

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

TOXIDADE DO FUNGICIDA COMERCIAL CONTENDO
AZOXISTROBINA E BENZOVIDIFLUPIR EM MODELOS
VEGETAIS

Autora: Eliane Adriana Lopes Souza
Orientadora: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça
Coorientador: Dr. Lucas Anjos de Souza

RIO VERDE – GO
Março– 2022

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

TOXIDADE DO FUNGICIDA COMERCIAL CONTENDO
AZOXISTROBINA E BENZOVIDIFLUPIR EM MODELOS
VEGETAIS

Autora: Eliane Adriana Lopes Souza
Orientadora: Dra. Maria Andréia C. Mendonça
Coorientador: Dr. Lucas Anjos de Souza

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, no Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Conservação dos Recursos Naturais.

RIO VERDE – GO
Março – 2022

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Souza, Eliane Adriana Lopes
SS0729 Toxidade do fungicida comercial contendo
azoxistrobina e benzovidiflupir em modelos vegetais.
/ Eliane Adriana Lopes Souza; orientadora Maria
Andréia Corrêa Mendonça; co-orientador Lucas Anjos
de Souza. -- Rio Verde, 2021.
48 p.

Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e
Conservação) -- Instituto Federal Goiano, Campus Rio
Verde, 2021.

1. bioensaios. 2. citotoxicidade. 3.
ecotoxicologia. 4. genotoxicidade. 5. estresse
oxidativo. I. Mendonça, Maria Andréia Corrêa, orient.
II. Anjos de Souza, Lucas, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610, de 19 de fevereiro de 1998, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano a disponibilizar gratuitamente o documento em formato digital no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

IDENTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese (doutorado) | <input type="checkbox"/> Artigo científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação (mestrado) | <input type="checkbox"/> Capítulo de livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia (especialização) | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC (graduação) | <input type="checkbox"/> Trabalho apresentado em evento |
| <input type="checkbox"/> Produto técnico e educacional - Tipo: | |

Nome completo do autor:
Eliane Adriana Lopes Souza

Matrícula:
2019102310840033

Título do trabalho:
TOXIDADE DO FUNGICIDA COMERCIAL CONTENDO
AZOXISTROBINA E BENZOVIDIFLUPIR EM MODELOS VEGETAIS

RESTRIÇÕES DE ACESSO AO DOCUMENTO

Documento confidencial: Não Sim, justifique:

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 24 /03 /2022

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O(a) referido(a) autor(a) declara:

- Que o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- Que obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autoria, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- Que cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

24 /03 /2022

Local

Data

Assinatura do autor e/ou detentor dos direitos autorais

Ciente e de acordo:

Maria Andréia Corrêa Mendonça

Assinatura do(a) orientador(a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 58/2021 - NREPG-RV/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

TOXIDADE DO FUNGICIDA COMERCIAL CONTENDO AZOXISTROBINA E BENZOVIDIFLUPIR EM
MODELOS VEGETAIS

Autora: Eliane Adriana Lopes Souza
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Andréia Corrêa Mendonça

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação - Área de Concentração Conservação dos
Recursos Naturais

APROVADO em 25 de maio de 2021.

Prof. Dr. Wellington Ronildo
Clarindo
Avaliador externo - UFV / Viçosa

Prof^ª. Dr^ª. Lia Raquel de Souza
Santos Borges
Avaliadora interna - IF Goiano /
Rio Verde

Prof^ª. Dr^ª. Maria Andreia Correa Mendonça
Presidente da Banca - IF Goiano / Rio Verde

Documento assinado eletronicamente por:

- Lia Raquel de Souza Santos Borges, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 26/05/2021 09:01:32.
- Wellington Ronildo Clarindo, Wellington Ronildo Clarindo - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Viçosa (25944455000196), em 25/05/2021 23:06:17.
- Maria Andreia Correa Mendonca, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 25/05/2021 15:01:49.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 24/05/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 271675
Código de Autenticação: 736a5a66f1



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Rio Verde
Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-970
(64) 3620-5600

AGRADECIMENTOS

“A Deus, pela sua infinita graça, abençoando-me com saúde e sabedoria, proporcionando o desenvolvimento dessa pesquisa.”

“Ao Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, pela oportunidade de realizar esse trabalho e possibilitar a conclusão desta pós-graduação.”

“Aos meus familiares, pela cumplicidade e por me apoiarem durante esse período, me incentivando e apoiando emocionalmente. Aos meus filhos, Gabriel e André, que tanto amo, sempre me proporcionando momentos alegres e me apoiando durante o percurso.”

“Em especial, à minha orientadora, Maria Andréia, pela confiança e paciência. Expresso minha gratidão por toda sua dedicação, delicadeza e pelos “mimos” recebidos no laboratório. Amei os chocolates, bolos e as lembrancinhas. Sua atenção e carinho permitiram que meus dias de análises fossem prazerosos.”

“Ao meu coorientador, Lucas Anjos de Souza, pela sua dedicação e disposição em me ensinar os testes enzimáticos. Obrigada pela sua atenção, que Deus possa retribuir tudo o que fez por mim.”

“Aos meus queridos professores que me ajudaram durante esse período, compartilhando todo conhecimento e sugestões.”

“A todos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Genética e do programa de mestrado em Biodiversidade e Conservação, que de forma direta ou indireta contribuíram auxiliaram na elaboração do presente estudo, desde já, meus agradecimentos.”

“Aos meus amigos, Atos Santos e André Silva, que me auxiliaram durante as realizações do estudo. Apenas Deus para recompensar o quanto fizeram por mim.”

“À monitora de laboratório, Beatriz Fermino, que foi minha parceira durante os períodos de germinação, coleta das raízes, esterilização de inúmeras ponteiras e organização dos materiais. Tenho muita gratidão pelo seu auxílio e trabalho desenvolvido.”

“Aos meus chefes de trabalho na Faculdade Unibrás, da qual sou colaboradora, atuando como técnica de laboratório, meus agradecimentos pela flexibilização de horário de trabalho, para que eu pudesse frequentar as aulas e realizar as atividades de pesquisa.”

“Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão desse trabalho fosse possível.”

BIOGRAFIA DA AUTORA

Eliane Adriana Lopes Souza, nascida em 11 de maio de 1979, na capital mato-grossense Cuiabá, mudou-se ainda criança para Rondonópolis, no interior do estado. É filha de Cleonice Adriana da Conceição e José Prudêncio Lopes. Em 1996 concluiu o Ensino Médio no Colégio Estadual Major Otávio Pitaluga, no mesmo município. Em 1999 mudou-se para Rio Verde, Goiás, passando a dedicar-se à família, paralisando os estudos. Após 18 anos de pausa, retomou os estudos e foi aprovada no vestibular. Em 2014 matriculou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano, campus Rio Verde, tendo colado grau em 2018. Em 2019 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, também no Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde. Em maio de 2021 defendeu sua dissertação, concluindo mais uma etapa da sua formação acadêmica.

ÍNDICE

Página

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Referências bibliográficas	4
2. OBJETIVOS	8
2.1. Objetivo geral:	8
2.2. Objetivos específicos:	8
3. CAPÍTULO I	9
EFEITOS DO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE <i>Lactuca sativa</i> L. (ASTERACEAE) E <i>Allium cepa</i> L. (AMARYLLIDACEAE): UMA AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA9	
3.1 Introdução	9
3.2 Material e métodos	13
3.3 Resultados e discussão	15
3.4 Conclusão	25
3.5 Referências bibliográficas	26
4. CAPÍTULO II	34
ANÁLISES BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO DAS RAÍZES DE <i>Lactuca sativa</i> L. (ASTERACEAE) E <i>Allium cepa</i> L. (AMARYLLIDACEAE) EXPOSTAS AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR.....	34
4.1 Introdução	34
4.2 Material e métodos	37
4.3 Resultados e discussão	39
4.4 Conclusão	43

4.5 Referências bibliográficas	44
--------------------------------------	----

ÍNDICE DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I: EFEITOS DO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (AMARYLLIDACEAE): UMA AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA

Tabela 1: Valores de média e desvio-padrão do comprimento das raízes de <i>Lactuca sativa</i> e <i>Allium cepa</i> expostas ao fungicida.....	19
Tabela 2: Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de <i>L. sativa</i>	21
Tabela 3: Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de <i>A. cepa</i>	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I: EFEITOS DO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (AMARYLLIDACEAE): UMA AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA

Figura 1: Modelo de exposição das sementes em placas de Petri (A); Germinação em BOD a 25°C (B); Identificação dos tubos contendo material germinado fixado para as análises microscópicas (C)..... 14

Figura 2: Comprimento das raízes de *Lactuca sativa* (alface) 24 horas (A); 48 horas (B); e 72 horas (C) durante o período de exposição às diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir e os controles positivos (TF 3,33 e 0,84 ppm) e o controle negativo (H₂O)..... 17

Figura 3: Comprimento das raízes de *Allium cepa* (cebola) 24 horas (A); 48 horas (B); e 72 horas (C) durante o período de exposição às diferentes concentrações do fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir e os controles positivos (TF 3,33 e 0,84 ppm) e o controle negativo (H₂O)..... 18

Figura 4: Imagens do ciclo celular e as alterações cromossômicas após exposição ao fungicida azoxistrobina + benzovindiflupir em modelos de vegetais. Interfase (A); Prófase (B); Metáfase (C); Anáfase (D); Telófase (E); Anáfase com ponte (F), Telófase com ponte (G); Prófase com micronúcleo (H); Células Binucleadas (I); e C-metáfase (J)..... 20

Figura 5: Frequência de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) por tratamento da espécie *Allium cepa* submetido à ANOVA..... 22

CAPÍTULO II: ANÁLISES BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO DAS RAÍZES DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (AMARYLLIDACEAE) EXPOSTAS AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR

Figura 1 - Atividade enzimática de raízes de *Lactuca sativa* submetidas às diferentes concentrações da mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus®). Proteína Total (A); Atividade específica de Catalase (B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (C); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (D). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância

40

Figura 2 - Atividade enzimática de raízes de *Allium cepa* submetidas às diferentes concentrações da mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus®). Proteína Total (A); Atividade específica de Catalase (B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (C); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (D). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância

41

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

APX	Ascorbato peroxidase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
Co-	Controle negativo
Co+	Controle positivo
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Coefficiente de Extinção Molar
EC	Enzyme Commission
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
g	Gramma
L	Litro
GPOX	Guaicol peroxidase
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
M	Massa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
POX	Peroxidase
ppm	Partes por milhão
PVP	Polivinilpirrolidona
RPM	Rotações Por Minuto
SOD	Superóxido dismutase
μ L	Microlitro
v	Volume

RESUMO

SOUZA, ELIANE ADRIANA LOPES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, maio de 2021. **Toxicidade do fungicida comercial contendo azoxistrobina e benzovindiflupir em modelos vegetais.** Orientadora: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça. Coorientador: Dr. Lucas Anjos de Souza.

Dentre os agroquímicos que são usados na agricultura, os fungicidas destacam-se pela sua grande utilização nas lavouras comerciais, em virtude de sua ação de combate às doenças fúngicas. A mistura comercial contendo os fungicidas azoxistrobina e benzovindiflupir tem sido amplamente utilizada para controle do agente causador da ferrugem da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), que é capaz de causar grandes prejuízos econômicos. No entanto, seu uso tem sido questionado, uma vez que os compostos ativos podem causar efeitos negativos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente. Com intuito de verificar os danos ocasionados por esses compostos, avaliou-se o potencial fitotóxico e citogenotóxico deste fungicida nos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) (alface) e *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) (cebola), por meio de análises macroscópicas (germinação e crescimento radicular), microscópicas (índice mitótico, alterações cromossômicas e nucleares) e enzimáticas (atividades específicas das enzimas catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase). Houve inibição no crescimento das raízes, apontando a fitotoxicidade deste fungicida sob diferentes concentrações nas espécies vegetais testadas. A partir dos resultados obtidos nas análises citogenéticas foi possível inferir que o fungicida comercial composto por azoxistrobina e benzovindiflupir possui potencial citotóxico e genotóxico, provocando diminuição do índice mitótico, alterações cromossômicas e nucleares. Em alguns casos foi observada atividade enzimática sob diferentes concentrações do fungicida, o que indica atuação do metabolismo antioxidante. A resposta da enzima ascorbato

peroxidase (APX) de *L. sativa* foi sensível aos tratamentos aplicados, sendo que, quando exposta às concentrações de 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹ de azoxistrobina e benzovindiflupir, houve diferença significativa da atividade quando comparada ao controle negativo. Por fim, os resultados obtidos indicam potencial fitotóxico devido à alteração das atividades das enzimas ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e catalase. Tais resultados indicam que esse fungicida pode ser nocivo para organismos não-alvo.

PALAVRAS-CHAVE: bioensaios, citotoxicidade, ecotoxicologia, genotoxicidade, estresse oxidativo.

ABSTRACT

SOUZA, ELIANE ADRIANA LOPES. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, May, 2021. **Toxicity of commercial fungicide containing azoxystrobin and benzovindiflupyr in plant models.** Advisor: Dra. Maria Andréia Corrêa Mendonça. Co-advisor: Dr. Lucas Anjos de Souza.

Fungicides are pesticides frequently used in agriculture, due to their action to combat fungal diseases. The commercial mixture containing the fungicides azoxystrobin and benzovindiflupyr is applied to control the agent that causes soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*), which is capable of causing great economic losses. However, the use of this agrochemical can have negative effects on both human health and the environment. In order to verify the damage caused by these chemicals, the phytotoxic and cytogenotoxic potential of this fungicide in the vegetable models *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) (lettuce) and *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) (onion) was evaluated through macroscopic analysis (germination and root growth), microscopic (mitotic index, chromosomal and nuclear changes) and enzymatic (specific activities of the enzymes catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase). It was possible to observe that there was inhibition in the growth of the roots, pointing out the phytotoxicity of this fungicide in the plant species tested in different concentrations. From the results obtained for cytogenetic analyzes it was possible to infer that azoxystrobin and benzovindiflupyr has the potential for cytotoxic and genotoxic, as it causes a decrease in the mitotic index, chromosomal and nuclear changes. In some cases, enzymatic activity was observed under different concentrations of the fungicide, which indicates the action of antioxidant metabolism. In both models, the ascorbate peroxidase response was the most sensitive to the treatments applied. The APX response of *L. sativa* was sensitive to the treatments applied, and when exposed to concentrations of 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹ of azoxystrobin and benzovindiflupyr, there was a significant difference in activity when compared to the negative control. Finally, the results

obtained indicate phytotoxic potential due to changes in the activities of the enzymes ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and catalase in the models studied. Such results indicate that this fungicide can be harmful to non-target organisms.

KEYWORDS: bioassays, citotoxic, ecotoxicology, genotoxic, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna desempenha um papel importante na sustentação de todas as atividades humanas, tendo como um de seus principais objetivos o aumento da produtividade, de forma a garantir segurança alimentar para a população mundial (SHARMA et al., 2020). Atualmente a segurança alimentar está ameaçada pelos impactos das mudanças climáticas e pelo crescimento da população mundial (MICHLER et al., 2019).

Neste cenário de produção de alimentos, o Brasil destaca-se como o segundo maior produtor de soja (*Glycine max*L) do mundo, sendo este grão uma fonte de proteína e óleo vegetal para consumo humano e animal (MARRO, 2020). A cultura da soja é considerada por Cattelan e Dall’Agnol (2018) como a responsável pelo recente desenvolvimento agrícola do Brasil, com impacto econômico e social. Nesse contexto, Michler et al. (2019) destacam que o crescimento da produtividade agrícola é vital para os resultados econômicos. Além disso, o país apresenta grande visibilidade por produzir várias outras *commodities*, como milho, algodão, café, entre outros (MARRO, 2020).

Para garantir essa produção de destaque, os agricultores brasileiros têm lançado mão de diferentes tecnologias, destacando-se o crescente uso de pesticidas, colocando o Brasil como um dos quatro maiores consumidores de pesticidas do mundo, junto com os EUA, UE e China (DONLEY, 2019). Assim, diferentes moléculas, isoladas ou em misturas comerciais têm sido lançadas no mercado, com o objetivo de oferecer aumento da produtividade e, conseqüentemente, dos lucros. De acordo com dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA (2019), no início de 2019, existiam no Brasil cerca de 13.300 registros de agrotóxicos, dos quais 517 ingredientes ativos já possuíam seu uso autorizado e 97 haviam sido banidos. Dentre os autorizados, os mais consumidos são os herbicidas, seguido pelos fungicidas (IPEA, 2019).

O fungicida selecionado para a realização do presente estudo consiste de uma mistura comercial dos fungicidas de contato e sistêmico contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (AGROLINK, 2019). Devido a menor eficiência observada com os fungicidas do grupo dos triazóis, a partir da safra 2007/08 na região Centro Oeste, e nas demais regiões a partir da safra 2008/09, a Comissão de Fitopatologia da Reunião de Pesquisa da Região Central do Brasil passou a indicar somente a utilização de misturas comerciais de triazóis com estrobilurinas para o controle da ferrugem asiática da soja (*Phakosporapachyrhizi*), considerada a doença de maior importância para essa cultura no Brasil (GODOY et al., 2016). Assim, a mistura comercial destes componentes ativos tem sido amplamente aplicada, de forma a evitar as perdas causadas pelo fungo, que chegaram até 70% da produção das lavouras atingidas (GODOY et al., 2016).

A azoxistrobina pertence à classe das estrobilurinas e o benzovindiflupir é considerado uma carboxamida (AGROLINK, 2019). As estrobilurinas, em geral, inibem a oxidação do ubiquinol no citocromo *bc₁* (complexo III) da mitocôndria, inibindo a fosforilação oxidativa e, portanto, diminuindo a produção de ATP, molécula importante em diversos processos fisiológicos dentro da célula (ANKE, 1995; KOEHLER e SHEW, 2017). Já as carboxamidas, atuam como inibidores da respiração celular, no complexo II, succinatodesidrogenase (WALTER et al., 2015).

O uso desses agroquímicos envolve os benefícios decorrentes do controle de patógenos, mas também deve-se considerar um potencial risco de fitotoxicidade e estresse oxidativo, que inclui desde a inibição de processos biológicos como mitose, fotossíntese, como também funções enzimáticas, crescimento radicular, interferência na síntese de pigmentos, DNA ou proteínas, além de destruição da membrana (WILLIAM et al., 1995).

A aplicação de pesticidas tem gerado um grande impacto aos organismos não-alvo, tornando a biota vulnerável a esses produtos lançados na lavoura, logo que tais produtos já foram reportados na literatura por diferentes efeitos nocivos ao meio ambiente e à saúde humana e animal, que vão desde contaminações do solo (GOMES et al., 2017) e água (BOULOGNE et al., 2012; WAGNER et al., 2014), até a bioacumulação desses compostos ao longo da cadeia trófica (GONÇALVES et al., 2017; MONTALVÃO et al., 2017). Com isso, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos da exposição de diferentes organismos a agroquímicos, uma vez que estes apresentam potencial para afetar o homem e o meio ambiente (ADAMS e MOSS, 2008).

A exposição de organismos não-alvo à pesticidas tem sido associada ao declínio de espécies, com isso, estudos sobre os efeitos da exposição desses organismos a produtos nocivos e seus impactos em diferentes níveis tróficos têm aumentado nos últimos anos (SCHWARZBACHERVA et al., 2017). Diversas metodologias estão disponíveis para avaliar a ação de compostos tóxicos em seres vivos, incluindo bioensaios que utilizam plantas superiores como modelos, já que apresentam características como rapidez no crescimento, baixo custo, alta sensibilidade e boa correlação com modelos animais (GRANT, 1994; TIGRE et al., 2012).

De acordo com Çildir e Liman (2020), o teste usando *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) (cebola) pode ser considerado o método citogenético mais utilizado para o estudo dos efeitos citogenotóxicos de fungicidas, logo que permite a observação de diferentes parâmetros, como crescimento radicular, índice mitótico e alterações cromossômicas. Esse teste é um método rápido, fácil, altamente preciso e facilmente reproduzível (GRANT, 1994; RANK e NIELSEN, 1994; TEIXEIRA et al., 2003; LEME e MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA et al., 2016; FATMA et al., 2018; BERNARDES et al., 2019). Mais recentemente, o modelo *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) (alface) começou a ser utilizado em análises de citogenotoxicidade e, comparado ao modelo *A. cepa*, poucos trabalhos utilizam esse modelo para avaliação de efeitos citogenotóxicos, embora seja muito utilizado em análises macroscópicas dos efeitos tóxicos de compostos químicos e resíduos ambientais (SILVEIRA, 2016).

Também cabe ressaltar que os estudos sobre os parâmetros metabólicos, bioquímicos e fisiológicos usando modelos vegetais expostos a diferentes substâncias tem aumentado, logo que são excelentes bioindicadores, aceitos para testes de toxicidade, permitindo a investigação concomitante com os mecanismos de ação das células de diferentes órgãos e tecidos (MALUSZYNSKA e JUCHIMIUK, 2005; LEME e MARIN MORALES, 2009; SILVEIRA et al., 2017; GHOSH et al., 2019). Estes modelos de bioensaios também atuam como eficientes ferramentas para analisar mecanismos de ação de componentes químicos derivados do metabolismo secundário de plantas (MACÍAS et al., 2000; PANDARD et al., 2006).

A genotoxicidade de um composto pode ser expressa através de múltiplos mecanismos, incluindo clastogênese e aneugênese (DA COSTA et al., 2012), considerados como eventos irreversíveis ao nível cromossômico (CHEN et al., 2020). Agentes genotóxicos induzem a aneuploidia por indução de perda ou ganho cromossômico durante a divisão celular (SALAZAR et al., 2010). O ensaio de

micronúcleos é um excelente método para avaliação de genotoxicidade, podendo detectar quebras cromossômicas causadas por tais mecanismos (CHEN et al., 2020). A aneuploidia é resultado da desagregação cromossômica, já os rearranjos cromossômicos surgem da indução clastogênica de ciclos de quebra e rearranjo cromossômico (SALAZAR et al., 2010). As chamadas aberrações cromossômicas, como pontes e quebras cromossômicas, são indicadores de uma ação clastogênica, enquanto perdas cromossômicas, atrasos, aderências, multipolaridade e C-metáfases resultam de efeitos aneugênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

1.1 Referências bibliográficas

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. Food microbiology and public health. In: **Food microbiology**. p. 161-183, 2000.

AGROLINK. BulaElatus[®]. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/elatus-150-ec_10462.html>. Acesso em 02/05/2019

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 940-945, 1995.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicological effects of commercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 21013-21021, 2019.

BOULOGNE, I. et al. Insecticidal and antifungal chemicals produced by plants: a review. **Environmental chemistry letters**, v. 10, n. 4, p. 325-347, 2012.

CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **Oilseeds and Fats, Crops and Lipids**, v. 25, n. 1, 2018.

CHEN, L. et al. A new 3D model for genotoxicity assessment: EpiSkin[™] Micronucleus Assay. **Mutagenesis**, v. 36, n. 1, p. 51-61, 2021.

ÇILDIR, D. S.; LIMAN, R. Cytogenetic and genotoxic assessment in *Allium cepa* exposed to imazalil fungicide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 20335-20343, 2020.

DA COSTA, R. M. G. et al. Multiple genotoxic activities of ptaquiloside in human lymphocytes: aneuploidy, clastogenesis and induction of sister chromatid exchange. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 747, n. 1, p. 77-81, 2012.

DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, v.18, p. 44, 2019

FATMA, F. et al. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. **Chemosphere**, v. 195, p. 864–870, 2018.

GHOSH, M. et al. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, p. 132-145, 2019.

GODOY, C.V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da ferrugem-asiática da soja, *Phakopsora pachyrhizi*, na safra 2015/16: resultados sumarizados dos ensaios cooperativos. Londrina: **EmbrapaSoja**, Circular Técnica, 119. 2016.

GOMES, A. R. et al. Review of the ecotoxicological effects of emerging contaminants to soil biota. **Journal of environmental science and health**, v. 52, n. 10, p. 992-1007, 2017.

GONÇALVES, M.W. et al. The agricultural impact of pesticides on *Physalaemus cuvieri* tadpoles (Amphibia: Anura) ascertained by comet assay. **Zoologia**, v. 34, 2017.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

IPEA, 2019. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada- Brasília: Rio de Janeiro: Ipea, 2019. Disponível em: <http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf> Acesso em 20/08/2020

KOEHLER, A.M., SHEW, H.D. Field efficacy and baseline sensitivities of fungicides used for the management of *Septoria* leaf spot of stevia. **Crop Protection**, v. 109, p. 95–101, 2017.

- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- MACÍAS, F. A. et al. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Plant Genotoxicity**, v. 56, n. 2, p. 177-184, 2005.
- MARRO, N. et al. Soybean yield, protein content and oil quality in response to interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and native microbial populations from mono-and rotation-cropped soils. **Applied Soil Ecology**, v. 152, p. 103575, 2020.
- MICHLER, J. D. et al. Conservation agriculture and climate resilience. **Journal of environmental economics and management**, v. 93, p. 148-169, 2019.
- MONTALVÃO M.F. et al. The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). **Chemosphere**, v. 183, p. 491-502, 2017.
- PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the total environment**, v. 363, n. 1-3, p. 114-125, 2006.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 1, p. 17-24, 1994.
- SALAZAR, A. M. et al. Suppression of p53 and p21CIP1/WAF1 reduces arsenite-induced aneuploidy. **Chemical research in toxicology**, v. 23, n. 2, p. 357-364, 2010.
- SCHWARZBACHEROVÁ, V. et al. Evaluation of cytotoxic and genotoxic activity of fungicide formulation Tango[®] Super in bovine lymphocytes. **Environmental pollution**, v. 220, p. 255-263, 2017.
- SHARMA, R. et al. A systematic literature review on machine learning applications for sustainable agriculture supply chain performance. **Computers & Operations Research**, v. 119, p. 104926, 2020.

- SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.
- SILVEIRA, M. A. D. et al. Mutagenicity of two herbicides widely used on soybean crops by the *Allium cepa* test. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1215-1222, 2016.
- TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 125-132, 2012.
- WALTER, H. et al. Sedaxane, Isopyrazam and Solatenol™: Novel Broad-spectrum Fungicides Inhibiting Succinate Dehydrogenase (SDH)–Synthesis Challenges and Biological Aspects. **CHIMIA International Journal for Chemistry**, v. 69, n. 7-8, p. 425-434, 2015.
- WAGNER, N. et al. Evaluating the risk of pesticide exposure for amphibian species listed in Annex II of the European Union Habitats Directive. **Biological Conservation**, v. 176, p. 64-70, 2014.
- WILLIAM, R. D. et al. Pacific northwest weed control handbook 1995. **Oregon State University Extension Service, Corvallis, OR**, p. 358, 1995.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Avaliar o potencial de efeitos citogenotóxicos e efeitos relacionados ao estresse oxidativo do fungicida comercial contendo o princípio ativo azoxistrobina e benzovindiflupir em células meristemáticas de raízes de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) (alface) e *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) (cebola).

2.2. Objetivos específicos:

- Investigar o potencial fitotóxico do fungicida supracitado por meio de análises de parâmetros macroscópicos, baseados em avaliação de desenvolvimento germinativo e crescimento radicular de plântulas das espécies modelo, submetidas às concentrações distintas do fungicida;
- Avaliar o potencial citotóxico do fungicida, por meio de estudo do ciclo celular, e potencial genotóxico, por meio da quantificação de alterações cromossômicas e nucleares em células do meristema radicular das espécies modelo selecionadas.
- Verificar a possibilidade de dose-dependência dos possíveis danos observados.
- Avaliar as alterações bioquímicas ligadas ao estresse oxidativo após exposição de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* ao fungicida.
- Verificar diferentes respostas fisiológicas aos testes enzimáticos realizados por meios das reações com catalase, ascorbato peroxidase e guaiacol peroxidase.

3. CAPÍTULO I

EFEITOS DO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (AMARYLLIDACEAE): UMA AVALIAÇÃO FITOTÓXICA E CITOGENOTÓXICA

Resumo: A demanda por alimentos estimulou o desenvolvimento da agricultura, resultando também na necessidade de aumento da produtividade agrícola. Os agroquímicos têm sido usados em superabundância, com o intuito de proteger as plantas das pragas e patógenos, no entanto, esses insumos atingem organismos não-alvo e podem afetar a saúde humana. Nesse sentido, se faz cada vez mais necessário entender como o uso indiscriminado dos agroquímicos pode afetar a fauna e a flora, a partir de efeitos deletérios celulares. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as implicações do fungicida comercial azoxistrobina e benzovindiflupir em células meristemáticas dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) e *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae), por meio de testes macroscópicos e microscópicos. Para isso, as espécies vegetais foram expostas a diferentes concentrações do fungicida, como controle positivo foi usada a Trifluralina e, como controle negativo, a água destilada. Os resultados fitotóxicos mostraram que o fungicida supracitado inibiu o crescimento e desenvolvimento das raízes de *L. sativa* nas concentrações de 3,0 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹, em 72 horas de exposição. No entanto, considerando o mesmo período de exposição em *A. cepa*, apenas a concentração de 6,0 g L⁻¹ apresentou diminuição no desenvolvimento germinativo. Concentrações menores (0,375 g L⁻¹ e 0,75 g L⁻¹) favoreceram efeitos subletais, logo que algumas concentrações não são significativamente altas para inibir a germinação, mas podem retardar o crescimento radicular. Análises da espécie *A. cepa*, exposta ao fungicida, identificaram alterações cromossômicas do tipo anáfases com ponte e prófases com micronúcleo. Tais resultados indicam que a mistura comercial contendo azoxistrobina e benzovindiflupir pode ser nociva para organismos não-alvo.

Palavras-chave: Agroquímicos, Modelos Vegetais, Fitotoxicidade, Genotoxicidade.

3.1 Introdução

O uso intensivo dos agroquímicos foi potencializado em meados dos anos 60, o que levou à chamada Revolução Verde, que por meio da mecanização e inclusão desses

insumos, modificou a produção agrícola (MAZOYER e ROUDART, 2010). Desde então, a utilização de insumos para controle de pragas e doenças tem se propagado de forma exponencial entre os agricultores que tem buscado por maiores rendimentos nas lavouras (MAZOYER e ROUDART, 2010). Nesse sentido, o Brasil é considerado um dos países com maiores consumos de pesticidas no mundo (FARIA et al., 2007). De acordo com a ANVISA (2020), existe um consumo crescente de agroquímicos no Brasil, de forma que nos últimos anos (2015-2018), consumiu-se valores acima de 500.000 toneladas por ano.

Embora a eficiência agrônômica dos insumos seja reconhecida, uma vez que sua ação no combate às pragas e doenças é relativamente rápida e eficaz, essas substâncias oferecem risco e estão fortemente relacionadas à poluição ambiental, causando danos à saúde humana e aos ecossistemas (NEVES et al., 2020; FERNANDES et al., 2020). Além disso, estimativas globais indicam que apenas 1% do valor aplicado atinge os organismos-alvo, de forma que os 99% restantes de pesticidas permanecem no solo, água e atmosfera, sendo eventualmente absorvido por organismos não-alvo (ZHANG et al., 2011).

Normalmente os insumos lançados no meio ambiente possuem ações sistêmicas, que na maior parte dos casos não é seletiva a ponto de causar apenas o controle da praga e/ou doença (NEVES et al., 2020). Na maioria das vezes esses produtos causam impactos na fauna e na flora existentes nos locais em que são aplicados, em função de sua alta atividade biológica e sua persistência no ambiente (NEVES et al., 2020). No solo, por exemplo, esses agroquímicos afetam não só os microrganismos que vivem nesse ambiente, como também podem atuar como um veículo para levar esses poluentes aos ambientes aquáticos, gerando riscos para todo o ecossistema (FERNANDES et al., 2020). Nesse sentido, a contaminação do solo é um problema ambiental associado ao transporte de contaminantes, como pesticidas, através processos erosivos, colocando em risco a saúde de diferentes ecossistemas, afetando organismos não-alvo por meio de diferentes formas de exposição e contaminação (DORES e DE-LAMONICA, 1999; FERNANDES et al., 2020).

A contaminação dos recursos hídricos tem causado um grande estresse ambiental, pois esses locais recebem impactos desde a aplicação, momento em que pode ocorrer a lixiviação das substâncias, possivelmente afetando os lençóis freáticos, além das águas superficiais, onde podem ser encontradas uma série de substâncias químicas com efeitos citotóxicos por produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em

organismos aquáticos (LI e RANDAK, 2009). Dessa forma, nos últimos anos, vários estudos laboratoriais estão sendo realizados para averiguar os efeitos de toxicidade desses compostos em todo o mundo (DUCHARME et al., 2015; HAN et al., 2016; GLABERMAN et al., 2017).

A utilização de organismos bioindicadores é um recurso importante para o monitoramento ambiental, uma vez que esses modelos respondem às alterações no ambiente (MANGIÉRI JUNIOR, 2002). Nesse sentido, diferentes grupos de organismos tem sido utilizados como bioindicadores, tais como bactérias (WATANABE-AKANUMAET et al., 2005), algas (Martinez et al., 2015), insetos (KARADENIZ et al., 2015), moluscos (JANAKIDEV et al., 2013), peixes (COSTA-SILVA et al., 2018), anfíbios (VASCONCELOS, 2014) e mamíferos (SABER et al., 2019; BENVINDO-SOUZA et al., 2022). Em geral, as plantas são utilizadas como organismos modelos para avaliação da genotoxicidade de pesticidas, uma vez que são reconhecidas como excelentes modelos de detecção de agentes mutagênicos ambientais (WANDSCHEER et al., 2017), sendo os testes com plantas comumente utilizados pela sua simplicidade e baixocusto (FISKEIJO, 1985; GRANT, 1999), além de não necessitar de aprovação de comissão de ética (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014).

Os bioensaios toxicológicos em plantas incluem desde avaliações de fitotoxicidade, durante a germinação das sementes, até análises do desenvolvimento radicular durante a exposição às substâncias potencialmente tóxicas. Durante a etapa da germinação, o embrião poderá sofrer alterações fisiológicas ou morfológicas, seja por fatores externos ou internos durante o desenvolvimento habitual da planta (DUTKA, 1989; LEWIS, 1995; CASTILLO, 2004). Em alguns casos, a quantidade de substâncias tóxicas pode não impedir que a germinação aconteça, contudo, se a concentração for muito elevada, pode comprometer o crescimento radicular (SOUZA, 2011).

Os testes de genotoxicidade permitem avaliar os efeitos de diferentes substâncias no material genético, por meio de investigação de mutações gênicas, dano cromossômico e lesões ao DNA (VALENTE et al., 2017). Há também modelos de bioensaios que avaliam citotoxicidade, que permitem mostrar como os agentes estressores atuam no funcionamento do metabolismo celular, além de averiguar como esses processos podem interromper o crescimento/multiplicação celular e até resultar na morte celular (ABREU, 2008). Sendo assim, a escolha desses organismos modelo é um fator muito relevante para a avaliação ecotoxicológica, pois a resposta pode determinar o nível de toxicidade do local estudado. Nesse sentido, informações sobre os modelos

utilizados, tais como sensibilidade, abundância, disponibilidade, distribuição geográfica, espécies de biologia, fisiologia e hábitos alimentares conhecidos, além de espécies estáveis geneticamente e uniformidade das populações, devem ser consideradas (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008; MONTEIRO, 2009).

As espécies modelo usadas para os testes macroscópicos e microscópicos foram a *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) e *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). A espécie vegetal *L. sativa* é comumente usada para as avaliações de fitotoxicidade e genotoxicidade (RIBEIRO et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014; MARTIN-PUZON e RIVERA, 2015), além de possuir germinação rápida, crescimento linear, baixa sensibilidade às diferenças de pH e potencial osmótico e alta sensibilidade aos agentes tóxicos (RICE, 1984; SOUZA et al., 2007; CARVALHO et al., 2014). A espécie *A. cepa* é uma excelente indicadora para avaliar efeitos citogenéticos (distúrbios no ciclo mitótico) e mutagenicidade (alterações cromossômicas) em plantas para um sistema de triagem rápida para esses modelos de insumos agrícolas, assim como estimar a sua toxicidade e genotoxicidade devido à sua sensibilidade e número pequeno de cromossomos ($2n=16$), sendo um modelo ideal para as análises de microscopia, apresentando boa correlação com outros bioensaios (FISKESJO, 1985; GRANT, 1999; CHAPARRO et al., 2010; LIMAN et al., 2015; PALMIERI et al., 2016; RAHMAN et al., 2017).

O fungicida Elatus[®], classificado como um fungicida sistêmico e de contato, é composto por uma mistura de uma estrobirulina, a azoxistrobina, e uma carboxamida, o benzovindiflupir, sendo recomendado para uso preventivo em culturas como o algodão, amendoim, aveia, cana-de-açúcar, café, cevada, feijão, milho, soja e trigo (AGROLINK, 2020). Os dados de proteção ao ambiente indicam que esse é um produto altamente persistente no meio ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos (microcrustáceos, algas e peixes) (AGROLINK, 2020), sendo necessárias maiores informações quanto à toxicidade e genotoxicidade contra organismos não-alvo, visando conhecer os impactos desse produto, bem como fornecer informações que subsidiem a conservação de espécies animais e vegetais. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos citogenotóxicos desse fungicida em células meristemáticas dos modelos vegetais *L. sativa* e *A. cepa*.

3.2 Material e métodos

Insumo químico

O composto selecionado para a realização do presente estudo foi um fungicida de contato e sistêmico, cujo nome comercial é Elatus[®] (Syngenta), adquirido em casa de revenda e distribuição de insumos local. Esta mistura comercial de fungicidas é utilizada em pulverizações preventivas, para o controle de doenças da parte aérea das culturas do algodão, amendoim, cana-de-açúcar, feijão, milho e soja (AGROLINK, 2020), sendo considerado um dos principais fungicidas registrados e utilizados no Brasil para o controle da ferrugem asiática da soja, causada por *Phakosporapachyrhizi* (MAPA, 2014).

A azoxistrobina pertence à classe das estrobilurinas e o benzovindiflupir é considerado uma carboxamida. As estrobilurinas podem ser classificadas pela atuação sistêmica, como é o caso da azoxistrobina (JULIATTI, 2019). Seu mecanismo de ação geral está ligado à inibição da oxidação do ubiquinol pelo citocromo *bc₁* (complexo III) da mitocôndria, conseqüentemente inibindo a fosforilação oxidativa e, portanto, diminuindo a produção de ATP, molécula importante em diversos processos fisiológicos dentro da célula (ANKE, 1995). Já as carboxamidas, atuam como inibidores de respiração celular, no complexo II, succinatodesidrogenase. Ao que se sabe, os efeitos tóxicos dessa combinação de fungicidas ainda não são bem elucidados.

Modelos de Bioensaios

Para as análises macroscópicas e microscópicas dessa pesquisa foram utilizadas sementes de *L. sativa*, variedade Monica lote 00030101730053050 98, eA. *cepa*, variedade Amarela lote 0091701910000170 97, todas da empresa Feltrin[®], de um mesmo lote, adquiridas em casas de revenda e distribuição de insumos.

Preparo do fungicida

Para a avaliação da ação desse fungicida foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,375 g L⁻¹ (C1); 0,75 g L⁻¹ (C2); 1,5 g L⁻¹ (C3); 3,0 g L⁻¹ (C4); 6,0 g L⁻¹ (C5). Estas concentrações foram estabelecidas a partir da concentração recomendada pelo fabricante para a cultura da soja (C3), sendo testadas duas concentrações menores, na proporção de 1/4 e 1/2 da concentração de uso recomendada (C1, C2, respectivamente), e duas concentrações maiores, sendo a primeira 2 vezes maior (C4) e a segunda 4 vezes maior (C5) que concentração de uso recomendada. A água destilada

foi usada como controle negativo (Co-) e a trifluralina, um herbicida pertencente ao grupo químico dinitroanilinas, nas concentrações de 0,84 ppm e 3,33 ppm, como controle positivo (Co+), conforme recomendado por Fernandes et al. (2007).

Análises Macroscópicas

O efeito fitotóxico do fungicida foi avaliado pela análise de parâmetros macroscópicos baseados na germinação das sementes e crescimento radicular das plântulas. O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com cinco concentrações do fungicida, em 5 repetições. Cada repetição consiste em uma placa de Petri ou Gerbox com vinte e cinco sementes colocadas sobre papel de germinação contendo solução-teste ou um dos controles. As placas foram mantidas em BOD a 25 °C, por 72h (Figura 1). Durante o período de exposição ao fungicida, foram realizadas contagens de germinação e medidas de comprimento da raiz a cada 24 horas, de forma a avaliar a porcentagem de sementes germinadas e comprimento da raiz de cada semente. Para a medida do comprimento da raiz, as sementes foram retiradas e colocadas em papel colorset preto e fotografadas. Para medir o comprimento das raízes, foi utilizado o programa Image J. Ao fim da exposição ao fungicida, as raízes foram coletadas e fixadas com ácido acético glacial e álcool metílico na proporção 3:1, com três substituições de fixador e armazenadas a -20 °C até o momento da confecção das lâminas para as análises microscópicas.



Figura 1: Modelo de exposição das sementes em placas de Petri (A); Germinação em BOD a 25°C (B); Identificação dos tubos contendo material germinado fixado para as análises microscópicas (C).

Análises Microscópicas

Para avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do fungicida, foram utilizados os meristemas das raízes expostos às diferentes concentrações da mistura comercial de fungicidas (0,375 g L⁻¹ a 6,0 g L⁻¹). Para a confecção das lâminas, as raízes passaram por hidrólise com HCl 1 mol L⁻¹ em temperatura ambiente, sendo que o tempo de

hidrólise para a espécie de *A. cepa* foi 16 minutos, e para a espécie *L. sativa* o tempo foi 6 minutos. Em seguida, os meristemas radiculares foram dissociados, corados com três gotas de Orceína Acética (2%) por 10 minutos, cobertos com lamínula e esmagados. Foram analisadas 5.000 células por tratamento, contabilizando total de 80.000 células examinadas para ambas espécies. Também foram analisados os seguintes parâmetros: índice mitótico, calculado a partir da razão entre o número de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase); e o número total de células observadas, considerando a frequência de aberrações cromossômicas (pontes, fragmentos, quebras cromossômicas, perdas cromossômicas e c-metáfases), micronúcleos e anormalidades nucleares, conforme descrito por Leme e Marin-Morales(2009).

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas dos dados macroscópicos e microscópicos obtidos, foi utilizado o teste de normalidade de Levene ($p > 0.05$) e, em seguida, utilizada ANOVA One-Way, para os dados paramétricos, e o teste Kruskal-Wallis, para os dados não paramétricos. No entanto, em primeiro momento, quando os dados mostravam-se ser não paramétricos, eles eram submetidos à transformação $\text{Log}(X+1)$ e testada a normalidade novamente. Os testes post hoc utilizados foram o Teste de Tukey e o teste de Student-Newman-Keuls. As análises foram realizadas com auxílio do software *Statística 7* e o teste de Student-Newman-Keuls no *BioEstat v.5.0*. Para os parâmetros macroscópicos, os testes foram aplicados considerando o comprimento das raízes diariamente durante três dias para cada concentração.

3.3 Resultados e discussão

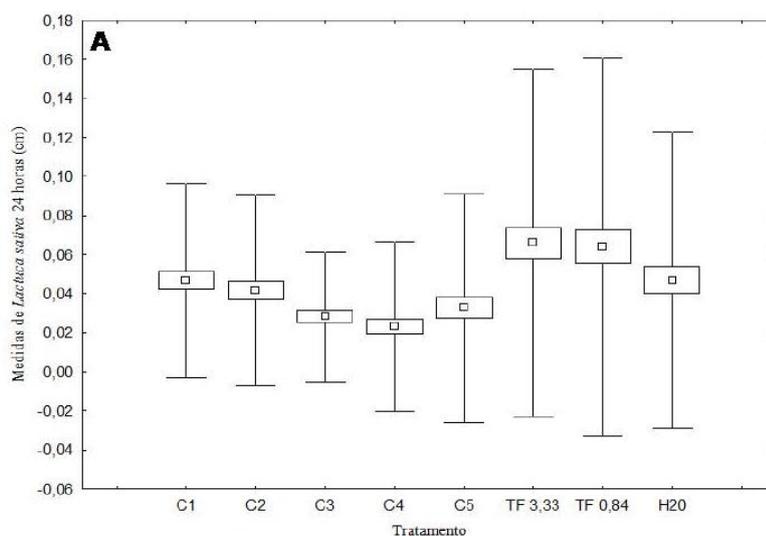
Análises de crescimento radicular da espécie *Lactuca sativa* (alface)

Os dados do comprimento das raízes de *L. sativa* (média e desvio-padrão) estão disponíveis na tabela 1. Os valores observados não atenderam aos pressupostos do teste de Levene ($p > 0,05$), portanto, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Houve uma diferença significativa para 24 horas ($H_{(7,N=1000)} = 33,69334$ $p = 0,0000$) a C4 e C5 em relação ao C1; C4 em relação ao C2 e C1; C2 e TF 3,33 em relação ao C4. C1 em relação ao C5; e C4 em relação a TF 3,33 (Figura 2). Após 48 horas $H_{(7,N=1000)} = 29,38731$ $p = 0,0001$ de exposição das radículas ao agroquímico, foi observada diferenças entre C5 em relação a C2; C5 em relação a C3, C2, C3; e TF 3,33 em relação a C5; e C5 em

relação a TF 3,33. Já para 72 horas $H_{(7, N= 1000)}=52,78868$ $p =0,0000$ de exposição, as diferenças foram observadas em C4, C5 e TF 0,84 em relação a C2; TF 0,84 em relação a C3; C2 e TF 3,33 em relação a C4; C2 e TF 3,33 em relação a C5 e C4; C5, TF 0,84 e H₂O em relação a TF 3,33, C2 e C3; TF 3,33 em relação a TF 0,84; e TF 3,33 em relação a H₂O, sendo que o teste de Student-Newman-Keuls apontou diferenças significativas ($p<0,05$) (Figura 2).

Análises de crescimento radicular da espécie *Allium cepa* (cebola)

Para as análises do crescimento radicular de *A. cepa* também foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Foram observadas diferenças significativas em 24 horas de exposição ($H_{(7, N= 1000)} =57,97940$ $p =0,0000$ (figura 3). As concentrações de C1 a C5 diferiram estatisticamente de TF 3,33. Ainda, as concentrações C4 e C5 diferiram estatisticamente de TF 0,84, sendo que apenas C5 apresentou diferença significativa para o controle negativo. Após 48 horas (Kruskal-Wallis: $H_{(7, N= 1000)} =63,01744$ $p =0,0000$) de contato com o fungicida, as diferenças significativas observadas foram C1 em relação a TF 3,33, 0,84 e H₂O, C2, C3 e C4 em relação à TF 3,33; C5 em relação à TF 3,33, 0,84 e H₂O. Depois de 72 horas de exposição (Kruskal-Wallis: $H_{(7, N= 1000)} =69,27750$ $p = 0,0000$), os dados que mostraram diferenças significativas da exposição do fungicida foram de C1 em relação a TF 3,33, 0,84 e H₂O; C2 em relação ao C5; C4 em relação TF 3,33 e H₂O; C5 em relação a C2, TF 3,33, 0,84 e H₂O. Os valores de média e desvio-padrão estão disponíveis na tabela 1.



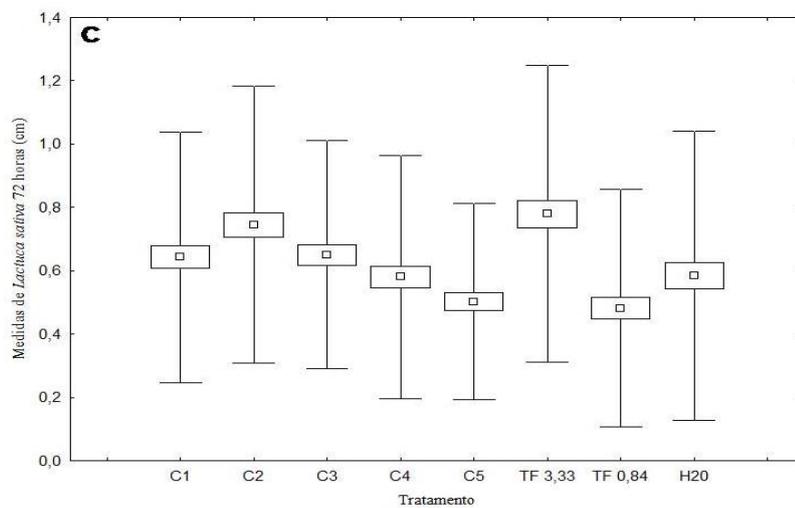
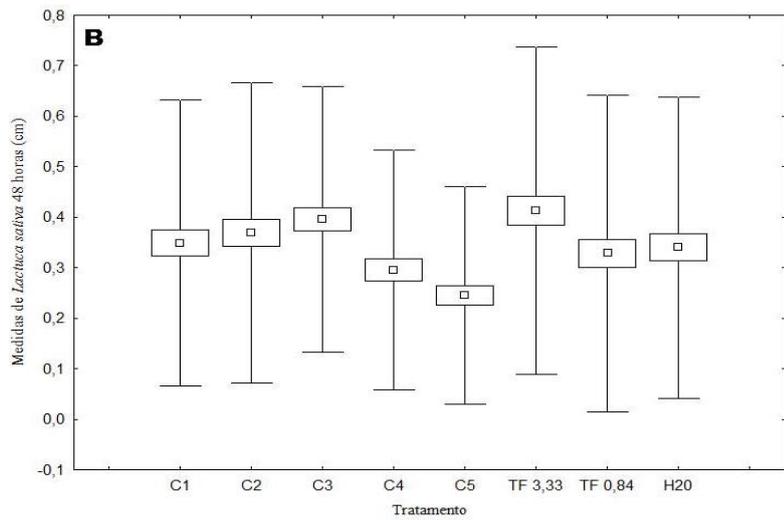


Figura 2: Comprimento das raízes de *Lactuca sativa* (alface) em 24 horas (A); 48 horas (B); e 72 horas (C) durante o período de exposição às diferentes concentrações do fungicida, controles positivos (TF 3,33 e 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O).

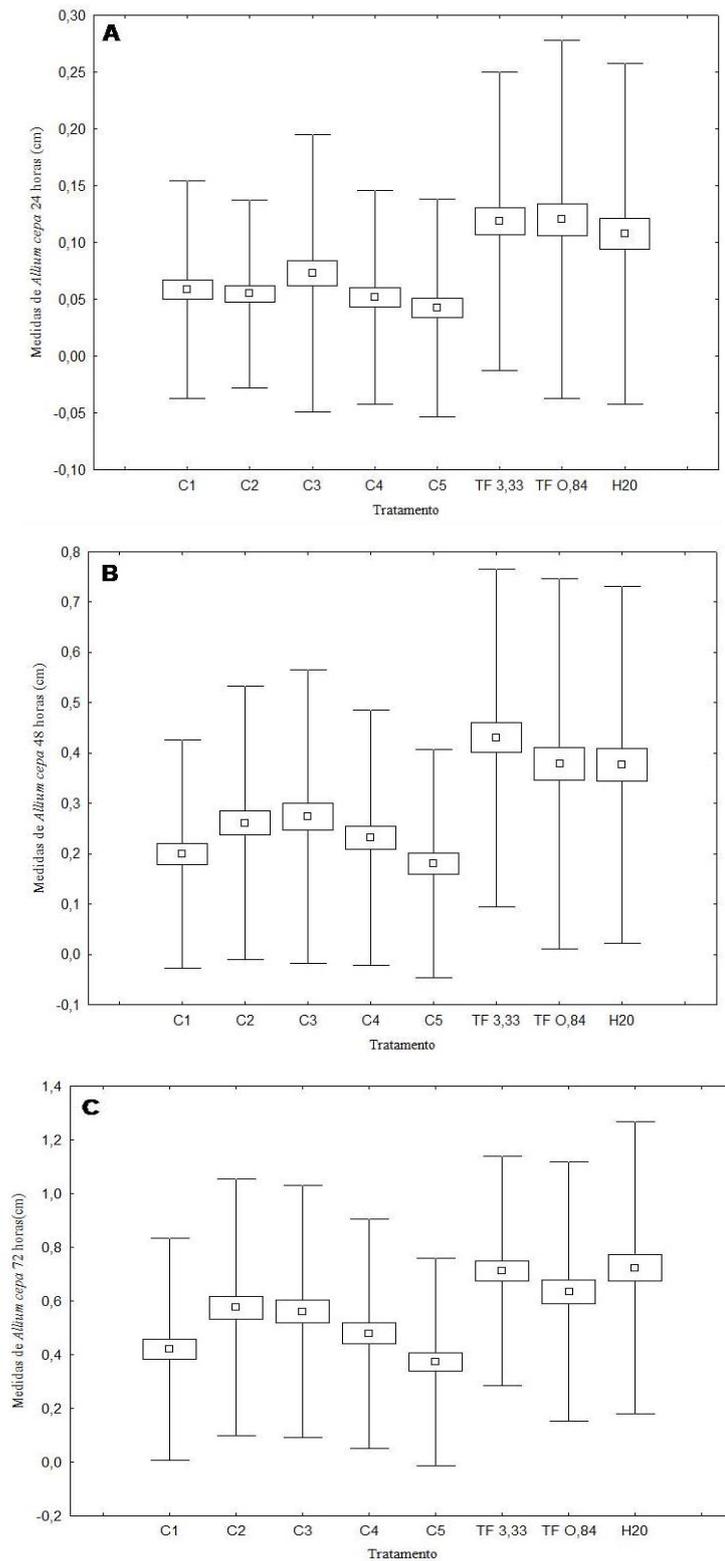


Figura3: Comprimento das raízes de *Allium cepa* (cebola) em 24 horas (A), 48 horas (B) e 72 horas (C) durante o período de exposição às concentrações do fungicida, controles positivos (TF 3,33 e 0,84 ppm) e controle negativo (H₂O).

Tabela 1: Valores de média e desvio-padrão do comprimento das raízes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa* expostas ao fungicida

Espécie/Período	TRATAMENTOS							
	C1	C2	C3	C4	C5	TF 3,33	TF 0,84	H ₂ O
<i>L. sativa</i> (24 horas*)	0,047±0,495	0,041±0,048	0,028±0,033	0,029±0,046	0,032±0,058	0,065±0,089	0,063±0,096	0,047±0,076
<i>L. sativa</i> (48 horas*)	0,351±0,282	0,369±0,297	0,396±0,263	0,295±0,244	0,245±0,215	0,412±0,324	0,328±0,313	0,354±0,308
<i>L. sativa</i> (72 horas*)	0,647±0,393	0,745±0,437	0,650±0,360	0,580±0,383	0,501±0,309	0,778±0,468	0,482±0,375	0,584±0,455
<i>A. cepa</i> (24 horas*)	0,058±0,096	0,054±0,082	0,072±0,121	0,051±0,093	0,042±0,095	0,118±0,131	0,120±0,157	0,107±0,149
<i>A. cepa</i> (48 horas*)	0,199±0,227	0,261±0,272	0,273±0,292	0,231±0,253	0,180±0,226	0,430±0,335	0,378±0,367	0,377±0,355
<i>A. cepa</i> (72 horas*)	0,421±0,413	0,579±0,475	0,561±0,468	0,479±0,427	0,372±0,386	0,712±0,427	0,634±0,482	0,724±0,544

Valores de média± Desvio padrão; * p < 0,001.

Análises Microscópicas

Depois da análise das imagens capturadas, foram calculadas a frequência, em porcentagem, de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase), o índice mitótico e a frequência das alterações cromossômicas, a partir 5.000 células de cada tratamento. As imagens de células normais e as alterações cromossômicas encontradas durante os testes realizados nos modelos vegetais de *L. sativa* e *A. cepa* são mostradas na figura 4.

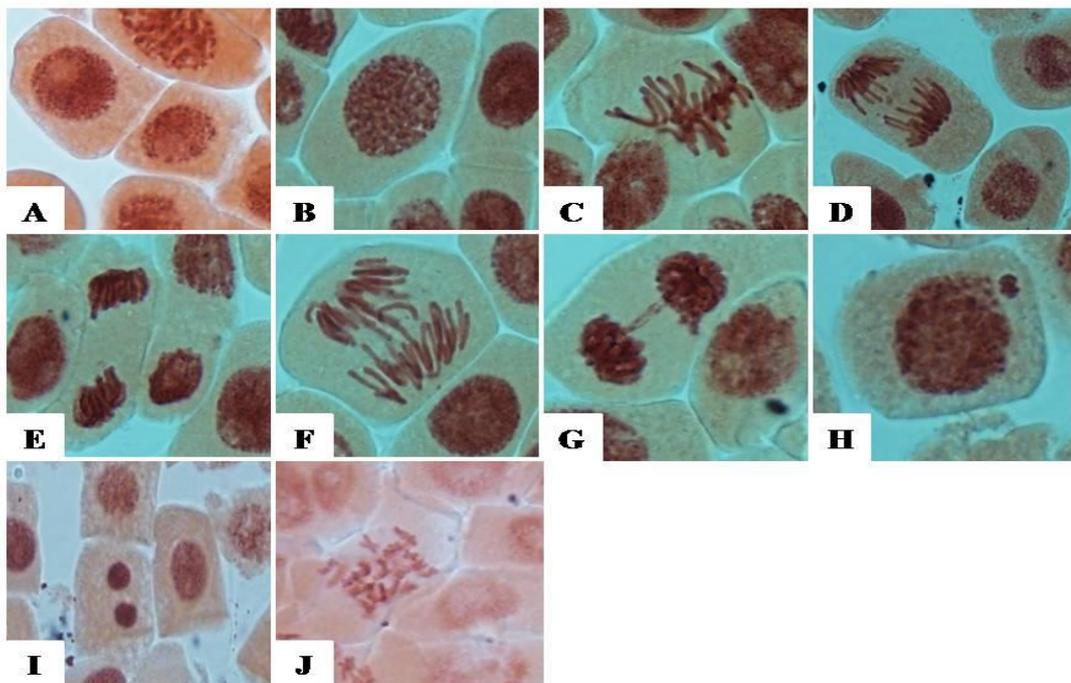


Figura 4: Imagens do ciclo celular e as alterações cromossômicas após exposição ao fungicida contendo azoxistrobina e benzovindiflupir em modelos de vegetais. Interfase (A), Prófase (B), Metáfase (C), Anáfase (D), Telófase (E); Anáfase com ponte (F), Telófase com ponte (G), Prófase com micronúcleo (H), Células Binucleadas (I) e C-metáfase (J).

Na tabela 2 estão mostrados os dados de *L. sativa*, juntamente com a porcentagem de células em divisão (mitose), alterações cromossômicas e alterações nucleares. Os dados das frequências de células em divisão dos indivíduos de alface foram submetidos à ANOVA ($p < 0,05$). As anáfases com ponte [$F_{(7, 21)}=1,5877$, $p=0,19371$] e telófases com ponte [$F_{(7, 21)}=1,5877$, $p=0,19371$] não apresentaram diferença estatística significativa. As c-metáfases e as prófases com micronúcleo encontradas foram submetidas ao teste de Kruskal-Wallis, não apresentando diferença significativa para c-metáfase [$H_{(7, N=29)}= 7,419808$ $p=,3865$], e para prófases com micronúcleo [$H_{(7, N=29)}= 19,61312$ $p= 0,0065$].

Tabela 2: Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de *Lactuca sativa*.

Ciclo Celular							
[C]	IM	I	P	M	A	T	AC
C1	20,4%	79,1%	11,7%	4,6%	0,8%	3,3%	0,4%
C2	25,6%	72,1%	17,5%	4,5%	0,7%	2,9%	2,3%
C3	27,3%	71,7%	18,1%	3,9%	0,6%	4,7%	1,0%
C4	23,8%	73,9%	15,7%	4,0%	0,7%	3,4%	2,1%
C5	19,5%	78,5%	14,1%	3,0%	0,5%	1,9%	2,0%
TF 3,33	15,7%	76%	9,5%	3,5%	0,7%	2,0%	8,3%
TF 0,84	24,2%	74%	16,5%	4,1%	0,7%	2,9%	1,8%
H₂O	23,8%	75,2%	13,5%	5,5%	1,6%	3,2%	1,0%

[C]: Concentração do fungicida; IM: Índice Mitótico; I: Intérfase; P: prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; AC: Frequência total de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas.

Na figura 5 podem ser verificadas as frequências de células em divisão (mitose) e as frequências das alterações cromossômicas e alterações nucleares. A soma da frequência de células em divisão dos indivíduos de cebola foi submetida à ANOVA ($p > 0,05$). Para as análises com a espécie *A. cepa* (cebola) foram identificadas as seguintes alterações cromossômicas: anáfases com pontes, telófases com pontes, c-metáfases, prófases com micronúcleo, anáfases com perdas cromossômicas e células binucleadas. Nesse caso, após o teste de homogeneidade, todos os dados foram transformados e submetidos ao teste Kruskal-Wallis, apresentando ser significativo para anáfases com ponte [$H_{(7, N=39)} = 18,53934$ $p = 0,0098$] e para prófases com micronúcleo [$H_{(7, N=390)} = 29,80926$ $p = 0,0001$]. Os resultados das análises estatísticas não foram significativos para telófases com ponte [$H_{(7, N=39)} = 7,854111$ $p = 0,3456$], para c-metáfases [$H_{(7, N=39)} = 10,27387$ $p = 0,1736$], e para anáfases com perdas cromossômicas [$H_{(7, N=39)} = 8,627027$ $p = 0,2806$].

Tabela 3: Índice mitótico e porcentagem das diferentes fases do ciclo celular e alterações cromossômicas/anormalidades nucleares de *Allium cepa*.

Ciclo Celular							
[C]	IM	I	P	M	A	T	AC
C1	49,5%	50,5%	39,2%	4,0%	1,0%	5,3%	0,0%
C2	56,5%	43,3%	48,0%	2,5%	0,9%	5,1%	0,2%
C3	41,0%	58,0%	31,7%	4,3%	1,0%	4,0%	1,0%
C4	70,3%	28,2%	69,4%	0,3%	0,2%	0,4%	1,5%
C5	70,4%	25,5%	69,5%	1,6%	0,4%	2,6%	0,4%
TF 3,33	73,3%	25,2%	66,5%	2,9%	0,5%	3,4%	1,5%
TF 0,84	76,8%	22,2%	69,7%	2,8%	0,6%	3,7%	1,0%
H₂O	86,5%	12,7%	81,4%	1,9%	0,7%	2,5%	0,8%

[C]: Concentração do fungicida; IM: Índice Mitótico; I: Intérfase; P: prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; AC: Frequência total de alterações cromossômicas e anormalidades nucleares observadas.

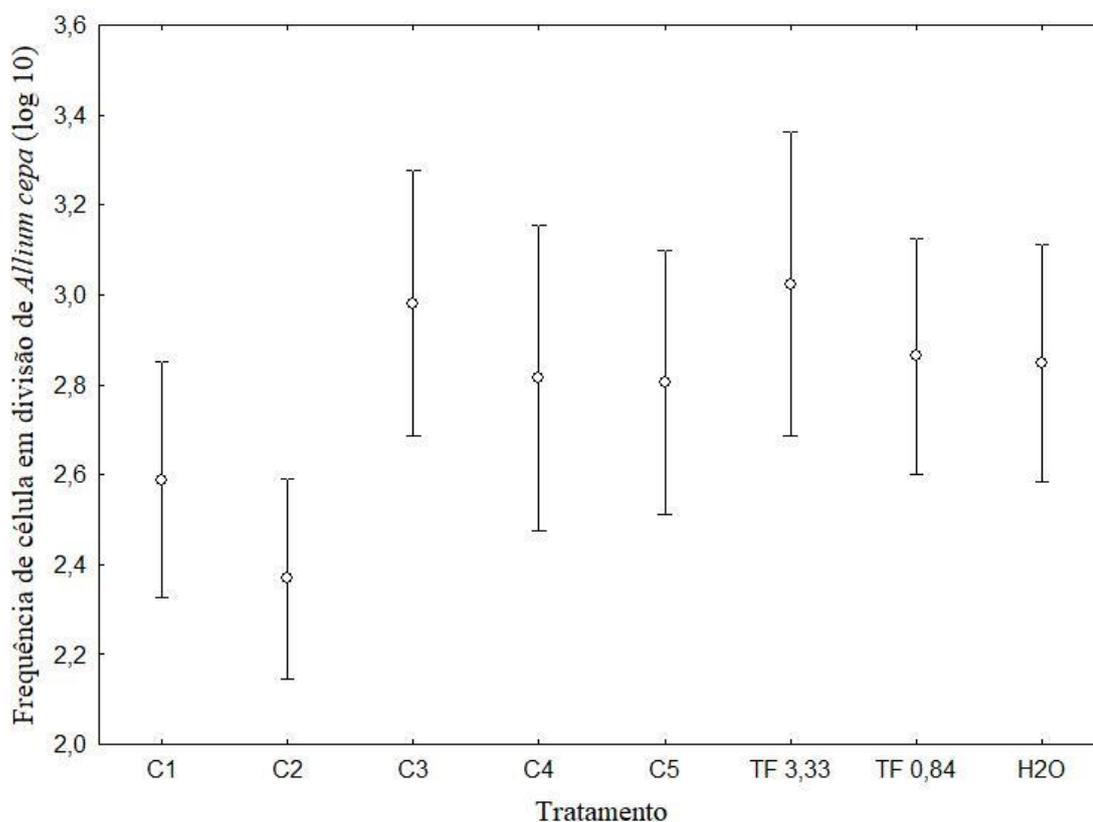


Figura 5: Frequência de células em divisão (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase) por tratamento da espécie *Allium cepa* submetido à ANOVA.

No presente estudo foram avaliados os efeitos de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da mistura comercial do fungicida nos modelos vegetais de *A. cepa* e *L. sativa* por meio dos testes macroscópicos e microscópicos.

Por meio das avaliações macroscópicas, foi possível verificar que as concentrações avaliadas do fungicida causaram uma redução no crescimento radicular das espécies *L. sativa* e *A. cepa*. Para o tempo máximo de exposição avaliado (72 horas), observou-se uma inibição no desenvolvimento radicular em *A. cepa*. Esses resultados estão de acordo com os dados mostrados pelos autores Andrade et al. (2008; 2010) que os efeitos destes compostos químicos reduziram o crescimento das raízes em períodos maiores de exposição. Também pode ser explicado pela diminuição da atividade meristemática (WEBSTER e MCLLEOD, 1996) para o alongamento celular (FUSCONI et al., 2006). Radetski et al. (2000) afirmaram que a biomassa (alongamento de raiz) é um dos parâmetros mais sensíveis para avaliação de toxicidade de herbicidas no ensaio de *L. sativa*.

Esses resultados reforçam que o crescimento radicular é inibido quando *A. cepa* foi exposta ao fungicida estudado, quando comparados ao controle negativo (H_2O) e às concentrações abaixo do recomendado (C1) e (C2). Segundo Sobrero e Ronco (2004), essa inibição pode ser um sinal de efeito subletal, pois algumas concentrações não são significativamente altas para inibir a germinação, mas podem retardar o crescimento radicular. Harashima e Schnittger (2010) afirmaram que o crescimento de um órgão está intimamente relacionado aos ciclos sucessivos de divisão celular e à inibição da síntese de proteínas.

Em relação às alterações observadas durante o ciclo celular na análise citogenética clássica, verificou-se que, para a espécie *L. sativa*, não houve diferenças significativas quando as concentrações do fungicida são comparadas ao controle negativo e controles positivos. Já para a espécie *A. cepa*, as frequências de divisões ao longo do período proposto foram consideradas relativamente baixas nas concentrações C1 e C2. O controle positivo (H_2O) e TF 0,84 se igualaram, não atingindo a TF 3,33 e C3, porém se for comparado o controle positivo (H_2O) com a concentração (C1), o fungicida demonstra ser um inibidor de divisão celular. Sendo assim, a azoxistrobina e benzovindiflupir mostraram que possuem uma interação com DNA, apresentando ser genotóxico e que pode oferecer comprometimento celular. Segundo Andrade-Vieira (2012), os agentes genotóxicos causam danos ao DNA, que podem ser reparados pelos mecanismos de reparo da célula, ou serem fixados levando ao comprometimento

celular, podendo ser expressos como alterações cromossômicas observadas no ciclo celular (MAURO et al., 2014).

Foram identificadas alterações cromossômicas significativas apenas para a espécie *A. cepa* durante as análises estatísticas. As anáfases com ponte constatadas em imagens microscópicas podem estar relacionadas às alterações morfológicas no núcleo interfásico, ou seja, a preparação para o início da divisão celular, sendo que, tais condições possuem funções específicas. Segundo Humphrey e Brinkley (1969), as pontes cromossômicas que aparecem na anáfase podem ser decorrentes de trocas estruturais ocorridas anteriormente entre as cromátides de um mesmo cromossomo ou entre as cromátides de dois cromossomos diferentes. Uma vez que há presença dessas anormalidades cromossômicas, este fenômeno pode estar relacionado à quebra de frações cromossômicas. Essa quebra pode significar a perda dos telômeros, região na extremidade terminal do cromossomo, que tem como uma das funções garantir a proteção e estabilidade cromossômica (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012), sugerindo que azoxistrobina e benzovindiflupir possuem características clastogênicas. O efeito clastogênico resulta das quebras no DNA, que é evidenciado pela presença de pontes em anáfase-telófase e fragmentos cromossômicos durante o ciclo de divisão celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009; BIANCHI et al., 2015). Desse modo, diante de ciclos repetitivos de quebra, fusão e formação de pontes, as células filhas podem sofrer anormalidades por várias gerações.

A presença de micronúcleos observados em células de *A. cepa* e *L. sativa* tratadas com o fungicida foi observada em diferentes tamanhos nas células e também podem ter tido sua formação relacionada às características clastogênicas. Os micronúcleos, alterações mais citadas em trabalhos de avaliação de toxicidade, são estruturas presentes no citoplasma que contém cromatina, envolvidos por uma membrana e não possuem ligação com o núcleo principal, podendo ser originados tanto por cromossomos inteiros como por fragmentos acêntricos (FENECH, 2000; LEME e MARIN-MORALES, 2009). Estudos conduzidos por Aurora et al. (1969) revelaram que quando há presença de micronúcleos na $F_{(1)}$ normalmente estes não se dividem, mas tendem a se degenerar na próxima geração seguinte $F_{(2)}$, o que pode estar relacionado com a quantidade de micronúcleos encontrados em períodos maiores de exposição e níveis de concentração de produtos. Geralmente os efeitos são mais severos em concentrações mais altas e em longos períodos de exposição ao fungicida, que assegura que os micronúcleos têm potencial mutagênico (PATRA et al., 2004).

As alterações numéricas são provocadas por segregação anormal dos cromossomos (aneuploidia e poliploidia), indicando um agente aneugênico (aderências, c-metáfases, atrasos e perdas cromossômicas) (SABEEN et al., 2019). Nesse sentido, foram constatados a presença c-metáfases em (C5) e perdas cromossômicas em (C3) e (C5) e TF 0,84 ppm em quantidades mínimas em *A. cepa*. Porém, em *L. sativa* apenas a concentração do controle positivo TF 3,33 mostrou quantidades altas de c-metáfases.

Corroborando com as análises realizadas no presente estudo, as c-metáfases podem ser indicativas de efeitos citotóxicos severos. Franco-Bernardes (2016) afirma que a trifluralina é capaz de provocar morte celular por necrose ou apoptose, além de induzir bloqueio do ciclo celular na fase S. Fernandes et al. (2007) relataram que o mesmo apresenta ação aneugênica. Sendo assim, as concentrações de trifluralina pode inferir com a permeabilidade de membrana, mas que esses efeitos são esperados para o teste-controle.

As células binucleadas encontradas na concentração C3 em *A. cepa* podem ser originadas de falhas na polimerização da tubulina devido à ação do fungicida. Segundo Canevari (1996), essas células binucleadas surgem devido à dificuldade da formação do fuso mitótico, sendo consideradas como efeitos aneugênicos de compostos químicos. Porém, outro autor complementa que a ocorrência de células binucleadas é resultado da inibição da formação da placa celular entre as células filhas, que é dependente do bom funcionamento dos microtúbulos (TURKOGLU, 2008). Sendo assim, a concentração recomendada pelo fabricante já oferece indícios de desorganização das vesículas para a formação da placa celular.

3.4 Conclusão

Os resultados do presente trabalho demonstraram que o fungicida formulado com azoxistrobina e benzovindiflupir causou inibição do crescimento radicular nos modelos vegetais analisados. Além disso, as análises indicam que esse fungicida possui interação com o DNA e alteração das frequências mitóticas, indicando efeitos citotóxicos, genotóxicos, clastogênicos e aneugênicos. Análises da espécie *A. cepa*, exposta ao fungicida, identificaram alterações cromossômicas do tipo anáfases com ponte e prófases com micronúcleo. A presença de micronúcleos nas células corrobora com o potencial mutagênico desse agroquímico. Tais resultados

indicam que a mistura comercial contendo azoxistrobina e benzovindiflupir pode ser nociva para organismos não-alvo.

3.5 Referências bibliográficas

ABREU, C. L. C. **Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de Quantificação de Proteínas Totais em células 3T3**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2008.

AGROLINK. Bula Elatus®. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/elatus-150-ec_10462.html>. Acesso em 27/02/2021.

ANDRADE, L. F. et al. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.

ANDRADE, L. F. et al. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 4, 626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** (Impresso), v. 86, p. 373-382, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of landfills assessed by plant cytogenetic approaches. **Waste management, regional practices, and environmental impact. New York**, p. 319-330, 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140-146, 2012.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 940-945, 1995.

ANVISA–AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201/>. Acesso em 20/09/20.

BARBÉRIO, A. et al. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011.

BENVINDO-SOUZA, M. et al. Evaluation of genotoxicity in bat species found on agricultural landscapes of the Cerrado savanna, central Brazil. **Environmental Pollution**, v. 293, p. 118579, 2022.

BIANCHI, J. et al. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, p. 102-111, 2015.

CANEVARI, R.A. **Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina.** n. f. Monografia (Bacharelado em Biologia Geral). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.

CARVALHO, W. P. et al. Allelopathy of green manures extracts on germination and initial growth of the lettuce. **Bioscience Journal**, v. 30, n. Supplement, p. 1-11, 2014.

CASTILLO, G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Resultados y Aplicaciones.** México: IMTA, 188p. 2004.

CHAPARRO, T. R. et al. Biodegradability and toxicity assessment of bleach plant effluents treated anaerobically. **Water Science and Technology**, v. 62, n. 6, p. 1312-1319, 2010.

COSTA-SILVA, D. G. et al. N-acetylcysteine inhibits Mancozeb-induced impairments to the normal development of zebrafish embryos. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 68, p. 1-12, 2018.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do Ambiente Aquático por pesticidas: Vias de Contaminação e Dinâmica dos Pesticidas no Ambiente Aquático. **Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, p. 18, 1999.

- DUCHARME, N. A. et al. Comparison of toxicity values across zebrafish early life stages and mammalian studies: Implications for chemical testing. **Reproductive Toxicology**, v. 55, p. 3-10, 2015.
- DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments (B. Dukta, Ed.) **National Water Research Institute (NWRI)**. Environment Canada, p. 120-122, 1989.
- FARIA, N. M. X. et al. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FERNANDES, C. L. F. et al. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p. 256-270, 2020.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985.
- FRANCO-BERNADES, M. F. **Avaliação de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuron e trifluralina, e seus efeitos na expressão genes de respostas ao estresse celular**. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.
- FUSCONI, A. et al. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, n. 1-3, p. 253-260, 2006.
- GLABERMAN, S. et al. Evaluating the zebrafish embryo toxicity test for pesticide hazard screening. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 5, p. 1221-1226, 2017.
- GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

HAN, Y. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 133, p. 13-19, 2016.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current opinion in plant biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010.

HUMPHREY, R.M.; BRINKLEY, B.R. Ultrastructural studies of radiation-induced chromosome damage. **The Journal of Cell Biology**, v. 42, p. 745-753, 1969.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil.** Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 20/08/20.

IPEA, 2019. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória.** Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada- Brasília: Rio de Janeiro: IPEA, 2019. Disponível em: http://repositorio.ipea.gov.br/bitstream/11058/9371/1/td_2506.pdf. Acesso em 20/08/20.

JANAKIDDEV, V. et al. A study of proteotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide and fungicide on marine invertebrate (*Donax faba*). **Chemosphere**, v. 90, p. 1158-1166, 2013.

KARADENIZ et al. Effects of two fungicides, cyprodinil and fludioxonil, on genotoxicity in drosophila smart assay and on proliferation and viability of HEK293 cells from the perspective of carcinogenesis. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 5B, p. 1920-1925.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEWIS, M. A. Algae and vascular plant tests. in: Rand, G. (Ed), **Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**, Taylor; Francis Publishers, USA, p. 135-169, 1995.

- LI, Z. H.; RANDAK, T. Residual pharmaceutically active compounds (PhACs) in aquatic environment—status, toxicity and kinetics: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 7, p. 295-314, 2009.
- LI, X. et al. The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: growth, photosynthesis and antioxidant system. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 212-219, 2018.
- LIMA, J. A. M. et al. “Modern agriculture” transfers many pesticides to watercourses: a case study of a representative rural catchment of southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 10, p. 10581-10598, 2020.
- LIMAN, R. et al. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 38-42, 2015.
- LIU, D. et al. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**. Lund, v. 117, n. 1, p. 23-29, 1992
- LUBINI, G. et al. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v.63, p. 647-651, 2008.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.
- MARTINEZ, R. S. et al. Genotoxic effects of commercial formulations of Chlorpyrifos and Tebuconazole on green algae. **Ecotoxicology**, v.24, p. 45-54, 2015.
- MARTIN-PUZON, J.J.R.; RIVERA, W. Free-radical scavenging activity and bioactive secondary metabolites from various extracts of *Glinusop positifolius* (L.) Aug. DC. (Molluginaceae) roots, stems and leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.5, n.9, p.711-715, 2015.
- MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4808-4819, 2014
- MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. – São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF, 568p, 2010.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 24 de setembro de 2019.

MONTEIRO, S. P. P. B. **Desenvolvimento e aplicação de teste de toxicidade aguda utilizando como organismo-teste *Daphnia magna***. 2009. 81 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Londrina, 2009.

NEVES, P. D. M. et al. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2743–2754, 2020.

OLIVEIRA A.K.M. et al. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de *Pouteria ramiflora* na germinação de alface. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 41-47, 2014.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PATRA, M. et al. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 199-223, 2004.

RADETSKI, C. M. et al. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environmental and experimental botany**, v. 44, n. 3, p. 221-229, 2000.

RAHMAN, M. et al. A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the *Allium cepa* test. **Chemistry and Ecology**, v. 33, n. 5, p. 434-446, 2017.

RIBEIRO, L. et al. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 220, 2012.

RICE, E.L.; **Allelopathy**. 2. Ed, New York: Academic Press, 1984.

SABEEN, M. et al. *Allium cepa* assay based comparative study of selected vegetables and the chromosomal aberrations due to heavy metal accumulation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2019.

SABER, T. M.; ABO-ELMAATY, A. M. A.; ABDEL-GHANY, H. M. Curcumin mitigates mancozeb- induced hepatotoxicity and genotoxicity in rats. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109467, 2019.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) In: MORALES, G. C. (Ed.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: estandarización, intercalibración**, resultados y aplicaciones. 1. ed. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, 2004.

SOLOMON, M. et al. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431-443, 1999.

SOUZA, B.S. **Avaliação do processo H₂O₂/UV como pós-tratamento e remoção da atrazina de um efluente secundário de ETE para fins de reuso**. Tese de Doutorado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

SOUZA, F. A. et al. Fungos micorrízicos arbusculares: muito mais diversos do que se imaginava. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, p. 483-536, 2008.

TURKOGLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2035-2041, 2008.

VALENTE, D. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

VASCONCELOS, A.M. **Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec[®] 18CE sobre girinos de *Lithobatesbeianus* (Amphibia, Anura, Ranidae)**. 188 f. Tese (Doutorado em Química) Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), Universidade de São Paulo, 2014.

WEBSTER, P. L.; MACLEOD, R. D. The root apical meristem and its margin. In: Waishel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) **Plant roots. The hidden half**, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, p. 51–76, 1996.

ZHANG, W. et al. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences**, v. 1, n. 2, p. 125-144, 2011.

4. CAPÍTULO II

ANÁLISES BIOQUÍMICAS ASSOCIADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO DAS RAÍZES DE *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) E *Allium cepa* L. (AMARYLLIDACEAE) EXPOSTAS AO FUNGICIDA AZOXISTROBINA + BENZOVINDIFLUPIR

Resumo: Os fungicidas são agroquímicos frequentemente empregados na agricultura, em virtude de sua ação de combate às doenças fúngicas. No entanto, a ampla aplicação desses produtos em todo o mundo aumenta a preocupação ambiental e de saúde pública, já que estes compostos são tóxicos e podem representar riscos para os ecossistemas e a saúde humana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos bioquímicos da mistura comercial dos fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir em *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) e *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae). Os efeitos bioquímicos foram observados por meio da análise da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPOX). Para a avaliação da ação desse fungicida foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,375 g L⁻¹ (C1); 0,75 g L⁻¹ (C2); 1,5 g L⁻¹ (C3); 3,0 g L⁻¹ (C4); 6,0 g L⁻¹ (C5). Estas concentrações foram estabelecidas a partir da concentração recomendada pelo fabricante para a cultura da soja (C3). A água destilada foi usada como controle negativo e a trifluralina (nas concentrações de 0,84 ppm e 3,33 ppm) como controle positivo. A partir dos resultados das avaliações enzimáticas das raízes expostas ao fungicida, é possível inferir que este fungicida promoveu a redução da atividade específica de APX de *L. Sativa*, de forma que a resposta observada foi de sensibilidade aos tratamentos aplicados, sendo que, quando exposta às concentrações de 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹ de azoxistrobina e benzovindiflupir, houve diferença significativa da atividade quando comparada ao controle negativo, feito com água destilada. A atividade enzimática nessas concentrações foi comparável estatisticamente à atividade observada no controle positivo, realizado com trifluralina. A menor atividade enzimática obtida foi observada no tratamento de 6,0 g L⁻¹, maior concentração de Elatus®.

Palavras-chave: agroquímicos, estresse oxidativo, catalase, guaiacol peroxidase, ascorbato peroxidase.

4.1 Introdução

O Brasil é considerado um dos países com maiores consumos de pesticidas no mundo (FARIA et al., 2007). De acordo com a ANVISA (2020), existe um consumo

crescente de agrotóxicos e afins no Brasil, de forma que nos últimos anos (2015-2018), consumiu-se valores acima de 500.000 toneladas por ano. Embora os agrotóxicos mais consumidos no Brasil atualmente sejam os herbicidas (338.838,14 toneladas de ingrediente ativo comercializados, dos quais glifosato e ácido diclorofenóxiacético ocupam o primeiro e o segundo lugar), dados do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, divulgados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2020) indicam que foram comercializados no Brasil 73.315,13 toneladas de ingredientes ativos com ação fungicida, dos quais 5.976,09 toneladas foram comercializadas no Estado de Goiás. Além disso, foram comercializados outros produtos combinados com fungicidas, como acaricidas, inseticidas, bactericidas, nematicidas, dentre outros, que somam um total de 42.265,35 toneladas de Ingredientes ativos (ANVISA, 2020). Assim, o consumo de fungicidas é extremamente relevante no Brasil e no estado de Goiás. Ainda relacionado ao consumo de fungicidas, dados fornecidos pelo IBAMA e divulgados pela ANVISA indicam que fungicidas (Mancozebe e Oxicloreto de Cobre) estão entre as 10 substâncias mais vendidas no país em 2018 (ANVISA, 2020).

Alguns pesquisadores têm alertado para a flexibilização do registro de ingredientes ativos e sua posterior liberação para uso na agricultura (BRAGA et al., 2020). De acordo com dados da ANVISA (2020), 475 novos pesticidas já foram liberados para uso no Brasil, o que confirma a possibilidade de aumento nos números de intoxicação humana, alimentar e ambiental.

A mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus[®]), tem sido utilizada em pulverizações preventivas, para o controle de doenças da parte aérea de diferentes culturas (algodão, amendoim, aveia, cana-de-açúcar, café, cevada, feijão, milho, soja e trigo), possuindo classificação do potencial de periculosidade ambiental II – produto muito perigoso ao meio ambiente (AGROLINK, 2019). A azoxistrobina pertence à classe das estrobilurinas e o benzovindiflupir é considerado uma carboxamida. As estrobilurinas podem ser classificadas pela atuação sistêmica, como é o caso da azoxistrobina (JULIATTI, 2019). Seu mecanismo de ação geral está ligado à inibição da oxidação do ubiquinol no citocromo *bc*₁ (complexo III) da mitocôndria, conseqüentemente inibindo a fosforilação oxidativa e, portanto, diminuindo a produção de ATP, molécula importante em diversos processos fisiológicos dentro da célula (ANKE, 1995). Já as carboxamidas, atuam como inibidoras de respiração celular, no complexo II, succinato desidrogenase (fungicidas SDHI).

De modo geral, a presença destas substâncias pode desencadear uma série de danos, podendo levar a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (FOYER e NOCTOR, 2000). Os EROs são formados pelos radicais livres (radicais superóxido, O_2^-) e peróxido de hidrogênio, (H_2O_2) e são subprodutos do metabolismo celular regular, mas podem ser gerados com a destruição do sistema de transporte de elétrons em momentos de estresse (FOYER e NOCTOR, 2000). Sendo assim, em organismos fotossintéticos, a produção de EROs ocorre em reações nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (FOYER e NOCTOR, 2000). Nos cloroplastos a formação dos EROs está relacionada com os eventos que ocorrem durante a fotossíntese, já nas mitocôndrias, alguns estudos revelaram que tais organelas podem ser fontes de EROs em condições específicas de estresse (BREUSEGEM et al., 2001), pois dentro da célula, uma vez que os elétrons passam, podem escapar e reagir com o oxigênio molecular, formando compostos reativos, como ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, como destacam Loschen et al. (1974), Boveris e Cadenas (1975) e Liu et al. (2002). Essa comunicação entre a produção do EROs, mitocôndria e núcleo são importantes para manter a homeostasia celular. No entanto, a formação excessiva de EROs pode ocasionar o estresse oxidativo, uma vez que eles são extremamente reativos e citotóxicos, fazendo parte do sistema de sinalização celular, pois os seus subprodutos (radicais livres) possuem alvos específicos, que são as proteínas, cuja oxidação leva à perda de função ou à degradação precoce nos proteossomas (SCANDALIOS, 2005). No DNA, a oxidação pode gerar mutações gênicas, levando à alterações nos produtos gênicos, podendo causar alteração na expressão gênica e até a morte celular (SORG, 2004).

As atividades de enzimas antioxidantes desencadeiam uma cascata de reações que protegem as células do estresse abiótico (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012). Com isso, a concentração ou a atividade de enzimas envolvidas na eliminação de EROs, como as peroxidases do guaiacol (GPOX, EC 1.11.1.7), peroxidases do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e catalases (CAT, EC 1.11.1.6) podem ser alteradas como consequência da exposição ao fungicida (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012). Portanto, dados obtidos em ensaios de estresse oxidativo podem ser usados para complementar os dados das análises citogenotóxicas em bioensaios realizados com bioindicadores específicos de poluição e toxicidade.

Uma vez que pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos da combinação desse

fungicida, o objetivo desse capítulo foi avaliar os efeitos causados por essa mistura em raízes dos modelos vegetais *L. sativa* e *A. cepa*, por meio de análises da atividade enzimática de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo.

4.2 Material eméodos

Material Biológico

Para as análises bioquímicas foram usadas de sementes de *L. sativa* e *A. cepa* adquiridas na cidade de Rio Verde – GO, em revenda local. O período de germinação para o armazenamento das raízes foi de cinco meses, sendo que foram coletadas 1.600 raízes por repetição de tratamento, totalizando 25.600 raízes colhidas para as duas espécies testadas.

Diluição do insumo e delineamento

Para a avaliação da ação do fungicida foram preparadas soluções aquosas nas concentrações de 0,375 g L⁻¹ (C1); 0,75 g L⁻¹ (C2); 1,5 g L⁻¹ (C3); 3,0 g L⁻¹ (C4); 6,0 g L⁻¹ (C5). Estas concentrações foram estabelecidas a partir da concentração recomendada pelo fabricante para a cultura da soja (C3), sendo testadas duas concentrações menores na proporção de 1/4 e 1/2 da concentração de uso recomendada (C1, C2, respectivamente) e duas concentrações maiores, sendo uma delas 2 vezes maior (C4) e a outra quatro vezes maior (C5) que a concentração de uso recomendada. A água destilada foi usada como controle negativo (Co-) e a trifuralina, um herbicida pertencente ao grupo químico dinitroanilinas, como controle positivo (Co+), nas concentrações de 0,84 ppm e 3,33 ppm, conforme recomendado por Fernandes et al. (2007).

Para a germinação, foram usadas 100 sementes expostas à mistura em papel Germitest, em cada caixa do tipo Gerbox e armazenadas em BOD, sob temperatura de 25°C. O tempo de germinação foi de 3 dias para *L. sativa* e 8 dias para *A. cepa*. Após a germinação, as raízes foram acondicionadas em tubos do tipo Eppendorf, contendo 100 raízes cada. Este material foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C até o momento das análises bioquímicas.

Extração proteica

As amostras de raízes foram maceradas e homogeneizadas a 2°C em solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), acrescido de 1 mM de EDTA, 3 mM de DTT e 1% PVP, na proporção de 1:1,5 (m/v). O extrato resultante foi centrifugado a 10000RPM a 4°C, durante 30 minutos, após esse período o sobrenadante foi separado e armazenado em freezer -80 °C até o momento das análises.

Quantificação das proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976), com pequenas modificações, no qual em 20 µL de amostra foi adicionado 1 mL de reagente de Bradford. A solução foi condicionada sob temperatura ambiente por 2 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro a λ 595 nm.

Atividade da enzima Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade de catalase (CAT) foi determinada em espectrofotômetro, de acordo com o método descrito por Kraus et al. (1995), com modificações de Azevedo et al. (1998). O meio de reação foi composto por 975 µL de tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) e 30 mM de H₂O₂. A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ durante 1 minuto, em absorvância de 240 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar (ϵ) = 39,4 M⁻¹ cm⁻¹ (peróxido de hidrogênio) e expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Atividade da enzima AscorbatoPeroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada de acordo com o método descrito por Nakano e Asada (1981), em 1 mL do meio de reação, contendo 50 µL de amostra e 650 µL de solução tampão fosfato de potássio a 80 mM (pH 7,0); 100 µL de solução 5 mM de ascorbato, 100 µL de solução 1 mM de EDTA e 100 µL de solução 1,45 mM de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada durante 5 minutos em espectrofotômetro a λ 290 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando ϵ = 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (ascorbato) e expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

Atividade da enzima Guaiacol Peroxidase(GPOX, EC 1.11.1.7)

A atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) foi determinada de acordo com o método descrito por Matsuno e Uritani (1972), em 1060µL de meio de reação, contendo 900 µL (alface) ou 907,5 µL (cebola) e tampão fosfato-citrato a 200 mM (pH 5,0); 50 µL de solução 0,5% de guaiacol (v/v); 10 µL de extrato proteico de alface ou 2,5 µL de extrato proteico de cebola; os tubos foram agitados e então foi acrescentado 50 µL de solução 3% de peróxido de hidrogênio (v/v), a reação foi incubada em banho maria a 30°C por 15 minutos e, ao final desse período, foram adicionados 50 µL de solução 2% de metabissulfito de sódio (m/v) para paralização da reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a λ 450 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $\epsilon = 25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ de tetrahydro-guaiacole expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Análises estatísticas

Para as análises estatísticas das atividades enzimáticas, foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk, para verificação da distribuição normal das médias. Para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram realizadas com auxílio do software SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

4.3 Resultados e discussão

O sistema antioxidante enzimático atua para manutenção da homeostase oxidativa das células, pois espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas naturalmente durante o metabolismo aeróbico. Nesse sentido, as atividades de enzimas antioxidantes são responsáveis pela eliminação de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que por meio do mecanismo de Fenton, na presença de íons metálicos, leva à formação de radicais hidroxila (OH^\cdot), altamente reativos, e, por isso, essas enzimas desencadeiam uma cascata de reações que protegem as células do estresse oxidativo induzido por agentes bióticos e/ou abióticos (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012).

Os dados obtidos em ensaios de estresse oxidativo podem ser usados para complementar os dados das análises mutagênicas, pois respostas deste teste podem indicar as consequências da exposição do material biológico a poluentes ambientais. Nas figuras 1 e 2 são mostrados os resultados de quantificação de proteína total extraída, bem como a atividade específica das enzimas CAT, APX e GPOX, todas relacionadas ao

metabolismo antioxidante, realizado com raízes de *L. sativae* A. *cepa*, respectivamente, quando expostas às diferentes concentrações do fungicida.

Embora a concentração de proteína total obtida no tratamento C4 para *L. sativa* tenha sido a maior observada entre os tratamentos, as atividades específicas das enzimas APX e GPOX foram menores (Figuras 1A – 1D). A atividade da enzima CAT foi estatisticamente igual em todos os tratamentos. Observando as atividades de cada enzima, podemos observar que essas enzimas apresentam atividades sob concentrações bem distintas do fungicida, o que indica sua atuação no metabolismo antioxidante. Nesse caso, em alface, temos $CAT > APX > GPOX$ (Figuras 1B – 1D). Ainda, dentre as enzimas avaliadas, observamos que a resposta de APX foi a mais sensível aos tratamentos aplicados (Figura 1D). A resposta de APX de *L. sativa* foi de sensibilidade aos tratamentos aplicados, sendo que, quando exposta às concentrações de $1,5 \text{ g L}^{-1}$, $3,0 \text{ g L}^{-1}$ e $6,0 \text{ g L}^{-1}$ de azoxistrobina e benzovindiflupir, houve diferença significativa da atividade quando comparada ao controle negativo, feito com água destilada. As atividades enzimáticas em todas as concentrações do fungicida foram comparáveis estatisticamente à atividade observada no controle positivo, realizado com trifluralina (0,84 ppm). A menor atividade enzimática obtida foi observada no tratamento de $6,0 \text{ g L}^{-1}$, maior concentração de Elatus®.

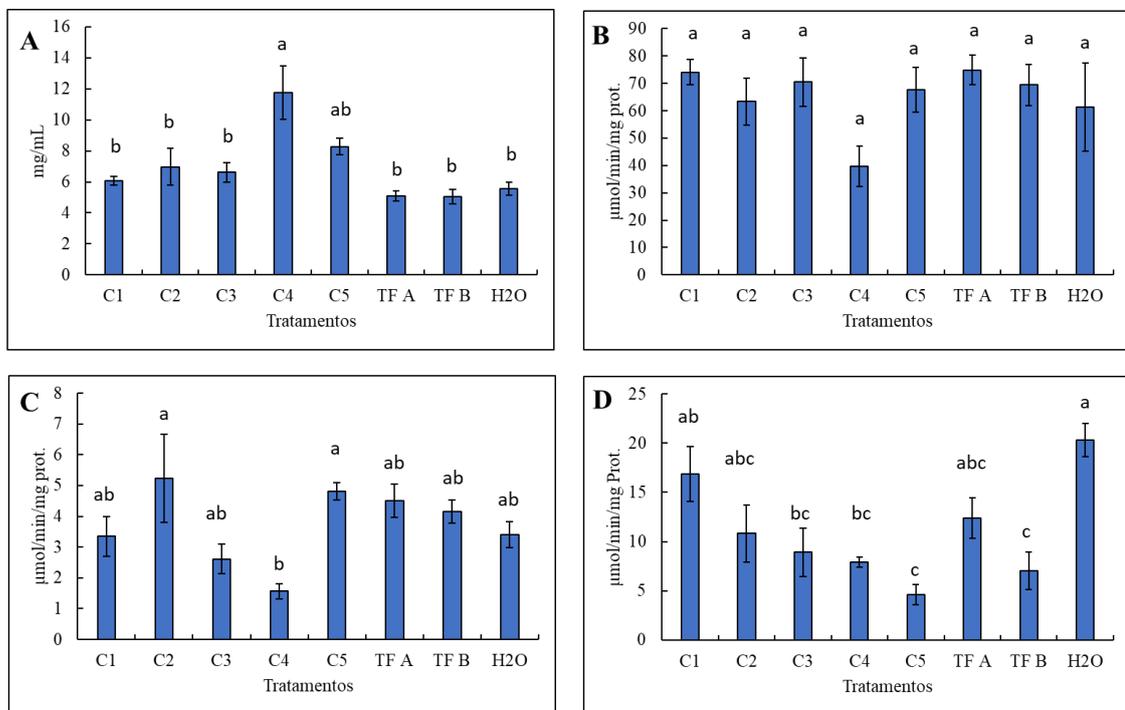


Figura 1 - Atividade enzimática de raízes de *Lactuca sativa* submetidas às diferentes concentrações da mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus®). Proteína Total (A); Atividade específica de Catalase

(B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (C); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (D). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.

Os resultados obtidos para *A. cepa* demonstram que no tratamento C4 e C5 as radículas apresentaram maior concentração proteica (Figura 2A). Não houve diferença significativa das atividades específicas das enzimas entre todos os tratamentos avaliados.

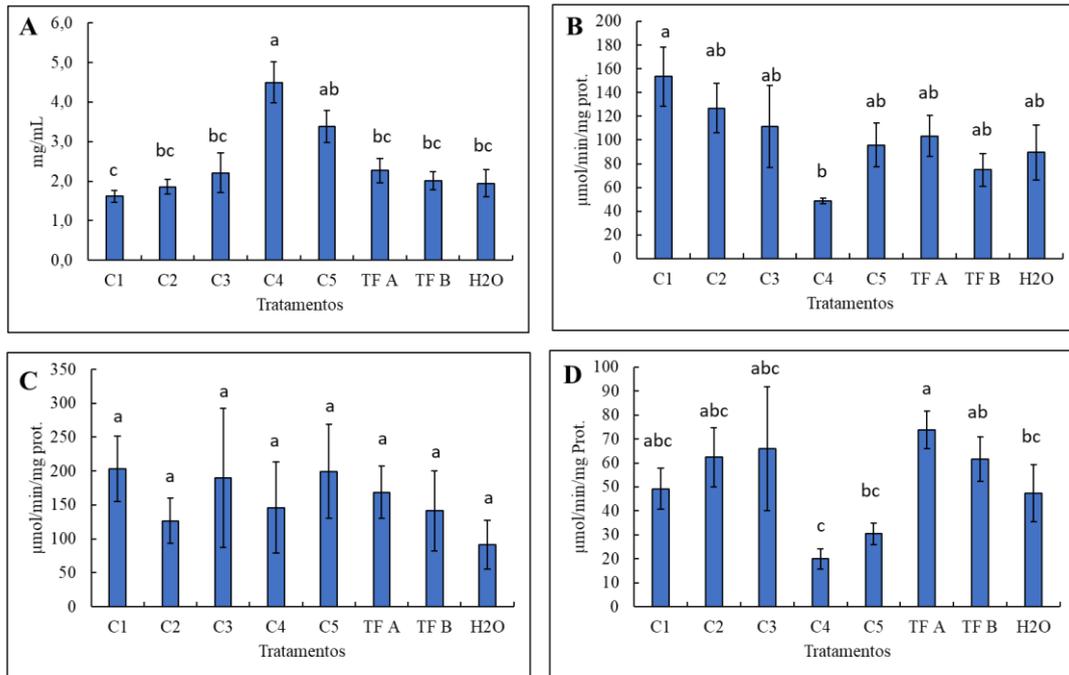


Figura 2 - Atividade enzimática de raízes de *Allium cepa* submetidas às diferentes concentrações da mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus®). Proteína Total (A); Atividade específica de Catalase (B); Atividade específica de Guaiacol Peroxidase (C); Atividade específica de Ascorbato Peroxidase (D). As médias indicadas por letras diferentes diferem estatisticamente, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.

O oxigênio possibilita a eficiente produção energética por combustão enzimática de compostos orgânicos. Por outro lado, o metabolismo aeróbico pode provocar diversos danos às células, devido à formação de EROs e espécie reativas de nitrogênio ERN, que possuem alta reatividade com outras classes de biomoléculas. Deste modo, o metabolismo celular possui mecanismos para manter a homeostase de EROs a fim de não entrar em estresse oxidativo (HUANG et al., 2000).

As plantas possuem um sistema de defesa antioxidante, cuja função é inibir ou diminuir os danos causados pela ação deletéria dos EROs e dos radicais livres, por meio da produção de compostos antioxidantes que possuem a capacidade de neutralizar o efeito negativo desses radicais sobre o metabolismo do organismo. Essas ações podem

ocorrer por diferentes mecanismos que impedem os radicais livres ou espécies-não radicais, impossibilitando a atividade, ou a atuação como reparo ou reconstrução das estruturas biológicas que foram lesadas (KOURY et al., 2003). Dentre as defesas de caráter enzimático, citamos as enzimas Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Peroxidase (POX), Guaiacol peroxidase (GPX) e Ascorbato peroxidase (APX) (JOHANSEN et al., 2005).

Apesar da eficiência dos mecanismos de defesa da planta, ainda é possível ocorrer desequilíbrios entre a produção e eliminação de EROs, o que acaba desencadeando eventos de estresse oxidativo, provocando danos em macromoléculas, como DNA, RNA, lipídeos e proteínas (HALLIWELL, 2009) e, conseqüentemente, causar falhas no sistema de reparo do DNA, causando diversos problemas às células, como divisão descontrolada e morte celular (SOSA et al., 2013). Portanto, a produção de EROs pode ser estimulada pelos estressores a partir de diversos mecanismos, sendo que o aumento destas espécies leva principalmente a um aumento da atividade de peroxidases, catalases, entre outras, provavelmente como defesa da planta contra ação fitotóxica destes compostos (CAMPOS et al., 2004; SOARES; MACHADO, 2007). Este resultado foi observado por Grecco (2020), ao avaliar os efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e bioquímicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim no modelo *L. sativa*, em que a autora afirmou que os fungicidas induziram estresse oxidativo em alface, por meio do aumento das atividades das enzimas CAT, SOD, APX e Glutathione peroxidase. No entanto, no presente estudo, observamos que nem todas as concentrações dos fungicidas testados promoveram o aumento da atividade específica das enzimas estudadas.

As peroxidases são responsáveis pela remoção de átomos de hidrogênio dos grupos álcoois hidroxicinâmicos, cujos radicais se polimerizam para formar a lignina (VIECELLI et al., 2010), sendo encontradas principalmente na parede celular e vacúolo. A atividade destas enzimas está relacionada a eventos que envolvem indução de resistência ou adaptação frente às condições adversas que geram estresse (CAVALCANTI et al., 2005), ou seja, é uma proteção antioxidativa (PAULA et al., 2015). A APX, que atua degradando o peróxido de hidrogênio, utilizando o ascorbato como substrato, é de grande importância na defesa de tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (ASADA, 1992). A atividade destas enzimas pode ser considerada como um marcador bioquímico de estresse, assim também auxilia na identificação precoce do processo morfogênico durante a diferenciação celular, crescimento e multiplicação de

plantas (LIMA et al., 2002; PIZA et al., 2003; LOCATO, 2010; KIM e KWAK, 2010). Segundo Cavalcanti et al. (2005), não é observado um comportamento padrão para esta enzima, uma vez que sua atividade depende do tipo de indutor, concentração, tempo após a sua aplicação na planta e sistema em estudo. Neste sentido, as diferentes atividades observadas quando se compara os controles positivos e os tratamentos aplicados, principalmente C4 e C5, em que se observa redução na atividade enzimática em *L. sativa*, podem ser explicadas pelos diferentes tipos de indutores de estresse utilizados. Outros autores observaram estas variações de atividades, ao longo tempo (BALDO, 2008; VIECELLI, 2010) ou em função da concentração testada (PAULA et al., 2015). No presente estudo não foi possível verificar se a mesma amostra apresentou os dois comportamentos tendo em vista que a avaliação foi realizada somente após o terceiro ou oitavo dia de exposição, para os modelos alface e cebola, respectivamente.

A CAT é responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio formado na conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração, e pela decomposição do peróxido formado na reação de oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos (HOLTMAN et al., 1994; IGAMBERDIEV e LEA, 2002). Uma atividade aumentada desta enzima sugere maior proteção e eficiência. Os dados de atividade específica para esta enzima em alface não diferiram estatisticamente, não sendo possível afirmar que houve aumento em sua atividade em resposta ao estresse gerado pela presença dos fungicidas. Cabe ressaltar que na concentração C4 observou-se menor atividade específica, o que pode indicar uma alteração no sistema de defesa antioxidante de cebola causado pela exposição às altas concentrações da mistura de fungicidas. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Asrorov et al. (2016), que identificaram interrupção do balanço oxidativo em plantas de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) tratadas com inseticidas (Carbophos, Lannate e Sumi-alfa).

4.4 Conclusão

Por meio dos resultados das avaliações enzimáticas das raízes expostas à mistura comercial de fungicidas contendo azoxistrobina e benzovindiflupir (Elatus[®]), é possível inferir que houve alteração na atividade específica da APX em resposta aos tratamentos, sendo que, quando exposta às concentrações de 1,5 g L⁻¹, 3,0 g L⁻¹ e 6,0 g L⁻¹ de azoxistrobina e benzovindiflupir, houve diferença significativa da atividade específica, quando comparada ao controle negativo, feito com água destilada. A atividade

enzimática nessas concentrações foi comparável estatisticamente à atividade observada no controle positivo, realizado com trifluralina. A menor atividade enzimática obtida foi observada no tratamento de 6,0 g L⁻¹, maior concentração de Elatus®.

4.5 Referências bibliográficas

AGROLINK. Bula Elatus®. Disponível em: <https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/elatus-150-ec_10462.html>. Acesso em 02/05/2019.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liners (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 882-888, 2011.

ANKE, T. The antifungal strobilurins and their possible ecological role. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 940-945, 1995.

ANVISA–AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201/>. Acesso em 20/09/20.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.

ASROROV, A. et al. Agrochemicals affect the antioxidative defense potential of cotton plants. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**; Nitra Vol. 5, p. 505-508. 2016.

BALDO, M. **Aspectos histológicos e bioquímicos da indução de resistência em feijoeiro e atividade antifúngica por derivados de *Pycnoporus sanguineus***. 2008. 83p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to antimycin insensitive respiration. **FEBS Letters**, v. 54, p. 311-314, 1975.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, p. 248-254, 1976.

BRAGA, A. R. C. et al. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, n. 6, p. 312-314, 2020.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, p. 405-414, 2001.

CAMPOS, A.D. et al. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Revista de Agropecuária Brasileira**, v.19, p.637-643, 2004.

CAREGNATO, F. F. **Análise dos parâmetros de estresse oxidativo em espécies vegetais expostas a poluentes ambientais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2009.

CAVALCANTI, L.S. et al. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, p.81-124, 2005.

ESPOSITO, J. B. N. **Influência do MnDFB na tolerância ao estresse oxidativo em plantas de *Glycine max* expostas ao ozônio e chuva ácida**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal E Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo-SP, 2012.

FARIA, N. M. X. et al. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, p. 25-38, 2007.

FERNANDES, C. L. F. et al. Distribution of pesticides in agricultural and urban soils of Brazil: a critical review. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 22, n. 2, p.

256-270, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. **New Phytologist**, v. 146, p. 359-388, 2000.

GRECCO, K. D. **Efeitos toxicogénéticos, bioquímicos e fisiológicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim em bioensaios vegetais**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2020.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, 2006.

HOLTMAN, W. L. et al. Beta-oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, v. 99, p. 43–53, 1994.

HUANG, T.T. et al. Ubiquitous overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase does not extend life span in mice. **The journals of Gerodontology/Seriea Biological Science Medical Science**, v.55, p.B5–B9, 2000.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 651-674, 2002.

JOHANSEN, J. S. et al. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, v.4, p.5, 2005.

JULIATTI, F.C. Modo de ação dos fungicidas sobre plantas e fungos. Disponível em:<<http://ppi-ppic-ipi.org/ppiweb/pbrazil.nsf>>. Acesso em: 04 set 2019.

KIM, Y.H.; KWAK, S.S. The role of antioxidant enzymes during leaf development. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.129-150,2010

- KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 433-441, 2003.
- KRAUS, T. E. et al. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576, 1995.
- LIMA, G.P.P. et al. Efeito do BAP e ANA e atividade da peroxidase em mandioca (*Manihotesculenta* Crantz CV 'MCOL 22') cultivada *in vitro*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.8, n.2, p.107-110, 2002.
- LIU, Y. et al. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v. 80, p. 780-787, 2002.
- LOCATO, V. et al. Reactive oxygen species and ascorbate glutathione interplay in signaling and stress responses. In: GUPTA, S.D. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**. Enfield: Science Publishers, p.45-64, 2010.
- LOSCHEN, G. et al. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. **FEBS letters**, v. 42, n. 1, p. 68-72, 1974.
- MATSUNO, H.; URITANI, I. Physiological behavior of peroxidase isozymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black rot. **Plant and Cell Physiology**, v. 13, n. 6, p. 1091-1101, 1972.
- MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo: do neolítico à crise contemporânea**. – São Paulo: Editora UNESP; Brasília, DF, 568p, 2010.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
- NEVES, P. D. M. et al. Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 7, p. 2743 – 2754, 2020.

PAULA, C. V. et al. Estudos do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia unguolata* L. sobre a divisão celular e atividade enzimática em plântulas de alface. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 577-584, 2015.

PIZA, I.M.T. et al. Atividade de peroxidase e níveis de proteínas em plantas de abacaxizeiro micropropagadas em meio salino. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n.4, p.361-366, 2003

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SOARES, A.M.S.; MACHADO, O.L.T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica**, v.1, p.9-18, 2007

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. **Comptes rendus biologiques**, v. 327, n. 7, p. 649-662, 2004.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

VIECELLI, C.A. et al. Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathology**, v.36, p.73-80, 2010.

ZHANG, W. et al. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the international academy of ecology and environmental sciences**, v. 1, n. 2, p. 125, 2011.