



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**LEVI ARAÚJO PINTO**

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS INDUZIDAS  
POR GLIFOSATO EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp**

**FORTALEZA  
2025**

LEVI ARAÚJO PINTO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS INDUZIDAS  
POR GLIFOSATO EM *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Biotecnologia do  
Centro de ciências da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes  
Daloso.

FORTALEZA

2025

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)

---

A69a Araújo Pinto, Levi.  
Alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas induzidas por glifosato em *Vigna unguiculata* (L.) Walp / Levi Araújo Pinto. – 2025.  
45 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.

1. Glifosato. 2. Feijão-caupi. 3. Morfologia. 4. Fisiologia. 5. Metabolismo. I. Título.

CDD 661

---

LEVI ARAÚJO PINTO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E METABÓLICAS INDUZIDAS  
POR GLIFOSATO EM *Vigna unguiculata L. Walp.*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Biotecnologia do  
Centro de ciências da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do  
grau de Bacharelado em Biotecnologia.

Aprovada em: 21/07/2025

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Eva Gomes Morais  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ma. Isabelle Mary Costa Pereira  
Universidade Estadual do Ceará (UFC)

À Deus e minha avó que me iluminam do céu.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro à realização desse trabalho.

À minha mãe, Rejane, que dedicou a vida para me educar e que sempre acreditou em mim. Minha trajetória até aqui, sem seu apoio, seria impossível.

À minha sobrinha Samantha, meu gatinho Nick e meu doguinho Billy, meus xodós. À minha cachorrinha Nina, que estará sempre no meu coração.

Ao Laboratório de metabolismo de plantas (LabPlant), pela estrutura necessária para realizar este trabalho.

À família LabPlant, em especial o Prof. Danilo, pela orientação e por ter me acolhido no laboratório juntamente com o Prof. Albenísio. Katharine, Matheus, Carolina, Bruno, Fabio, Jônatas, Daiane, Magna, Vitória, Janaína, Paulo e Patrick, vocês são como uma família para mim. Amo todos vocês, cada um do seu jeitinho. Espero continuar compartilhando ótimos momentos com vocês.

Ao meu amigo e parceiro de laboratório Samuel, que me ajudou em vários experimentos desde quando entrei no laboratório e por sempre deixar o ambiente mais leve.

Aos membros da banca avaliadora. Muito obrigado Eva e Isabelle por todo apoio, pelos ensinamentos e por compartilhar bons momentos ao longo dessa trajetória.

Aos meus amigos: Arlene, Axel, Bia, Carol, Carol Carvalho, Debora, Duda, Gabice, Guilherme, Ianah, Júlia, Laryssa, Luan, Pedro, Samuel, Thiago, Vit e Yandra. Com vocês, vivi os momentos mais lindos da minha vida até aqui e espero que nossa amizade continue por muito tempo. Obrigado por todo apoio, amo vocês pra sempre.

## RESUMO

O glifosato (N-(fosfonometil)glicina) é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura mundial. Ele atua de forma sistêmica na planta, inibindo a enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase, uma enzima importante na via do ácido shikímico. Sabe-se que a ação do glifosato bloqueia a síntese de aminoácidos aromáticos e de metabólitos secundários, importantes para a defesa das plantas. No entanto, pouco se sabe como outras rotas metabólicas são afetadas por este herbicida. Ademais, culturas não transgênicas e, portanto, não resistentes ao glifosato, como o feijão-caupi, podem ser expostas accidentalmente a este herbicida, principalmente por deriva de pulverização. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos da exposição ao glifosato em parâmetros morfológicos, fisiológicos, e metabólicos do feijão-caupi. Para isso, três experimentos foram conduzidos, sendo o primeiro com diferentes dosagens de glifosato (0,0; 62,5; 125; 250; 500; e 1000 mg L<sup>-1</sup>) para avaliação de estresse oxidativo e perfil metabólico. Os resultados demonstraram que apenas doses acima de 125 mg L<sup>-1</sup> induziram estresse oxidativo, evidenciados pelo aumento da concentração de malondialdeído (MDA). A partir deste experimento, outros dois foram realizados com a dosagem de 125 mg L<sup>-1</sup> de glifosato, em que análises de perfil metabólico, estresse oxidativo, morfologia e fisiologia das plantas foram realizadas. A aplicação de 125 mg L<sup>-1</sup> de glifosato praticamente não afetou as trocas gasosas e o aparato fotoquímico, mesmo com diferenças pontuais em Y(NA) e ETR(I). No entanto, após 7 dias da aplicação, plantas expostas ao glifosato apresentaram menor acúmulo de a biomassa seca. No metabolismo, ao analisar diferentes concentrações do herbicida, foi possível verificar uma alteração significativa em metabólitos como malato, citrato, glicerato e glutamato, sugerindo que o glifosato altera metabólitos associados com a fotorrespiração e aos ciclos do ácido cítrico (TCA) e glutamina sintetase – glutamato sintase (GS-GOGAT). Sob a dose de 125 mg L<sup>-1</sup>, foi observado acúmulo de shikimato e ureia, juntamente com alterações de aminoácidos e carboidratos. Além de confirmar que o glifosato altera a via do ácido shikímico, nossos resultados revelam que a aplicação deste herbicida também altera o nível de metabólitos dos metabolismos do carbono e nitrogênio, possivelmente como um efeito secundário e/ou uma ação direta do herbicida sobre enzimas dos ciclos TCA e/ou GS-GOGAT.

**Palavras-chave:** glifosato; feijão-caupi; morfologia; fisiologia; metabolismo.

## ABSTRACT

Glyphosate (N-(phosphonomethyl)glycine) is one of the most widely used herbicides in agriculture worldwide. It acts systemically in the plant, inhibiting the enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, an important enzyme in the shikimate pathway. It is known that glyphosate blocks the synthesis of aromatic amino acids and secondary metabolites, which are important for plant defense. However, little is known about how other metabolic pathways are affected by this herbicide. In addition, non-transgenic crops that are not resistant to glyphosate, such as cowpeas, may be accidentally exposed to this herbicide, mainly through spray drift. In this sense, this study aimed to analyze the effects of glyphosate exposure on morphological, physiological, and metabolic parameters of cowpeas. To this end, three experiments were conducted, the first with different doses of glyphosate (0.0, 62.5, 125, 250, 500, and 1000 mg L<sup>-1</sup>) to assess oxidative stress and metabolic profile. The results showed that only doses above 125 mg L<sup>-1</sup> induced oxidative stress, evidenced by an increase in malondialdehyde (MDA) concentration. Based on this experiment, two others were conducted with a dosage of 125 mg L<sup>-1</sup> of glyphosate, in which analyses of metabolic profile, oxidative stress, morphology, and physiology of the plants were performed. The application of 125 mg L<sup>-1</sup> of glyphosate had virtually no effect on gas exchange and the photochemical apparatus, even with occasional differences in Y(NA) and ETR(I). However, 7 days after application, plants exposed to glyphosate showed lower dry biomass accumulation. In metabolism, when analyzing different concentrations of the herbicide, it was possible to verify a significant change in metabolites such as malate, citrate, glycerate, and glutamate, suggesting that glyphosate alters metabolites associated with photorespiration and the citric acid (TCA) and glutamine synthetase-glutamate synthase (GS-GOGAT) cycles. At a dose of 125 mg L<sup>-1</sup>, accumulation of shikimate and urea was observed, along with changes in amino acids and carbohydrates. In addition to confirming that glyphosate alters the shikimic acid pathway, our results reveal that the application of this herbicide also alters the level of metabolites in carbon and nitrogen metabolism, possibly as a secondary effect and/or a direct action of the herbicide on enzymes in the TCA and/or GS-GOGAT cycles.

**Keywords:** glyphosate; cowpea; morphology; physiology; metabolism.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	10
2	<b>HIPÓTESE .....</b>	12
3	<b>OBJETIVOS .....</b>	13
3.1	<b>Objetivo geral .....</b>	13
3.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	13
4	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	14
4.1	<b>Material vegetal e condições de crescimento .....</b>	14
4.2	<b>Tratamentos e design experimental .....</b>	14
4.3	<b>Análise do perfil metabólicos .....</b>	15
4.4	<b>Análise das trocas gasosas .....</b>	17
4.5	<b>Análise da fluorescência da clorofila <i>a</i> .....</b>	17
4.6	<b>Determinação do estresse oxidativo .....</b>	17
4.7	<b>Avaliação do parâmetro de crescimento .....</b>	18
4.8	<b>Análise estatística .....</b>	19
5	<b>RESULTADOS .....</b>	19
5.1	<b>Alterações no fenótipo e no estresse oxidativo .....</b>	19
5.2	<b>Alterações metabólicas induzidas por diferentes doses de glifosato .....</b>	21
5.3	<b>Efeito de dose moderada sobre o estresse oxidativo e perfil metabólico ....</b>	27
5.4	<b>Efeito de dose moderada na fotossíntese e no crescimento.....</b>	32
6	<b>DISCUSSÃO .....</b>	38
7	<b>CONCLUSÃO .....</b>	42
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	43

## 1 INTRODUÇÃO

O feijão é uma das leguminosas mais cultivadas no mundo. Segundo dados da Organização Mundial das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), o feijão é produzido em mais de 100 países, sendo o Brasil o segundo maior produtor com uma produção média de aproximadamente 3 milhões de toneladas por ano e produtividade de 1.1 toneladas por hectare (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2025). Dentre as espécies de feijão cultivadas no Brasil, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata L. Walp.*), conhecido popularmente como feijão-de-corda, tem grande relevância para a agricultura do Nordeste. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), fornecidas pelo Instituto Brasileiro de Feijão e Pulses (IBRAFE, 2022), o feijão-caupi é o segundo mais expressivo em termos de produção, sendo mais produzido na região nordeste, que corresponde a 75% da produção nacional. Essa espécie possui ampla importância socioeconômica, especialmente em regiões semiáridas e tropicais do mundo, além de ser uma das principais fontes de proteína vegetal (Freire Filho *et al.*, 2011). Adaptado às condições tropicais, a cultura se destaca por sua boa adaptação a solos pobres, resistência a altas temperaturas e a regiões que sofrem de escassez hídrica, tornando-a essencial para a segurança alimentar em áreas de vulnerabilidade social e de agricultura familiar (Júnior *et al.*, 2017). O manejo de plantas daninhas continua sendo um dos maiores desafios no sistema produtivo agrícola. Neste sentido, o uso de herbicidas se mostra como uma alternativa eficaz para mitigar esse problema na agricultura moderna. Porém, o uso indiscriminado ou mal realizado de herbicidas pode afetar plantas não resistentes (como o feijão-caupi) e a estabilidade do meio ambiente.

Dentre os tipos de herbicidas mais usados no mundo está o glifosato [N-(fosfonometil) glicina], uma substância de ação sistêmica que, ao ser absorvida pelas partes verdes da planta, folhas e caule, é transferida via floema para as raízes (Pérez *et al.*, 2011). O glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), importante para a via do ácido shikímico, uma rota metabólica essencial para a produção de compostos aromáticos como fenilalanina, tirosina e triptofano. A aplicação de glifosato leva a um acúmulo de shikimato e a interrupção da produção de proteínas essenciais para a manutenção do crescimento da planta e de precursores de metabólitos secundários como pigmentos, flavonóides, auxinas, fitoalexinas e lignina (Duke & Powles, 2008). Além de bloquear a via do shikimato, o glifosato pode comprometer outros processos em plantas sensíveis como a absorção de nutrientes, diminuição da eficiência fotossintética e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo levar à danificação de lipídios, proteínas e

DNA, levando à morte celular (Gomes *et al.*, 2014). Tomados em conjunto, esses efeitos levam à morte da planta, sob ação de altas doses de glifosato.

A ampla adoção do glifosato se dá por sua fácil aplicação, eficiência e baixo custo. No entanto, seu uso contínuo tem gerado muitas preocupações sobre possíveis efeitos fitotóxicos no meio ambiente, sobretudo em culturas não-alvo, ou seja, não modificadas geneticamente para resistir ao estresse causado pelo herbicida (Boutin *et al.*, 2014). Ademais, um estudo recente ressalta que a toxicidade do glifosato sobre organismos aquáticos pode ser aumentada quando aplicado em conjunto com outros agrotóxicos (Maia *et al.*, 2025). Efeitos deletérios na microbiota intestinal de insetos, em especial de abelhas, já foram relatados (Motta *et al.*, 2018). Os relatos sobre a toxicidade em humanos ainda são controversos. Em 2015, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou o glifosato como provavelmente cancerígena em humanos com base em testes em animais. No ano seguinte, a Organização Mundial da Saúde (OMS) descartou a toxicidade em animais, mas não excluiu a possibilidade de carcinogênese quanto a exposição em doses altas (Tarazona *et al.*, 2017). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), reavaliou o glifosato como não cancerígeno, mas alerta quanto ao uso de proteção individual pelos trabalhadores e o risco de deriva de aplicação.

Estudos que envolvem os efeitos do glifosato em doses baixas têm ganhado grande relevância científica, devido ser uma situação recorrente no campo, como é o caso da deriva de pulverização, sendo uma das principais causas da exposição ao herbicida em plantas não-alvo. Esse evento acontece quando gotículas do glifosato são transportadas pelo vento de uma região alvo da aplicação até áreas vizinhas contendo culturas não-alvo (Cederlund, H., 2017). O feijão-caupi, por não ser uma cultura transgênica e, portanto, não resistente ao glifosato, torna-se bastante vulnerável quando exposto não intencionalmente, o que pode implicar efeitos deletérios na cultura, impactando na sua produtividade. Torna-se importante, portanto, entender quais os efeitos de diferentes doses deste herbicida no cultivo do feijão-caupi.

Embora o glifosato seja um agroquímico relativamente bem estudado, os danos causados a níveis fisiológicos e metabólicos em plantas sensíveis, em especial o feijão-caupi, ainda não são totalmente compreendidos, sobretudo no que concerne os efeitos derivados de doses baixas do glifosato na morfologia, fisiologia e no metabolismo da planta. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos do glifosato no crescimento, fisiologia e no metabolismo do feijão-caupi. Para tal, foram realizadas análises de parâmetros de estresse oxidativo, trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, perfil metabólico e de crescimento.

## **2 HIPÓTESE**

A sensibilidade do feijão-caupi ao glifosato está associada à incapacidade da planta em ativar rotas metabólicas foliares de defesa ao estresse.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Analisar os efeitos do glifosato no crescimento, fisiologia e metabolismo do feijão-caupi.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de glifosato no metabolismo do feijão-caupi;
- Quantificar o estresse oxidativo induzido pelo glifosato através da determinação de malondialdeído (MDA);
- Mensurar o impacto do glifosato na fotossíntese por meio das análises de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*;
- Avaliar os impactos do glifosato no crescimento do feijão-caupi;
- Identificar metabólitos e rotas metabólicas alteradas pela aplicação de glifosato.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de *V. unguiculata* (L.) Walp., do genótipo pitiúba, foram desinfetadas pela adição de hipoclorito de sódio 0,2% e mantidas com agitação por 5 minutos, logo após enxaguadas com água destilada. Após a sanitização, as sementes foram distribuídas em duas folhas de papel filtro (280 x 380 mm, germitest), previamente umedecidas com água destilada, na proporção de 2 vezes em relação à massa do papel e ao final coberto com outra folha também previamente umedecida formando assim um rolo. Os rolos foram cobertos com sacos plásticos, previamente desinfestados com 70% etanol (v/v) e colocados em câmara de crescimento em posição vertical, onde permaneceram incubados por um período de 5 dias a 27 °C, sob fotoperíodo de 12 h e densidade de fluxo de fôtons fotossintéticos (PPFD) de 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Após germinadas, as plantas jovens foram transferidas para vasos plásticos de 6 L contendo areia e vermiculita (1:1), aclimatando-as com solução de Hoagland e Arnon's (Hoagland; Arnon's, 1950) 1/4 da força e posteriores irrigações com metade da força. As plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação com luz solar natural (300-650  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), com temperatura diária variando de 27 a 31,0 °C e 79,8 ± 10,9% de umidade relativa média. As irrigações foram feitas a cada 2 dias.

### 4.2 Tratamentos e design experimental

Foram realizados três experimentos, os dois primeiros voltados para análise de perfil metabólico e análise de estresse oxidativo, e o terceiro para avaliação de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e biomassa seca de *V. unguiculata*. O primeiro experimento foi inteiramente casualizado (DIC), com apenas um fator (concentração do herbicida) em 6 diferentes níveis: 0,0; 62,5; 125; 250; 500 e 1000 mg L<sup>-1</sup> de glifosato comercial na forma líquida concentrada e solúvel contendo sal de isopropilamina 480 g L<sup>-1</sup>, o equivalente a 360 g L<sup>-1</sup> de N-(fosfonometil) glicina (Tabela 1). Esse experimento totalizou 24 plantas, sendo 4 repetições por tratamento. A coleta foi realizada 4 dias após a aplicação do glifosato. A partir deste experimento, outros dois foram realizados com a dose de 125 mg L<sup>-1</sup>, que se mostrou uma dose não-letal e que gerou estresse oxidativo moderado nas plantas.

O segundo experimento foi realizado em arranjo fatorial 2x3: 2 níveis de concentração de glifosato (0,0 e 125 mg L<sup>-1</sup>) e 3 tempos de coleta (1, 2 e 3 dias após a aplicação), com 4 repetições por combinação, 8 plantas coletadas em cada tempo, totalizando 24 plantas. O terceiro experimento dispôs de 36 plantas, 4 delas foram coletadas no mesmo dia antes da aplicação do herbicida, representando o tempo 0. As demais foram delineadas em fatorial 2x4: 4 tempos de coleta (1, 2, 3 e 7 dias após a aplicação) e 2 níveis de concentração (0,0 e 125 mg L<sup>-1</sup>). Em todos experimentos, o glifosato foi aplicado em plantas no estágio V3 por meio de borrifamento foliar, com um volume de 5 mL da solução diluída do herbicida por planta, garantindo a cobertura uniforme das folhas.

Tabela 1 – Preparação das concentrações de glifosato adotadas nos experimentos.

<b>Concentração final (mg/L)</b>	<b>Volume de glifosato (mL)</b>	<b>Volume de água (mL)</b>
0	0	1000
62,5	0,1302	999,8698
125	0,2604	999,7396
250	0,5208	999,4792
500	1,0417	998,9583
1000	2,0833	997,9167

Fonte: elaborada pelo autor

#### 4.3 Análise do perfil metabólico

A análise do perfil metabólico foi realizada via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) exatamente como descritos por LISEC *et al.*, (2006). Após a coleta do primeiro trifolíolo completamente expandido de *V. unguiculata*, o material foi congelado e macerado com auxílio de nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>) até a obtenção de um pó fino. Em seguida, alíquotas de 50 mg foram pesadas e separadas em tubos de 2 mL e mantidas sob congelamento por N<sub>2</sub>. Para a extração de metabólitos, foram adicionados 700 µL de metanol 100% e 30 µL da solução estoque de ribitol 0,2 mg mL<sup>-1</sup> (usado como padrão interno na análise) diluído em água ultrapura (MilliQ®), aos tubos contendo o material vegetal e

posteriormente homogeneizados em vórtex. As amostras foram colocadas sob agitação por 15 minutos a 70 °C, com uma rotação de 350 rpm. Em seguida, foram centrifugadas a 11000 rcf por 10 minutos à 27 °C. Foram transferidos 500 µL do sobrenadante para um novo microtubo de 2 mL, onde foram adicionados 375 µL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e 750 µL de água ultrapura, com homogeneizações intercaladas em vórtex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas a 10000 rcf por 15 min a 4 °C. Foram aliquotados 150 µL do sobrenadante presente no microtubo, correspondente a fase polar, para a realização da corrida em GC-MS. As alíquotas foram, por fim, transferidas para secagem overnight no *speed vaccum*.

Para o procedimento de derivatização, antes da injeção na cromatografia gasosa, adicionou-se 20 µL de uma solução de cloridrato de metoxiamina em piridina (20 mg mL<sup>-1</sup>), às amostras. Logo após, elas passaram por uma homogeneização em vórtex. Os microtubos então foram incubados à 37 °C por 2 horas, com agitação constante a 400 rcf, seguido de uma rápida centrifugação (*spin down*). Depois disso, foram adicionados 35 µL de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA mix), seguido de incubação a 37 °C por 30 minutos, agitando novamente a 400 rcf e um novo *spin down*. Alíquotas de 50 µL foram transferidas para *vials* para injeção em GC-MS (modelo QP2010 Shimadzu, Tóquio, Japão) a fim de separar e detectar os metabólitos. 1 µL de uma amostra derivatizada foi injetada no modo split (1:5) e vazão de gás hélio de 1.2 mL min<sup>-1</sup> em uma coluna capilar RTX-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek, Bellefonte, EUA) com uma temperatura de injeção de 230°C e de 250 °C. Inicialmente, os parâmetros da corrida foram programados com uma temperatura de 80 °C por 5 minutos, depois aumentada em 10 °C por minuto, gradualmente, até 315 °C e mantido por 8 min. Após a ionização e fragmentação por elétrons (EI) a 70 eV (elétron-volts), os metabólitos passaram por um analisador do tipo quadrupolo operando em modo *full scan* entre 40 e 700 m/z. Os dados gerados foram exportados para posterior visualização de cromatogramas no programa Xcalibur™ 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os metabólitos foram identificados a partir dos tempos de retenção e do padrão de fragmentação utilizando a biblioteca de espectro de massas da Golm Metabolome Database (<http://gmd.mpimp-golm.mpg.de/>) (Kopka *et al.*, 2005). Foi realizada uma quantificação relativa dos metabólitos com base na área do pico correspondente ao fragmento detectado e a área do pico do fragmento do ribitol (padrão interno). Os valores foram normalizados a partir da subtração dos valores da amostra branco, multiplicado pela massa fresca da amostra que foi pesada antes do preparo e dividido pelos valores de ribitol. Para a análise estatística, foi utilizada a plataforma MetaboAnalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>) (Pang *et al.*, 2024).

#### **4.4 Análise das trocas gasosas**

As trocas gasosas entre a folha e o ambiente foram realizadas em folhas centrais completamente expandidas do primeiro trifolíolo. Essas análises foram realizadas usando um analisador de gás por infravermelho (IRGA) portátil, modelo GFS-3000 (Heinz Walz, Alemanha). Foram mensurados os parâmetros de taxa de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), taxa de transpiração (*E*), concentração interna de CO<sub>2</sub> (*C<sub>i</sub>*), condutância estomática ao vapor d'água (*g<sub>s</sub>*), eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), calculada pela razão *A/g<sub>s</sub>*, e eficiência da carboxilação (EiC), obtida pela razão *A/C<sub>i</sub>*, todas realizadas entre 9:00 e 11:00 da manhã. Durante as medições, o equipamento foi ajustado com fluxo de ar de 750 µmol s<sup>-1</sup>, concentração de CO<sub>2</sub> de 420 ppm, intensidade luminosa de 1000 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, temperatura interna de 25 ± 2 °C e umidade relativa de aproximadamente de 50 ± 5%.

#### **4.5 Análise da fluorescência da clorofila *a***

Como forma de avaliar os efeitos do glifosato sobre a atividade fotoquímica da planta, realizamos análise de fluorescência da clorofila *a* utilizando um fluorômetro DUAL-PAM-100 (Walz, Alemanha), que permite a análise simultânea dos fotossistemas I e II (PSI e PSII). Para isso, folhas completamente expandidas do primeiro trifolíolo foram previamente submetidas ao escuro por 30 minutos e, logo em seguida, foram expostas a um pulso de luz. As medições foram realizadas em 4 plantas por grupo (controle e glifosato 125 mg L<sup>-1</sup>) em cada tempo de coleta (1, 2, 3 e 7 dias). Os parâmetros avaliados foram: Fv/Fm - eficiência máxima do PSII; Y(I) - rendimento quântico do PSI; Y(II) - rendimento quântico efetivo do PSII; ETR(I) - taxa de transporte de elétrons do PSI; ETR(II) - taxa de transporte de elétrons no PSII; Y(NPQ) - rendimento quântico da dissipação regulada de energia no PSII ; Y(NA) - rendimento quântico da limitação no lado acceptor do PSI; Y(NO) - rendimento quântico da dissipação não regulada da energia no PSII; Y(ND) - rendimento quântico da limitação no lado doador do PSI e NPQ - extinção não fotoquímica.

#### **4.6 Determinação do estresse oxidativo**

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), usando um protocolo adaptado de Heath e Packer (1968). Durante o estresse oxidativo, os lipídios poli-insaturados, presentes nas membranas celulares, sofrem oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROs), incluindo os radicais livres, caracterizados por elétrons desemparelhados, formando peróxidos lipídicos e subprodutos como o MDA. O ensaio de TBARS detecta o MDA por meio da reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), gerando um composto de coloração avermelhada onde a intensidade dessa cor, medida por espectrofotometria, permite quantificar o nível de peroxidação lipídica, sendo um indicativo importante do estresse oxidativo na amostra.

Para esse procedimento, foram necessárias duas soluções: solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% e uma solução composta de TBA 0.5% em TCA 20%, obtida por uma mistura de 0.5g de TBA e 20g de TCA, completando para um volume de 100 mL de solução. Para a extração, foram utilizados 200 mg de massa fresca de folhas de *V. unguiculata*, maceradas em N<sub>2</sub>. Em seguida foram adicionados 1.5 mL de TCA 5%. O extrato foi recolhido e armazenado em microtubos para centrifugação a 12000 g por 20 minutos a 4 °C. Posteriormente 500µL do sobrenadante foi recolhido e transferido para tubos de ensaio, junto com 2 mL de TBA. Para o ensaio em branco foram usados 500µL de TCA 5% + 2 mL de TBA. Os tubos foram tampados e submetidos a banho maria por 1 hora a 100 °C. Logo após, os tubos passaram por banho de gelo até esfriar. Ao fim foi realizada uma nova centrifugação a 10000 g por 5 minutos.

As amostras foram lidas em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda: 532 e 660 nm. Para o cálculo, os valores da absorbância de 660 nm foram subtraídas de 532 nm, logo após dividiu-se o valor pelo coeficiente de extinção molar TBA-MDA (155  $\text{mM} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (valores em TBA-MDA/L). Em seguida os valores obtidos foram divididos por 1000, para obtenção do valor em mL e depois dividido pela quantidade de massa fresca (g) usada na extração (dados em mmol TBA-MDA/g<sup>-1</sup> MF). Por fim, o resultado obtido foi multiplicado por 1.000.000 para que os dados estejam expressos em nmol TBA-MDA/ g<sup>-1</sup> MF.

#### 4.7 Avaliação do parâmetro de crescimento

O material vegetal coletado foi coletado, separado em caule, folhas completamente expandidas e raízes e seco em estufa a 80°C até atingir peso constante. Após 3 dias, o peso seco

de caule, folhas completamente expandidas e das raízes foi determinado usando balança analítica.

#### **4.8 Análise estatística**

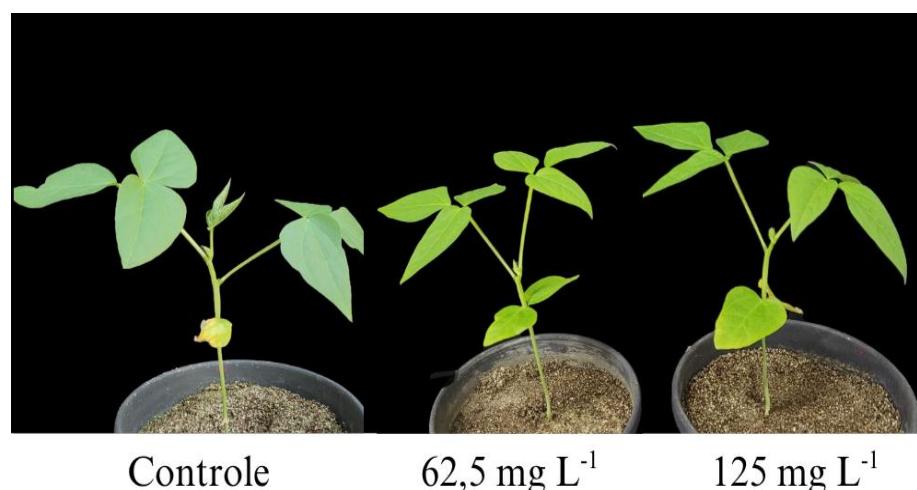
Para representação estatística, os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as médias dos grupos foram comparadas usando teste de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) usando o software R (versão 4.5.1). Os gráficos foram produzidos nos softwares SigmaPlot (versão 15.0) ou OriginPro (2018). Para os dados de perfil metabólico, foram realizadas análises multivariadas (PCA – *principal component analysis*) e box plots usando a plataforma Metaboanalyst 6.0 (Pang *et al.*, 2024). A PCA se baseia na Análise de Variância Multivariada Permutacional (PERMANOVA), um teste usado para avaliar a separação entre os grupos experimentais.

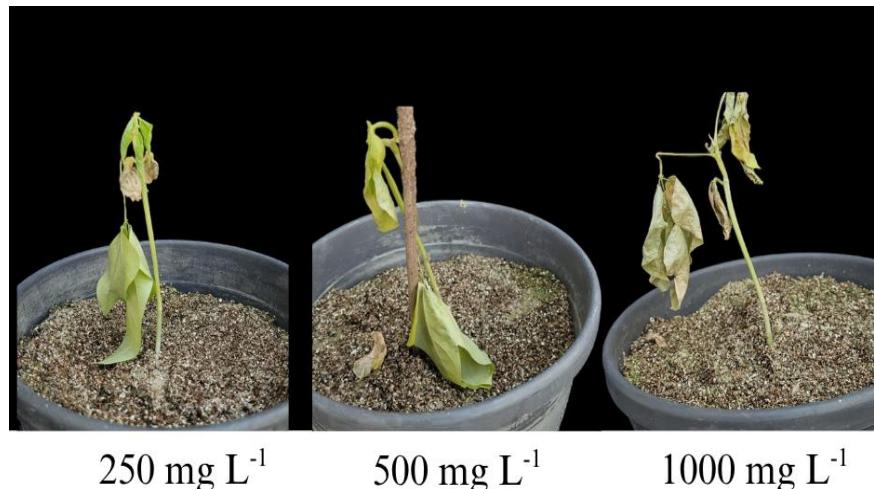
### **5 RESULTADOS**

#### **5.1 Alterações no fenótipo e no estresse oxidativo**

As plantas tratadas com diferentes concentrações apresentaram alterações fenotípicas em comparação as plantas do controle (Figura 1).

Figura 1 – Fenótipo das plantas submetidas a  $125 \text{ mg L}^{-1}$  em comparação com o controle ao longo de 3 dias.

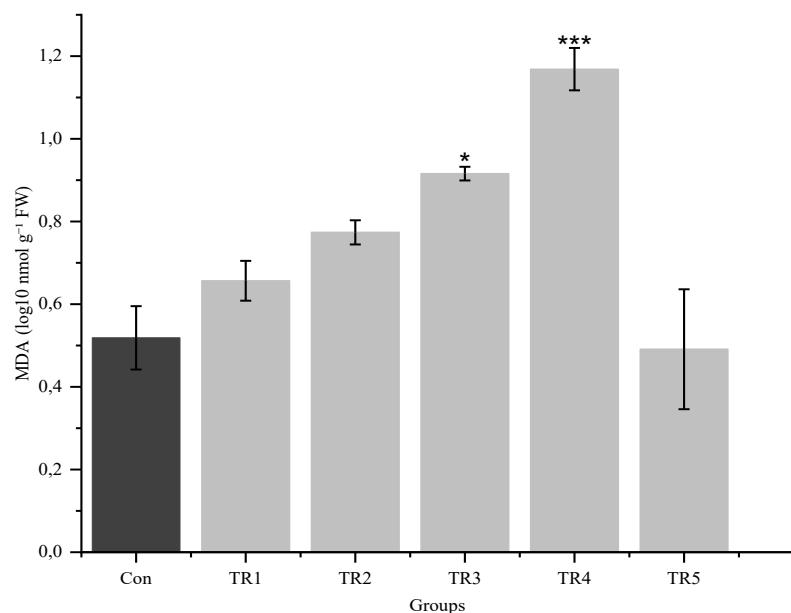




Fonte: elaborada pelo autor.

Ao verificar os níveis de malondialdeído (MDA), no experimento I, observou-se um aumento gradativo de sua produção nos grupos que receberam tratamento com glifosato, nas mais diferentes concentrações (Figura 2). É possível notar que os primeiros grupos tratados (TR1 - 62,5 mg L<sup>-1</sup> e TR2 - 125 mg L<sup>-1</sup>) tiveram um aumento discreto, mas não se diferenciaram estatisticamente do grupo controle (Con), enquanto os tratamentos TR3 (250 mg L<sup>-1</sup>) e TR4 (500 mg L<sup>-1</sup>) diferiram significativamente do controle ( $P \leq 0.05$ ). No entanto, os níveis de MDA não diferiram no TR5 (1000 mg L<sup>-1</sup>), quando comparado ao controle.

Figura 2– Efeitos de múltiplas concentrações de glifosato (62,5;125;250;500 e 1000 mg L<sup>-1</sup>) sobre a peroxidação lipídica, indicador de estresse oxidativo.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Produção de malondialdeído (MDA,  $\log_{10}$  nmol g<sup>-1</sup> de peso fresco – FW) em plantas de feijão-caupi expostas a diferentes concentrações de glifosato. Con (0 mg/L); TR1: 62,5 mg L<sup>-1</sup>; TR2: 125 mg L<sup>-1</sup>; TR3: 250 mg L<sup>-1</sup>; TR4: 500 mg L<sup>-1</sup>; TR5: 1000 mg L<sup>-1</sup>. Os asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle pelo teste de Dunnett (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001). Para a estatística foi feita uma análise de variância (ANOVA) e Teste de Tukey. (n=3).

## 5.2 Alterações metabólicas induzidas por diferentes doses de glifosato

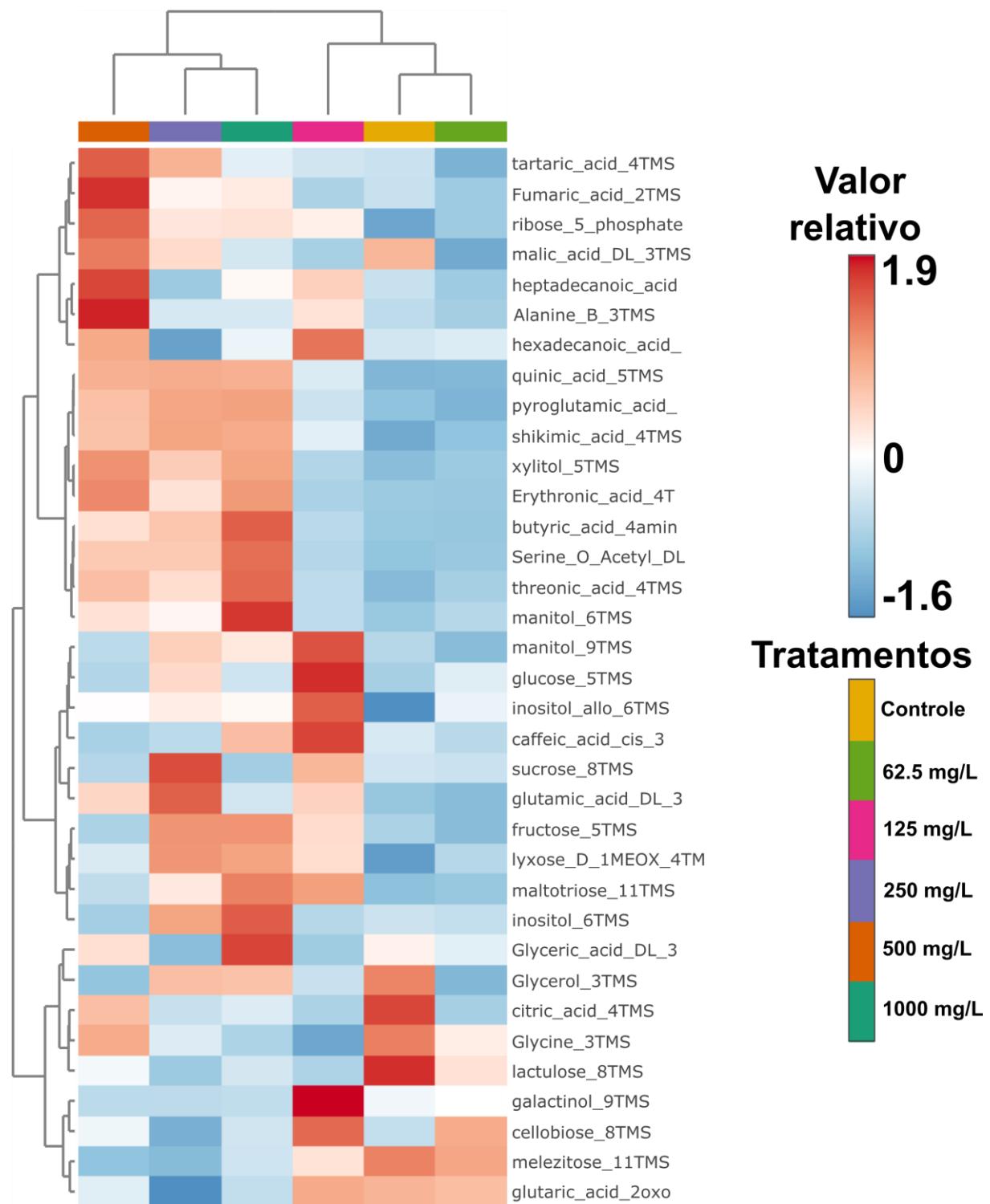
Foram identificados um total de 37 metabólitos no experimento I (Tabela 2) dos quais 15 são carboidratos, 14 ácidos orgânicos, 6 aminoácidos e 3 classificados como outros. Essa classificação foi feita com base na Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG ID).

Tabela 2 – Lista de metabólitos identificados em folhas de *Vigna unguiculata (L.) Walp.* De acordo com a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG ID) no experimento I.

Metabólito	TR	m/z	KEGG ID	Classificação
1 Hidroxylamine	5.52	133	C00172	Outro
2 Alanine	8.28	116	C00041	Aminoácido
3 Serine	11.13	116	C00065	Aminoácido
4 Glycerol	11.43	205	C00116	Outro
5 Glycine	11.88	174	C00037	Aminoácido
6 Glyceric acid	12.31	189	C00258	Ac. Orgânico
7 Alanine beta	13.62	174	C08263	Aminoácido
8 Malic acid	14.49	233	C00711	Ac. Orgânico
9 Pyroglutamic acid	14.94	156	C01879	Aminoácido
10 4-Aminobutyric acid	14.98	174	C00334	Ac. Orgânico
11 Threonic acid	15.24	177	C01620	Ac. Orgânico
12 Erythronic acid	15.46	292	C03064	Ac. Orgânico
13 Glutaric acid	15.57	198	C00489	Ac. Orgânico
14 Glutamic acid	16.08	246	C00025	Aminoácido
15 Tartaric acid	16.39	292	C00898	Ac. Orgânico
16 D-Xylose	17.01	217	C00181	Carboidrato
17 Xylitol	17.09	217	C00379	Carboidrato
18 D-Lyxose	17.83	217	C00476	Carboidrato
19 Cinnamic acid	17.98	293	C10438	Ac. Orgânico
20 Shikimic acid	18.21	204	C00493	Ac. Orgânico
21 Citric acid	18.38	273	C00158	Ac. Orgânico
22 Quinic acid	18.87	345	C00296	Ac. Orgânico
23 Fructose	19.02	217	C00095	Carboidrato
24 Galactose	19.23	319	C00124	Carboidrato
25 Glucose	19.29	319	C00031	Carboidrato
26 Mannitol	19.61	319	C00392	Carboidrato
27 Inositol allo	19.85	191	-	Carboidrato
28 Hexadecanoic acid	20.43	313	C00249	Ac. Orgânico
29 Mio-Inositol	21.15	305	C00137	Carboidrato
30 Caffeic acid	21.38	219	C01197	Ac. Orgânico
31 Cellobiose	21.96	204	C00185	Carboidrato
32 Heptadecanoic acid	22.21	117	C16536	Ac. Orgânico
33 Lactulose	22.60	204	C07064	Carboidrato
34 D-Ribose 5-phosphate	23.57	217	C00117	Carboidrato
35 Melezitose	24.03	361	C08243	Carboidrato
36 Maltotriose	24.54	204	C01835	Carboidrato
37 Trehalose	26.52	361	C01083	Carboidrato

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 3 – Demonstração dos níveis dos metabólitos via mapa de calor (heat map) de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp. submetidas a diferentes concentrações de glifosato após 4 dias depois da aplicação.

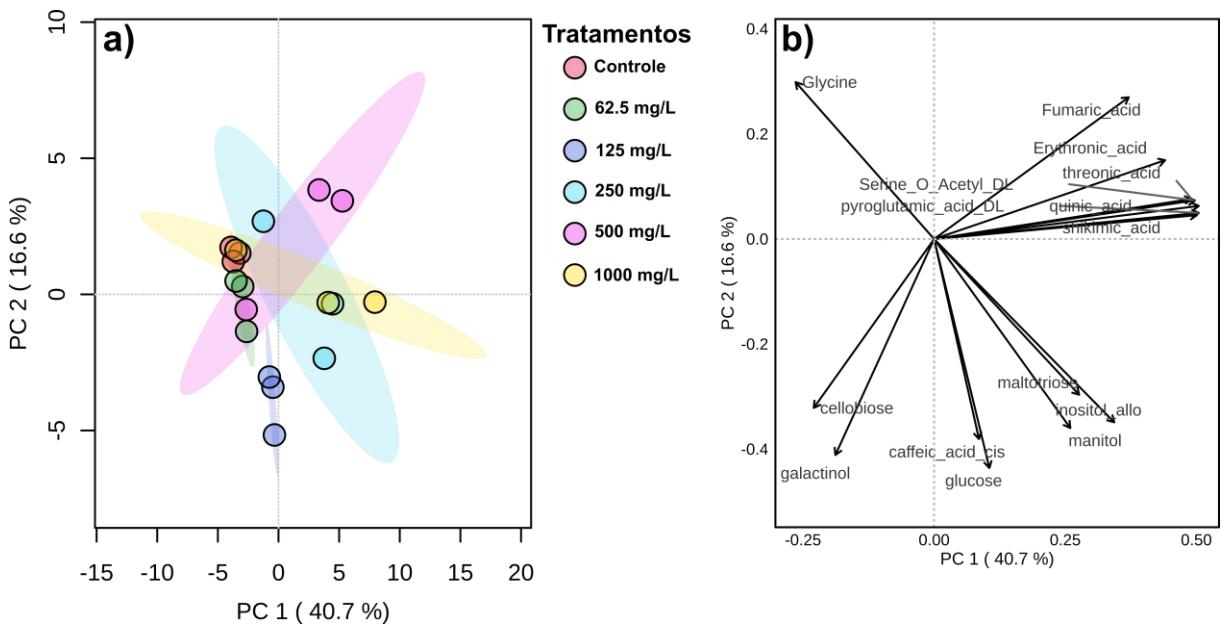


Fonte: elaborada pelo autor.

O mapa de calor (heat map) demonstra uma alta semelhança entre o controle e o tratamento  $62.5 \text{ mg L}^{-1}$ , com evidenciado pelo padrão de cor dos metabólitos no mapa de calor e pela clusterização euclidiana observada entre estes tratamentos (Figura 3 - verificar clusters acima do heat map). Nesta análise de cluster, nota-se que os tratamentos  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  formam um cluster separado, enquanto o tratamento  $125 \text{ mg L}^{-1}$  é intermediário entre os dois clusters maiores (Figura 3). Neste sentido, nota-se um acúmulo preferencial de ácido quínico, piroglutamato, shikimato, xylitol, ácido eritrônico, ácido butírico, serina-O-acetyl, ácido treônico e manitol nas maiores doses de glifosato (Figura 3).

A análise de componentes principais (PCA) demonstrou que os tratamentos  $125 \text{ mg L}^{-1}$  e  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato foram os mais distintos do controle, como evidenciado pela separação desses tratamentos do controle pelos componentes 2 e 1 da PCA, respectivamente (Figura 4a). Os tratamentos  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  também apresentaram tendência de separação do controle. No entanto, provavelmente pela alta variabilidade dos dados, já esperado em condições maiores de estresse, esses tratamentos não foram completamente separados do controle por nenhum dos componentes da PCA (Figura 3a). O Biplot dessa análise ressalta os 15 metabólitos que mais contribuíram para a separação dos tratamentos, com destaque para cellobiose e galactinol para o tratamento  $125 \text{ mg L}^{-1}$  (Figura 4b).

Figura 4 – Análise de componentes principais (PCA) dos metabólitos extraídos de plantas de *V. unguiculata* (L.) Walp submetidas a diferentes concentrações de glifosato após 4 dias depois da aplicação.

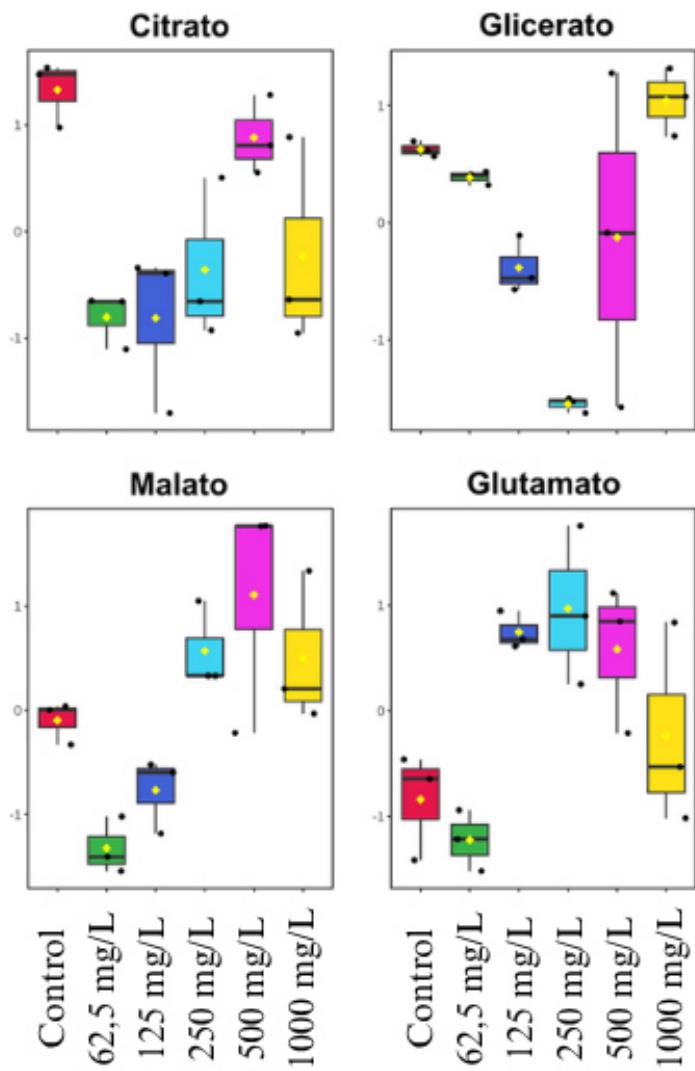


Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: O gráfico representa a PCA e o biplot dessa análise. A variância de PC1 e PC2 está indicada nos eixos X e Y, respectivamente.

Dentre os metabólitos encontrados, apenas 4 (citrato, matato, glicerato e glutamato) apresentaram diferença estatística entre os grupos (Figura 5).

Figura 5 - Metabólitos com diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e teste de tukey ( $P < 0.05$ ).



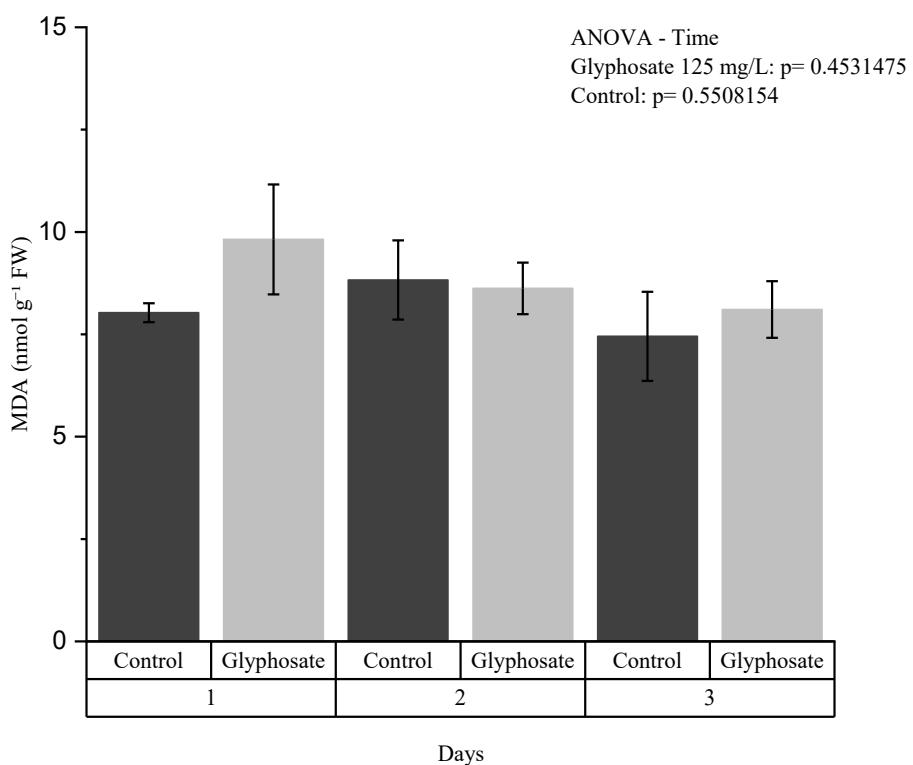
Fonte: elaborada pelo autor.

Visto que o tratamento de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  de glifosato diferiu do controle, evidenciado pela separação no PCA e no heat map (Figuras 3-4) e não indicou estresse oxidativo severo (Figura 2), esta concentração foi escolhida para desenvolver novos experimentos, porém incluindo séries temporais de coleta das amostras (1, 2 e 3 dias após a aplicação).

### 5.3 Efeito de dose moderada sobre o estresse oxidativo e perfil metabólico

Os níveis de MDA não variaram ao longo do tempo, de acordo com ANOVA. Ademais, não houve diferenças significativas entre o controle e o tratamento com glifosato em nenhum dos dias (Figura 6).

Figura 6 – Efeitos do glifosato 125 mg L<sup>-1</sup> sobre a peroxidação lipídica, indicador de estresse oxidativo, ao longo do tempo.



Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: Produção de malondialdeído (MDA, log<sub>10</sub> nmol g<sup>-1</sup> de peso fresco – FW) em plantas de feijão-caupi. submetidas a 125 mg L<sup>-1</sup> de glifosato ao longo do tempo. O gráfico mostra a evolução temporal de MDA em 1,2 e 3 dias após a aplicação. As médias de MDA são comparadas entre controle e tratamento em cada tempo, com barras verticais indicando o erro-padrão; (n = 3). Para a estatística foi feita uma análise de (ANOVA) e Teste de Tukey.

Neste experimento, foram identificados 43 metabólitos, sendo cerca de 16 metabólitos foram classificados como carboidratos, 16 como ácido orgânico, 8 aminoácidos e 3 foram classificados como outros metabólitos (Tabela 3). Curiosamente, diferente do experimento anterior, não foi possível verificar uma separação dos grupos pela PCA (Figura 7). No entanto, 15 metabólitos apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 8), sendo que

apenas dois metabólitos (shikimato e ureia) foram significativamente alterados em mais de um tempo (Figura 8). Após 1, 2 e 3 dias da aplicação de glifosato ( $125 \text{ mg L}^{-1}$ ), observamos um aumento nos níveis de ácido quínico, ureia, glicina e shikimato (dia 1), beta-alanina (dia 2) e alanina, eritritol, shikimato, prolina e treonina (dia 3). Em contraste, os níveis de ácido tartárico e palatinose (dia 1), trealose e ureia (dia 2) e ribose (dia 3) diminuíram após a aplicação de glifosato, em comparação ao controle (Figura 8).

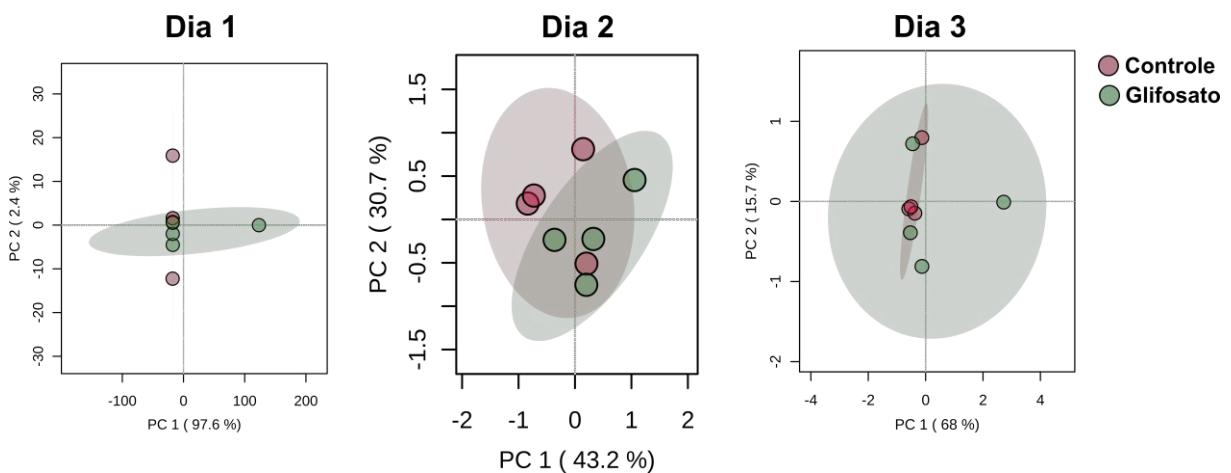
Tabela 3 – Lista de metabólitos identificados em folhas de *Vigna unguiculata (L.) Walp.* De acordo com a Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG ID) no experimento II.

Metabólito	TR	m/z	KEGG ID	Classificação
1 Hidroxylamine	5.52	133	C00172	Outro
2 Glycolic acid	7.64	177	C00160	Ac. Orgânico
3 Alanine	8.22	116	C00041	Aminoácido
4 Oxalic acid	8.80	190	C00209	Ac. Orgânico
5 Urea	10.77	189	C00086	Outro
6 Serine	11.09	116	C00065	Aminoácido
7 Glycerol	11.4	205	C00116	Outro
8 Proline	11.71	177	C00148	Aminoácido
9 Glycine	11.88	174	C00037	Aminoácido
10 Succinic acid	11.95	147	C00042	Ac. Orgânico
11 Glyceric acid	12.28	189	C00258	Ac. Orgânico
12 Threonine	13.13	219	C00188	Aminoácido
13 Alanine beta	13.62	174	C08263	Aminoácido
14 Malic acid	14.47	233	C00711	Ac. Orgânico
15 Lactic acid	14.72	191	C00256	Ac. Orgânico
16 Erythritol	14.78	217	C00503	Carboidrato
17 Aspartic acid	14.88	232	C00049	Ac. Orgânico
18 Pyroglutamic acid	14.93	156	C01879	Aminoácido
19 4-Aminobutyric acid	14.98	174	C00334	Ac. Orgânico
20 Xylusose	15.14	263	C00310	Carboidrato
21 Threonic acid	15.24	177	C01620	Ac. Orgânico
22 Erythronic acid	15.44	292	C03064	Ac. Orgânico
23 Glutaric acid	15.56	198	C00489	Ac. Orgânico
24 Glutamic acid	16.07	246	C00025	Aminoácido
25 Tartaric acid	16.38	292	C00898	Ac. Orgânico
26 Ribose	16.69	103	C00121	Carboidrato
27 Xylitol	17.08	217	C00379	Carboidrato
28 Cinnamic acid	17.98	293	C10438	Ac. Orgânico
29 Shikimic acid	18.19	204	C00493	Ac. Orgânico
30 Dehydroascorbate	18.72	173	C05422	Ac. Orgânico
31 Quinic acid	18.84	345	C00296	Ac. Orgânico
32 Fructose	19.10	217	C00095	Carboidrato
33 Glucose	19.27	319	C00031	Carboidrato
34 Inositol allo	19.83	191	-	Carboidrato
35 Mio-Inositol	21.14	305	C00137	Carboidrato
36 Cellobiose	21.94	204	C00185	Carboidrato
37 Glucoheptose	23.88	160	M00064	Carboidrato
38 Maltose	25.53	217	C00208	Carboidrato
39 Sucrose	25.82	361	C00042	Carboidrato

40 Melezitose	26.51	361	C08243	Carboidrato
41 Trehalose	26.63	361	C01083	Carboidrato
42 Galactinol	28.4	204	C01235	Carboidrato
43 Palatinose	29.58	204	C01742	Carboidrato

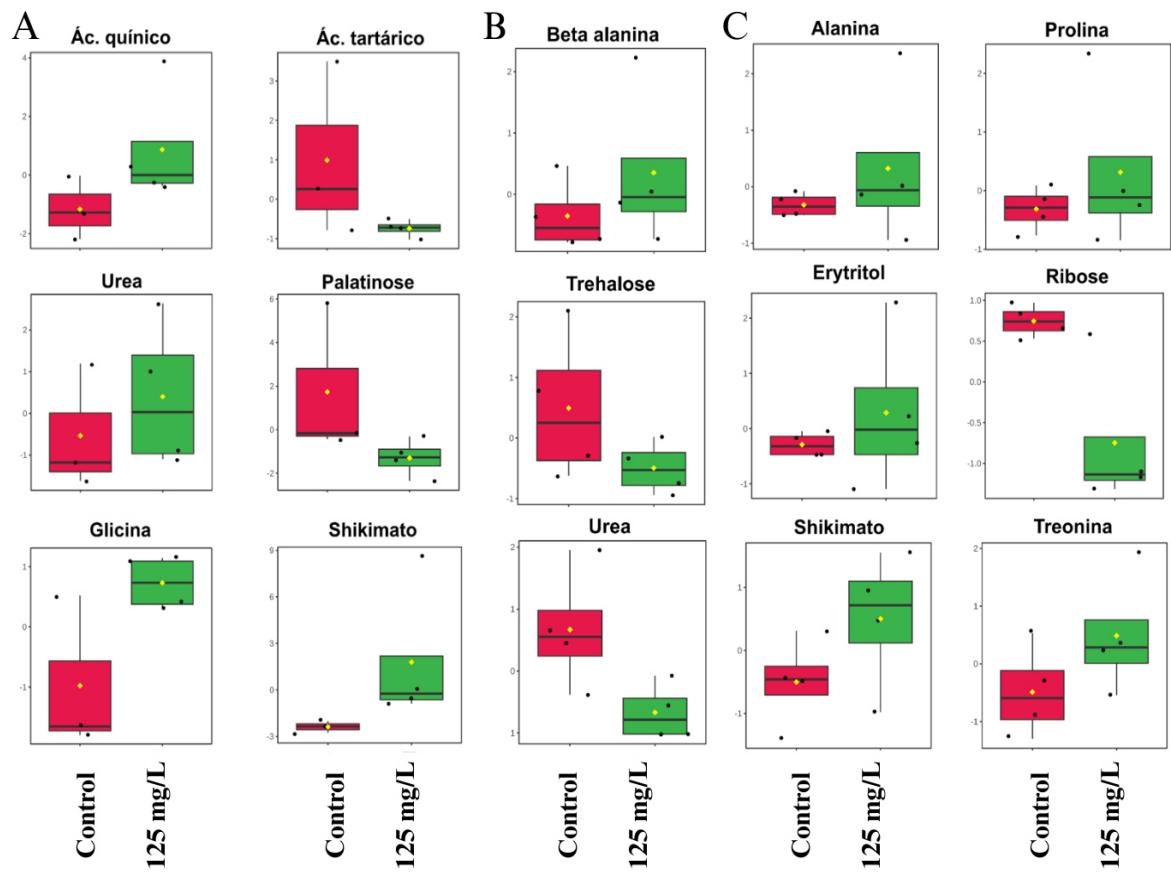
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 7 - Análise de componentes principais (PCA) dos metabólitos extraídos de plantas de *V. unguiculata* (*L.*) *Walp* submetidas a diferentes concentrações de glifosato ao longo de 3 dias depois da aplicação. A variância de PC1 e PC2 está indicada nos eixos X e Y, respectivamente.



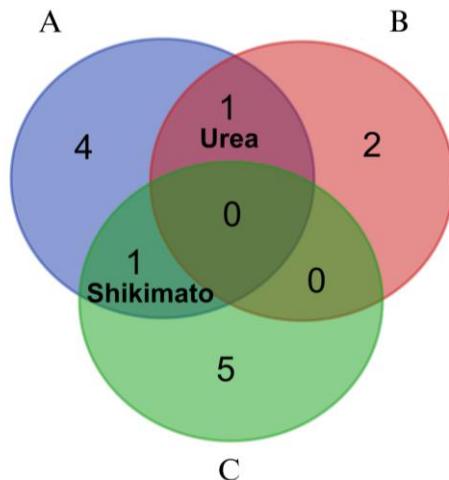
Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 8: Metabólitos com diferenças significativas por test t de Student ( $P < 0.05$ ) nos dias 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Essa análise foi realizada na plataforma Metaboanalyst.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 9: Diagrama de Venn de metabólitos com diferenças significativas entre os grupos por test t de Student ( $P < 0.05$ ) em 1(A), 2 (B) e 3 (C) dias após a aplicação.



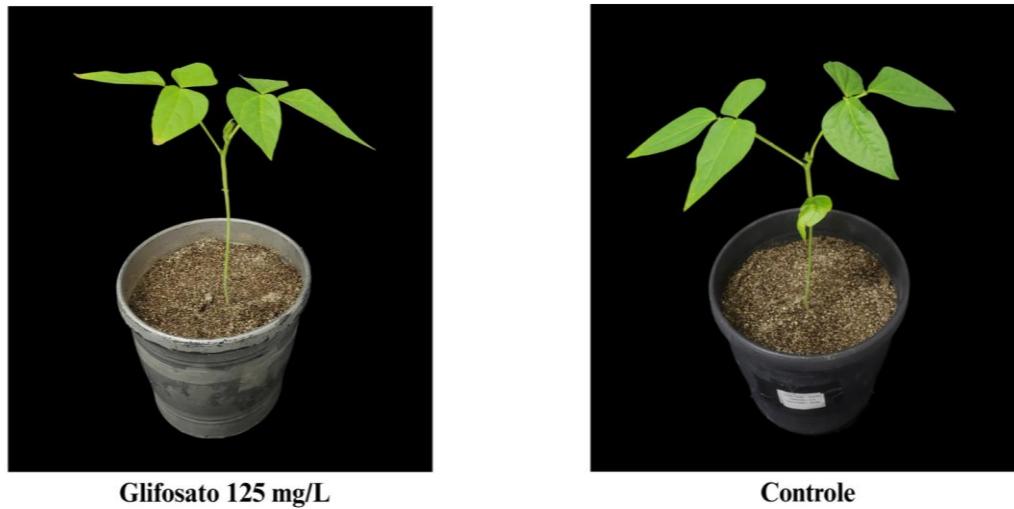
Fonte: elaborada pelo autor.

A análise de componentes principais (PCA) usando dados de metabolômica demonstrou pouca variação entre os tratamentos, uma vez que não houve separação entre controle e glifosato (Figura 7).

#### **5.4 Efeito de dose moderada na fotossíntese e no crescimento**

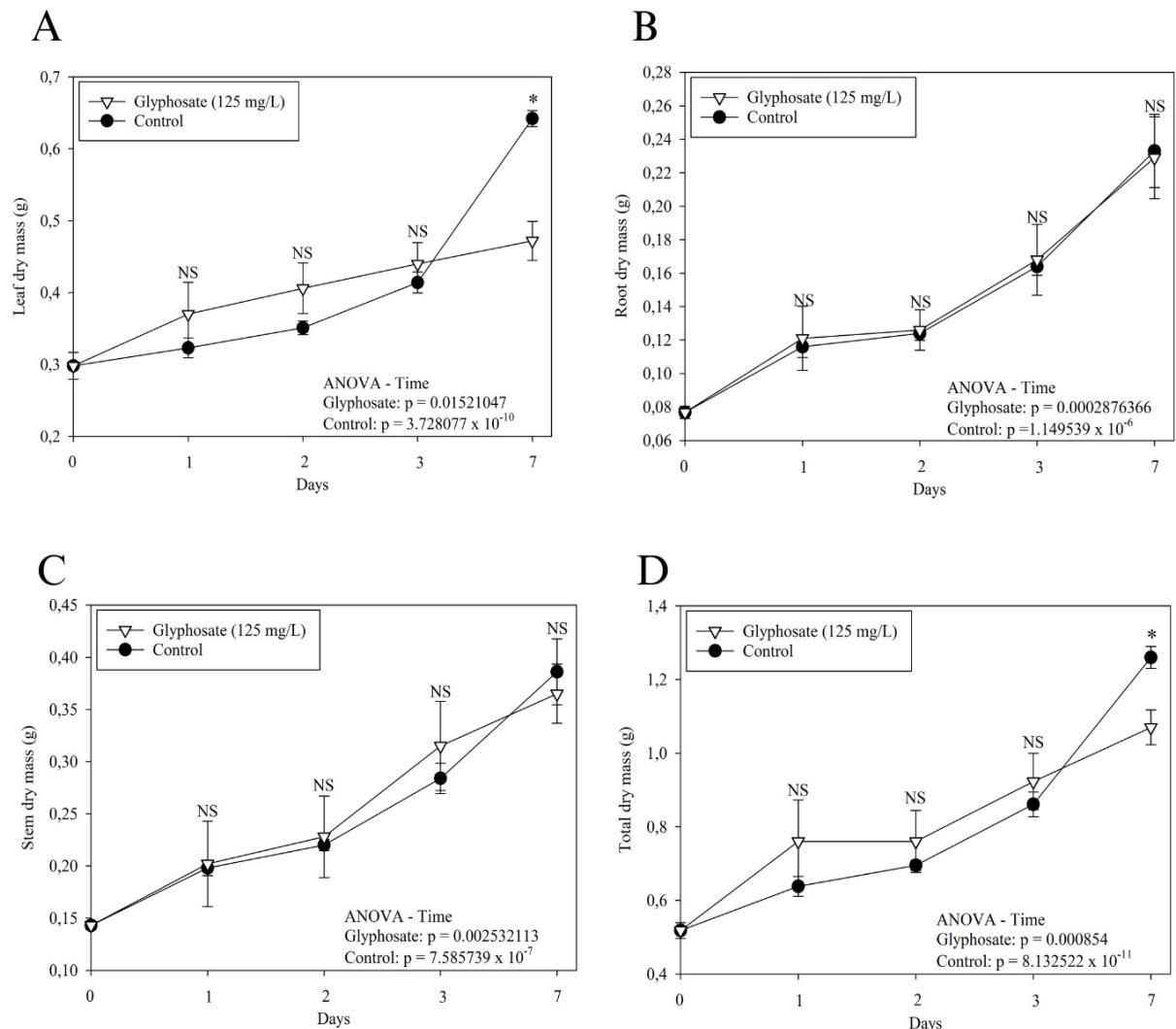
As plantas tratadas com  $125 \text{ mg L}^{-1}$  não apresentaram alterações fenotípicas severas em comparação as plantas do controle (Figura 10). Ao longo dos 7 dias, notou-se que a biomassa seca das folhas, raiz e caule aumentou ( $P \leq 0.05$ ) progressivamente em ambos os grupos (Figura 11 A-C). No entanto, a diferença foi maior no controle, que demonstrou um crescimento gradual mais acentuado, o que pode ser verificado no 7º dia, em que folhas do grupo controle exibiram um maior acúmulo de biomassa (Figura 11 A) em comparação às plantas tratadas com glifosato e na biomassa total (Figura 11 D).

Figura 10 – Fenótipo das plantas submetidas a 125 mg L<sup>-1</sup> em comparação com o controle ao longo de 3 dias.



Fonte: elaborada pelo autor

Figura 11 – Parâmetro de biomassa seca de plantas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. submetidas à ausência e presença de glifosato ( $125 \text{ mg L}^{-1}$ ) ao longo de 7 dias.



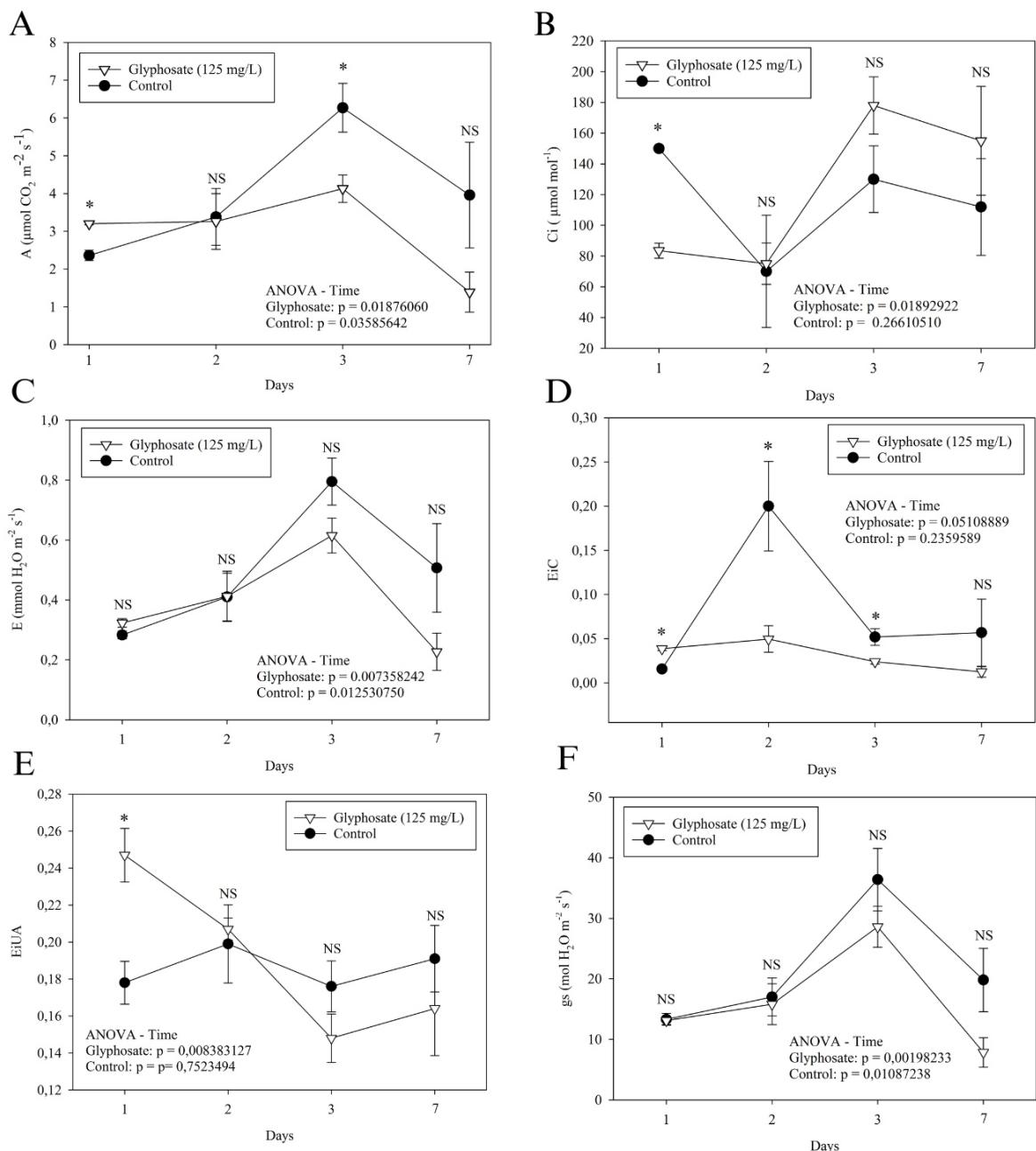
Fonte elaborada pelo autor:

Legenda: A) biomassa seca de folhas; B) biomassa seca de raiz; C) biomassa seca de caule e D) biomassa seca total dos grupos controle e glifosato ( $125 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em cada tempo e ao longo do tempo, e as médias foram comparadas utilizando teste de Tukey. O erro-padrão está indicado pelas barras. A presença de asterisco indica que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

O glifosato também afetou a dinâmica temporal das trocas gasosas (Figura 12). Foi possível verificar uma maior taxa fotossintética líquida ( $A$ ) apenas no primeiro dia em plantas tratadas pelo glifosato e, ao longo do tempo, a tendência foi de redução. A concentração interna de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) foi menor nas plantas sob glifosato no primeiro dia, com diferença estatística em relação ao controle. A taxa de transpiração ( $E$ ) e a condutância estomática ( $g_s$ ) não tiveram

diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum dos tempos A eficiência da carboxilação (EiC) e a eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) mostraram valores mais altos no grupo tratado no primeiro dia, com diferença estatística, mas sem manter essa tendência nos demais dias (Figuras 12 D-E).

Figura 12 – Efeitos do glifosato 125 mg L<sup>-1</sup> sobre os parâmetros de trocas gasosas.

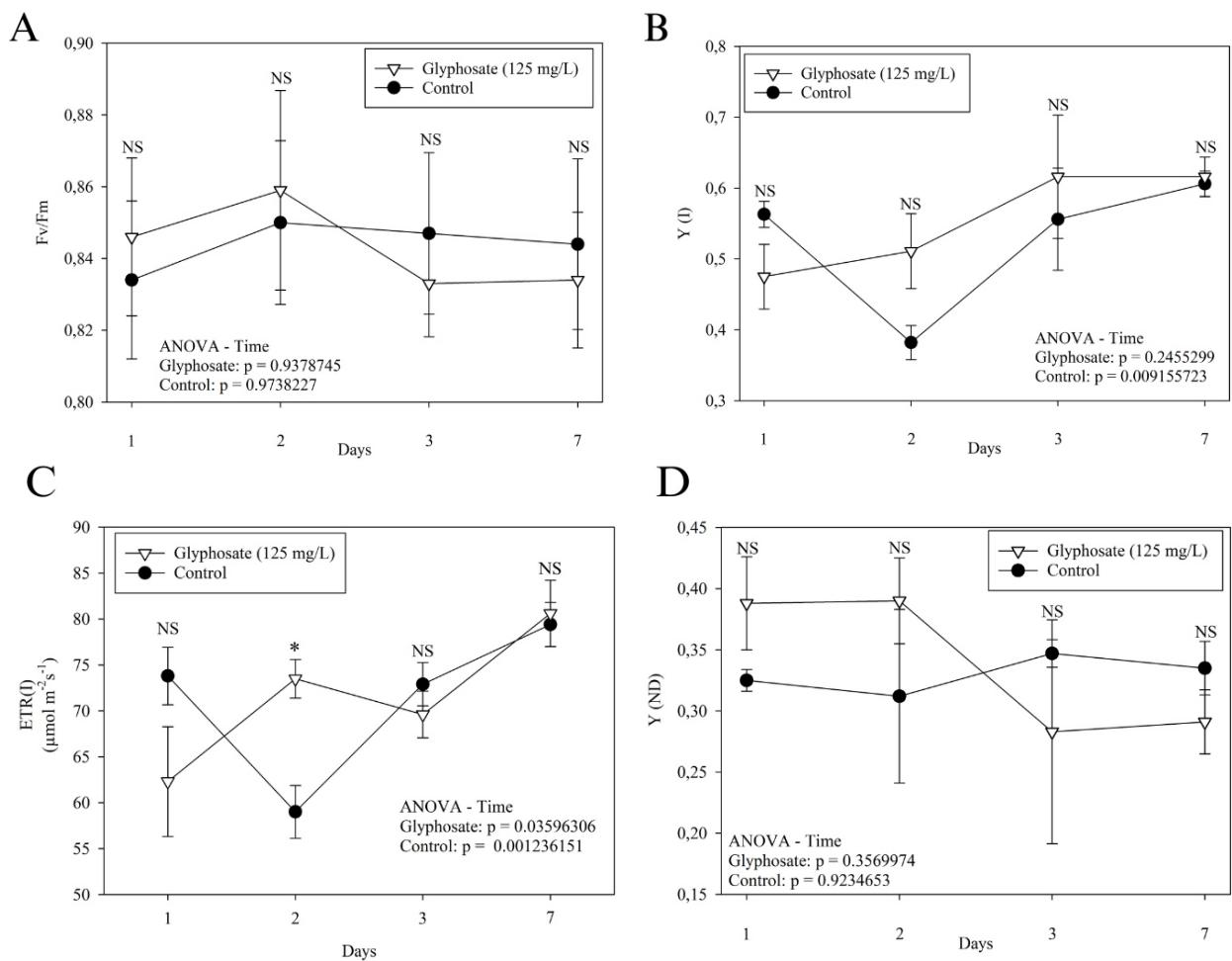


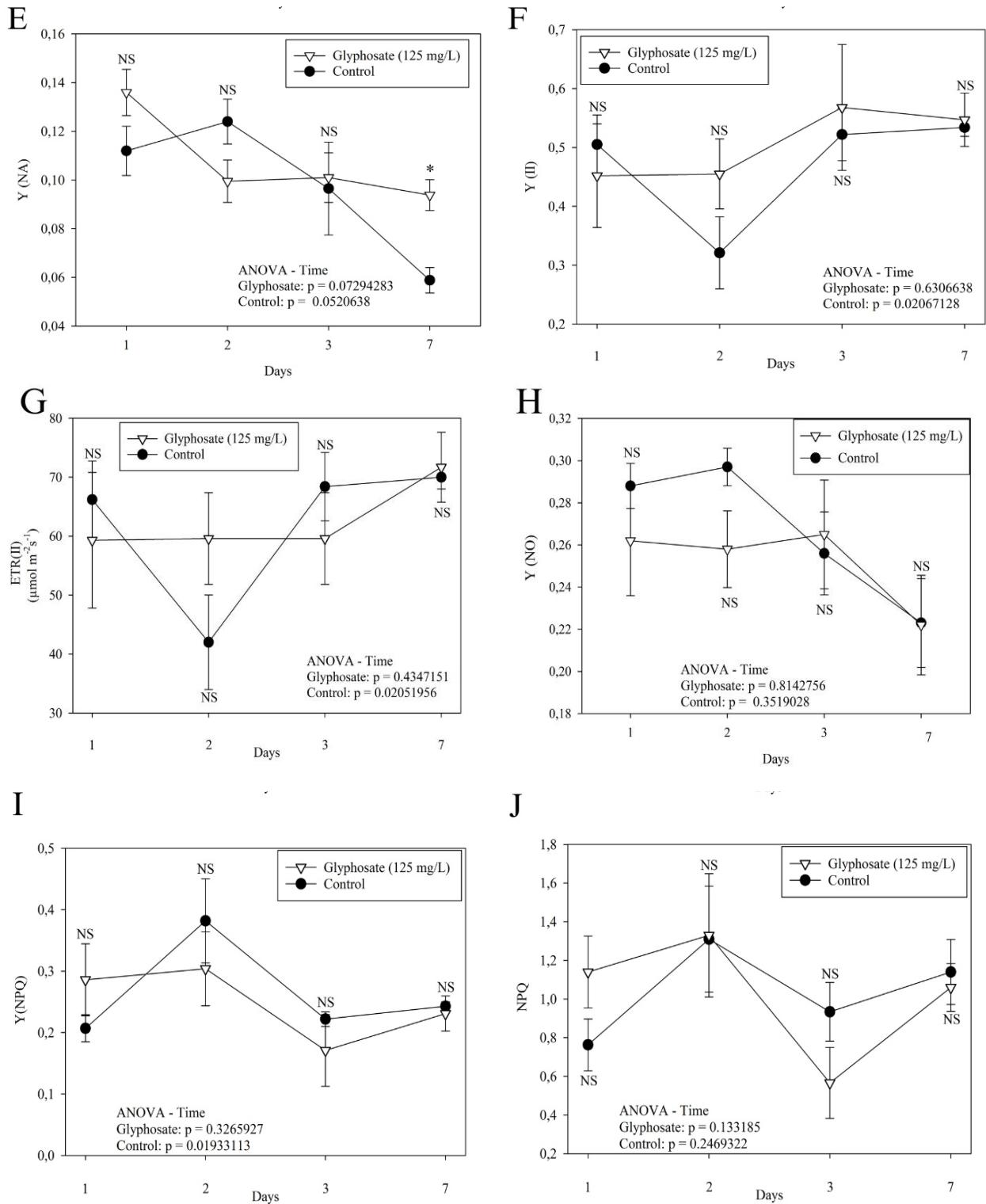
Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: A) taxa fotossintética líquida; B) concentração interna de CO<sub>2</sub>; C) taxa de transpiração; D) eficiência da carboxilação (EiC); E) eficiência intrínseca do uso da água (A/gs); F) condutância estomática. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), em cada tempo e ao longo do tempo, e as médias comparadas por teste de Tukey. A presença de asterisco indica que houve significativa p ≤ 0,05.

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* analisados não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle e glifosato em cada tempo, com exceção de uma diferença pontual, no dia 7, no rendimento quântico da limitação no lado aceptor do PSI (Figura 13 E) e na taxa de transporte de elétrons do PSI, no segundo dia (Figura 13 C). Embora haja oscilações nas curvas de cada parâmetro, elas não foram confirmadas estatisticamente, não sendo, portanto, suficientes para indicar alterações consistentes na atividade fotoquímica induzidas pelo herbicida.

Figura 13 — Efeitos do glifosato 125 mg L<sup>-1</sup> nos parâmetros da eficiência fotoquímica por fluorescência da clorofila.

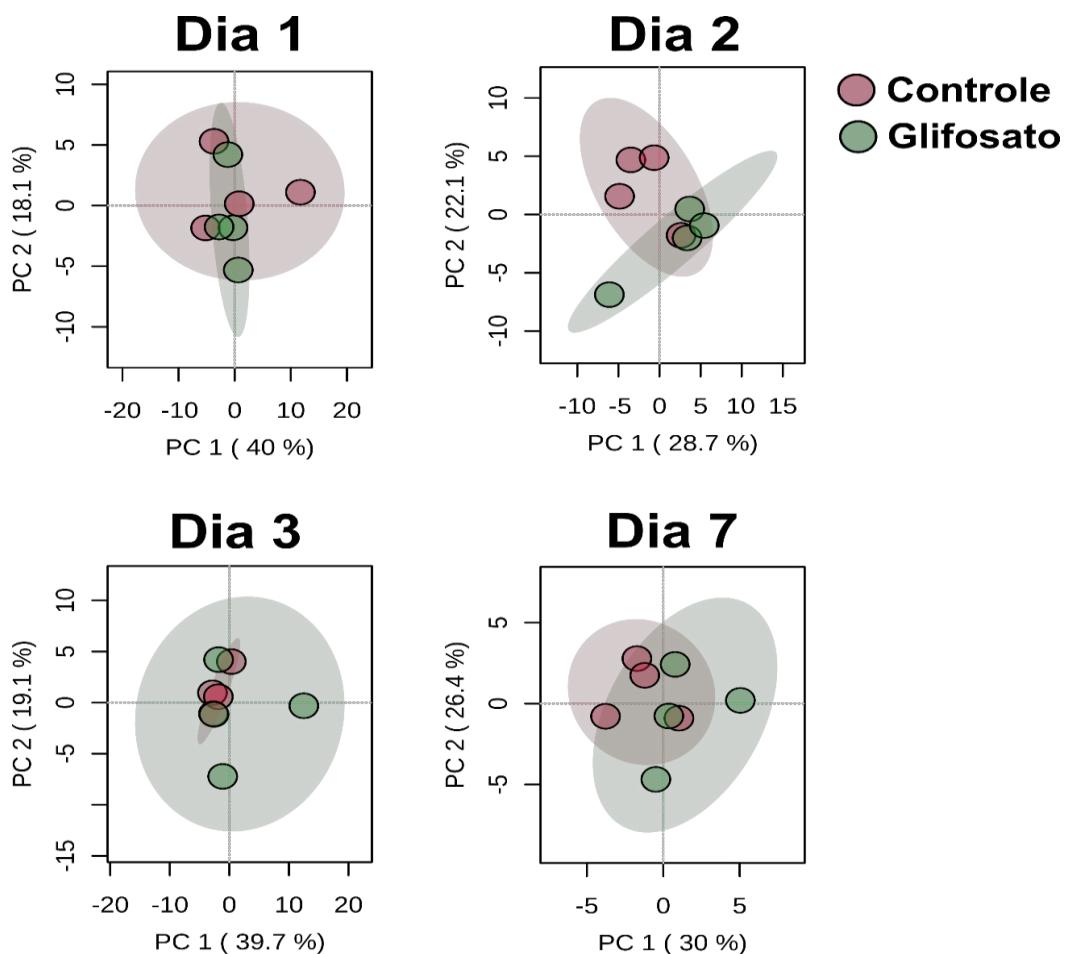




Legenda: A) Eficiência máxima do PSII; B) Rendimento quântico do PSI; C) Taxa de transporte de elétrons do PSI; D) Rendimento quântico da limitação no lado doador do PSI; E) Rendimento quântico da limitação no lado acceptor do PSI; F) Rendimento quântico efetivo do PSII; G) Taxa de transporte de elétrons no PSII; H) Rendimento quântico da dissipação não regulada da energia no PSII; I) Rendimento quântico da dissipação regulada de energia no PSII; J) Extinção não fotoquímica.

Similar ao observado nos dados de metabolômica, não houve separação entre controle e glifosato pela análise de PCA, neste caso usando todos os dados deste experimento (Figura 14).

Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) dos parâmetros de crescimento, fotossíntese e parâmetros bioquímicos (incluindo as análises metabolômicas) ao longo do tempo.



Fonte: elaborada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

Os efeitos do glifosato em plantas não-alvo são amplamente relatados. Por exemplo, foi verificado que o glifosato pode causar estresse oxidativo na planta (Gomes; Juneau, 2016). O acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs) pode gerar um efeito fitotóxico severo, como danos celulares irreversíveis e até mesmo morte celular (Gill *et al.*, 2010). Em *Zea mays L.*, foi

demonstrado que a aplicação de glifosato aumentou a peroxidação lipídica (Sergiev *et al* (2006)). De forma semelhante, no experimento I, ao comparar 5 doses de glifosato, observou-se que doses acima de 125 mg L<sup>-1</sup> geraram estresse oxidativo, indicado indiretamente pelo aumento na concentração de MDA, um subproduto da peroxidação lipídica (Figura 2). Esse foi um dos fatores cruciais para confirmar a subletalidade da dosagem, já que não houve indicativo de estresse oxidativo em plantas sob concentração de 125 mg L<sup>-1</sup> (Figura 6), o que permite a análise de mecanismos de possíveis respostas metabólicas em uma condição em que as plantas não apresentem danos severos.

Apesar de não existirem diferenças significativas para caule e raiz entre o tratamento e o controle, o grupo tratado com glifosato, em dose moderada de 125 mg L<sup>-1</sup>, apresentou uma menor massa seca em folhas, no dia 7 após a aplicação (Figura 11-A). Apesar da medida pontual, o herbicida, nesta concentração, não gerou danos no visíveis no crescimento e desenvolvimento das plantas neste período.

De forma paralela, foram observados impactos em trocas gasosas (Figura 12). A taxa fotossintética líquida ( $A$ ), inicialmente, teve um resultado melhor no tratamento, mas ao longo do tempo registrou-se uma queda em relação ao controle, evidenciada no dia 3. Porém, não houve diferença significativa na condutância estomática ( $g_s$ ) em nenhum dia, o que pode indicar que, em dose branda de glifosato, a planta parece aproveitar melhor o CO<sub>2</sub> disponível, isso fica evidente com a menor concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) encontrada no primeiro dia, revelando que o CO<sub>2</sub> não está sendo acumulado, apresentando uma alta eficiência de fixação de CO<sub>2</sub>. Análogo a esse resultado, em um estudo com tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) submetido a doses baixas de glifosato, Wang *et al* (2024) observou uma maior taxa fotossintética em comparação ao controle. Outro estudo feito com cana-de-açúcar e eucalipto também demonstrou um aumento na fotossíntese e na condutância estomática (Nascentes *et al.*, 2017). Ao calcular a eficiência da carboxilação (EiC) e a eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), notou-se também que, o glifosato, no primeiro dia após a aplicação, obteve melhores resultados, corroborando com a ideia de uma resposta compensatória ao estresse. Os resultados positivos iniciais desses parâmetros de trocas gasosas podem ser atribuídos, provavelmente, a um efeito de hormese, em que baixas doses de um herbicida podem gerar um estímulo positivo e compensatório (Erofeeva, 2022). Contudo, essa excitação benéfica não perdurou nos demais dias. Esses resultados podem prenunciar que, devido a inibição da enzima EPSPs, que leva a um bloqueio da síntese de aminoácidos aromáticos e, consequentemente, a um esgotamento do pool de aminoácidos, ocorra uma menor síntese proteica e um desenvolvimento lento dos sintomas ao longo do tempo (Duke; Powles, 2008 *apud* Yannicciari *et al.*, 2012).

Os fotossistemas I e II não foram severamente afetados (Figura 13), uma vez que a maioria os parâmetros fotoquímicos praticamente não diferiram entre os grupos. Apenas dois parâmetros apresentaram diferenças pontuais. Maiores níveis de Y(NA) podem indicar um aumento relativo da limitação no lado acceptor de elétrons do PS(I), mais precisamente em NADP<sup>+</sup>, uma molécula carreadora de elétrons e acceptora final do PS(I), que é reduzida a NADPH ao fim do processo pela ferredoxina-NADP<sup>+</sup> redutase, quando reage com os elétrons transportados e prótons H<sup>+</sup>. O NADPH gerado é essencial na fase bioquímica da fotossíntese no ciclo de Calvin-Benson (Da Fonseca-Pereira *et al.*, 2021). Um maior nível em Y(NA) poderia ser relacionado com uma redução na atividade do ciclo de Calvin-Benson, gerando uma demanda menor de NADPH, fazendo com que não haja renovação de NADP<sup>+</sup> e, consequentemente, mais elétrons ficariam retidos no PSI. No entanto, por ser uma medida pontual, não é suficiente para afirmar que houve limitação, até porque os níveis nesse parâmetro são baixos. No dia 2, verificou-se um maior nível de ETR(I), com diferença estatística, mas ambos os grupos mantêm praticamente o mesmo nível nos dias seguintes, indicando que os elétrons estão fluindo normalmente no PSI. Alguns estudos mostram resultados distintos sobre os fotossistemas. Mateos-Naranjo; Perez Martin (2013), ao estudar as implicações não-alvo de subdoses de glifosato em junco-da-praia (*Bolboschoenus maritimus L.*), mostrou que o herbicida gerou impactos negativos em parâmetros como Fv/Fm e YII, indicando que houve danos no PSII e queda na eficiência da fotossíntese. Mateos-Naranjo; Perez Martin (2013) demonstrou que doses baixas de glifosato não alteraram a eficiência do PSII.

No perfil metabólico de plantas tratadas com várias concentrações de glifosato (Figura 5), notou-se diferença em dois metabólitos, malato e citrato, componentes do ciclo do ácido cítrico (TCA), importantes para o metabolismo energético das plantas (Nunes-Nesi *et al.*, 2013). Resultados semelhantes em plantas sensíveis ao glifosato foram registrados (Zulet-Gonzalez *et al.*, 2023). As alterações em glutamato e glicerato sugerem mudanças no ciclo da glutamina sintetase – glutamato sintase (GS-GOGAT), essencial para assimilação de nitrogênio e fotorrespiração, respectivamente (Timm & Hagemann, 2020). Maroli *et al.*, (2016) também registrou alterações nesse ciclo em plantas sensíveis ao glifosato. Trenkamp *et al.*, (2009) apresentou alterações no nível de glicerato em *Arabidopsis thaliana* sob tratamento do herbicida.

Quando glifosato foi aplicado na dose de 125 mg L<sup>-1</sup> (Experimento II), foi possível observar que, dos 43 metabólitos identificados. A PCA não mostrou uma separação dos grupos (Figura 9), contrariando a PCA do experimento I (Figura 4a), provavelmente por uma alta variabilidade nos dados deste experimento, provavelmente devido ao baixo número de

repetições biológicas. No entanto, 15 metabólitos mostraram níveis discrepantes com relação ao controle (Figura 8). Dentre esses, ureia e shikimato demonstraram respostas mais consistentes, sendo diferente do controle em mais de um tempo após a aplicação (Figura 9). A ureia é um composto que, no metabolismo de plantas, é um produto do catabolismo de arginina (Witte, 2011), que é considerada a principal forma de transporte e armazenamento de nitrogênio pela planta (Winter *et al.*, 2015). Esses resultados sugerem que a planta está liberando nitrogênio armazenado na forma de ureia. O shikimato, por sua vez, é o metabólito intermediário central da via do ácido shikímico em plantas, uma via afetada diretamente pelo glifosato, como previamente descrito (Kanissery *et al.*, 2019; Velini *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2017). O acúmulo do shikimato, evidenciado nos dias 1 e 3, é um biomarcador da ação do glifosato sobre a EPSPs, ou seja, mesmo em dose baixa, o glifosato está atuando sobre o metabolismo e pode estar inibindo essa enzima. Essa ideia pode ser reforçada pelo acúmulo do ácido quínico no primeiro dia, precursor do ácido shikímico (Bochkov *et al.*, 2011 apud Adachi *et al.*, 2006).

Ao longo dos dias, foram identificados aminoácidos (glicina, beta-alanina, alanina, treonina e prolina) com maior nível no grupo tratado (Figura 8). O acúmulo de aminoácidos pode ser apontado como um mecanismo relacionado a aclimatação de plantas em vários tipos de estresse (Cardoso *et al.*, 2023) e causado pela degradação de proteínas (Araújo *et al.*, 2011), numa tentativa de reduzir os efeitos gerados pelo estresse, como a eliminação de EROs (Hildebrandt, 2018). Em estudos feitos com plantas susceptíveis de *Amaranthus palmeri*, L., Maroli *et al.*, (2016) e Zulet-Gonzalez *et al.*, (2023) identificaram um aumento no pool de aminoácidos livres e atribuíram esse resultado ao catabolismo de proteínas. Houve também um padrão de resposta em carboidratos (Figura 8). As variações no nível de açúcares são bastante estudadas em muitos tipos de estresse (Obata & Fernie, 2012). Suas alterações refletem uma resposta de aclimatação ao estresse e pode variar de acordo com a espécie e o tipo de estresse (Zandalinas *et al.*, 2022). Em um estudo realizado com plantas de girassol em doses baixas de glifosato, Vital *et al.*, (2017) registrou-se uma redução nas reservas de carboidratos e atribuiu esse efeito aos danos no aparato fotossintético no tratamento. Porém, os resultados desse trabalho não mostraram que houve danos severos no aparato fotossintético. Zulet-Gonzalez *et al.*, (2023), identificou, por sua vez, um acúmulo de carboidratos após o tratamento com doses baixas de glifosato. Como não há indícios de danos no aparato fotossintético, esses açúcares, provavelmente, podem estar sendo direcionados para rotas de defesa e síntese de aminoácidos para manter a homeostase da planta. A PCA que integra todos os parâmetros estudados para a dose de 125 mg L<sup>-1</sup> (Figura 14) sugere que a planta consegue manter uma determinada

homeostase funcional mesmo apresentando alterações metabólicas pontuais. Estudos com uma janela temporal maior podem ajudar a determinar se o sistema, como um todo, permanece resiliente.

## 7 CONCLUSÃO

O tratamento com a subdose de glifosato impactou aspectos funcionais da planta como metabolismo e parâmetros associados a fotossíntese. Os resultados encontrados prenunciam a ausência de estresse oxidativo, pelos valores baixos de MDA, evidenciando a subletalidade da dosagem de  $125 \text{ mg L}^{-1}$ . As mudanças sutis sob a dose de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  observadas nos dados de trocas gasosas, com valores inicialmente aumentados de fotossíntese ( $A$ ), eficiência da carboxilação (EiC) e eficiência intrínseca do uso da água (EiUA), sugerem um efeito de hormese. Entretanto, esse efeito parece não se sustentar ao longo do tempo. Os resultados de fluorescência da clorofila *a* indicaram que a atividade fotoquímica foi pouco alterada. Apesar das diferenças pontuais em ETR(I) e Y(NA), o fluxo de elétrons no PS(I) não sofreu danos funcionais. Já o perfil metabólico apresentou que há mudanças consistentes. O maior acúmulo de shikimato evidencia a ação direta do glifosato na via do ácido shikímico e o acúmulo de ureia pode sugerir alterações no metabolismo do nitrogênio. O aumento nos níveis relativos de aminoácidos como glicina, beta-alanina, alanina, treonina e prolina, em relação ao controle, sugere uma maior degradação de proteínas e uma tentativa de aclimatação ao estresse. A hipótese testada não foi confirmada. Na dosagem de  $125 \text{ mg L}^{-1}$  os resultados mostram que há alterações metabólicas sem levar ao estresse oxidativo severo e também alterações nos teores relativos de alguns aminoácidos indicando mecanismos de aclimatação ao estresse, o que indica uma resposta metabólica ativa. Então, não há uma incapacidade completa da planta em ativar rotas metabólicas foliares de defesa ao estresse. Por outro lado, um acúmulo de shikimato pode indicar que as rotas afetadas podem não ter sido completamente compensadas. Como perspectivas, podem ser realizados mais estudos para determinar se a ausência de estresse oxidativo está relacionada ou não com a eficiência do sistema antioxidante, a partir da quantificação de enzimas como a catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Ademais, um estudo com um espaço temporal maior pra atestar se os efeitos tardios observados no crescimento persistem ao longo do tempo e como o perfil metabólico é alterado em tempos mais prolongados e analisar como essas alterações nas rotas de defesa se comportam em diferentes doses ao longo do tempo.

## REFERÊNCIAS

ADRIANO NUNES-NESI; ARAÚJO, Wagner L; OBATA, Toshihiro; *et al.* Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 16, n. 3, p. 335–343, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.01.004>

AMITH MAROLI; VIJAY NANDULA; DUKE, Stephen; *et al.* Stable Isotope Resolved Metabolomics Reveals the Role of Anabolic and Catabolic Processes in Glyphosate-Induced Amino Acid Accumulation in *Amaranthus palmeri* Biotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 37, p. 7040–7048, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02196>

**Anvisa reavalia glifosato e descarta risco de câncer pelo consumo de alimentos.** Ministério da Agricultura e Pecuária. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/anvisa-reavaliou-risco-do-glifosato-e-descartou-risco-ao-consumidor> Acesso em: 13 jun. 2025

ARAÚJO, Wagner L; TAKAYUKI TOHGE; ISHIZAKI, Kimitsune; *et al.* Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 9, p. 489–498, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.05.008>

BABIKER, E. M.; HULBERT, S. H.; SCHROEDER, K. L.; *et al.* Optimum Timing of Preplant Applications of Glyphosate to Manage Rhizoctonia Root Rot in Barley. **Plant Disease**, v. 95, n. 3, p. 304–310, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30743538/>>. Acesso em: 14 jun. 2025.

BOCHKOV, Denis V.; SYSOLYATIN, Sergey V.; KALASHNIKOV, Alexander I.; *et al.* Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. **Journal of Chemical Biology**, v. 5, n. 1, p. 5–17, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12154-011-0064-8>

BOUTIN, C; STRANDBERG, B; CARPENTER, D; *et al.* Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? **Environmental Pollution**, v. 185, p. 295–306, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.009>

CARDOSO, Livia L.; FREIRE, Francisco Bruno S. ; DALOSO, Danilo M. Plant Metabolic Networks Under Stress: a Multi-species/Stress Condition Meta-analysis. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 4–21, 2022. DOI: [10.1007/s42729-022-01032-2](https://doi.org/10.1007/s42729-022-01032-2)

CEDERLUND, H. (2017), Effects of spray drift of glyphosate on nontarget terrestrial plants-A critical review. **Environ Toxicol Chem**, 36: 2879-2886. <https://doi.org/10.1002/etc.3925>

**Cenário brasileiro do Feijão-caupi. IBRAFE.ORG.** Disponível em: <<https://www.ibrafe.org/artigo/cenario-brasileiro-do-feijao-caupi>>. Acesso em: 13 jun. 2025.

DUKE, S. O.; POWLES, S. B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, v. 64, n. 4, p. 319–325, 2008. DOI: 10.1002/ps.1518.

EISENHUT, Marion; ROELL, Marc-Sven ; ANDREAS. Mechanistic understanding of photorespiration paves the way to a new green revolution. **New Phytologist**, v. 223, n. 4, p. 1762–1769, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15872>

ERICK; RAYMANN, Kasie ; MORAN, Nancy A. Glyphosate perturbs the gut microbiota of honey bees. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 41, p. 10305–10310, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1803880115>

EROFEEVA, Elena A. Environmental hormesis: From cell to ecosystem. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 29, p. 100378–100378, 2022. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468584422000538?via%3Dhub>>. Acesso em: 2 jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2022.100378>

FONSECA-PEREIRA, Paula da; SOUZA, Paulo V L; FERNIE, Alisdair R; et al. Thioredoxin-mediated regulation of (photo)respiration and central metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 17, p. 5987–6002, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erab098>

Food and Agriculture Organization of the United Nations (2025) – with major processing by Our World in Data. “Bean production – FAO” [dataset]. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, “Production: Crops and livestock products” [original data]. Retrieved June 13, 2025 from <https://ourworldindata.org/grapher/bean-production>

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/916831> Acesso em: 13 maio 2025.

GILL, Sarvajeet Singh; NARENDRA TUTEJA. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

GOMES, Marcelo P.; SMEDBOL, Elise; CHALIFOUR, Annie; et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 17, p. 4691–4703, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>

GOMES, Marcelo Pedrosa; JUNEAU, Philippe. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) induced by glyphosate: Is the mitochondrial electron transport chain a target of this

herbicide? **Environmental Pollution**, v. 218, p. 402–409, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.019>

HEATH RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch Biochem Biophys**. 1968 Apr;125(1):189-98. doi: 10.1016/0003-9861(68)90654-1

HILDEBRANDT, Tatjana M. Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. **Plant Molecular Biology**, v. 98, n. 1-2, p. 121–135, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0767-0>

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. California **Agricultural Experiment Station Circular**, [S. l.], v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

JÚNIOR, E. P.; MORAIS, O. M.; ROCHA, M. de M.; PÚBLIO, A. P. P. B.; BANDEIRA, A. da S. Características agronômicas de genótipos de feijão-caipi cultivados no sudoeste da Bahia. **Científica, Dracena, SP**, v. 45, n. 3, p. 223–230, 2017. DOI: 10.15361/1984-5529.2017v45n3p223-230

KOPKA, Joachim; SCHAUER, Nicolas; KRUEGER, Stephan; *et al.* GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. **Bioinformatics**, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti236>

LISEC, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature protocols**, 1(1), 387-396. doi: 10.1038/nprot.2006.59.

LONG, S. P.; Bernacchi, C. J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis? Procedures and sources of error, **Journal of Experimental Botany**, Volume 54, Issue 392, 1 November 2003, Pages 2393–2401, DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erg262>

MAIA, Maria Eduarda; MARTINS, Rafael Xavier; CARVALHO, Matheus; *et al.* Effects of atrazine, diuron and glyphosate mixtures on zebrafish embryos: acute toxicity and oxidative stress responses. **Ecotoxicology**, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-024-02839-8>

MATEOS-NARANJO, E; PEREZ-MARTIN, A. Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. **Chemosphere**, v. 93, n. 10, p. 2631–2638, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.094>

MATEOS-NARANJO, E., Redondo-Gómez, S., Cox, L., Cornejo, J., and Figueroa, M. E. (2009). Effectiveness of glyphosate and imazamox on the control of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 1694–1700. doi: 10.1016/j.ecoenv.2009.06.003

NASCENTES, Renan F; CARBONARI, Caio A; SIMÕES, Plínio S; et al. Low doses of glyphosate enhance growth, CO<sub>2</sub> assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. **Pest Management Science**, v. 74, n. 5, p. 1197–1205, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.4606>

OBATA, Toshihiro ; FERNIE, Alisdair R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, n. 19, p. 3225–3243, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1091-5>

PANG, Zhiqiang; LU, Yao; ZHOU, Guangyan; et al. MetaboAnalyst 6.0: towards a unified platform for metabolomics data processing, analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, v. 52, n. W1, p. W398–W406, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae253>

PÉREZ, Gonzalo & Vera, María & Miranda, Leandro. (2011). Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on **Aquatic Ecosystems**. DOI: 10.5772/12877.

QUEIROZ, C. S. DE et al. Combined NaCl and DTT diminish harmful ER-stress effects in the sorghum seedlings CSF 20 variety. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 147, p. 223–234, 1 fev.2020.

SERGIEV, Iskren G; ALEXIEVA, Vera S; IVANOV, Sergei V; et al. The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 85, n. 3, p. 139–146, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.01.001>

TARAZONA, Jose V; COURT-MARQUES, Daniele; TIRAMANI, Manuela; et al. Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 8, p. 2723–2743, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-017-1962-5>

VITAL, Roberto Gomes; ADRIANO JAKELAITIS; SILVA, Fábia Barbosa; et al. Physiological changes and in the carbohydrate content of sunflower plants submitted to sub-doses of glyphosate and trinexapac-ethyl. **Bragantia**, v. 76, n. 1, p. 33–44, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.540>

WANG, Yuru; CUI, Yidi; LI, Jing; et al. Glyphosate hormesis stimulates tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant growth and enhances tolerance against environmental abiotic stress by triggering nonphotochemical quenching. **Pest Management Science**, v. 80, n. 7, p. 3628–3639, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1002/ps.8067>

WILLIAMS, G. M.; Kroes, R.; and Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 31, 117–165. doi: 10.1006/rtpb.1999.1371

WINTER, Gudrun; TODD, Christopher D; TROVATO, Maurizio; et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00534>

WITTE, Claus-Peter. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 431–438, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.11.010>

YANNICCARI, Marcos; TAMBUSSI, Eduardo; ISTILART, Carolina; et al. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 210–217, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.05.027>

ZANDALINAS, Sara I; BALFAGÓN, Damián; GÓMEZ-CADENAS, Aurelio; et al. Responses of plants to climate change: Metabolic changes during abiotic stress combination in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 73, n. 11, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erac073>

ZOBIOLE, L. H. S., Kremer, R. J., de Oliveira, R. S. Jr., and Constantin, J. (2012). Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** 175, 319–330. doi: 10.1002/jpln.201000434

ZULET-GONZALEZ, Ainhoa; GORZOLKA, Karin; DÖLL, Stefanie; et al. Unravelling the Phytotoxic Effects of Glyphosate on Sensitive and Resistant *Amaranthus palmeri* Populations by GC–MS and LC–MS Metabolic Profiling. **Plants**, v. 12, n. 6, p. 1345, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12061345>