- and pathogenesis-induced changes of the *Medicago truncatula* root proteome. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 4, p. 753–768, 2010.

SERRA, Anne-Antonella; NUTTENS, Andréina; LARVOR, Vanessa; *et al.* Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 10, p. 2753–2766, 2013.

SHACKIRA, A. M.; SARATH, Nair G.; ASWATHI, K. P. Raj; *et al.* Green seed photosynthesis: What is it? What do we know about it? Where to go? **Plant Physiology Reports**, v. 27, n. 4, p. 573–579, 2022.

SHARMA, Iti ; AHMAD, Parvaiz. Catalase. *In*: AHMAD, Parvaiz (Org.). **Oxidative Damage to Plants**. [s.l.]: Elsevier Inc. , 2014, p. 131–148.

SILVA, Célia Maria Maganhotto de Souza ; FAY, Elisabeth Francisconi. **Agrotóxico e ambiente**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004.

SINGH, Ritu ; KUMAR, Sanjeev (Orgs.). **Green Technologies and Environmental Sustainability**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

SINGH, Simranjeet; KUMAR, Vijay; DATTA, Shivika; *et al.* Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring, toxicity and degradation: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 663–702, 2020.

SINGH, Simranjeet; KUMAR, Vijay; GILL, Jatinder Pal Kaur; *et al.* Herbicide Glyphosate: Toxicity and Microbial Degradation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 20, p. 7519, 2020.

TOPPING, C. J.; ALDRICH, A. ; BERNY, P. Overhaul environmental risk assessment for pesticides. **Science**, v. 367, n. 6476, p. 360–363, 2020.

TUDI, MUYESAIER; DANIEL RUAN, Huada; WANG, Li; *et al.* Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7908628/>>.

VERECKEN, Harry. Mobility and leaching of glyphosate: a review. **Pest Management Science**, v. 61, n. 12, p. 1139–1151, 2005.

VIVANCOS, Pedro Diaz; DRISCOLL, Simon P.; BULMAN, Christopher A.; *et al.* Perturbations of Amino Acid Metabolism Associated with Glyphosate-Dependent Inhibition of Shikimic Acid Metabolism Affect Cellular Redox Homeostasis and Alter the Abundance of Proteins Involved in Photosynthesis and Photorespiration. **Plant Physiology**, v. 157, n. 1, p. 256–268, 2011.

WANG, Siyi; WANG, Kunmei; XIA, Qi; *et al.* Genome-Wide Identification and Multi-Stress Response Analysis of the DABB-Type Protein-Encoding Genes in Brassica napus. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 11, p. 5721–5721, 2024.

WILLIAMS, Gary M.; KROES, Robert ; MUNRO, Ian C. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117–165, 2000.

ZIKANKUBA, Vumilia Lwoga; MWANYIKA, Gaspary; NTWENYA, Julius Edward; *et al.* Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. **Cogent Food & Agriculture**, v. 5, n. 1, 2019.