

CARLOS EDUARDO SOUZA CRUZ

**RESPOSTAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM *Eugenia uniflora*
L. (MYRTACEAE) AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Cruz, Carlos Eduardo Souza, 1990-
C957r Respostas morfoanatômica e fisiológicas em *Eugenia*
2016 *uniflora* L. (Myrtaceae) ao herbicida Glifosato / Carlos Eduardo
Souza Cruz. – Viçosa, MG, 2016.
xi, 46f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Luzimar Campos da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.25-32.

1. Pitanga - Morfologia. 2. Pitanga - Fisiologia. 3. *Eugenia
uniflora*. 4. Pitanga - Efeito do herbicida. 5. Produtos químicos
agrícolas - Toxicidade. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação
em Botânica. II. Título.

CDD 22. ed. 583.765

CARLOS EDUARDO SOUZA CRUZ

**RESPOSTAS MORFOANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS EM *Eugenia uniflora*
L. (MYRTACEAE) AO HERBICIDA GLIFOSATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para a obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de abril de 2016.

Kacilda Naomi Kuki

Cléberson Ribeiro
(Coorientador)

Luzimar Campos da Silva
(Orientadora)

*Aos meus queridos pais, irmãos, tias e vó,
por tudo que sou, através de seus conselhos,
convivência e educação me ensinaram como
ser uma pessoa boa e me ajudaram a alcançar
meus sonhos e construir como vocês o caráter!*

DEDICO.

**“Pelo Senhor é que foi feito tudo isso:
Que maravilhas ele fez a nossos olhos!
Este é o dia que o Senhor fez para nós,
alegremo-nos e nele exultemos!”**

Salmo 117: 23-24.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em quem acredito, por tudo que me possibilitou realizar, pela presença constante em minha vida e por ouvir minhas orações.

À Universidade Federal de Viçosa, por toda estrutura para estudo no período em que tive a oportunidade de estar aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica e ao Departamento de Biologia Vegetal, pela oportunidade de realizar o mestrado. Agradeço ao Ângelo, por todo o suporte administrativo na pós-graduação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Botânica, meus sinceros agradecimentos pela formação.

À professora Luzimar Campos da Silva, por confiar em meu trabalho, pela orientação pessoal e profissional prestada ao longo do mestrado.

Ao professor Cléberon Ribeiro, pela contribuição como coorientador desta dissertação, pela disponibilidade em avaliar as plantas e pela colaboração na banca de defesa.

À Kacilda Naomi Kuki, pela relevante colaboração na banca de defesa e pelo curso de Avaliação das Trocas Gasosas em Plantas que foi ministrado.

Ao Luiz, que gentilmente aplicou o herbicida na plantas.

Aos professores da Fisiologia Vegetal que permitiram utilizar os laboratórios e equipamentos para realização das análises da dissertação. Ao técnico Rogério Gomide, da Unidade de Crescimento de Plantas, por ser prestativo e permitir usar equipamentos e a bancada da casa de vegetação. Ao pós-doutorando Samuel e aos pós-graduandos dos laboratórios, pelo esclarecimento das dúvidas e pela ajuda com os equipamentos. Ao Paulo, do lab. de sementes, pela ajuda com o condutivímetro.

Ao pessoal do Núcleo de Microscopia e Microanálise da UFV, pela ajuda no preparo do material de microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Renê Chagas da Silva, do Departamento de Física, por permitir utilizar o Microscópio Eletrônico de Varredura.

Às técnicas do laboratório de Anatomia Vegetal, Aurora e Patrícia, por serem pessoas especiais e essenciais, esclarecendo todas as dúvidas sobre os procedimentos, desde a disciplina de métodos, por acompanhar e se preocuparem com o desenvolvimento dos trabalhos, enfim o carinho.

Aos amigos e colegas que construí no laboratório, dos vários departamentos, meu agradecimento por sempre estarem ali me animando, torcendo e tornando o trabalho menos cansativo. Andréa, Brenda, Carol, Dayana, Dya, Ítalo, Ivan, Marinalva, Samara, Tiago, Valéria, Vanessa e aos “bics”. Aqueles que conviveram comigo e que se sentirem incluídos sintam meu abraço.

Em continuação aos amigos que o laboratório me proporcionou não posso deixar de citar alguns nomes que foram providenciais para mim, que deixaram marcas profundas e nunca serão esquecidos. A Katiúscia, que apelidei apenas pelo sobrenome Freire, que é uma segunda amiga-irmã que foi construída pelo mestrado e benção de Deus, agradeço pela presença constante em minha estadia em Viçosa, ajudando nas coletas e no lab., rindo e sendo amiga. A verdadeira e única “Presidenta”, apelido de Luana, você foi muito especial comigo, gente finíssima, valeu pelas várias gargalhadas e ótimas confraternizações. À Isabel, por ter sido uma companhia de vários serões no lab., sempre presente e muito prestativa. À Daniela Fernandes, a “Bananecker”, grande pessoa e muito gentil, obrigado pela ajuda e divertidas conversas. À Juliana Xavier, pela ajuda com o resumo em inglês e pela amizade.

Ao grupo de estudo da Luzimar, egressos e atuais, graduandos ou pós-graduandos, que foram muito importantes para construção do projeto e com discussões relevantes. André, Daniel, Elisa, Guilherme, Larisse, Marina, Nágila, Talita, Talles, Thamires e Tiago (Tica). Valeu galera!

Em especial agradeço a Larisse, por compartilhar um pouquinho do seu conhecimento sobre o glifosato e sobre as mudas de *Eugenia uniflora*. Não posso me abster de agradecer de maneira especial também ao Guilherme, um verdadeiro poço de conhecimento, sem sua ajuda os resultados do MEV não seriam alcançados para a defesa, e muito obrigado pela amizade.

À galera do forró, pertencentes ao seletto grupo “Kidsgrama”, agradeço a Deus por ter conhecido vocês, os senhores são 10... são 1000. A estadia em Viçosa não seria tão boa sem as importantes reuniões, reflexões, e churrascos na ‘Fazenda’. Aquele carinhoso abraço de agradecimento para Regiane, Michele, Jussara, Cida, Heber e outros. Estendo meu agradecimento à família da Regiane que sempre nos recebeu tão bem na ‘Fazenda’.

Se é para agradecer por momentos de descontração, agradeço a família da Luzimar, principalmente ela e o Alvinho, que foram sempre muito atenciosos comigo em sua casa. Concluindo, eu me senti muito bem acolhido na casa de vocês e o lado profissional estava em construção. Só tenho a agradecer por tudo e rezo a Deus que esta família continue sendo abençoada.

À galera da “Terça Concreta” e do LEEP (Alaísma, Nayara, Gustavo, Pedro, Júnia, Fernando F., Carla, Fábio, Prímula, Lucas, Cristielle, Evandro, Carol, Ronaldo, Juan e Alex), valeu por todos os momentos construtivos kkkk. Agradeço a amizade da Alaísma que me incentivou muito a fazer o mestrado e durante o início do curso. À galera do Futebol da Botânica e da Pelada da Fisiologia, obrigado pelos momentos de diversão.

À Ana Paula Pires Marques, que foi uma verdadeira amiga que Deus e o mestrado me permitiram fazer. Agradeço pela força e companhia na realização do trabalho, pegando pesado, tanto no trabalho braçal quanto intelectual, esclarecendo dúvidas e discussão do trabalho. Obrigado! “Não vá chorar quando eu for embora”.

Aos jovens amigos (não espalhem para eles, kkkkkkkkk) e com quem tive o privilégio de morar na mesma casa, durante todo o período do mestrado ou por um tempo. Aos grandes, Colômbia (Álvaro), Guidoal (Daniel), Recife (Ivanilson) e Caian (novato e sem apelido), agradeço pelo tempo de convivência e pelos momentos grandiosos que jamais serão esquecidos. Que nosso sugestivo grupo de “whats” não deixe que este vínculo acabe. O Colômbia me disse certa vez que a minha chegada foi providencial, pois precisava de uma pessoa um pouco mais séria para balancear com as criancices de vocês. Só digo uma coisa: podem chorar sim no Leão. O que eu disse lá foi verdadeiro e me sinto extremamente feliz de tê-los conhecido. Eu tenho um defeito grave que preciso melhorar, deixo de fazer visitas aos amigos que faço. Acredito que

seja uma maneira de proteção, assim, esta dissertação sempre será a lembrança de uma amizade construída em pouco tempo, porém, duradoura.

Agradeço ao Recife e Guidoal por todo o apoio braçal na construção e na obtenção de resultados desta dissertação.

Agradeço aos professores da educação básica que foram essenciais para minha formação. Aos professores da graduação e do curso técnico, obrigado pelos ensinamentos. Meu agradecimento especial a professora Dayana Francino, que foi a grande incentivadora para realizar o mestrado na UFV.

Por último, e mais importante, agradeço o apoio da minha família, que são tudo para mim e a quem devo tudo. São eles que me conhecem realmente, sabem dos meus sonhos, das minhas lutas, sabem que sou chato e cabeça-dura. À meu pai e minha mãe, Edvan e Lurdinha, meu agradecimento por tudo que deixaram de fazer por vocês para fazerem por seus filhos. Aos meus irmãos, Gu e Caio, agradeço pelo companheirismo e por se importarem comigo. Às minhas tias, Ordália e Neusa, que são duas mães para mim e para os meus irmãos, tenho muita dívida com as senhoras, principalmente Tia Ordália, que largou sua vida em Senador Mourão para cuidar dos “bebês” em Diamantina. À minha querida vó, Nazinha, e aos meus tios, Consolação, Zezinho, Milton e Carlinhos, que torcem muito por mim. Aos parentes de Planalto, os meus primos, aos verdadeiros amigos e colegas, obrigado pela torcida!

BIOGRAFIA

Carlos Eduardo Souza Cruz, filho de Edvan da Imaculada Cruz e Maria de Lourdes Souza Cruz, nasceu em Diamantina- Minas Gerais- Brasil, em 16 de maio de 1990. Coursou o ensino básico na Escola Estadual Artur Tibães do distrito de Senador Mourão- MG, concluído em dezembro de 2008. Concluiu curso Técnico em Enfermagem pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial de Diamantina- MG em fevereiro de 2012. Em fevereiro de 2014, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina- MG.

Em março de 2014, iniciou o Mestrado em Botânica, pelo Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa- Viçosa- MG. Concluindo o curso, em abril de 2016, com a defesa da dissertação intitulada “Repostas morfoanatômicas e fisiológicas em *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) ao herbicida glifosato”.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESE E QUESTÕES A SEREM RESPONDIDAS.....	4
3. OBJETIVOS.....	5
3.1 Geral.....	5
3.2 Específicos.....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	5
4.1 Material vegetal e condição experimental.....	5
4.2 Quantificação de ácido chiquímico.....	6
4.3 Determinação do índice SPAD.....	7
4.4 Teores pigmentos fotossintéticos.....	7
4.5 Permeabilidade de membranas.....	7
4.6 Determinação da peroxidação lipídica.....	8
4.7 Medidas de trocas gasosas.....	8
4.8 Sintomatologia visual e fitotoxicação.....	9
4.9 Microscopia de luz.....	9
4.10 Microscopia eletrônica de varredura.....	10
4.11Análises estatísticas.....	10
5. RESULTADOS.....	10
5.1 Sintomatologia visual e fitotoxicação.....	10
5.2 Teor de ácido chiquímico.....	11
5.3 Índice SPAD.....	12
5.4 Pigmentos fotossintéticos.....	12
5.5 Extravasamento de eletrólitos (EE).....	12
5.6 Peroxidação lipídica.....	13
5.7 Trocas gasosas.....	13
5.8 Microscopia de luz.....	14
5.9 Microscopia eletrônica de varredura.....	15
6. DISCUSSÃO.....	16
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	25
9. FIGURAS.....	33

RESUMO

CRUZ, Carlos Eduardo Souza, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2016. **Respostas morfoanatômicas e fisiológicas em *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) ao herbicida glifosato.** Orientadora: Luzimar Campos da Silva. Coorientador: Cléberon Ribeiro.

Com o interesse de aumentar a produtividade na agricultura foram introduzidos uma série de produtos químicos no combate a plantas daninhas, entre eles o glifosato, que é o herbicida mais utilizado mundialmente. Contudo, trabalhos recentes têm destacado o glifosato como um poluente ambiental podendo persistir no solo e água. Devido à deriva, durante a aplicação, este pode alcançar fragmentos florestais próximos às áreas de plantações, atingindo plantas nativas, como *Eugenia uniflora* L., que é uma espécie nativa de Mata Atlântica e tem sido utilizada em trabalhos de biomonitoramento. Assim, esse trabalho tem o objetivo de avaliar a toxicidade do herbicida glifosato em *E. uniflora*. Mudanças foram adquiridas, aclimatadas em casa de vegetação, cultivadas em substrato e fertilizadas com solução nutritiva de Hoagland, a meia força iônica em pH 5.5. As plantas foram submetidas à simulação da deriva de diferentes doses do herbicida (0, 144, 432, 864 e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato), aplicada por um pulverizador costal com pressão constante mantida por CO₂ pressurizado. Foram realizadas análises dos parâmetros de trocas gasosas, sintomatologia visual, fitotoxicação, análises anatômicas, quantificação de ácido chiquímico, determinação do índice SPAD, quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos, permeabilidade da membrana e quantificação de malondialdeído. Os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Scott Knott ($P < 0,05$). Os sintomas visuais começaram a ser observados após três dias da aplicação e foram mais evidentes em folhas mais jovens. Ocorreu incremento do teor de ácido chiquímico e alterações morfoanatômicas, sendo possível verificar redução dos teores de pigmentos, comprometimento da permeabilidade da membrana e peroxidação lipídica. O glifosato promoveu decréscimo dos parâmetros de trocas gasosas, independente da dose. Conclui-se que *E. uniflora* apresentou sensibilidade ao glifosato, mesmo à menor dose utilizada, ocasionou alterações morfoanatômicas e fisiológicas na planta, demonstrando ser um risco para plantas nativas presentes em fragmentos próximos à áreas de plantação e aplicação constante do herbicida.

Palavras-chave: ácido chiquímico, agrotóxico, danos morfofisiológicos, glyphosate, pitanga.

ABSTRACT

CRUZ, Carlos Eduardo Souza, M.Sc., Federal University of Viçosa, April, 2016. **Morphoanatomic responses and physiological in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) the herbicide glyphosate.** Adviser: Luzimar Campos da Silva. Co-adviser: Cléberon Ribeiro.

In the interest of increasing the productivity in agriculture they were introduced a series of chemicals to combat weeds, including glyphosate, herbicide which is the most used worldwide. However, recent studies have highlighted the glyphosate as an environmental pollutant may persist in soil and water. Due to drift during application, this can reach forest fragments near the crop areas, reaching native plants such as *Eugenia uniflora* L., which is a native species of the Atlantic Forest and has been used in biomonitoring studies. So, this work has to evaluate the toxicity of glyphosate in *E. uniflora*. Seedlings were purchased, acclimated in the greenhouse, grown in substrate and fertilized with Hoagland, half ionic strength at pH 5.5. The plants were under simulated drift of different doses of the herbicide (0, 144, 432, 864 and 1440 g e.a ha⁻¹ the glyphosate) applied by a knapsack sprayer with constant pressure maintained by pressurized CO₂. Analyses were carried out of gas exchange parameters, visual symptoms, phytotoxicity, anatomical analysis, quantification of shikimic acid, determining the SPAD index, measuring the levels of photosynthetic pigments, membrane permeability and quantification of malondialdehyde. Data were submitted to variance analysis, and compared means, by Scott Knott test at 5%. In the third day after of application the experiment visual symptoms began to be observed and were more evident in younger leaves. There was an increase of shikimic acid content and morphoanatomic, it is possible to verify reducing pigment levels, impaired membrane permeability and lipid peroxidation. Glyphosate promoted decrease in gas exchange parameters, independent of dose. It concludes that *E. uniflora* showed sensitivity to glyphosate, even at the lowest dose used caused morphoanatomic and physiological changes in the plant, proving to be a risk to native plants present in fragments near planting areas and constant application of the herbicide.

Keywords: shikimic acid, pesticides, morphophysiological damage, glyphosate, cherry.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é um dos setores de produção da sociedade responsável por boa parte dos poluentes liberados no ambiente, perdendo apenas para o setor industrial, promovendo grandes extensões de contaminação ambiental e pela toxicidade dos produtos empregados se tornam problema para diversos organismos (Gilmore, 2001; Hoai *et al.*, 2011).

Para aumentar a produção agrícola e tentar sanar as dificuldades na produtividade de alimentos (Amarante Júnior *et al.*, 2002), além da inserção de produtos químicos na agricultura, mais áreas florestais têm sido devastadas para estabelecimento das plantações de interesse econômico (Young, 2006). Nas plantações, o uso de agrotóxicos gera resíduos contaminantes para o solo, água e ar que atingem organismos não alvos (Castro Júnior *et al.*, 2006; Coutinho e Barbosa, 2007). Assim, além de contaminar a área da plantação pode ocorrer a contaminação dos fragmentos próximos as áreas plantadas e, como consequência, plantas nativas podem ser alvos desses poluentes.

Um dos grandes problemas na agricultura com o uso de agrotóxicos é a deriva, cuja ocorrência promove a contaminação ambiental (Madureira *et al.*, 2015). Deriva é tratada como tudo aquilo que não atinge o alvo principal durante a aplicação do agrotóxico (Christofoletti, 1999). Ozkan *et al.* (1993) classificaram a deriva como o movimento do agrotóxico para áreas que não sejam o local de interesse da aplicação, e ainda complementaram que a redução da deriva reduz a poluição ambiental. Dentre os agrotóxicos utilizados comumente na agricultura destacam-se os herbicidas.

No Brasil, devido à grande área cultivada, à escassez e ao alto custo de mão-de-obra no meio rural, o uso de herbicidas vem aumentando progressivamente (Brighenti *et al.*, 2002). Com a falta de fiscalização e cuidado com o uso do herbicida, essa prática tem aumentado a contaminação ambiental, afetando os organismos não alvos presentes nos diversos ambientes, pois esses produtos possuem alto poder de toxicidade (Coutinho e Barbosa, 2007).

Os herbicidas são utilizados na agricultura por desempenharem atividade de controle químico, agindo na remoção e controle de plantas daninhas, que competem com as plantas das culturas por diversos recursos (água, luminosidade, nutrientes, entre outros), afetando o desenvolvimento das plantas cultivadas (Werth *et al.*, 2008; Kuva *et al.*, 2008). Tuffi Santos *et al.* (2007) relataram que, algumas vezes, devido a aplicação

incorreta do herbicida, a própria cultura de interesse pode ser atingida, ocorrendo redução da produtividade e causando intoxicação da parte aérea.

Entre a diversidade de herbicidas encontrados no cenário agrícola destaca-se o glifosato (N-(fosfonometil) glicina), que contabilizou a venda de 185 mil toneladas de ingrediente ativo em 2013 no Brasil (Amarante Júnior *et al.*, 2002; Berg *et al.*, 2008; Werth *et al.*, 2008; IBAMA, 2014). O glifosato é aplicado no período de pós-emergência, com amplo espectro de ação, podendo causar injúrias em todas as espécies de plantas, atuando principalmente em regiões de crescimento (meristemas) (Smith *et al.*, 1986; Monquero *et al.*, 2004; Dill *et al.*, 2008). O glifosato é indicado no controle de plantas daninhas perenes ou anuais, monocotiledôneas ou eudicotiledôneas, em culturas de arroz irrigado, milho, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, pastagens, soja, fumo, uva, ameixa, algodão, cacau, entre outras (Rodrigues, 2005).

O glifosato, na classificação de toxicidade aos humanos, é considerado como quase não tóxico aos humanos (Williams *et al.*, 2000). Contudo, trabalhos recentes têm apresentado questionamentos sobre essa classificação, uma vez que tem sido destacado que o princípio ativo é neurotóxico e contribui no desenvolvimento de várias doenças (Samsel e Seneff, 2013; Seneff *et al.*, 2013; Samsel e Seneff, 2015). A Organização Mundial de Saúde (OMS) acrescentou o glifosato na classe dos produtos com potencial carcinogênico (IARC, 2015), o que tem provocado repercussão pelo uso do herbicida na agricultura. E na Câmara Federal Brasileira foi protocolado requerimento, sobre inscrição RIC 569/2015, que solicita ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento informações sobre a evolução do consumo de glifosato e os níveis de aplicação no Brasil (Brasil, 2015).

O principal meio de entrada da molécula de glifosato, na superfície foliar, é através da cutícula (Monquero *et al.*, 2004; Guimarães *et al.*, 2009). Logo após a absorção, ocorre a translocação simplástica, seguindo o fluxo do floema e tomando a mesma rota dos produtos fotossintetizados, da fonte para o dreno, tanto para folhas e meristemas aéreos quanto para os subterrâneos (Carlisle e Trevors, 1988; Monquero *et al.*, 2004). Dessa maneira, o movimento do herbicida na planta é favorecido pela translocação dos açúcares na planta (Carlisle e Trevors, 1988).

O mecanismo de ação do glifosato está relacionado à inibição da biossíntese de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), que são metabólitos secundários importantes para síntese protéica e divisão celular em regiões meristemáticas (Cole *et al.*, 1983; Binarová *et al.*, 1994). O glifosato interrompe a

atividade da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPs), que compete com o fosfoenol piruvato pelo sítio de ligação, impedindo assim, a formação de 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato e fósforo inorgânico (Amrhein *et al.*, 1980). A rota do chiquimato ocorre em plantas, microorganismos e fungos, e é interrompida antes da produção do corismato, produto final da rota e intermediário da biossíntese dos aminoácidos aromáticos (Amrhein *et al.*, 1980; Herrmann, 1995). Como consequência da inibição da rota, ocorre o acúmulo intracelular de ácido chiquímico (Carlisle e Trevors, 1988), sendo o principal marcador da ação do glifosato, que pode provocar injúrias foliares. Os danos e morte da planta podem ocorrer, uma vez que os aminoácidos aromáticos, produzidos pela rota, são precursores não somente de proteínas, mas também de metabólitos secundários importantes para proteção da planta e síntese de pigmentos foliares (Velini *et al.*, 2008).

Eugenia uniflora L. é uma espécie da família Myrtaceae, amplamente distribuída em países da América, entre os biomas brasileiros pode ser encontrada na Restinga (Assis *et al.*, 2004; Braz *et al.*, 2013) e outras fisionomias da Mata Atlântica (Ivanauskas e Rodrigues, 2000; Barddal *et al.*, 2003; Mochiutti *et al.*, 2008; Joly *et al.*, 2012). Conhecida popularmente como “pitangueira”, é muito utilizada na medicina popular no tratamento contra febre, doenças no estômago, hipotensão, gota e como hipoglicemiante (Lago *et al.*, 2011; Rattmann *et al.*, 2012). Além do fato de ser uma espécie nativa, também tem demonstrado sensibilidade quando exposta a poluentes aéreos, como: chuva ácida, ozônio, dióxido de enxofre e material particulado de ferro (Silva *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008; Neves *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2015b). *E. uniflora* tem sido utilizada em trabalhos de biomonitoramento, a qual tem mostrado alterações estruturais, fisiológicas e bioquímicas aos poluentes estudados.

O surgimento de sintomas visíveis ou não nas folhas e morte das plantas está associado não somente ao acúmulo de ácido chiquímico, mas também pela falha na produção de compostos secundários, desregulação do fluxo de carbono, redução na síntese de proteínas e deficiência de nutrientes, que reduzem os parâmetros fotossintéticos e da fluorescência da clorofila (Zobiolo *et al.*, 2010a). Dessa maneira, a fotossíntese é indiretamente alterada pela aplicação de glifosato por não ser um herbicida inibidor fotossintético e sim um inibidor da enzima EPSPs, uma vez que a molécula do herbicida inibe a rota do ácido chiquímico que é responsável pela biossíntese de intermediários que sintetizam a clorofila e proteínas (Zobiolo *et al.*, 2010a). Além do mais, nas plantas ocorre a formação contínua de espécies reativas de

oxigênio (EROs) como produto de vias metabólicas (Apel e Hirt, 2004), contudo em resposta à exposição ao glifosato pode ser ocasionado danos bioquímicos, por ocorrer o aumento na concentração de EROs, que promovem danos nas membranas celulares pela peroxidação lipídica (Araldi *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014).

A anatomia é uma das propriedades que podem ser alteradas pela ação do elemento xenobiótico, assim utilizada na investigação de danos em plantas, destacando-se pela possibilidade de identificação de danos microscópicos (colapso dos tecidos foliares, hiperplasia, hipertrofia, deformações celulares, formação de tecido de cicatrização, entre outros) antes que se possa verificar a presença de modificações à vista desarmada (cloroses, necrose, e morte) ocasionados por poluentes atmosféricos, pela aplicação de herbicidas ou de metais (Silva *et al.*, 2000; Sant'Anna-Santos *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006; Tuffi Santos *et al.*, 2008; Tuffi Santos *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2014; Freitas-Silva *et al.*, 2016).

Devido ao fato do glifosato ser o herbicida mais utilizado na agricultura, por apresentar potencial para contaminação ambiental e pela repercussão de seu uso, este trabalho tem interesse em verificar os potenciais efeitos do glifosato em *Eugenia uniflora*, que é uma planta nativa e que apresentou sensibilidade a poluentes aéreos.

2. HIPÓTESE E QUESTÕES A SEREM RESPONDIDAS

A hipótese a ser testada neste trabalho é:

A exposição da espécie nativa *Eugenia uniflora* L. ao glifosato pode acarretar alterações morfofisiológicas e bioquímicas em decorrência do acúmulo de ácido chiquímico nos tecidos foliares.

As perguntas a serem respondidas com o presente trabalho são:

Doses diferentes de glifosato podem causar diferentes níveis de toxidez? Ocorrem alterações anatômicas e fisiológicas em *Eugenia uniflora* devido a simulação da deriva do herbicida glifosato? Os parâmetros de trocas gasosas são modificados com diferentes dosagens de glifosato? A partir de quantos dias após a aplicação do tratamento ocorrem os sintomas visuais? A quantidade de ácido chiquímico na folha altera com as distintas doses de herbicida?

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a toxicidade de diferentes dosagens do herbicida glifosato na espécie nativa *Eugenia uniflora*.

3.2 Específicos

Identificar alterações anatômicas nas folhas de *Eugenia uniflora* exposta a diferentes doses de glifosato, utilizando Microscopia de Luz e Microscopia Eletrônica de Varredura;

Identificar alterações dos parâmetros fisiológicos (fotossíntese, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO₂) e dos pigmentos fotossintéticos;

Determinar a quantidade do ácido chiquímico acumulado pelas plantas nos tratamentos com glifosato;

Avaliar a permeabilidade das membranas e a produção de malondialdeído em resposta a exposição ao glifosato.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal e condição experimental

O estudo foi realizado em casa de vegetação durante o período de julho de 2014 a fevereiro de 2016, na Unidade de Crescimento de Plantas (UCP), do Departamento de Biologia Vegetal, pertencente à Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (649 m altura, 20° 45' 20" S e 42° 52' 40" N). Mudanças de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) foram doadas para cultivo e pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF), transplantadas uma planta por vaso, em vasos de 2 L com substrato comercial de cultivo de mudas Bioplant Prata HT. As mudas receberam solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon 1950) a ½ força iônica em pH 5.5 durante a aclimação (julho de 2014 a janeiro de 2016).

Dois experimentos foram realizados, um em agosto de 2015 e outro em fevereiro de 2016. Para cada experimento foi realizado uma única aplicação dos tratamentos, com as seguintes doses do herbicida glifosato: 144 g e.a ha⁻¹, 432 g e.a ha⁻¹, 864 g e.a ha⁻¹, 1440 g e.a ha⁻¹ e um tratamento controle que recebeu pulverização com água. As doses correspondem a 10, 30, 60 e 100% da dosagem comercial usada para o controle de plantas daninhas em diversas plantações. Para aplicação dos tratamentos utilizou-se um

pulverizador costal com pressão constante mantida a CO₂ pressurizado, munido de barra com dois bicos leque TT110.02, operando a 250 KPa de pressão e 150 L de volume de calda.

No primeiro experimento, após 3 e 12 dias da aplicação do glifosato foram realizadas a determinação da fitotoxicação e 12 dias após a aplicação foi realizada coleta para microscopia. No segundo experimento, após 10, 11 e 12 dias da aplicação dos tratamentos, foram realizadas medições dos parâmetros de trocas gasosas com o uso de um analisador de gás no infravermelho (IRGA). No 12º dia após a aplicação, foram realizadas leituras para determinação do índice SPAD, e coletas de material para quantificação de ácido chiquímico, extravasamento de eletrólito, peroxidação lipídica e quantificação de clorofilas.

4.2 Quantificação de ácido chiquímico

Folhas do primeiro ao terceiro nó de quatro plantas por tratamento foram coletadas, no 12º DAA, embrulhadas em papel alumínio, colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C (IULT 335/710 Vertical, Indrel, Brasil). Posteriormente, foram maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C.

Para extração do ácido chiquímico, foi pesado 25 mg do material macerado e colocado em eppendorf de 2 mL, remacerado com 0,25 ml de HCL (ácido clorídrico), centrifugado a velocidade de 15.000 xg, em temperatura de 4°C durante 25 minutos (Singh e Shaner, 1998).

Para a quantificação do ácido chiquímico, o sobrenadante foi coletado (30 µL) e colocado em microtubo de 2 mL. Foram adicionados 500 µL de solução de ácido periódico a 1%, homogeneizados, posteriormente, e colocado em banho-maria a 37°C por 45 minutos. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas, e adicionados 500 µL de hidróxido de sódio (1N) e 300 µL de glicina (0,1 M). Após, foram homogeneizadas e colocadas no gelo por 20 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro UV/VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Fischer Scientific®, Madison, USA), à 380 nanômetros. A quantificação de ácido chiquímico foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ácido $4,76 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ (modificado de Gaitonde e Gordon, 1957; e Perez-Jones *et al.*, 2005).

4.3 Determinação do índice SPAD

Com a utilização de um colorímetro SPAD (SPAD-502, Minolta, Japão) foi estimada quantitativamente a intensidade da cor verde da folha *in situ*. Duas folhas de terceiro nó, por repetição, foram medidas. Em cada folha, foram realizadas três medições, uma na região apical, uma na região mediana e outra na região basal, utilizadas para cálculo da média para cada folha (Guimarães *et al.*, 1999).

4.4 Teores pigmentos fotossintéticos

Os teores dos pigmentos fotossintetizantes foram determinados utilizando como extrator a acetona 80% (Lichthenthaler, 1987). Folhas de segundo e terceiro nó, completamente expandidas, foram coletadas. As folhas foram envoltas por papel alumínio, colocadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C. Posteriormente, o material foi macerado e pesado. Em amostras de 40 mg de material acondicionado em ultrafreezer, foram adicionados 1 ml de acetona 80% e colocada em gelo por 30 minutos no escuro, em seguida, centrifugada a velocidade 15.000 xg, em temperatura de 4°C durante 10 minutos. Do sobrenadante foram coletados 500 µl da amostra e posteriormente armazenados em gelo. Com a outra parte do material, ocorreu repetição do processo e foi coletado mais 500 µl do sobrenadante. Os sobrenadantes foram juntados, homogeneizados e acondicionados em gelo por 20 minutos. Posteriormente, foram determinados os valores de absorbâncias do extrato (470, 646 e 663 nanômetros), que foram lidos em espectrofotômetro UV/VIS (Modelo Evolution 60S, Thermo Fischer Scientific®, Madison, USA). Os teores dos pigmentos foram calculados segundo a metodologia de Lichthenthaler (1987).

$$Cl_a = 12.25x A_{663} - 2.79x A_{646}$$

$$Cl_b = 21.51x A_{646} - 5.10x A_{663}$$

$$Cl_{total} = 7.15x A_{663} + 18.71x A_{646}$$

$$\text{Carotenóides} = (1000x A_{470} - 1.82x Cl_a - 85.02x Cl_b)/198$$

4.5 Permeabilidade de membranas

A permeabilidade de membranas medidas pelo extravasamento de eletrólitos foi quantificado segundo a metodologia de Szalai *et al.* (1996), com modificações. Seis discos foliares de 8 mm de diâmetro foram excisados de quatro repetições por tratamento, sendo retirados da região basal, mediana e apical, de folhas de segundo nó.

Os discos foram lavados e imersos, por três vezes, em água Mili-Q, acondicionados em tubo “falcon” de 15 mL com 5 mL de água Mili-Q, por dezoito horas à temperatura ambiente. A condutividade elétrica inicial (C1) foi aferida com um condutivímetro (DM-32, Digicrom Analítica Ltda, Campo Grande, Brasil). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em banho-maria à 95 °C por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente para resfriar. Após esse período a condutividade foi medida para obtenção da condutividade final (C2). O extravasamento de eletrólito foi expresso como porcentagem, através da formula:

$$EE (\%) = (C1/C2) * 100.$$

4.6 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídeos foi medida pela quantificação do indicador geral, o malondialdeído (MDA).

Amostras de 100 mg de folhas de *E. uniflora*, de segundo e terceiro nó, foram remaceradas em nitrogênio líquido com polivinilpolipirrolidona (PVPP), homogeneizadas com 1000 µL de tricloroacético (TCA) (p/v) e triton 1%, colocados em microtubo de 2ml no gelo. Os homogeneizados foram centrifugados a 10.000 xg, por 15 minutos à temperatura de 4°C. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi acondicionada a um tubo de rosca de 2 mL, adicionado 1,2 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5 % (p/v) em TCA 20% (p/v) e os tubos foram fechados, vortexados por 30 segundos e incubados em banho-maria a 95 °C por 25 minutos. Após esse período, a reação foi paralisada colocando os tubos em banho de gelo por 15 minutos. Posteriormente, foram centrifugados a 9.000 xg por 10 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada com leituras nos comprimentos de onda de 440, 532 e 600 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Evolution 60S, Thermo Fischer Scientific®, Madison, USA). A concentração do complexo aldeído malônico-TBA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (modificado de Du e Bramlage, 1992).

$$\{[(A_{532} - A_{600}) - (A_{440} - A_{600}) * 0,057] / 155000\} * 10000000$$

4.7 Medidas de trocas gasosas

As trocas gasosas (*A*, taxa de assimilação de CO₂- µmol CO₂ m⁻²s⁻¹; *g_s*, condutância estomática -µmol H₂O. m⁻²s⁻¹; *E*, transpiração - mmol m⁻²s⁻¹; e *C_i*,

concentração interna de CO_2 – $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) foram mensuradas utilizando analisador de gás em infravermelho LI-6400 (IRGA, LI-COR Biosciences Inc., Nebraska, USA) equipado com fonte de azul/vermelho modelo LI-6400-02B (LI-COR). De posse dos dados de trocas gasosas foi quantificada a eficiência instantânea da carboxilação (EiC) = (A/Ci) ($\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) (Machado *et al.*, 2005). Foram realizadas medidas em folhas do terceiro nó, já expandidas, por indivíduo em cada tratamento, no período da manhã (de 9-11 horas), aos 10, 11 e 12 DAA do herbicida.

4.8 Sintomatologia visual e fitotoxicação

Monitoramento do surgimento de sintomas visuais nas folhas foi realizado diariamente após a aplicação do glifosato até o dia da coleta. Registros fotográficos de sintomas visuais foram realizados no terceiro, quinto, nono, décimo primeiro e décimo segundo dia após aplicação (DAA) dos tratamentos, com o auxílio de uma câmera digital (Cyber-Shot DSC-W310, Sony Corporation, Japão). Os danos visuais do 3º e 12º dia foram usados para avaliar a fitotoxicidade do herbicida, empregando uma escala de porcentagem visual, no qual foi atribuído valores de 0 a 100% onde, 0%= sem sintoma de fitotoxicação e 100%= plantas com todas as folhas com danos ou morte da planta, na qual foi considerada a proporção de folhas na planta e as folhas que apresentaram cloroses, necroses, entre outros sintomas (adaptado de Foloni *et al.*, 2005).

4.9 Microscopia de luz

Amostras da região mediana das folhas com e sem sintomas visuais, próximas à nervura mediana, do segundo nó (com sintomas) e do quarto nó (sem sintomas visuais) de cada tratamento, foram coletadas no 12º DAA do herbicida. A classificação de folhas sintomáticas e assintomáticas foi realizada através de observações no decorrer do experimento e no dia da coleta. As amostras foram fixadas em Karnovsky (solução glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 4%, em tampão fosfato de sódio pH 7,2, acrescido de cloreto de cálcio 5mM) (Karnovsky, 1965), por 48 horas, e estocadas em etanol 70%. O material foi desidratado em série etílica, seguido pela inclusão em resina do tipo metacrilato (HISTORESINA LEICA®). Secções transversais com 6 μm de espessura, foram obtidas em micrótomo rotativo de avanço automático (modelo RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, USA), coradas com azul de toluidina pH 4,7 (O'Brien e McCully, 1981) e montadas em resina sintética Permound (Erv-Mount, Easy Path®).

4.10 Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de folhas do terceiro nó foram coletadas no 12º DAA para cada tratamento, e fixadas em Karnovsky. As amostras da região mediana próximas à nervura central foram seccionadas em aproximadamente 1 cm de comprimento. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série etílica, secas com CO₂ em equipamento de ponto crítico (Baltec, modelo CPD 030, Liechtenstein), afixadas em *stubs* com fita dupla face e cobertos com ouro em metalizador (Sputter Coater, marca Balzers, modelo FDU 010, Liechtenstein), pertencentes ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. O registro fotográfico foi realizado em microscópio eletrônico de varredura (JSM-610 LA, Jeol, Tokyo, Japan) pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa.

4.11 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos e quatro repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$). As análises foram efetuadas utilizando o programa ASSITAT (Assistência Estatística) da Universidade Federal de Campina Grande (Silva *et al.*, 2002).

5. RESULTADOS

5.1 Sintomatologia visual e fitotoxicação

O surgimento de sintomas visuais foi observado a partir do terceiro DAA do glifosato, principalmente nas folhas do segundo e terceiro nó. O primeiro sintoma verificado foi o amarelecimento das folhas com regiões oscilando entre o verde mais escuro e regiões cloróticas. As folhas do tratamento controle apresentaram coloração uniforme (Figura 1 A).

Os principais sintomas verificados durante o experimento foram: crescimento diferencial das folhas do mesmo nó (Figura 1 B), enrolamento foliar (Figura 1 G), “clorose atípica” ocorrendo a perda da cor verde escuro iniciando nos ápices e margens das folhas (Figura 1 D), clorose (Figura 1: B, E e F) e necrose foliar (Figura 1: C, E e H). Foi verificado também que folhas de primeiro nó não apresentaram a coloração

vermelho-arroxeadas como as do controle (Figura 1 I), sendo possível notar que as folhas do primeiro nó de tratamentos com glifosato apresentaram coloração verde (Figura 1J).

A partir do quinto DAA do herbicida os sintomas verificados progrediram nas plantas e foram mais evidentes, no qual se verificou enrugamento foliar (Figura 1 F) nas plantas dos tratamentos com 144, 432 e 864 g e.a ha⁻¹, desenvolvimento desigual das folhas de mesmo nó nos tratamentos 144 e 864 g e.a ha⁻¹, queda foliar e cloroses (típicas e atípicas) em todos os tratamentos, e necroses nos tratamentos 432, 864 e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato, mais evidenciado em folhas do primeiro a terceiro nó.

No nono DAA do herbicida foi possível verificar o surgimento dos sintomas nos outros nós. As plantas do tratamento de 864 g e.a ha⁻¹ desenvolveram cloroses, necroses e diferença de coloração das folhas do primeiro nó, assim como no tratamento de 1440 g e.a ha⁻¹ que apresentou perda da coloração arroxeadas das folhas do primeiro nó e enrolamento foliar. Em todos os tratamentos foi possível verificar necrose do ápice foliar. Nos dias subsequentes foi possível verificar que tanto as cloroses e necroses apresentaram o desenvolvimento dos danos de maneira parecida. Em poucos casos, foram verificadas necroses pontuais no centro da folha (Figura 1 C), tendo a maioria surgida nas margens e ápices da folha e avançando para a área central.

Com relação à fitotoxicação das plantas pelo glifosato, foi considerada a quantidade de folhas dos vasos e a proporção de folhas que apresentaram danos, sendo considerado todos os tipos de danos apresentados na descrição anterior.

No terceiro DAA do herbicida foi possível diferenciar a fitotoxicação entre as plantas do tratamento e os tratamentos pulverizados com o glifosato, independente da concentração usada. Já para o décimo segundo DAA, verificou-se que as plantas do tratamento de 1440 g e.a ha⁻¹ apresentaram maior proporção de folhas com danos, seguido pelo tratamento de 864 g e.a ha⁻¹, que não diferenciou do tratamento 432 g e.a ha⁻¹. Este por sua vez, foi mais tóxico que o tratamento de 144 g e.a ha⁻¹, e os tratamentos 432 e 144 g e.a ha⁻¹ não apresentaram diferença estatística quanto à proporção de danos nas folhas das plantas (Figura 2).

5.2 Teor de ácido chiquímico

Folhas de *Eugenia uniflora* apresentaram maior quantidade de ácido chiquímico nos tratamentos com glifosato. Enquanto as plantas do controle apresentaram 69.65 µg g⁻¹ MF de ácido chiquímico, plantas do tratamento 144 g e.a ha⁻¹ acumularam 32% a mais de ácido chiquímico em comparação ao controle, que não diferiu da concentração

1440 g e.a ha⁻¹. As plantas do tratamento com 432 g e.a ha⁻¹ acumularam 16% mais que o controle, e a dose 864 g e.a ha⁻¹ acumulou 28%. Já tratamento 1440 g e.a ha⁻¹ apresentou incremento de cerca de 33%, apresentando a maior quantidade de ácido chiquímico (Figura 3).

5.3 Índice SPAD

A intensidade da cor verde, determinada pelo colorímetro SPAD, foi maior nas plantas do tratamento controle (55.9), ocorrendo diferença significativa entre as médias dos tratamentos com pulverizados com glifosato. O tratamento 144 g e.a h⁻¹ não diferiu da dose 1440 g e.a h⁻¹, e os tratamentos 432 e 864 g e.a h⁻¹ não diferiram. O maior decréscimo ocorreu para dosagem de 144 g e.a h⁻¹, representando diminuição de aproximadamente 17%, em relação ao controle, seguido pelas doses 1440, 864 e 432 g e.a h⁻¹ (≅ 12, 9 e 8%, respectivamente) (Figura 4).

5.4 Pigmentos fotossintéticos

Ocorreu redução na quantidade da clorofila *a*, clorofila total e carotenóides, devido ao uso do glifosato. A clorofila *b*, entretanto, não apresentou diferença significativa (Figura 5).

A aplicação do herbicida promoveu nas plantas, que receberam a maior dose, a maior redução para clorofila *a* (≅ 32%), seguido pelos tratamentos 432 g e.a h⁻¹ (≅ 24%), 144 g e.a h⁻¹ (≅ 20%) e 864 g e.a h⁻¹ (≅ 14%), em relação ao controle (1.83 mg g⁻¹ MF) (Figura 5 A).

Para clorofila total, o glifosato promoveu maior diminuição no tratamento 1440 g e.a ha⁻¹ (25%), seguido pelos tratamentos 432 g e.a ha⁻¹ (20%) e o 144 g e.a ha⁻¹ (16%), em comparação ao controle (3.28 mg g⁻¹ MF). Já o tratamento 864 g e.a ha⁻¹ não diferiu na análise das médias em relação ao controle (Figura 5 C).

Para carotenóides, a dose 1440 g e.a h⁻¹ também apresentou a maior redução (≅ 54%), seguida pelos tratamentos 144 g e.a h⁻¹ (≅ 46%), 864 g e.a h⁻¹ (≅ 36 %) e 432 g e.a h⁻¹ (≅ 26%), em relação ao controle (0.52 mg g⁻¹ MF) (Figura 5 D).

5.5 Extravasamento de eletrólitos (EE)

O extravasamento de eletrólitos apresentou aumento em relação aos tratamentos, quanto maior a dose do glifosato maior foi a liberação de íons pelos discos foliares. O

tratamento com a dose 144 g e.a ha⁻¹ não apresentou diferença em relação ao controle. O tratamento com 432 g e.a ha⁻¹ de glifosato obteve incremento de \cong 53%, em comparação ao controle. O tratamento de 864 g e.a ha⁻¹ apresentou a segunda maior quantia de EE com aumento de \cong 60% em relação ao controle, não diferiu do tratamento 432 g e.a ha⁻¹. O EE da dose de 1440 g e.a ha⁻¹ apresentou aumento de aproximadamente 140% ao valor extravasado pelo controle (14.9%), diferindo de todos os outros tratamentos de pulverização do herbicida (Figura 6).

5.6 Peroxidação lipídica

E. uniflora apresentou incremento na peroxidação lipídica, sendo o maior valor encontrado a 432 g e.a ha⁻¹. Todos os tratamentos pulverizados com glifosato diferiram significativamente do controle (Figura 7).

Eugenia uniflora demonstrou aumento de aproximadamente 95, 143, 124 e 115% do marcador de estresse oxidativo malondialdeído (MDA) para os tratamentos 144, 432, 864 e 1440 g e.a h⁻¹ de glifosato, respectivamente, em relação ao controle (16.1 nmol g⁻¹ MF) (Figura 7).

5.7 Trocas gasosas

O glifosato provocou efeito negativo sobre as folhas de *Eugenia uniflora* em quase todos os parâmetros medidos, aos 10, 11 e 12 DAA do herbicida: taxa de assimilação de CO₂ (*A*) e condutância estomática (*gs*). A transpiração (*E*) e a eficiência instantânea de carboxilação (*EiC*) não apresentaram diferença significativa no 12º DAA do glifosato. Para a concentração interna de CO₂ (*Ci*) não houve diferença significativa (Figura 8).

A taxa de assimilação de CO₂ diferiu entre o controle, as doses 144 e 864 em relação as doses de 432 e 1440 g e.a h⁻¹ no 10 DAA do glifosato, já para os outros dias e para os outros parâmetros de trocas gasosas (*gs* e *E*) e a razão (*EiC*) não diferiram entre os tratamentos que receberam aplicação do herbicida, mas ocorreu diferença em relação ao controle (Figura 8).

Ocorreu diminuição de aproximadamente 57, 53 e 50% para (*A*), respectivamente, aos 10, 11 e 12 DAA do glifosato (Figura 8 A). (*gs*) reduziu cerca de 63, 56 e 52%, respectivamente, aos 10, 11 e 12 DAA do herbicida (Figura 8 B). A (*E*) foi 56 e 51% menores que as plantas do tratamento controle, aos 10 e 11 DAA do herbicida (Figura 8 C), e a razão (*EiC*) apresentou redução de aproximadamente 55 e

55% em comparação ao controle, aos 10 e 11 DAA do glifosato (Figura 8 F).

5.8 Microscopia de luz

Em conformidade com a descrição anatômica de Fontenelle *et al.* (1994), neste estudo, as folhas de *E. uniflora* apresentaram-se glabras, com espessa camada de cutícula cobrindo toda a epiderme das faces adaxial e abaxial. A epiderme da face adaxial é unisseriada e composta de células isodiamétricas. A epiderme da face abaxial possui uma camada de células, onde ocorre os estômatos, sendo as folhas hipoestomáticas (Figura 9 A; Figura 10 A). O mesofilo é dorsiventral, com parênquima paliçádico composto por uma camada de células alongadas, interrompidas por cavidades secretoras e idioblastos. O parênquima lacunoso apresenta de 7 a 9 camadas de células braciiformes, interrompidas por cavidades secretoras (Figura 9 A). A nervura mediana apresenta um feixe vascular biclateral, envolto por uma bainha de células parenquimáticas, com fibras na face ventral e dorsal. Ocorre colênquima anelar nas faces dorsal e ventral abaixo da epiderme (Figura 11 A).

Em relação às folhas assintomáticas, coletadas no quarto nó, que não apresentaram danos à vista desarmada, foram verificadas alterações microscópicas em todos os tratamentos. Em todas as plantas pulverizadas com as diferentes doses de glifosato ocorreu retração do protoplasto (Figura 9 B), acúmulo de compostos (Figura 9: B, C, D e I) provavelmente fenólicos, e de amido (Figura 9 C). É possível notar o acúmulo de compostos entre células epidérmicas e na junção com o parênquima paliçádico (Figura 9 C), região que corou intensamente com o azul de toluidina, onde se pode verificar posterior colapso celular.

Na epiderme, das duas faces da folha, verificou-se redução do tamanho de células com aumento do número destas (Figura 9 E). Outro dano na epiderme foi a ruptura das células, ocorrendo o colapso das mesmas (Figura 9: H e I). O parênquima paliçádico e o parênquima lacunoso apresentaram deformações do formato das células até o colapso (Figura 9: D, F, G e I), mas foi mais acentuado no parênquima paliçádico, ocorrendo nos tratamentos com doses de 864 e 1440 g e.a ha⁻¹. As cavidades secretoras também foram deformadas pela aplicação do herbicida, ocorrendo retração e colapso das mesmas (Figura 9: G e I).

As folhas sintomáticas, coletadas no segundo nó, demonstraram extensões maiores dos danos observados nas assintomáticas e apresentaram outros danos, como retração da face adaxial devido ao colapso das células do mesofilo e da epiderme

adaxial (Figura 10 C), danos nos feixes vasculares (Figura 10: D e G) e na nervura mediana (Figura 11: B e C). Como danos característicos entre os tratamentos pode-se notar: retração do protoplasto (Figura 10: B, E e I), retração das células das cavidades secretoras (Figura 10: B, C e F), colapso celular (Figura 10: D, F, G e I), alterações no formato das células epidérmicas (Figura 10 I) e acúmulo de compostos (Figura 10: H).

As regiões epidérmicas que apresentaram redução do tamanho celular e aumento da quantidade de células são locais em que ocorre o colabamento celular. O parênquima paliçádico foi um dos tecidos que mais apresentou danos, sendo verificado aumento na divisão de células, deformação das paredes, colapso e formação de espaços intercelulares. As cavidades secretoras apresentaram retração e colapso celular. Com a aplicação do herbicida o parênquima lacunoso apresentou células com paredes irregulares e colapso celular. O xilema, o floema, o colênquima e a bainha parenquimática apresentaram colapso de células.

A nervura mediana apresentou danos devido à aplicação do glifosato, com reentrâncias na face abaxial da nervura. O floema apresentou danos mais severos com o colapso celular. O xilema apresentou alteração no formato celular e obstrução de elementos de vaso. O colênquima e outras células parenquimáticas apresentaram deformação das paredes (Figura 11: B e C).

5.9 Microscopia eletrônica de varredura

A aplicação do glifosato sobre as folhas de *E. uniflora* ocasionou danos micromorfológicos em ambas as superfícies. A espécie apresenta, nas plantas do tratamento controle, epiderme glabra, relevo irregular e presença de células de cobertura das cavidades secretoras (Figura 12 A). A epiderme abaxial apresenta estômatos com células subsidiárias abaixo do nível das outras células epidérmicas e células-guarda elevadas (Figura 13 A), sendo os estômatos paracíticos (Figura 13 H).

Na face adaxial da folha, as células epidérmicas apresentaram perda da turgescência com aspecto enrugado (Figura 12: B e C). Ocorreram danos na cera epicuticular, na qual foi possível verificar o seu desprendimento (Figura 12: B, D, E e F), além de terem sido notadas regiões em que a cobertura de cera apresentou aspecto amorfo (Figura 12: C, E e F). Ocorreu proliferação de hifas fúngicas nos tratamentos 432, 864 e 1440 g e.a ha⁻¹ (Figura 12: D e E).

Na epiderme da face abaxial da folha foram visualizados danos semelhantes aos da epiderme adaxial, como aspecto amorfo da cera (Figura 13: B, C e E) e perda de

turgor celular. Entretanto, as alterações foram mais proeminentes com a elevação dos estômatos (Figura 13: C e E), alterações no relevo das células epidérmicas (Figura 13: B-E), colapso das cristas estomáticas e alteração no seu formato (Figura 13: B e D). Ocorreu, ainda, a deposição de cera, obliterando os estômatos (Figura 13 E) e próximo às células de cobertura das cavidades secretoras (Figura 13 F). Outros danos estomáticos foram a perda da turgescência das células-guarda que promoveu seu aprofundamento (Figura 13: G e J), redução do ostíolo (Figura 13: D e E) e ruptura das células-guarda (Figura 13I).

6. DISCUSSÃO

Os danos verificados nas folhas de *Eugenia uniflora* expostas à ação do glifosato, sejam intoxicação visual, alterações anatômicas, danos na membrana celular e interferência nos parâmetros de trocas gasosas são confirmados pela quantificação do ácido chiquímico, uma vez que é descrito como o principal marcador do efeito tóxico do herbicida nas plantas (Schrübbbers *et al.*, 2016). Somente a quantificação do ácido indica que o glifosato está afetando o metabolismo da planta, pois interrompe a via do chiquimato e promove acúmulo do composto.

E. uniflora apresentou incremento da quantidade de ácido chiquímico nas folhas das plantas pulverizadas com o glifosato, e mesmo o controle apresentou certa quantidade de ácido chiquímico. A via do chiquimato ocorre em plantas, fungos e microorganismos (Bochkov *et al.*, 2012). Bochkov *et al.* (2012) relataram que o ácido chiquímico encontrado nos tecidos e órgãos de diversas espécies plantas, variaram em quantidade e nos locais de armazenamento. O herbicida ao ser absorvido pela planta promove a interrupção da via do chiquimato e conseqüentemente ocorre o acúmulo de ácido chiquímico (Monquero *et al.*, 2004).

A maior concentração de ácido chiquímico pode promover danos para planta devido ao acúmulo intracelular do produto, e juntamente com o glifosato pode ocorrer danos citológicos (Campbell *et al.*, 1976; Haring *et al.*, 1998). Outros trabalhos, como Reddy *et al.* (2008) demonstraram que a quantidade do composto encontrado em 11 espécies, pertencentes a várias famílias, variaram de 2 a 904 $\mu\text{g g}^{-1}$ no tecido, em plantas não expostas ao herbicida. Corroborando com os resultados deste estudo, vários trabalhos descreveram o acúmulo de ácido chiquímico devido à aplicação de glifosato (Gomes *et al.*, 2015a; Gomes *et al.*, 2015b; Silva *et al.*, 2015a; Schrübbbers *et al.*, 2016). Vale ressaltar, entretanto, que os trabalhos descritos na literatura foram feitos com

plantas cultivadas ou plantas daninhas, sendo os trabalhos com espécies nativas à ação de herbicidas escassos.

O índice SPAD demonstrou redução dos tratamentos com glifosato em relação ao controle nas folhas de *E. uniflora*. Trabalhos relataram a utilização desse método para avaliar a resposta do glifosato, sendo destacados tempos variados. Zobiole *et al.* (2010a) encontraram redução do índice SPAD com 2 DAA do herbicida, e Foresti *et al.* (2015) encontraram redução do índice SPAD em folhas de laranjeiras a partir de 45 DAA quando expostas à glifosato, ocorrendo também queda foliar. Ressalta-se a importância da avaliação do índice SPAD, pois estima a clorofila por um método não destrutivo, podendo realizar as leituras ao longo do experimento. Os resultados confirmaram a ação do glifosato na planta e relaciona com o desenvolvimento de cloroses por danos na síntese de clorofila.

Outro importante método para análise da ação de poluentes sobre as plantas é a quantificação dos pigmentos fotossintéticos, sendo uma técnica em que se pode verificar o teor de clorofilas e carotenóides presentes nas folhas.

A redução dos pigmentos fotossintéticos é possivelmente devido ao acúmulo de ácido chiquímico, que indica a interrupção da rota do chiquimato. Sendo interrompida, acarreta na redução da produção dos precursores envolvidos na produção da clorofila, causada pela interrupção da via do chiquimato que é responsável pela formação de proteínas importantes na síntese de pigmentos. A redução da clorofila *a* e da clorofila total deve-se também a deficiência nutricional promovida pela atividade quelante atribuída ao glifosato e pela formação de espécies reativas de oxigênio que promovem a degradação dos cloroplastos, como relatado Zobiole *et al.* (2010c), Mateos-Naranjo e Perez-Martin (2013), Kaspary *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2014). Mateos-Naranjo e Perez-Martin (2013) indicaram, ainda, que a redução da clorofila é devido à redução de carotenóides ou a fotodestruição e inibição da biossíntese dos mesmos.

Os carotenóides diminuíram nos tratamentos com glifosato, sendo a maior dose do herbicida apresentando a maior redução. Dado semelhante foi encontrado por Mateos-Naranjo e Perez-Martin (2013) e Kaspary *et al.* (2014), enquanto Silva *et al.* (2014) verificaram aumento de carotenóides. Esses pigmentos são importantes por atuarem na proteção antioxidativa da planta contra estresse (Apel e Hirt, 2004; Mittler *et al.*, 2004), de qualquer natureza. Assim, sua diminuição pode favorecer a formação de EROs por serem responsáveis por parte da extinção molar de radicais livres.

A diminuição dos pigmentos é devido à degradação de clorofilas em decorrência

de um possível estresse oxidativo, que se instala nas plantas. Este estresse oxidativo é comprovado pelo incremento na produção de malondialdeído (MDA), que é gerado pela ação das EROs nos fosfolipídios das membranas. Azevedo Neto *et al.* (2006) relataram que este é o principal indicador da ocorrência de danos oxidativos nas células e apontam a formação de EROs, que desencadeiam o processo de peroxidação. Silva *et al.* (2014) relataram que as EROs e o etileno são responsáveis por induzirem a produção de enzimas de degradação de fosfolipídios e promoverem a diminuição da estabilidade da membrana.

A ação do glifosato como agente indutor de estresse oxidativo e a ação das EROs nas membranas levaram ao aumento no extravasamento de eletrólitos das plantas submetidas ao herbicida com o aumento das doses. Silva *et al.* (2014) relataram aumento do extravasamento de eletrólitos com crescentes concentrações de glifosato em relação com as horas após a aplicação. Os autores atribuíram este fato à ocorrência de foto-oxidação com degradação das membranas devido à síntese de etileno, destacando ainda que a formação de EROs promoveu alterações bioquímicas, fisiológicas e estruturais. A redução na quantidade de carotenóides pode indicar que as plantas estejam em estresse oxidativo e ocorrendo a formação de EROs, ocasionando danos nas membranas. Contudo, trabalhos futuros devem contemplar estudos sobre a formação de EROs, e do etileno. Ressalta-se que o etileno apresenta como precursor um produto da rota do chiquimato que é interrompida pelo glifosato, assim, a ação do etileno pode ser devido à desregulação na sua síntese.

Este estudo é um dos primeiros a procurar entender a os efeitos do glifosato nos parâmetros trocas gasosas em uma espécie nativa, enquanto outros trabalhos tiveram como enfoque plantas daninhas ou cultivadas. Foi possível verificar que o conjunto de alterações ocasionadas em *E. uniflora* proporcionou uma abrupta queda nos parâmetros de trocas gasosas. Outros trabalhos que utilizaram plantas daninhas ou cultivadas apresentaram dados parecido com o presente estudo, como Zobiolo *et al.* (2010 a; b; c) estudando a cultivar *Glycine max*, Mateos-Naranjo e Perez-Martin (2013) com a planta daninha *Bolboschoenus maritimus*, Silva *et al.* (2014) com a cultivar *Raphanus sativus*, e Andrade Silva *et al.* (2015) com as daninhas *Bidens pilosa* e *Commelina benghalensis*.

Os resultados do presente trabalho demonstram a ação do glifosato sobre as trocas gasosas, corroborando com outros trabalhos que descrevem a relação da interrupção da rota do chiquimato com o acúmulo de ácido chiquímico, promovendo alterações de parâmetros fotossintéticos. Importantes danos que interferem nas trocas

gasosas foram as alterações na clorofila ou cloroplastos que ocorreram e foram verificadas pela redução de pigmentos fotossintéticos e pelo surgimento de sintomas visuais. *E. uniflora* demonstrou alta redução da (*A*), (*gs*) e (*E*), que além dos fatos citados relaciona-se com danos estruturais, principalmente, nos estômatos. A (*gs*) é o principal parâmetro afetado pelas alterações estomáticas observadas, que por sua vez promove a redução da (*A*). Além disso, alterações dos parâmetros de trocas gasosas estão relacionadas com a desregulação do fluxo de carbono, uma vez que 20% do total de carbono fixado, em condições ideais, é direcionado para rota do chiquimato (Duke e Powles, 2008). Assim, com a interrupção da atividade da enzima EPSPs, o carbono acumula e não prossegue na rota, o que favorece a falta de carbono para outras rotas essenciais ao desenvolvimento e processos fisiológicos da planta (Duke e Powles, 2008). Zobiolo *et al.* (2010b) indicaram que essas alterações podem estar relacionadas a deficiência nutricional e por problemas na síntese de clorofila ou degradação do cloroplasto. A redução da (*gs*) ocasiona decréscimo da taxa de assimilação de CO₂ e da transpiração foliar, devido ao fechamento estomático (Fuchs *et al.*, 2002).

Apesar dos estômatos terem apresentado uma série de danos, verificados na microscopia eletrônica de varredura, não ocorreu alteração na concentração interna de CO₂. Com a ruptura das cristas estomáticas e perturbações nas células-guarda, os estômatos perderam a capacidade de controle e fechamento, ocorrendo entrada CO₂ na planta, como sugerido por Magalhães Filho *et al.* (2008), Rocha *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2015b).

Apesar da (*Ci*) não ter demonstrado resultado significativo, porém no caso da (*EiC*), o glifosato promoveu redução em dois dias avaliados, indicando que a atividade da enzima Rubisco foi comprometida. Farquhar *et al.* (1982) relataram que o aumento de (*A*) é limitado pela capacidade da folha em regenerar rubisco ou prosseguir a atividade para carboxilação. O glifosato interfere na carboxilação, uma vez que, pode promover redução na produção de várias proteínas importantes que são sintetizadas na via do chiquimato, e como consequência diminui a taxa de assimilação de CO₂. A redução da (*EiC*) está relacionada ainda ao acúmulo de amido evidenciado pela microscopia de luz, uma vez que o carbono assimilado e não exportado é direcionado para a formação do mesmo (Cruz *et al.*, 2004). Robinson (1996) atribuiu o acúmulo de amido devido a redução na demanda por fotoassimilados para a formação aminoácidos e proteínas e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade para sua produção. Dessa maneira, a redução da (*EiC*), que evidencia o efeito do glifosato sobre a Rubisco,

promove a redução da (A). A redução de (A) é devido a redução no teor de clorofila, aumento da peroxidação lipídica e pelo decréscimo na eficiência de carboxilação, promovido pelo efeito na Rubisco.

Conseqüentemente, devido aos danos bioquímicos e fisiológicos evidenciados pela ação do glifosato foi possível verificar alterações morfoanatômicas. Os sintomas visuais de fitotoxicação já foram evidentes em *Eugenia uniflora* no terceiro dia após a aplicação do glifosato, enquanto em outros trabalhos essa resposta foi verificada com tempos maiores. Foloni *et al.* (2005) destacaram a fitotoxicação com 20 DAA de glifosato para *Glycine max*, *Panicum maximum*, *Eleusine indica*, *Desmodium tortuosum*, *Tridax procumbens* e *Acanthospermum australe*. Tuffi Santos *et al.* (2005) verificaram alta intoxicação para *Brachiaria decumbens* com 15 DAA, Araldi *et al.* (2011) observaram com 7 DAA para *B. decumbens*, Carvalho *et al.* (2015) constataram em *Benghal dayflower* com 14 DAA, assim como, Gomes *et al.* (2015b) para *Zea mays*. As espécies de plantas, de maneira geral, apresentam respostas distintas quando expostas a diversos poluentes, neste estudo a planta nativa *E. uniflora* apresentou ser mais susceptível ao glifosato apresentando respostas em período menor ao comparado à plantas daninhas ou cultivadas. Assim, constata-se o risco de plantas nativas, presentes em fragmentos próximos à áreas cultivadas, serem alvos da deriva gerada pela aplicação do glifosato.

Os sintomas visuais relatados na literatura como efeito do glifosato foram “amarelecimento foliar”, clorose, necrose, enrugamento e enrolamento foliar (Brandle *et al.*, 1977; Tuffi Santos *et al.* (2005; 2008; 2009); Silva *et al.*, 2014; Araldi *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2011; Zobiolo *et al.*, 2010a). Entretanto, ainda não tinha sido descrito o desenvolvimento desigual de folhas de mesmo nó, a perda da coloração vermelho-arroxeadada e a clorose atípica, esta apresentou o desenvolvimento como “desbotamento foliar” visualizados em *E. uniflora*. Contudo, não existe uma especificidade dos sintomas visuais ocasionados pela toxicidade do glifosato, uma vez que estes são parecidos com as respostas a outros tipos de poluentes.

O primeiro sintoma observado nas folhas de *E. uniflora* neste experimento foi o “amarelecimento” foliar. As folhas apresentaram tonalidade mais clara de verde intercalando com o tom mais escuro. Esse sintoma ocorreu no terceiro dia após a aplicação do glifosato, fato que poderia ter sido confundido como fase de desenvolvimento foliar. Porém, foi verificado que esse sintoma era diferente do observado nas folhas jovens do tratamento controle. Os sintomas relacionados ao

desenvolvimento da folha podem estar relacionados à alteração na síntese de compostos importantes. A rota do chiquimato é importante por ser uma das principais envolvidas na produção de compostos secundários que são precursores na biossíntese dos hormônios do desenvolvimento, de proteção e das proteínas (Carlisle e Trevors, 1988). O glifosato é o principal agrotóxico que impede o funcionamento dessa rota (Amrhein, *et al.*, 1980; Gaspar *et al.*, 1996). O glifosato impede a síntese de auxina que proporciona alteração no desenvolvimento, o que pode justificar o desenvolvimento desigual de folhas de mesmo nó. O herbicida pode promover o amarelecimento foliar devido à indução da senescência foliar pela alteração na atividade do etileno e promover também a abscisão foliar. A redução da síntese de antocianina induz que as folhas de primeiro nó apresentem a cor verde diferente ao observado em folhas de *E. uniflora* sem aplicação do herbicida. Dessa maneira, fica evidente que a ação do glifosato na planta afeta o seu desenvolvimento e trabalhos que busquem entender melhor a ação do herbicida sobre metabólitos secundários, seus produtos, como hormônios (auxina e etileno) e antocianina serão importantes.

Os sintomas visuais de intoxicação verificados neste estudo, clorose e necrose, principalmente em folhas jovens foram atribuídos em outros trabalhos à mobilidade do glifosato na planta, uma vez que, ao penetrar na planta, este é translocado para folhas jovens e dessa maneira promove danos, principalmente, nas folhas dos primeiros nós (Kirkwood *et al.*, 2000), podendo ser acumulado dentro de célula e tecidos (Carlisle e Trevors, 1988). Ou ainda, devido à ineficiência na produção de aminoácidos aromáticos importantes para manter a síntese de proteínas, síntese de clorofila e por promover a degeneração de cloroplasto, acarretando em alterações das organelas, degradação de membranas e morte celular (Duke e Powles, 2008). O desenvolvimento de sintomas em folhas expandidas é justificado por Tuffi Santos *et al.*, (2009), que destacaram que apesar da mobilidade do glifosato ser direcionada para folhas jovens, podem ocorrer danos nas folhas totalmente expandidas devido a absorção, e complementam que doses altas podem causar danos apenas no local atingido pela aplicação ou desenvolvem a partir do dessa região.

Alterações anatômicas foram observadas em folhas de *E. uniflora*, mesmo nas que não apresentavam sintomas a vista desarmada. Portanto, podemos confirmar a importância de se avaliar a anatomia da planta como prognóstico do efeito de poluentes, como descrito por Tuffi Santos *et al.* (2008) para glifosato, e Sant'Anna-Santos *et al.* (2006) e Silva *et al.* (2006) para poluentes aéreos.

Danos anatômicos são relacionados na literatura à absorção do herbicida através da cutícula e à translocação, principalmente na via simplástica, ocorrendo lentamente. Dessa maneira, por apresentar alta toxicidade ou pela formação de metabólitos tóxicos para a planta, como o ácido aminometilfosfônico (AMPA), promove danos celulares por onde passa podendo, ainda, ser acumulado nas células (Carlisle e Trevors, 1988; Duke *et al.*, 2003). Danos epidérmicos podem estar relacionados ao local de contato do herbicida com a folha. Campbell *et al.* (1976) verificaram a ocorrência de alterações ultraestruturais, tais como desarranjo da membrana, descolamento da parede celular e danos na estrutura da mitocôndria.

Neste estudo foi verificado que os elementos de vaso apresentaram desorganização da parede celular. Isto pode ter ocorrido devido ao fato do glifosato interferir na síntese de lignina. A lignina é um dos produtos da rota do chiquimato, tendo como precursor a fenilalanina. Assim, devido ao fato do herbicida interromper a síntese do precursor, todo processo de lignificação é interrompido (Marchiosi *et al.*, 2009; Meschede *et al.*, 2011).

Os danos observados na superfície foliar, no presente trabalho, se assemelham aos descritos em *Eucalyptus grandis* por Tuffi Santos *et al.* (2007). Entretanto, é relevante relatar os danos verificados nos estômatos de *E. uniflora*, uma vez que Tuffi Santos *et al.* (2007; 2009) somente verificaram obliteração estomática pela cera que se despreendeu. Além da obliteração estomática, nesse trabalho, foi possível notar algumas modificações, como afundamento das células-guarda, elevação do estômato pela perda da turgescência celular, colabamento das cristas estomáticas e redução dos ostíolos. Apesar de ser relatado que o glifosato penetra principalmente pela cutícula (Schönherr, 2002), os danos estomáticos podem estar associados à entrada do herbicida na planta através dos estômatos. O glifosato ao ser pulverizado na planta deposita-se na lâmina foliar, podendo ser depositado sobre os estômatos o que favorece sua entrada. As células-guarda podem, em contato com o herbicida, perder a turgidez o que promoveu com que elas ficassem abaixo do nível da epiderme. No caso da elevação dos estômatos, as células epidérmicas perderam a turgidez e promoveram a elevação do estômato. O fechamento do estômato e a redução do ostíolo são medidas de proteção contra a perda de água frente ao herbicida que é tóxico.

Tuffi Santos *et al.* (2007) destacaram que os danos na cera podem ser devido à presença de adjuvantes nos produtos comercializados que contribuem para entrada do glifosato na planta sendo que, na deriva, os efeitos são potencializados em plantas não

alvo, que além da toxicidade do herbicida ocorre a proliferação de hifas fúngicas. Os autores relataram ainda, que as formulações do glifosato podem apresentar surfactantes (tipo de adjuvante) que promovem a entrada do herbicida via estômatos. Apesar de não ter sido descrito por esses autores que ocorreu danos estomáticos, a informação sobre a ação de surfactantes é relevante, confirmando as variadas alterações que os estômatos apresentaram.

7. CONCLUSÃO

O glifosato apresentou toxicidade sobre *Eugenia uniflora*, promovendo diversas alterações morfoanatômicas e fisiológicas. Em que as diferentes concentrações do herbicida apresentaram distinção em algumas análises, mas foi possível verificar que nas análises fisiológicas não houve abrupta diferença entre as concentrações, assim, mesmo a menor dose utilizada promoveu sérios danos a planta.

O acúmulo de ácido chiquímico, nas plantas tratadas com o herbicida, confirma a inatividade da enzima 5-enol-piruvil-chiquimato-3-fosfato sintase devido a aplicação do glifosato.

E. uniflora apresentou sintomas visuais com três dias após a aplicação da simulação da deriva do glifosato, em todas as doses. Alguns sintomas já foram descritos na literatura em plantas expostas ao herbicida, mas a perda da coloração arroxeadada das folhas próximas ao ápice foliar, desenvolvimento desigual de folhas mesmo nó e desenvolvimento da clorose atípica ainda não tinham sido relatados.

O glifosato promoveu redução dos parâmetros de trocas gasosas e dos teores de pigmentos fotossintéticos, independente da concentração. A redução dos parâmetros foi induzida pela diminuição dos teores de pigmentos, promovida pela desregulação da rota do chiquimato, por danos nas membranas celulares e por alterações anatômicas.

Anatomicamente foi possível verificar alterações no formato e colapso de células, sendo observados vários danos severos, principalmente nas células epidérmicas, do mesofilo, nervura e dos estômatos.

Este estudo obteve respostas para compreensão da atividade do glifosato em uma espécie nativa. Dessa maneira, comprova que *E. uniflora* demonstrou ser uma espécie mais susceptível a ação do glifosato, e assim sua deriva é um risco para plantas nativas presentes em fragmentos florestas próximos à áreas de aplicação constante do herbicida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, E. S.; Tresmondi, F.; Longui, E. L. 2008. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae) coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, 22, 241-248.
- Amarante Júnior, O. P.; Dos Santos, T. C. R.; Brito, N. M.; Ribeiro, M. L. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, 25, 589-593.
- Amrhein, N.; Schab, J.; Steinrücken, H. C. 1980. The mode of action of the herbicide glyphosate. **Naturwissenschaften**, 67, 356-357.
- Andrade Silva, R.; Matsumoto, S. N.; Oliveira, L. S.; Brito, C. L. L.; Costa, A. A. 2015. Interferência de subdoses de glyphosate nas trocas gasosas em picão-preto e trapoeraba. **Global Science and Technology**, 8, 31-39.
- Apel, K.; Hirt, H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 373-399.
- Araldi, R.; Giroto, M.; Velini, E. D.; Tropaldi, L.; Silva, I. P. F.; Carbonari, C. A. 2011. Análises de fluorescência e consumo de água em *Brachiaria decumbens* após aplicação de herbicidas em pós-emergência. **Planta Daninha**, 29, 1053-1060.
- Araújo, T. O.; Freitas-Silva, L.; Santana, B. V. N.; Kuki, K. N.; Pereira, E. G.; Azevedo, A. A.; Silva, L. C. 2014. Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 2777-2784.
- Assis, A. D.; Pereira, O. J.; Thomaz, L. D. 2004. Fitossociologia de uma floresta de restinga no Parque Estadual Paulo César Vinha, Setiba, município de Guarapari (ES). **Revista Brasileira de Botânica**, 27, 349-361.
- Azevedo Neto, A. D.; Prisco, J. T.; Enéas-Filho, J.; Abreu, C. E. B.; Gomes-Filho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. **Environmental and Experimental Botany**, 56, 87-94.
- Barddal, M. L.; Roderjan, C. V.; Galvão, F.; Curcio, G. R. 2003. Fitossociologia do sub-bosque de uma Floresta Ombrófila Mista Aluvial, no município de Araucária, PR. **Ciência Florestal**, 14, 35-45.
- Berg, B. J. V.; Hammer, P. E.; Chun, B. L.; Schouten, L. C.; Carr, B.; Guo, R.; Peters, C.; Hinson, T. K.; Beilinson, V.; Shekita, A.; Deter, R.; Chen, Z.; Samoylov, V.; Bryant Junior, C. T.; Stauffer, M. E.; Eberle, T.; Moellenbeck, D. J.; Carozzi, N. B.; Koziel, M. G.; Duck, N. B. 2008. Characterization and plant expression of a glyphosate-tolerant enolpyruvylshikimate phosphate synthase. **Pest Management Science**, 64,340–345.
- Binarová, P.; Cvikrova, M.; Havlický, T.; Eder, J.; Plevkova, J. 1994. Changes of shikimate pathway in glyphosate tolerant alfalfa cell lines with reduced embryogenic ability. **Biologia Plantarum**, 36, 65-73.
- Bochkov, D. V.; Sysolyatin, S. V.; Kalashnikov, A. I.; Surmacheva, I. A. 2012. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. **Journal of Chemical Biology**, 5, 5-17.

Brandle, J. R.; Campbell, W. F.; Sisson, W. B.; Caldwell, M. M. 1977. Net photosynthesis, electron transport capacity, and ultrastructure of *Pisum sativum* L. exposed to ultraviolet-B radiation. **Plant Physiology**, 60, 165-169.

Brasil. Câmara dos Deputados. 2015. **Requerimento de Informação RIC 569/2015**. Solicita informações à Senhora Ministra da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Exma. Sra. Kátia Abreu, sobre a evolução do consumo de glifosato e os níveis aplicados atualmente no Brasil. Autor: Antônio Goulart dos Reis Disponível em: <http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=1279938> Acessado em: 30 de maio de 2015.

Braz, D. M.; Lima Jacques, E.; Somner, G. V.; Silva Sylvestre, L.; Rosa, M. M. T.; Pereira-Moura, M. V. L.; Filho, P. G.; Couto, A. V. S.; Amorim, T. A. 2013. Restinga de Praia das Neves, ES, Brasil: caracterização fitofisionômica, florística e conservação. **Biota Neotropica**, 13, 315-331.

Brighenti, A. M.; Moraes, V. J.; Oliveira Jr, R. S.; Gazziero, D. L. P.; Voll, E.; Gomes, J. A. 2002. Persistência e fitotoxicidade do herbicida atrazine aplicado na cultura do milho sobre a cultura do girassol em sucessão. **Planta Daninha**, 20, 291-297.

Campbell, W. F.; Evans, J. O.; Reed, S. C. 1976. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. **Weed Science**, 24, 22-25.

Carlisle, S. M.; Trevors, J. T. 1988. Glyphosate in the environment. **Water, Air, and Soil Pollution**, 39, 409-420.

Carvalho, F. P.; São José, R. H.; Lopes, L. C. M.; Ronchi, C. P. 2015. *Benghal dayflower* control with different glyphosate formulations. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 14, 194-199.

Carvalho, S. J. P.; Tarozzo Filho, H.; Dias, A. C. R.; Nicolai, M.; Christoffoleti, P. J. 2011. Participação do nitrogênio na indução de injúrias foliares e na eficácia do herbicida glyphosate. **Revista Ceres**, 58, 516-524.

Castro Júnior, J. V.; Selbach, P. A.; Záchayub, M. A. 2006. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 16, 21-30.

Christoffoleti, J. C. 1999. **Considerações sobre tecnologia de aplicação nas pulverizações agrícolas e seu controle**. São Paulo: Teejet South America, 15p. In: Costa, A. G. F.; Velini, E. D.; Negrisoni, E.; Carbonari, C.A.; Rossi, C. V. S.; Corrêa, M. R.; Silva, F. M. L. 2007. Efeito da intensidade do vento, da pressão e de pontas de pulverização na deriva de aplicações de herbicidas em pré-emergência. **Planta Daninha**, 25, 203-210.

Cole, D. J.; Caseley, J. C.; Dodge, A. D. 1983. Influence of glyphosate on selected plant process. *Weed Res*, 23, 173-183. In: Araldi, R.; Giroto, M.; Velini, E. D.; Tropaldi, L.; Silva, I. P. F.; Carbonari, C. A. 2011. Análises de fluorescência e consumo de água em *Brachiaria decumbens* após aplicação de herbicidas em pós-emergência. **Planta Daninha**, 29, 1053-1060.

Coutinho, H. D.; Barbosa, A. R. 2007. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, 15, 103-117.

- Cruz, J. L.; Coelho, E. F.; Pelacani, C. R.; Coelho Filho, M. A.; Dias, A. T.; Santos, M. T. 2004. Crescimento e partição de matéria seca e de carbono no mamoeiro em resposta à nutrição nitrogenada. **Bragantia**, 63, 351-361.
- Dill, G. M.; CaJacob, C. A.; Padgett, S. R. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science**, 64, 326–331.
- Du, Z.; Bramlage, W. J. 1992. Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 1566-1570.
- Duke, S. O.; Powles, S. B. 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. **Pest Management Science**, 64, 319-325.
- Duke, S. O.; Rimando, A. M.; Pace, P. F.; Reddy, K. N.; Smeda, R. J. 2003. Isoflavone, glyphosate, and aminomethylphosphonic acid levels in seeds of glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 340-344.
- Farquhar, G. D.; Sharkey, T. D. 1982. Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, 33, 317- 345.
- Foloni, L. L.; Rodrigues, D.; Ferreira, F.; Miranda, R.; Ono, E. O. 2005. Aplicação de glifosato em pós-emergência, em soja transgênica cultivada no Cerrado. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 3, 47-58.
- Fontenelle, G. B.; Costa, C. G.; Machado, R. D. 1994. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). **Botanical Journal of The Linnean Society**, 116, 111-133.
- Foresti, E. R.; Nepomuceno, M. P.; Alves, P. L. C. A. 2015. Simulação da deriva de clomazone e glyphosate em mudas de laranjeira ‘Hamlin’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 37, 367-376.
- Freitas-Silva, L.; Araújo, T. O.; Silva, L. C.; Oliveira, J. A.; Araújo, J. M. 2016. Arsenic accumulation in Brassicaceae seedlings and its effects on growth and plant anatomy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124, 1-9.
- Fuchs, M. A.; Geiger, D. R.; Reynolds, T. L.; Bourque, J. E. 2002. Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti* medikus). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 74, 27-39.
- Gaitonde, M. K.; Gordon, M. W. 1957. A microchemical method for the detection and determination of shikimic acid. **Journal of Biological Chemistry**, 230, 1043-1050.
- Gaspar, T.; Kevers, C.; Penel, C.; Greppin, H.; Reid, D. M.; Thorpe, T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 32, 272-289.
- Gilmore, E. 2001. A critique of soil contamination and remediation: the dimensions of the problem and the implications for sustainable development. **Bulletin of Science, Technology & Society**, 21, 394-400.

- Gomes, G. L. G. C.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D.; Trindade, M. L. B.; Silva, J. R. M. 2015a. Extraction and simultaneous determination of glyphosate, AMPA and compounds of the shikimic acid pathway in plants. **Planta Daninha**, 33, 295-304.
- Gomes, G. L. G. C.; Velini, E. D.; Carbonari, C. A. 2015b. Fosfito de potássio não protege plantas de milho contra os efeitos fitotóxicos do glyphosate. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 45, 291-296
- Guimarães, A. A.; Ferreira, E. A.; Vargas, L.; Silva, A. A.; Viana, R. G.; Demuner, A. J.; Concenço, G.; Aspiazu, I.; Galon, L.; Reis, M. R.; Silva, A. F. 2009. Composição química da cera epicuticular de biótipos de azevém resistente e suscetível ao glyphosate. **Planta Daninha**, 27, 149-154.
- Guimarães, T. G.; Fontes, P. C. R.; Pereira, P. R. G.; Alvarez, V. H.; Monnerat, P. H. 1999. Teores de clorofila determinados por medidor portátil e sua relação com formas de nitrogênio em folhas de tomateiro cultivado em dois tipos de solo. **Bragantia**, 58, 209-210.
- Harring, T.; Streibig, J. C.; Husted, S. 1998. Accumulation of shikimic acid: a technique for screening glyphosate efficacy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46, 4406-4412.
- Herrmann, K. M. 1995. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Plant Physiology**, 107, 7-12.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. 1950. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station: Berkeley, CA, pp 347.
- Hoai, P. M.; Sebesvari, Z.; Minh, T. B.; Viet, P. H.; Renaud, F. G. 2011. Pesticide pollution in agricultural areas of Northern Vietnam: Case study in Hoang Liet and Minh Dai communes. **Environmental Pollution**, 159, 3344-3350.
- IARC- International Agency for Research on Cancer. 2015. **IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**. IARC Working Group. Lyon, 2015. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum (in press). Disponível em: <http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf> Acessado em 17 de junho de 2015.
- IBAMA- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília. 2014. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil 2014**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> Acesso em: 18 de junho de 2015.
- Ivanauskas, N. M.; Rodrigues, R. R. 2000. Florística e fitossociologia de remanescentes de floresta estacional decidual em Piracicaba, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, 23, 291-304.
- Joly, C. A.; Assis, M. A.; Bernacci, L. C.; Tamashiro, J. Y.; Campos, M. C. R.; Gomes, J. A. M. A.; Lacerda, M. S.; Santos, F. A. M.; Pedroni, F.; Pereira, L. S.; Padgurschi, M. C. G.; Prata, E. M. B.; Ramos, E.; Torres, R. B.; Rochelle, A.; Martins, F. R.; Alves, L. F.; Vieira, S. A.; Martinelli, L. A.; Camargo, P. B.; Aidar, M. P. M.; Eisenlohr, P. V.; Simões, E.; Villani, J. P.; Belinello, R. 2012. Florística e fitossociologia em parcelas

permanentes da Mata Atlântica do sudeste do Brasil ao longo de um gradiente altitudinal. **Biota Neotropica**, 12, 123-145.

Karnovsky, M. J. 1965. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, 27, 27–137.

Kaspary, T. E.; Lamego, F. P.; Cutti, L.; Aguiar, A. C. M.; Bellé, C. 2014. Determination of photosynthetic pigments in fleabane biotypes susceptible and resistant to the herbicide glyphosate. **Planta Daninha**, 32, 417-426.

Kirkwood, R. C.; Hetherington, R.; Reynolds, T. L.; Marshall, G. 2000. Absorption, localisation, translocation and activity of glyphosate in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L) Beauv): influence of herbicide and surfactant concentration. **Pest Management Science**, 56, 359-367.

Kuva, M. A.; Ferraudo, A. S.; Pitelli, R. A.; Alves, P. L. C. A.; Salgado, T. P. 2008. Padrões de infestação de comunidades de plantas daninhas no agroecossistema de cana-crua. **Planta Daninha**, 26, 549-557.

Lago, J. H. G.; Souza, E. D.; Mariane, B.; Pascon, R.; Vallim, M. A.; Martins, R. C. C.; Baroli, A. A.; Carvalho, B. A.; Soares, M. G.; Santos, R. T.; Sartorelli, P. 2011. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae—*Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. **Molecules**, 16, 9827-9837.

Lichtenthaler, H. K. 1987. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. 350-382. In: Colowick, S. P. 1999. **Methods in enzymology**. San Diego, Academic Press, 148, 350-382.

Machado, E. C.; Schmidt, P. T.; Medina, C. L.; Ribeiro, R. V. 2005. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40, 1161-1170.

Madureira, R. P.; Raetano, C. G.; Cavalieri, J. D. 2015. Interação pontas-adjuvantes na estimativa do risco potencial de deriva de pulverizações. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, 19, 180-185.

Magalhães Filho, J. R.; Amaral, L. R.; Machado, D. F. S. P.; Medina, C. L.; Machado, E. C. 2008. Deficiência hídrica, trocas gasosas e crescimento de raízes em laranja 'Valência' sobre dois tipos de porta-enxerto. **Bragantia**, 67, 75-82.

Marchiosi, R.; Ferrarese, M. L. L.; Bonini, E. A.; Fernandes, N. G.; Ferro, A. P.; Ferrarese-Filho, O. 2009. Glyphosate-induced metabolic changes in susceptible and glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.) roots. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 93, 28-33.

Mateos-Naranjo, E.; Perez-Martin, A. 2013. Effects of sub-lethal glyphosate concentrations on growth and photosynthetic performance of non-target species *Bolboschoenus maritimus*. **Chemosphere**, 93, 2631-2638.

Meschede, D. K.; Carbonari, C. A.; Velini, E. D.; Trindade, M. L. B.; Gomes, G. L. G. C. 2011. Efeitos do glyphosate nos teores de lignina, celulose e fibra em *Brachiaria decumbens*. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 10, 57-63.

- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, 9, 490-498.
- Mochiutti, S.; Higa, A. R.; Simon, A. A. 2008. Fitosociologia dos estratos arbóreo e de regeneração natural em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii*, De Wild.) na região da Floresta Estacional Semidecidual do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, 18, 207-222.
- Monquero, P. A.; Christoffoleti, P. J.; Osuna, M. D.; De Prado, R. A. 2004. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, 22, 445-451.
- Neves, N. R.; Oliva, M. A.; Cruz Centeno, D.; Costa, A. C.; Ribas, R. F.; Pereira, E. G. 2009. Photosynthesis and oxidative stress in the restinga plant species *Eugenia uniflora* L. exposed to simulated acid rain and iron ore dust deposition: potential use in environmental risk assessment. **Science of the Total Environment**, 407, 3740-3745.
- O'Brien, T. P.; McCully, M. E. 1981. **The study of plant structure: principles and selected methods**. Termarcaphi Pty Ltd, Melbourne. 46p.
- Ozkan, H. E.; Miralles, A.; Sinfort, C.; Zhu, H.; Fox, R. D. 1997. Shields to reduce spray drift. **Journal of Agricultural Engineering Research**, 67, 311-322.
- Perez-Jones, A.; Park, K. W.; Colquhoun, J.; Mallory-Smith, C.; Shaner, D. 2005. Identification of glyphosate-resistant Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) in Oregon. **Weed Science**, 53, 775-779.
- Rattmann, Y. D.; De Souza, L. M.; Malquevicz-Paiva, S. M.; Dartora, N.; Sasaki, G. L.; Gorin, P. A.; Iacomini, M. 2012. Analysis of flavonoids from *Eugenia uniflora* leaves and its protective effect against murine sepsis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012, 1-9.
- Reddy, K. N.; Rimando, A. M.; Duke, S. O.; Nandula, V. K. 2008. Aminomethylphosphonic acid accumulation in plant species treated with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, 2125-2130.
- Robinson, J. M. 1996. Leaflet photosynthesis rate and carbon metabolite accumulation patterns in nitrogen-limited, vegetative soybean plants. **Photosynthesis Research**, 50, 133-148.
- Rocha, D. I.; Silva, L. C.; Pereira, E. G.; Sant'Anna-Santos, B. F.; Gontijo, E. R.; Oliva, M. A. 2014. Early detection of injuries in leaves of *Clusia hilariana* Schltdl. (Clusiaceae) caused by particulate deposition of iron. **Revista Árvore**, 38, 423-432.
- Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S. 2005. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 591 p.
- Samsel, A.; Seneff, S. 2013. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. **Interdisciplinary Toxicology**, 6, 159-184.
- Samsel, A.; Seneff, S. 2015. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. **Surgical Neurology International**, 6, 45-65.

- Sant'Anna-Santos, B. F.; Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Araújo, J. M.; Alves, E. F.; Silva, E. A. M.; Aguiar, R. 2006. Effects of simulated acid rain on the foliar micromorphology and anatomy of tree tropical species. **Environmental and Experimental Botany**, 58, 158-168.
- Santana, B. V. N.; Araújo, T. O.; Andrade, G. C.; Freitas-Silva, L.; Kuki, K. N.; Pereira, E. G.; Azevedo, A. A.; Silva, L. C. 2014. Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. **Environmental Science and Pollution Research**, 21, 2550-2562.
- Schönherr, J. 2002. A mechanistic analysis of penetration of glyphosate salts across stomatous cuticular membranes. **Pest Management Science**, 58, 343-351.
- Schrübbers, L. C.; Valverde, B. E.; Strobel, B. W.; Cedergreen, N. 2016. Glyphosate accumulation, translocation, and biological effects in *Coffea arabica* after single and multiple exposures. **European Journal of Agronomy**, 74, 133-143.
- Seneff, S.; Lauritzen, A.; Davidson, R. M.; Lentz-Marino, L. 2013. Is encephalopathy a mechanism to renew sulfate in autism? **Entropy**, 15, 372-406.
- Silva, F. A. S.; Azevedo, C. A. V. 2002. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, 4, 71-78.
- Silva, F. B.; Costa A. C.; Alves, R. R. P.; Megguer, C. A. 2014. Chlorophyll fluorescence as an indicator of cellular damage by glyphosate herbicide in *Raphanus sativus* L. plants. **American Journal of Sciences**, 5, 2509-2519.
- Silva, F. M. L.; Duke, S. O.; Dayan, F. E.; Velini, E. D. 2015a. Low doses of glyphosate change the responses of soybean to subsequent glyphosate treatments. **Weed Research**, 56, 124-136.
- Silva, L. C.; Araújo, T. O.; Martinez, C. A.; Lobo, F. A.; Azevedo, A. A.; Oliva, M. A. 2015b. Differential responses of C3 and CAM native Brazilian plant species to a SO₂- and SPMFe- contaminated Restinga. **Environmental Science and Pollution Research**, 1-11.
- Silva, L. C.; Azevedo, A. A.; Silva, E. A.; Oliva, M. A. 2000. Flúor em chuva simulada: sintomatologia e efeitos sobre a estrutura foliar e o crescimento de plantas arbóreas. **Revista Brasileira de Botânica**, 23, 385-393.
- Silva, L. C.; Oliva, M. A.; Azevedo, A. A.; Araújo, J. M.; Aguiar, R. M. 2006. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. **Water, Air, and Soil Pollution**, 168, 129-143.
- Singh, B. K.; Shaner, D. L. 1998. Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. **Weed Technology**, 12, 527-530.
- Smith, C. M.; Pratt, D.; Thompson, G. A. 1986. Increased 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase activity in a glyphosate-tolerant variant strain of tomato cells. **Plant Cell Reports**, 5, 298-301.

- Szalai, G.; Janda, T.; Páldi, E.; Szigeti, Z. 1996. Role of light in the development of post-chilling symptoms in maize. **Journal of Plant Physiology**, 148, 378-383.
- Tuffi Santos, L. D.; Machado, A. F. L.; Viana, R. G.; Ferreira, L. R.; Ferreira, F. A.; Souza, G. V. R. 2007. Crescimento do eucalipto sob efeito da deriva de glyphosate. **Planta Daninha**, 25, 133-137.
- Tuffi Santos, L. D.; Sant'Anna-Santos, B. F.; Meira, R. M. S. A.; Tiburcio, R. A. S.; Ferreira, F. A.; Melo, C. A. D.; Silva, E. F. S. 2008. Danos visuais e anatômicos causados pelo glyphosate em folhas de *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, 26, 9-16.
- Tuffi Santos, L. D.; Sant'Anna-Santos, B. F.; Meira, R. M. S. A.; Ferreira, F. A.; Tiburcio, R. A. S.; Silva, E. F. S. 2009. Micromorfologia foliar na análise da fitotoxidez por glyphosate em *Eucalyptus grandis*. **Planta Daninha**, 27, 711-720.
- Tuffi Santos, L.; Ferreira, F. A.; Meira, R. M. S. A.; Barros, N. F.; Ferreira, L. R.; Machado, A. F. L. 2005. Crescimento e morfoanatomia foliar de eucalipto sob efeito de deriva do glyphosate. **Planta Daninha**, 23, 133-142.
- Velini, E. D.; Alves, E.; Godoy, M. C.; Meschede, D. K.; Souza, R. T.; Duke, S. O. 2008. Glyphosate applied at low doses can stimulate plant growth. **Pest Management Science**, 64, 489-496.
- Werth, J. A.; Preston, C.; Taylor, I. N.; Charles, G. W.; Roberts, G. N.; Baker, J. 2008. Managing the risk of glyphosate resistance in Australian glyphosate-resistant cotton production systems. **Pest Management Science**, 64, 417-421.
- Williams, G. M.; Kroes, R.; Munro, I. C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 31, 117-165. In: Samsel, A.; Seneff, S. 2013. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. **Interdisciplinary Toxicology**, 6, 159-184.
- Young, C. E. F. 2006. Desmatamento e desemprego rural na Mata Atlântica. **Floresta e Ambiente**, 13, 75-88.
- Zobiolo, L. H. S.; Kremer, R. J.; Oliveira Jr, R. S.; Constantin, J. 2010a. Glyphosate affects photosynthesis in first and second generation of glyphosate-resistant soybeans. **Plant Soil**, 336, 251-265.
- Zobiolo, L. H. S.; Oliveira Jr, R. S.; Huber, D. M.; Constantin, J.; Castro, C.; Oliveira, F. A.; Oliveira Jr, A. 2010b. Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. **Plant and Soil**, 328, 57-69.
- Zobiolo, L. H. S.; Oliveira, R. S.; Kremer, R. J.; Constantin, J.; Bonato, C. M.; Muniz, A. S. 2010c. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97, 182-193.

9. FIGURAS

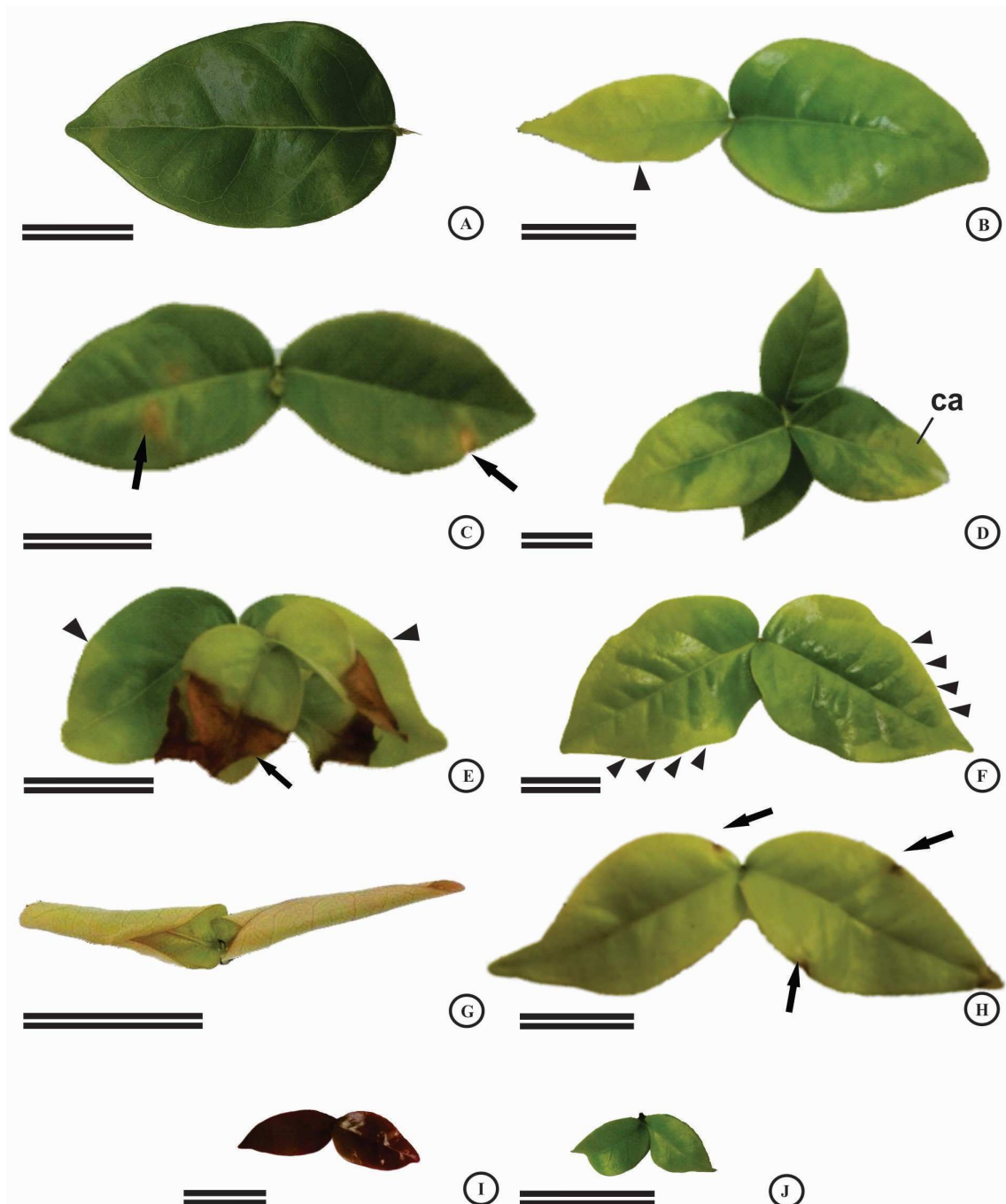


Figura 1: Folhas de *Eugenia uniflora* submetidas a doses de glifosato, 5 dias após a aplicação (DAA) (B), 9 DAA (G), 11 DAA (E, F e H), e 12 DAA (A, C, D, I e J). A e I- Controle. Submetidas a 144 g e.a ha⁻¹(B), 432 g e.a ha⁻¹ (C), 864 g e.a ha⁻¹ (D, E, F e J), e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (G e H). Barra: 30 mm. (cabeça de seta) clorose; (Seta) necrose; (ca) clorose atípica.

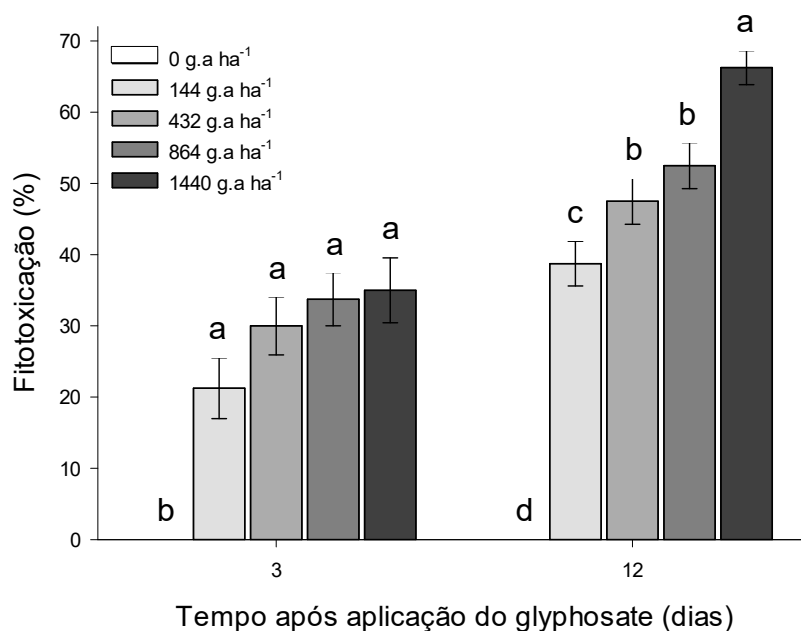


Figura 2: Efeito fitotóxico em *Eugenia uniflora* aos 3 e 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

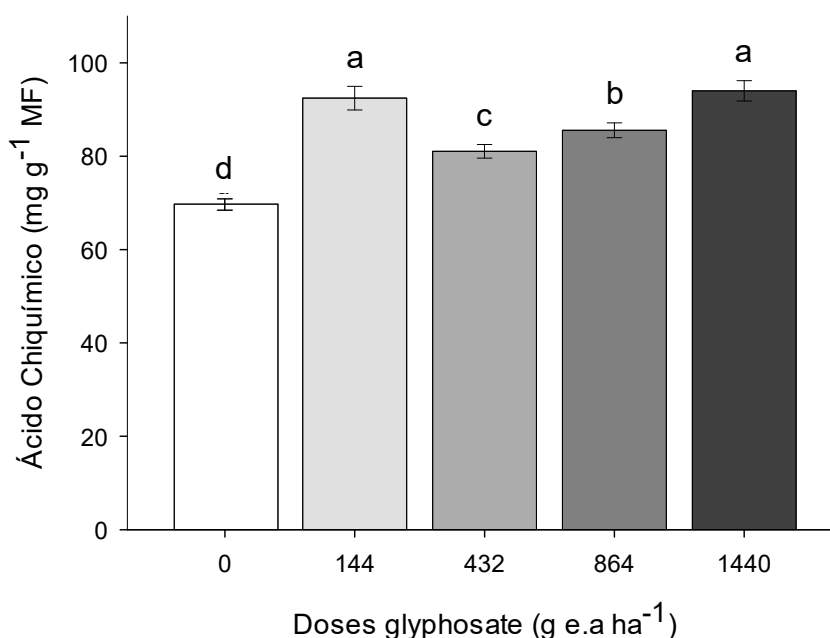


Figura 3: Teor de ácido chiquímico nos diferentes tratamentos com glifosato em folhas de *Eugenia uniflora*, aos 12 DAA do herbicida. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

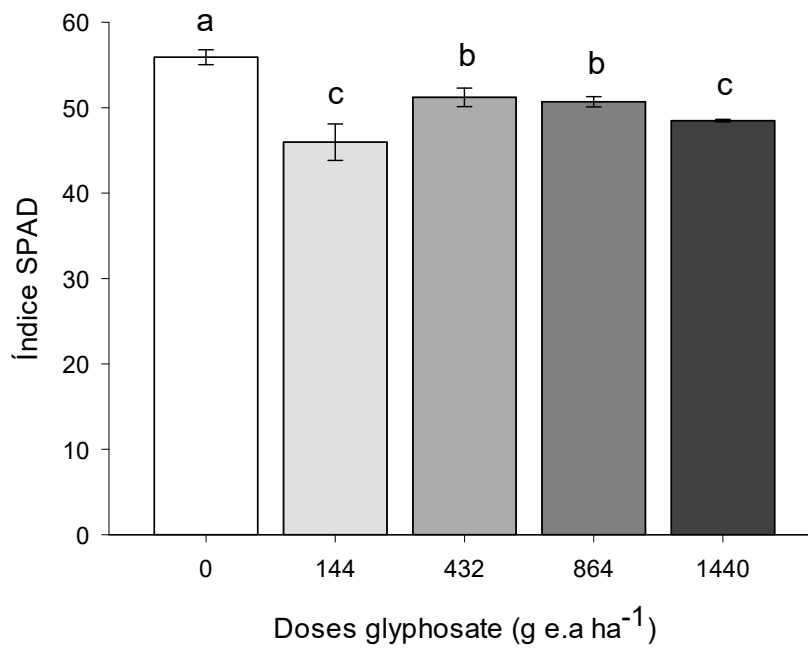


Figura 4: Intensidade da cor verde em folhas de *Eugenia uniflora*, 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

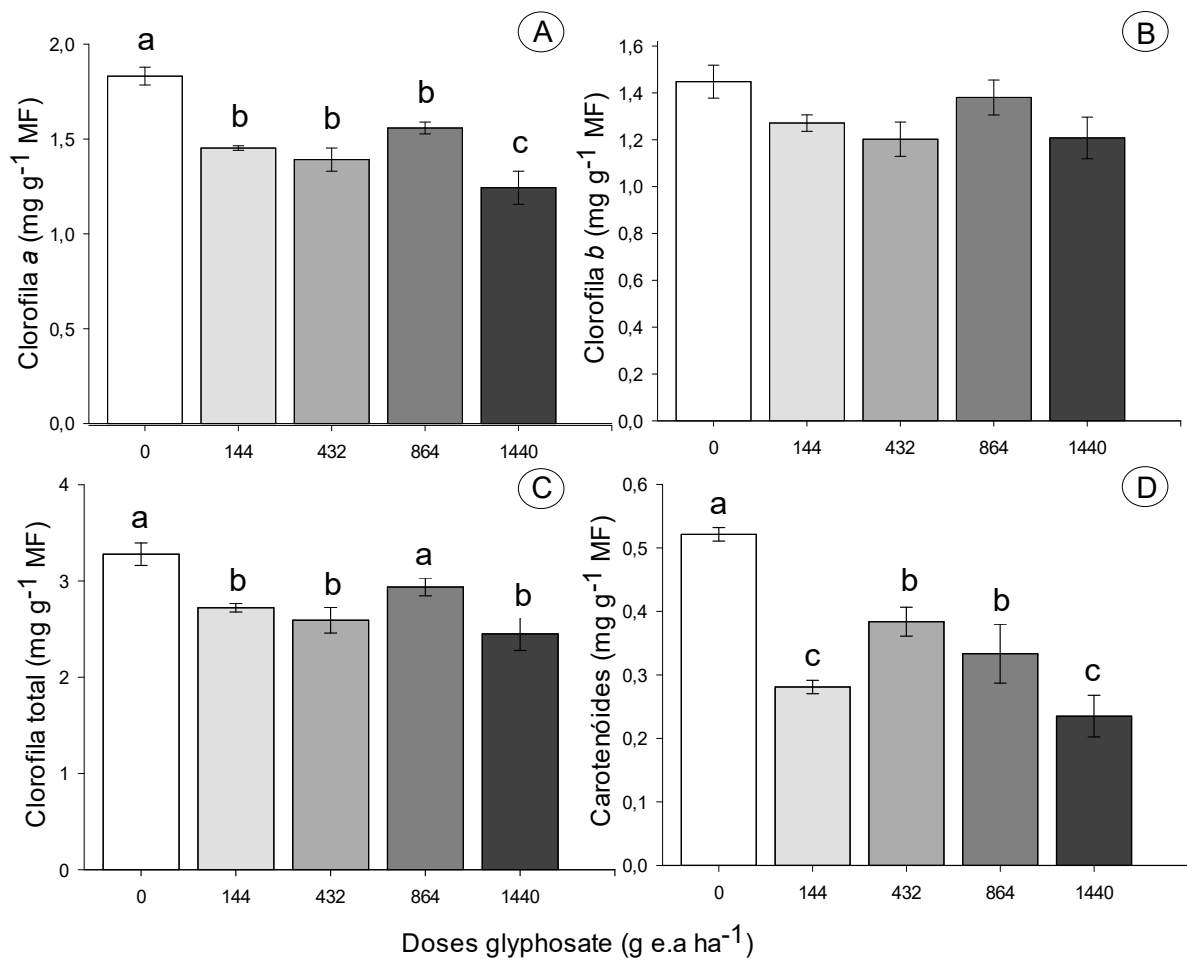


Figura 5: Teores dos pigmentos fotossintéticos em *Eugenia uniflora*, 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Clorofila *a* (A), clorofila *b* (B), clorofila total (C) e carotenóides (D). Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

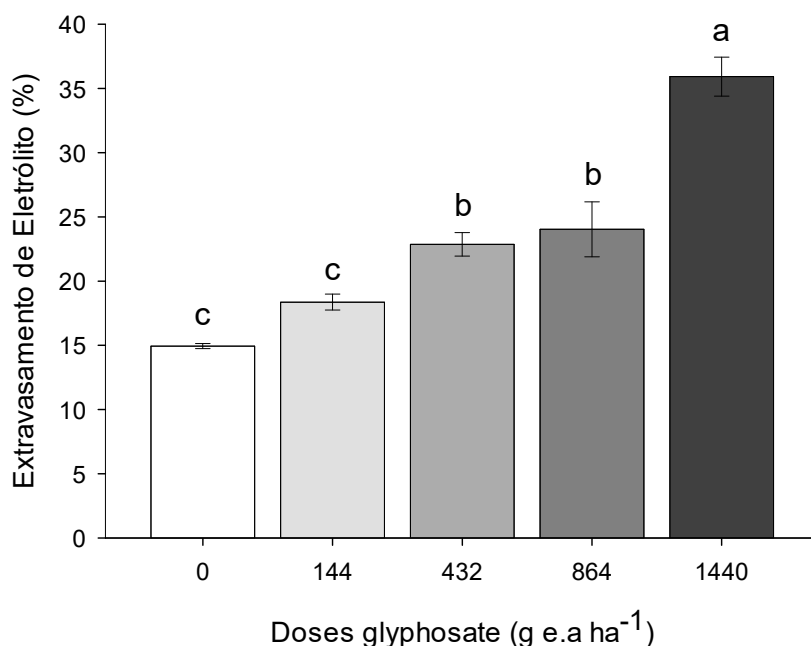


Figura 6: Extravasamento de eletrólitos em discos foliares de *Eugenia uniflora*, 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

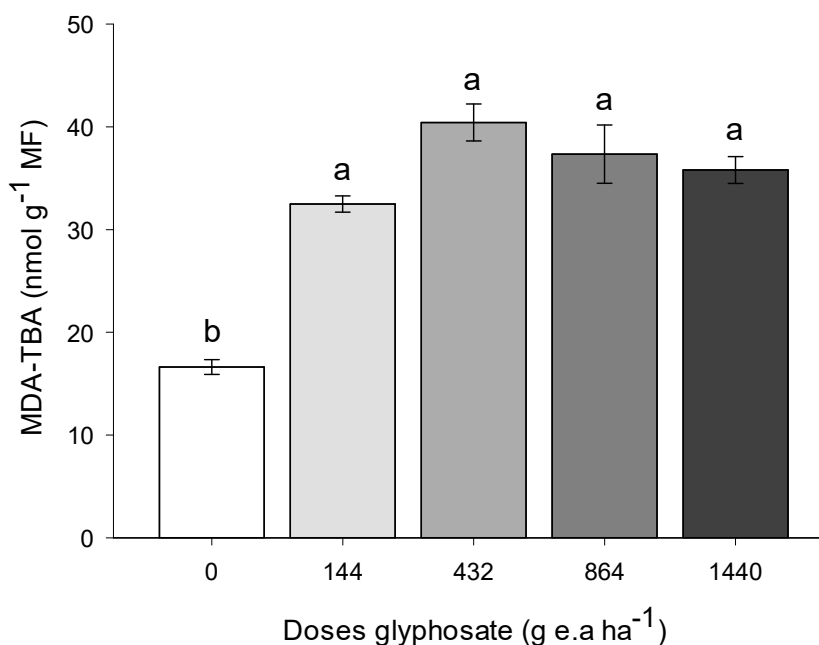


Figura 7: Peroxidação lipídica com produção de malondialdeído - ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) nas folhas de *E. uniflora*, 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

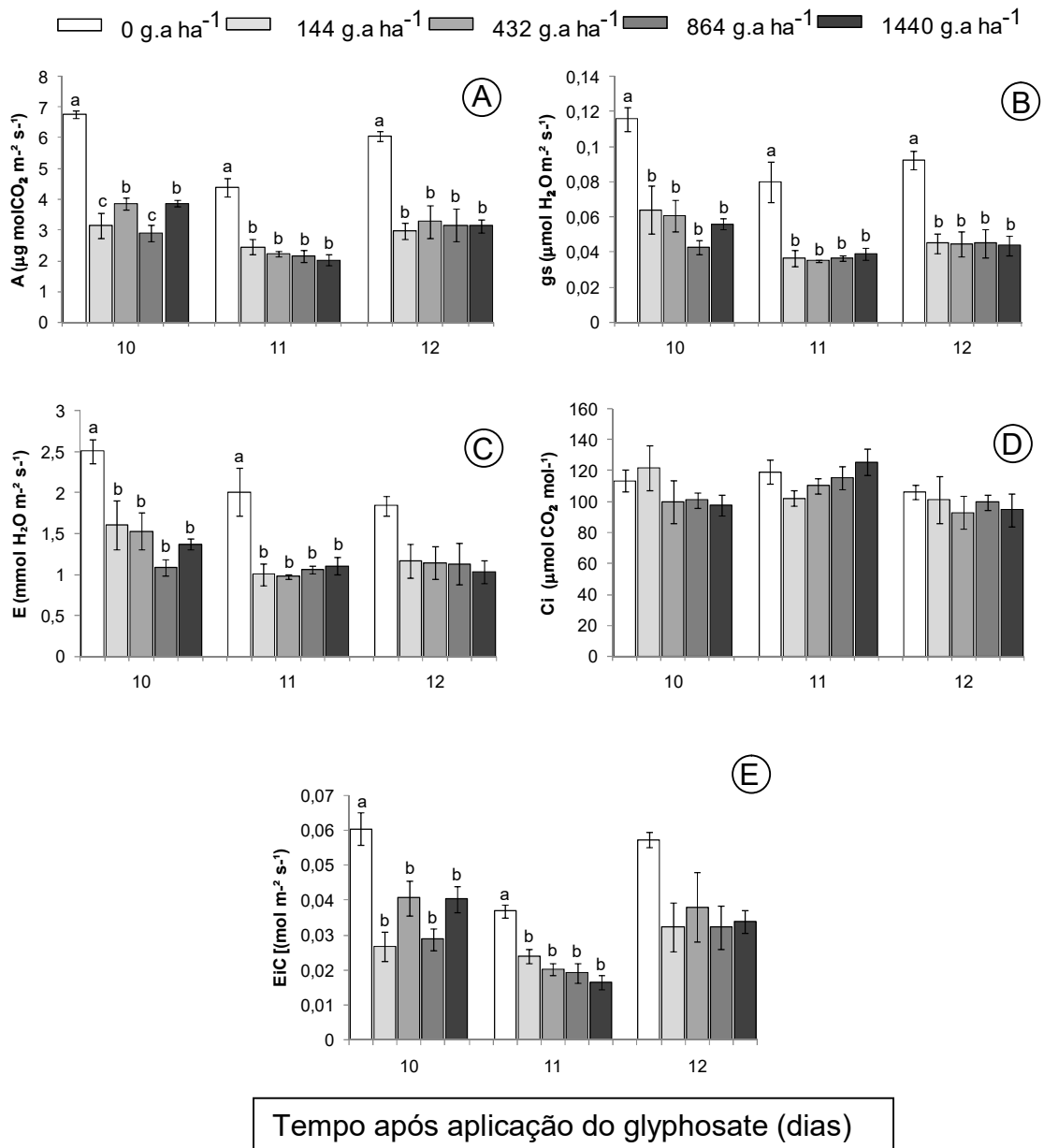


Figura 8: Trocas gasosas, com 10, 11 e 12 dias após a aplicação (DAA) de glifosato. Taxa de assimilação de CO₂ (*A*) (A); Condutância estomática (*gs*) (B); Transpiração (*E*) (C); Concentração interna de CO₂ (*C_i*) (D); Eficiência no uso da água (*EUA*) (E); Eficiência de carboxilação (*E_iC*) (F). Barras verticais indicam o erro padrão das médias dos tratamentos. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade.

Figura 9: Danos estruturais em folhas assintomáticas de *E. uniflora* exposta a diferentes dosagens de glifosato (secções transversais), 12 dias após aplicação (DAA) do herbicida. A- Controle. Submetidas a 432 g e.a ha⁻¹ (C), 864 g e.a ha⁻¹ (B, D, E e G), e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (F, H e I). Barras: 50 µm. (Ed) epiderme adaxial; (Pp) parênquima paliçadico; (Pl) parênquima lacunoso; (Fv) feixe vascular; (Id) idioblasto; (Co) colênquima; (Eb) epiderme abaxial; (Es) estômato; (C) cavidade secretora; (Rp) retração do protoplasto; (A) acúmulo de amido; (seta preta) redução do tamanho de células epidérmica; (*) deformação do parênquima paliçadico; (Rc) retração da cavidade; (CEd) colapso de células epidérmicas; (cruz) colapso; (seta branca) reentrância; (cabeça de seta) acúmulo de composto.

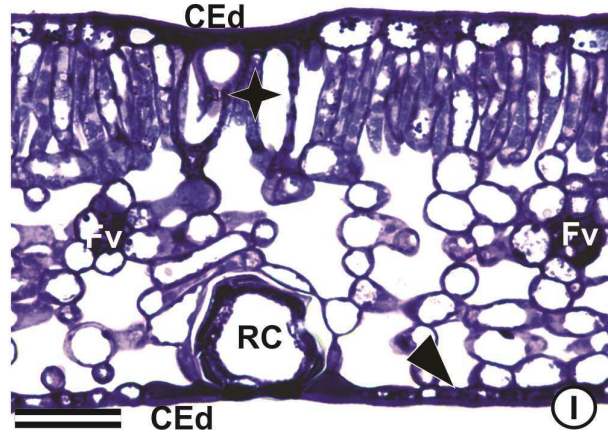
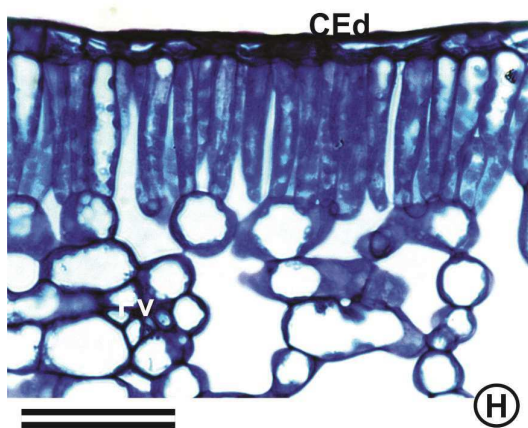
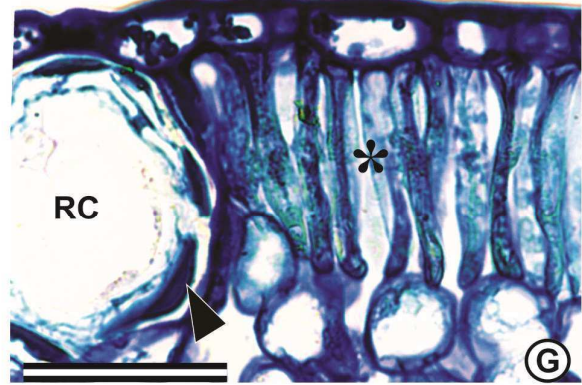
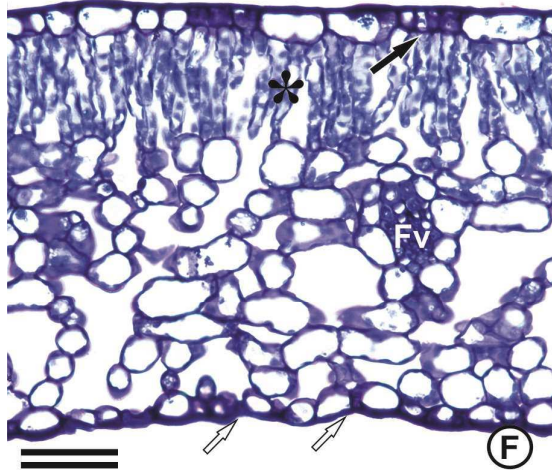
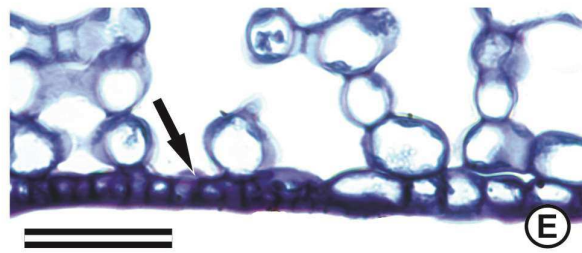
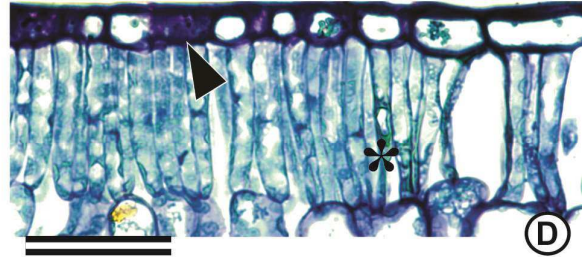
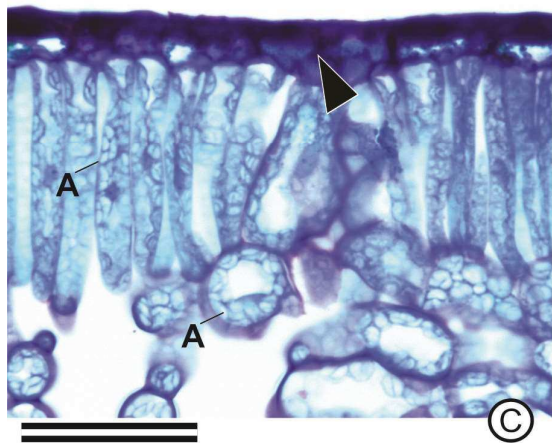
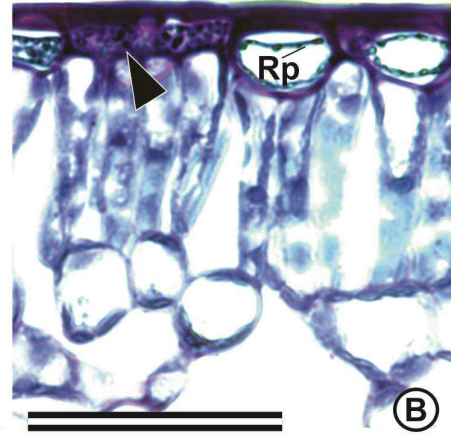
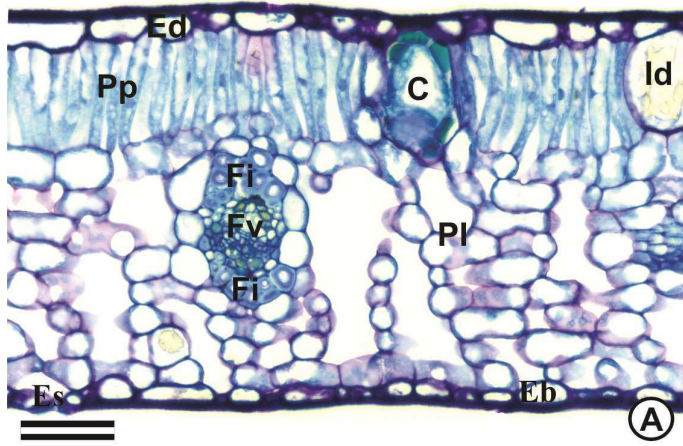
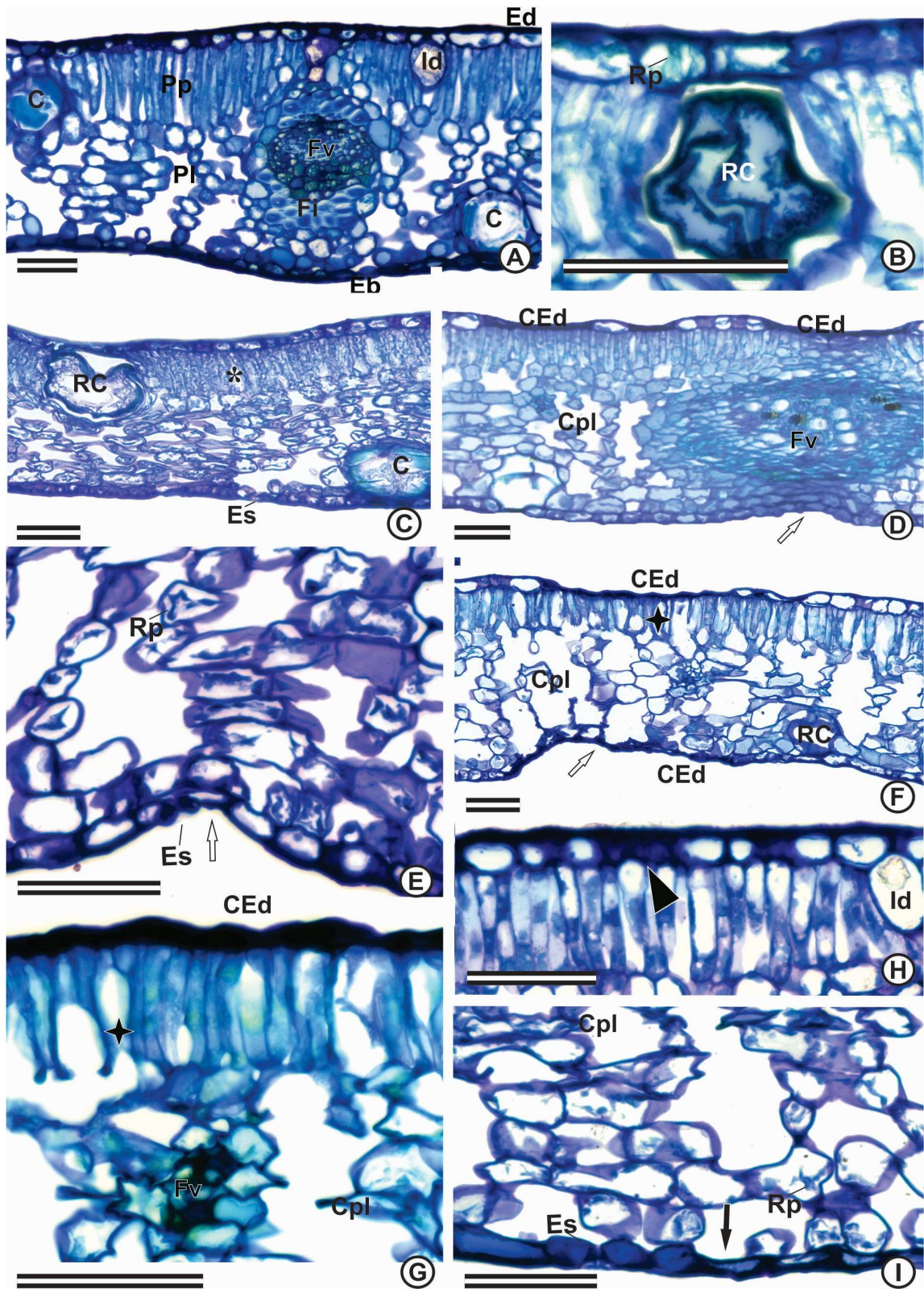


Figura 10: Danos estruturais em folhas sintomáticas de *E. uniflora* exposta a tratamentos com glifosato (secções transversais), 12 dias após aplicação (DAA) do herbicida. Controle (A). Submetidas a 144 g e.a ha⁻¹ (H), 432 g e.a ha⁻¹ (E e I), 864 g e.a ha⁻¹ (C e D), e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (B, F e G). Barras: 50 µm. (Ed) epiderme adaxial; (Pp) parênquima paliçadico; (Pl) parênquima lacunoso; (Fv) feixe vascular; (Id) idioblasto; (Co) colênquima; (Eb) epiderme abaxial; (Es) estômato; (C) cavidade secretora; (seta preta) alterações de células epidérmica; (*) deformação do parênquima paliçadico; (Rc) retração da cavidade; (CEd) colapso de células epidérmicas; (cruz) colapso; (Rp) retração de protoplasto; (Cpl) colapso de células do parênquima lacunoso; (seta branca) reentrância; (cabeça de seta) acúmulo de composto.



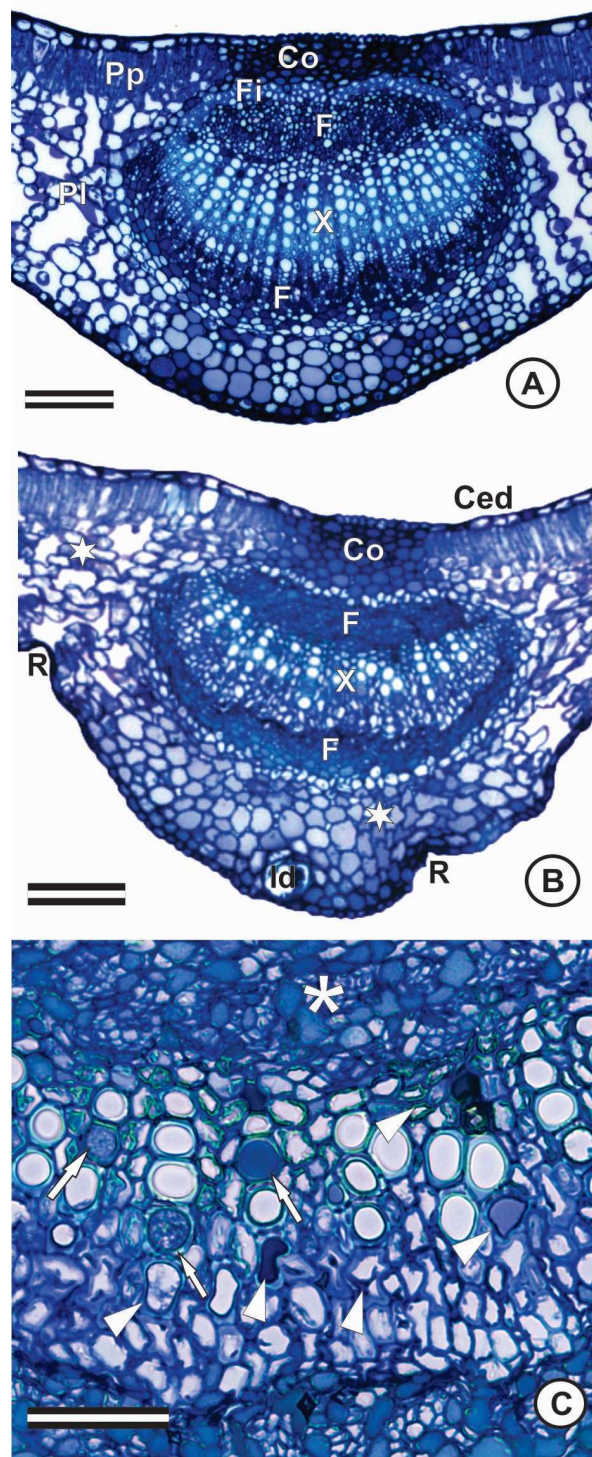


Figura 11: Danos estruturais na nervura mediana de folhas sintomáticas de *E. uniflora* exposta a tratamentos com glifosato (secções transversais), 12 dias após aplicação (DAA) do herbicida. Controle (A). Submetidas a dose 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (B e C). Barras: 100 µm. (Pp) parênquima paliçádico; (Pi) parênquima lacunoso; (Fi) fibras; (F) floema; (X) xilema; (Id) idioblasto; (R) reentrância; (seta branca) deformação das paredes de células do xilema; (*) colapso do floema; (CEd) colapso de células epidérmicas; (estrela) alteração do formato de células parenquimáticas.

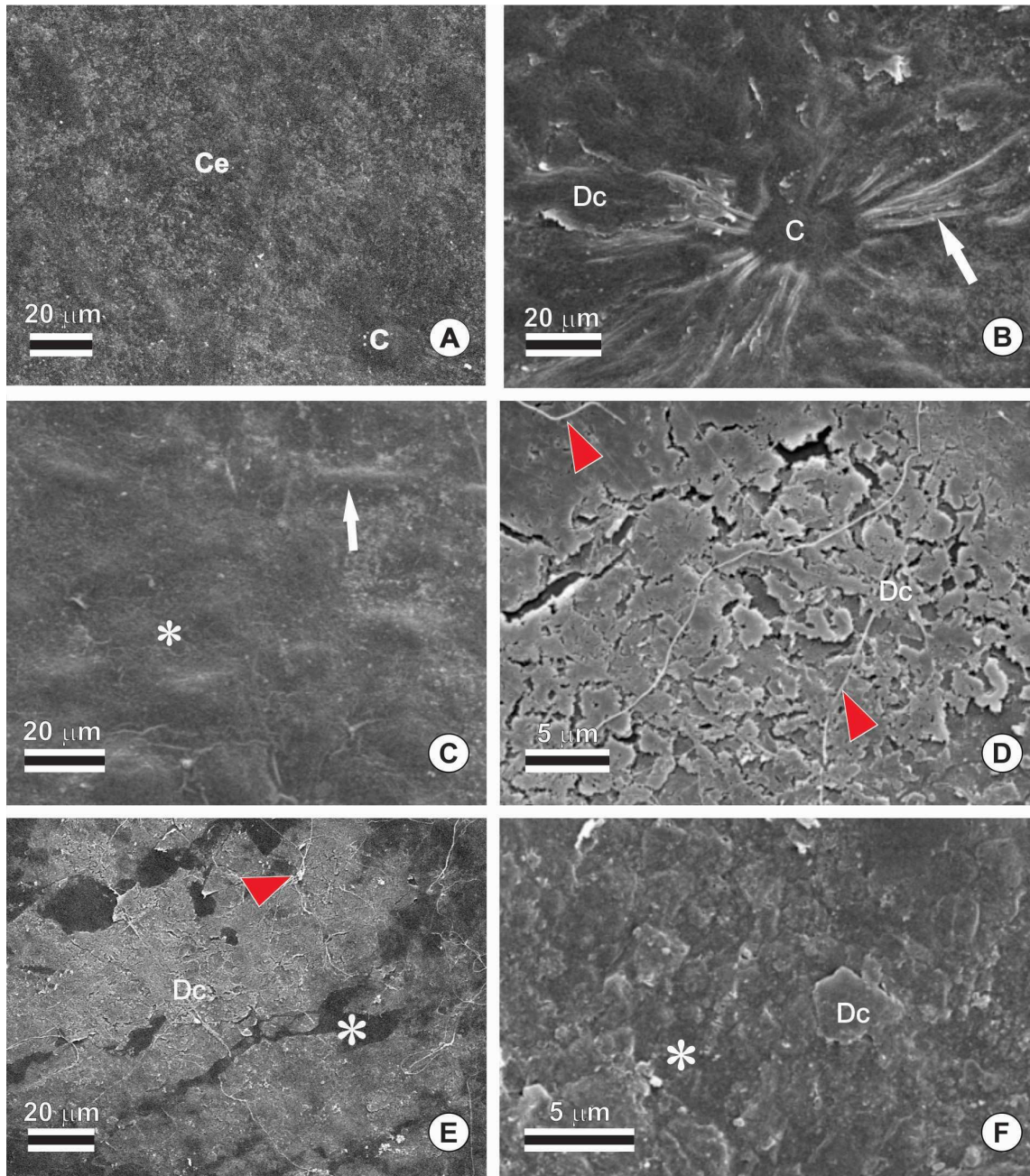


Figura 12: Superfície adaxial da folha de *E. uniflora* (Microscopia eletrônica de Varredura) após 12 dias de exposição a diferentes doses de glifosato. Controle (A). Submetidas a 144 g e.a ha⁻¹ (B), 432 g e.a ha⁻¹ (C), 864 g e.a ha⁻¹ (D), e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (E e F). (Ce) cobertura de cera epicuticular; (C) células de cobertura da cavidade secretora; (Dc) desprendimento da cera; (*) cera epicuticular com aspecto amorfo; (seta branca) perda da turgescência e elevação celular; (cabeça de seta) hifa fúngica.

Figura 13: Superfície abaxial da folha de *E. uniflora* (Microscopia eletrônica de Varredura) após 12 dias de exposição a diferentes doses de glifosato. (F) cavidade secretora com cera erodida; (G, I e J) alterações dos estômatos. (A e H) Controle. Submetidas a 144 g e.a ha⁻¹ (B), 432 g e.a ha⁻¹ (C e G), 864 g e.a ha⁻¹ (D, F e J), e 1440 g e.a ha⁻¹ de glifosato (E e I). (C) células de cobertura da cavidade secretora; (Es) estômato; (O) ostíolo; (Cg) célula-guarda; (Cs) célula subsidiária; (Ea) estômato alterado; (*) cera epicuticular com aspecto amorfo; (seta branca) perda da turgescência e elevação celular; (seta vermelha) obliteração estomática; (Ccr) colabamento das cristas estomáticas; (seta amarela) redução do ostíolo.

