UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO

PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGICIDAS POR MEIO DE BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa*.

VITÓRIA
2017

FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO

PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGICIDAS POR MEIO DE BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador (a): Profª. Drª. Silvia Tamie Matsumoto

VITÓRIA
2017

FRANCIELEN BARROSO ARAGÃO

“PROSPECÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FUNGICIDAS POR MEIO DE BIOENSAIOS COM *Lactuca sativa*”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profª Drª Silvia Tamie Matsumoto
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Orientadora

_____

Profª Drª Viviana Borges Corte
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Membro Interno

_____

Profª Drª Larissa Fonseca Andrade-Vieira
Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada - UFLA
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

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

A Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realizar este trabalho e possibilitar a conclusão desta pós-graduação.

Ao Programa de Biologia Vegetal, pela concessão ao uso dos laboratórios, equipamentos e materiais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Em especial, a minha querida Orientadora Prof.ª Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto pela paciência, carinho e ensinamentos recebido na trajetória dessa etapa de minha vida.

A Prof.ª Dr.ª Larissa Fonseca Andrade-Vieira, primeiramente pela sua amizade e apoio durante o desenrolar do trabalho, por confiar no meu potencial com dedicação incondicional neste trabalho.

Aos companheiros do GEMUT e da Botânica por terem tornado esta caminhada alegre e descontraída; em especial ao Ian Duarte por todo apoio no decorrer do trabalho, a Dayana, Iasmini, Ian Martins e Maressa pela imensa ajuda.

A Graciele e Gabriela muito obrigada por toda paciência e ajuda no decorrer da produção deste trabalho.

A minha querida avó Maria Del Carmen, por todo amor e ensinamentos sobre a vida. Aos meus pais, João e Maria, pela minha educação e apoio. Ao meu sobrinho Iago pelas alegrias que trazes a minha vida, a minhas irmãs queridas, Ana Paula e Fernanda, pelo apoio emocional e companheirismo.

Ao Weslley pelo amor e apoio em todos os momentos bons e difíceis ao longo dessa caminhada.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho se tornasse possível.

Até aqui nos ajudou o Senhor.
1 Samuel 7:12

RESUMO

O aumento na demanda de alimentos, devido ao crescimento da população mundial, acarreta no uso intensificado de substâncias sintéticas com a finalidade de ampliar a produtividade de alimentos. Entretanto, o crescente avanço de monoculturas destaca-se pelo significativo volume de resíduos dispersos no ambiente, como os agrotóxicos. Estas substâncias ocasionam impactos ambientais, pois quando lixiviadas podem afetar lençóis freáticos e águas superficiais, prejudicando, e consequentemente, a micro e macro biota local. Assim, na busca pela elucidação dos efeitos hereditários ou letais dessas substâncias tóxicas nos organismos vivos, diversos métodos de avaliação tem sido desenvolvidos com o intuito de compreender as propriedades e mecanismos de ação dos mesmos. Logo, o trabalho objetivou avaliar o efeito dos fungicidas tebuconazol (TBZ) e difenoconazol (DFZ) por meio de diferentes ferramentas de análise no modelo vegetal *Lactuca sativa*. As sementes de *L. sativa* foram germinadas em água destilada até atingirem 1 a 2 mm, após alcançarem o tamanho mínimo foram tratadas com diferentes concentrações dos fungicidas: TBZ (25; 50; 100; 200 e 400 g/mL) e DFZ (15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 g/mL). A trifluralina (0,84 g/L) e MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}) foram utilizadas como controle positivo (C+) e água destilada como controle negativo (C-). Foram realizadas análises de crescimento radicular, avaliação do potencial citogenotóxico por meio da análise de ciclo celular (índice mitótico, alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN)), quantificação dos danos ao DNA por meio do teste do cometa e teste de TUNEL, bem como avaliação do estresse oxidativo por meio da quantificação das enzimas antioxidantes CAT, APX, SOD e POD. As médias foram submetidas a ANOVA e comparadas pelos testes de Kruskal Wallis e Tukey ($p<0.05$). As diferentes concentrações do TBZ e DFZ apresentaram redução no crescimento radicular em relação ao controle negativo. Comparando-se com o índice mitótico do C-, as concentrações avaliadas de DFZ não apresentaram diferença estatística, enquanto as concentrações de TBZ apresentaram redução significativa na concentração C1, e aumento significativo nas demais concentrações. Todavia, tanto DFZ quanto TBZ apresentaram aumento significativo nas AC nas maiores concentrações. Ambos fungicidas induziram a formação de AC como c-metáfases, pontes e cromossomos pegajosos. As maiores concentrações dos dois princípios aumentaram a porcentagem de AN. Observou-se aumento de danos ao DNA, avaliado pelo cometa e TUNEL em todas as concentrações do TBZ, e apenas para o TUNEL no princípio ativo DFZ. A análise do estresse oxidativo demonstrou que apenas a enzima APX apresentou uma diferença estatística do C- para o TBZ, enquanto no DFZ apenas a enzima SOD foi diferente estatisticamente do C-. Diante dos testes realizados observou-se que os fungicidas TBZ e DFZ foram citotóxicos por diminuir o crescimento radicular, genotóxicos por aumentar a ocorrência de AN e AC bem como elevar a fragmentação de DNA, e alteraram a atividade enzimática.

Palavras-chave: Citogenotoxicidade, Cometa, Fungicidas, TUNEL, Estresse Oxidativo, Crescimento Radicular.

ABSTRACT

The increase in food demand due to world population growth, results in increased use of synthetic substances in order to increase food productivity. However, the growing advance of monoculture stands out for significant volume of waste dispersed in environment, such as pesticides. These substances cause environmental impacts, because when leached can affect groundwater and surface water, damaging micro and macro local biota. Thus, the search for elucidation of hereditary or lethal effects of toxic substances in living organisms, various evaluation methods have been developed in order to understand the properties and mechanisms of action thereof. Therefore, the study aimed to evaluate the effect of tebuconazole fungicides (TBZ) and difenoconazole (DFZ) through different analysis tools in the plant model *Lactuca sativa*. Lactuca sativa the seeds were germinated in distilled water to achieve 1-2 mm, after reaching the minimum size were treated with different concentration of fungicides: TBZ (25; 50; 100; 200 e 400 g/mL) and DFZ (15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 g/mL). Trifluralin (0,84 g/L) and MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}) was used as a positive control (C +) and distilled water as a negative control (C-). Analysis of cytogenotoxic potential was performed through cell cycle analysis (mitotic index, chromosomal aberrations (CA) and nuclear aberration (NA), quantification of DNA damage by comet test and Tunnel test, as well as evaluation of oxidative stress through antioxidant enzymes quantification as: CAT, APX, SOD and POD. The means were submitted to ANOVA and compared by the Kruskal Wallis and Tukey tests ($p < 0.05$). The different dilutions of TBZ and DFZ showed reduction in root growth compared to negative control. Compared with mitotic index of C-, the concentrations of DFZ showed no statistical difference, whereas the concentrations of TBZ showed a significant reduction in the concentration C1, and a significant increase in the other concentrations. However, both DFZ and TBZ showed a significant increase in CA in the highest concentrations. Both fungicides induced formation of CA as c-metaphases, bridges, and sticky chromosomes. The higher concentrations of the main principles increased the NA percentage. It was observed increased the DNA fragmentation evaluated by the comet and Tunel test in fungicide TBZ, and only for the TUNEL in the fungicide DFZ. Oxidative stress analysis showed that only the APX enzyme presented a statistical difference of C- for TBZ, whereas in DFZ only the SOD enzyme was statistically different from C-. Concerning to the tests carried out, it was observed that fungicides TBZ and DFZ were cytotoxic by reducing root growth, genotoxic by increasing the occurrence of NA and CA as well as increasing DNA fragmentation, and altered the enzymatic activity.

Keywords: Citogenotoxicity, Plant Comet Assay, Fungicides, TUNEL test, Oxidative Stress, Root Growth.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Crescimento radicular de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas com a mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis. CN: controle negativo e CP: controle positivo.....52

Figura 2 - Principais alterações cromossômicas encontradas em células meristemáticas tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. A: C-metáfase, B: Ponte cromossômica, C: cromossomo pegajoso….53

Figura 3 - Células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol no teste de TUNEL. As setas coloridas representam os tipos de danos encontrados, cinza: sem danos, amarela: danos leves e vermelha: danos graves.....56

Figura 4 - Análise de morte celular por meio do teste de TUNEL em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.....57

Figura 5 - Atividade enzimática de plântulas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.....58

CAPÍTULO II

Figura 1- Crescimento radicular de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas com a mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis. CN: controle negativo e CP: controle positivo.....77

Figura 2 - Principais alterações cromossômicas (apontadas pela seta) encontradas em células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. A: C-metáfase, B: ponte cromossômica, C: cromossomo pegajoso.....78

Figura 3 - Células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol no teste de TUNEL. As setas coloridas representam os tipos de danos encontrados, cinza: sem danos, amarela: danos leves e vermelha: danos graves.....81

Figura 4 - Análise de morte celular por meio do teste de TUNEL em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.....82

Figura 5 - Atividade enzimática de plântulas de alface em diferentes concentrações com o princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos fungicidas Triazóis segundo dados da ANVISA.....18

Tabela 2 - Concentração (g/mL) dos princípios ativos dos fungicidas.....27

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol.....54

Tabela 2 - Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol, em relação ao total de células em divisão analisadas.....55

Tabela 3 - Avaliação da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa em células de raízes de *L. sativa* tratadas com o princípio ativo tebuconazol.....55

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol.....79

Tabela 2 - Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol, em relação ao total de células em divisão analisadas.....80

Tabela 3 - Avaliação da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa em células de raízes de *L. sativa* tratadas com o princípio ativo difenoconazol. 80

SUMÁRIO

RESUMO.....V
ABSTRACT.....VI
LISTA DE FIGURAS.....VII
LISTA DE TABELAS.....IX
1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVO GERAL.....15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....15
3 REVISÃO 15
3.1 AGROTÓXICOS.....15
3.1.1 Fungicidas triazóis.....17
3.2 BIOENSAIOS VEGETAIS.....19
3.2.1 Crescimento radicular e ciclo celular.......20
3.2.2 Cometa.....22
3.2.3 Teste de TUNEL.....23
3.2.4 Estresse oxidativo.....24
4 MATERIAL E METÓDOS......26
4.1 MATERIAL VEGETAL.....26
4.2 SOLUÇÕES TESTE.....26
4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR.....27
4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....27
4.5 COMETA.....28
4.6 TESTE DE TUNEL.....29
4.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....30
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....32
REFERÊNCIAS 32
5 RESULTADOS 43

CAPÍTULO I: Fungicida Tebuconazol: Toxigenética por meio de bioensaios em *Lactuca sativa*.....44
RESUMO.....44
1 INTRODUÇÃO.....45

2 MATERIAIS E MÉTODOS.....46
2.1 SOLUÇÕES TESTE.....46
2.2 MATERIAL VEGETAL.....47
2.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR.....47
2.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....47
2.5 COMETA.....48
2.6 TESTE DE TUNEL.....49
2.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....50
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....51
3 RESULTADOS.....51
3.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR E CICLO CELULAR.....51
3.2 COMETA.....55
3.3 TESTE DE TUNEL.....56
3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....57
4 DISCUSSÃO.....59
5 CONCLUSÕES.....63
REFERÊNCIAS.....63

CAPÍTULO II: Fungicida Tebuconazol: Toxigenética por meio de bioensaios em *Lactuca sativa*.....69
RESUMO.....69
1 INTRODUÇÃO.....70
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....71
2.1 SOLUÇÕES TESTE.....71
2.2 MATERIAL VEGETAL.....72
2.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR.....72
2.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....72
2.5 COMETA.....73
2.6 TESTE DE TUNEL.....74
2.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....75
2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....76
3 RESULTADOS.....76

3.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR E CICLO CELULAR.....76
3.2 COMETA.....80
3.3 TESTE DE TUNEL.....81
3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....82
4 DISCUSSÃO.....84
5 CONCLUSÕES.....87
REFERÊNCIAS.....87
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....92

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o terceiro maior consumidor de agrotóxicos do mundo e o primeiro na América Latina. O principal motivo apontado para o aumento do uso destes compostos no país é a ampliação do monocultivo. Estes compostos são utilizados com eficiência no controle de pragas, doenças e plantas invasoras nas lavouras, garantindo maior produtividade e retorno econômico (ANVISA, 2012).

Agrotóxicos ou agroquímicos são compostos que possuem em sua composição grande diversidade de substâncias químicas ou produtos biológicos com ação biocida, utilizados em atividades agropecuárias com a finalidade de aumentar ou melhorar a produtividade agrícola e pecuária para controle de pragas (VEIGA, 2007). Segundo Krüger, (2009), eles são agrupados em fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocida, acaricidas e nematicidas de acordo com o organismo alvo, podendo ser classificados pela finalidade, modo de ação, origem e toxicidade.

Os fungicidas constituem os principais defensivos utilizados na agricultura, podendo ser classificados em fungicidas sistêmicos ou de contato, e com relação ao grupo químico em triazol, ditiocarbamatos, benzimidazol e dicarboximidas (ZAMBOLIM, 2007). O uso abusivo e inadequado destas substâncias vem ocasionando impactos no ecossistema, pois ao serem aplicados nas áreas agrícolas, podem ser lixiviados e contaminam lençóis freáticos e águas superficiais. Consequentemente afetam a biota local ocasionado danos a organismos-alvo e diversos organismos não alvos como insetos que são considerados inimigos naturais, organismos aquáticos e terrestres, e até mesmo ao homem (BRASIL, 2002; MOSS, 2008; CARSON, 2010).

Os triazóis são fungicidas de ação sistêmica, formado por compostos heterocíclicos constituídos por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. São sintéticos, possuem atividade biológica e são divididos em três sais: 1,2,3-triazol monocíclico, benzotriazois e 1,2,3-triazol (FREITAS et al., 2011). São compostos classificados como tóxicos para os organismos vivos, possuem propriedades genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas mesmo em baixas concentrações (BOLOGNESI; MORASSO, 2000; FERNANDES et al., 2007, 2009). Assim, representa grave risco à saúde de muitos organismos, inclusive o homem.

Diversos métodos avaliam a ação de poluentes ambientais (resíduos industriais, metais pesados, agrotóxicos, ente outros) nos seres vivos por meio de ensaios biológicos com organismos modelos que atuam como sistemas bioindicadores de poluição e toxicidade, sendo apontados como excelentes ferramentas para complementar os dados físico-químicos conhecidos dos compostos (BADERNA et al., 2011). Assim, tem sido propostos estudos ecotoxicológicos e de mutagenicidade que envolvam a determinação e conhecimento da composição química do resíduo/composto estudado, bem com a ação de seus componentes. Estes estudos envolvem a utilização de bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade que permitem avaliar a integridade do material genético estimando de forma real e funcional a dimensão dos riscos causados pelo composto ao ambiente e organismos (LAH et al., 2008, MATEJCZYK et al., 2011).

Dentre os bioensaios, aqueles constituídos por plantas superiores têm sido amplamente utilizados para avaliar o efeito biológico de substâncias simples ou compostos complexos nos organismos. A vantagem da utilização de plantas como modelos de estudo é o baixo custo, rápida resposta ao teste e a sensibilidade (FISKEJÖ, 1985). Assim, as plantas são utilizadas na avaliação de diversos tipos de amostras, tais como amostras ambientais de rios (GALTER, 2016) e lagoas (DUARTE, 2014), hidrocarbonetos (MACHADO, 2013), corantes alimentícios (GOMES et al., 2013) e outros exemplos. Dentre os modelos vegetais destaca-se a alface (*Lactuca sativa* L.), muito utilizada como indicador de agentes mutagênicos, devido seu baixo custo e boa correlação com outros sistemas teste (RIBEIRO et al., 2012; SILVEIRA, 2016).

Tendo em vista a disseminação dos fungicidas nas práticas agropecuárias, assim como os dos potenciais danos destes compostos sobre os ecossistemas, os estudos de prospecção de efeito biológico desses compostos potencialmente tóxicos são de grande relevância, pois: a) possibilitam dimensionar a periculosidade de diversos agentes tóxicos encontrados em nosso ambiente; b) permitem entender o mecanismo de ação dos mesmos; c) fornecem subsídio para discussão sobre aplicação em larga escala, estabelecimento de medidas mitigadoras e busca por alternativas sustentáveis de combate a pragas agrícolas.

Sendo assim, a hipótese defendida neste estudo é de que os fungicidas tebuconazol e difenoconazol, da classe química dos Triazóis são capazes de provocar danos citotóxicos e genotóxicos em células de plântulas em desenvolvimento de *Lactuca sativa*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o potencial tóxico dos princípios ativos dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol, utilizados na cultura do tomate, por meio de bioensaios vegetais.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFÍCOS

a. Determinar o potencial citogenotóxico dos princípios ativos dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol por meio da avaliação do crescimento radicular e ciclo celular em *Lactuca sativa*.

b. Avaliar a ocorrência de morte celular causado às células de *Lactuca sativa* expostas aos princípios ativos de fungicidas.

c. Quantificar os danos ao DNA causados pelos princípios ativos dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol por meio de ensaios cometa em *Lactuca sativa*.

d. Avaliar o grau de estresse oxidativo causado às plântulas de *Lactuca sativa* expostas aos princípios ativos dos fungicidas tebuconazol e difenoconazol por meio de análises enzimáticas.

3 REVISÃO

3.1 AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos também denominados defensivos agrícolas, são substâncias sintetizadas artificialmente com a função principal de aumentar a produtividade e

evitar as perdas pós-colheita por meio do combate a pragas, doenças e plantas invasoras. São agrupados em fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocida, acaricidas e nematicidas, podendo ser denominados a partir dos organismos alvo e classificados pela finalidade, modo de ação, origem e toxicidade (KRÜGER, 2009). Todos são produzidos a partir de princípios ativos, termo que nomeia as substâncias responsáveis pela atividade biológica. Sendo que um mesmo princípio ativo pode dar origem a diversos produtos comercias, ou ainda a possibilidade de produtos com combinações de mais de um princípio ativo (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

Amplamente utilizados no mundo inteiro, os agrotóxicos se tornaram problema de poluição ambiental (SOARES, 2011). Durante a aplicação dos agrotóxicos, ao atingirem o solo ou plantas alvo pode ocorrer dispersão ou degradação do mesmo. Porém, muitas vezes eles são volatizados, escoam sobre o solo e consequentemente são lixiviados para os corpos d'agua locais contaminando até mesmo águas subterrâneas. Além disso, podem atingir organismos não alvo, sendo assimilados pelos mesmos, causando danos irreversíveis ao ambiente (WERF, 1996; SOARES, 2011).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos da América Latina e o Terceiro maior consumidor do mundo. Em 2010, houve aumento de 190% na utilização de agrotóxicos no país, sendo o seu grande uso atribuído às facilidades que grandes empresas do mercado encontram de registrar seus agrotóxicos no Brasil, diferentemente de outros países (CARNEIRO et al., 2012). São conhecidos 366 princípios ativos de uso agrícola registrados no Brasil que são utilizados como matéria prima para a produção de 1458 produtos, aproximadamente (LONDRES, 2011).

Apesar dos benefícios econômicos para a agricultura, os efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente são questionados. Segundo Waichman et al. (2002, 2006), a contaminação dos agricultores por agrotóxicos está relacionada à falta do uso de equipamento de proteção individual, à falta de treinamento e de conhecimento dos riscos, e ao desrespeito dos prazos de carência. Além do agricultor, o consumidor também está sujeito à contaminação pelo consumo de resíduos nos produtos alimentícios. Ao fiscalizar os resíduos encontrados nos alimentos, por meio do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em

Alimentos (PARA), a ANVISA, a partir da análise de 1665 amostras de alimentos, observou que 29% destas apresentavam resíduos de produtos não autorizados ou autorizados acima do limite máximo do permitido (ANVISA, 2012).

3.1.1 Fungicidas triazóis

Os fungicidas são comumente utilizados no controle de fungos nas plantas, sendo os principais defensivos agrícolas encontrados no mercado devido a sua abrangência de organismo-alvo, além da infinidade de compostos químicos. Os mesmos podem ser classificados de acordo com a sua classe química e mecanismo de ação nos organismos (ZAMBOLIM; JESUS, 2008).

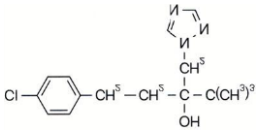
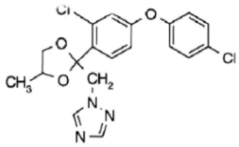
A classe química dos triazóis remete-se aos fungicidas sintéticos de ação sistêmica, constituído por compostos heterocíclicos formados por três átomos de nitrogênio no mesmo núcleo cíclico. São divididos em três sais, 1,2,3-triazol monocíclico, 1,2,3-triazol e benzotriazóis (Tabela 1) (FREITAS et al., 2011). Eles possuem um elevado efeito fungitóxico, onde a penetração e transportes pelos dos tecidos vegetais ocorre de maneira eficaz, evitando a perda do composto por lixiviação, além disso, apresentam efeito residual prolongado (FORCELINI, 1994).

Os triazóis atuam como inibidores da biossíntese de esteróis, principalmente o ergosterol, componente essencial da membrana plasmática das células de fungos (YANG et al., 2009). Consequentemente, a falta do ergosterol na membrana e o acumulo de compostos intermediários provocam a formação de membranas alternativas e a desorganização da célula, não ocorrendo reposição do ergosterol, pois as posições onde ele se encontrava são preenchidas por outros esteróis (FORCELINI et al., 2001).

Os compostos triazóis são classificados como tóxicos para os organismos vivos, podendo provocar danos aos organismos não alvo como as comunidades de invertebrados (IPPOLITO et al., 2012), assim como lesões genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas até mesmo em baixas concentrações (BOLOGNESI; MORASSO, 2000; FERNANDES et al., 2007, 2009; BERNARDES, 2014). Logo, evidenciam-se os riscos que em compostos trazem para os ecossistemas naturais, como para a saúde humana.

No grupo dos triazóis encontram-se os princípios ativos tebuconazol e difenoconazol (Tabela 1), comumente utilizados em culturas olerícolas. Amostras de alimentos avaliadas pela ANVISA usualmente apresentam resíduos desses princípios (ANVISA, 2011).

Tabela 1 - Caracterização dos fungicidas triazóis segundo dados da ANVISA

Nome comercial	Princípio ativo	Grupo químico	Nome químico	Classe toxicológica	Estrutura química
Folicur	Tebuconazol	Triazóis	RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl) pentan-3-ol	III - Medianamente tóxico	
Score (Sistêmico)	Difenoconazol	Triazóis	cis-trans-3-chloro-4-[4-methyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-2-yl]phenyl 4-chlorophenyl ether	I - Extremamente tóxico	

Referências segundo dados da ANVISA de 2011.

O princípio ativo tebuconazol segundo dados da ANVISA apresenta classificação toxicológica no nível III, onde se considera medianamente tóxico. Apesar desta classificação, o mesmo é utilizado legalmente no Brasil em diversas culturas como tomate, banana, laranja emaça (THEOPHILO et al., 2014), compreendendo 37 diferentes formulações (AGROFIT, 2013). Estudos demonstram a atividade do tebuconazol em seres vivos, como o processo de inibição da germinação e alterações nucleares em células de *Allium cepa* (BERNARDES, 2014), o aumento da mortandade de embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) com o aumento na concentração do fungicida (MACHADO et al., 2016) bem como possíveis efeitos adversos na unidade materno-placentária-fetal de ratas *wistar* durante o período gestacional (SOARES; MARTIN, 2014). Todavia, ainda não se sabe os efeitos em seres humanos.

Outro representante do grupo químico dos triazóis é o difenoconazol, conhecido por controlar o crescimento de diversos fungos por meio do rompimento da parede celular dos mesmos (SYNGENTA, 2016). Destarte, estudos demonstram que o difenoconazol possuem efeitos genotóxicos no material genético de organismos vegetais como no *Allium cepa,* até mesmo em baixas concentrações (KRÜGER, 2009; BERNARDES et al., 2015). Além disso, são capazes de provocar alterações em brânquias de *Orechromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) (VIRGENS et al., 2015).

3.2 BIOENSAIOS EM VEGETAIS

A utilização de bioensaios vegetais cresceu nas pesquisas de mutagenicidade e ecotoxicologia. Os vegetais podem ser utilizados com o intuito de monitoramento ambiental para análises de toxicidade e bioindicação de poluentes ambientes, como resíduos industriais, agrotóxicos, metais pesados (SANDALIO et al., 2001). Além disso, podem atuar como ferramentas para evidenciar os mecanismos de ação de componentes químicos derivados do metabolismo secundário de plantas (FERREIRA; AQUILA, 2000; MACÍAS et al., 2000; PANDARD et al., 2006).

Fiskejö (1985) realizou os primeiros trabalhos utilizando modelos vegetais na avaliação da toxicidade de poluentes, na qual realizava análises de compostos solúveis e insolúveis na água e verificava o efeito de misturas complexas ao ciclo celular de *Allium cepa*. Aferindo principalmente a raiz devido a sua grande proliferação de células meristemáticas no inicio do desenvolvimento da plântula, este processo constituiu-se como um método rápido e simples para o monitoramento da toxicidade de substâncias (FISKEJÖ, 1988).

Os bioensaios em plantas superiores podem ser empregados por sua alta sensibilidade a agentes mutagênicos em diversos ambientes. Assim são capazes de detectar danos genéticos com respostas ao nível cromossomico do DNA e até mesmo genômico (MALUSZYNSKA; JUCHIMIUK, 2005). Além disso, são considerados bons modelos genéticos por possibilitar a análise simultânea de vários mecanismos de ação, além de detectar desde mutações pontuais até aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos e tecidos (GRANT, 1994; LEME; MARIN MORALES, 2009).

Dentre os principais modelos vegetais utilizados em análises de citogenotoxicidade além do *Allium cepa*, destaca-se a *Lactuca sativa, Tradescantia, Vicia faba, Zea mays, Crepis capillaris e Hordeum vulgare* (GRANT, 1994; ARAGÃO et al., 2015; IQBAL, 2016; SILVEIRA, 2016).

Lactuca sativa L. popularmente conhecico como alface, pertence à familia Asteraceae (Compositae). Trata-se de uma dicotiledônea comumente consumida durante sua fase vegetativa, tendo sua origem proveniente da bacia do Oriente Médio (ABAURRE, 2004). Além disso, é um modelo vegetal muito utilizado como indicador de agentes mutagênicos (SOUZA FILHO et al., 2010; GOMES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012) devido a sua alta sensibilidade a fatores externos, por ser um organismo eucarioto e possuir cromossomos grandes, por apresentar baixo custo para realização das pesquisas, por possuir grande quantidade de sementes e por ser de fácil manuseio (GRANT, 1994; SOUSA et al., 2009).

Diversos trabalhos destacam a sua alta sensibilidade de *L. Sativa* na avaliação de poluentes ambientais como metais pesados e defensivos agricolas bem como outras substâncias, como substâncias alelopáticas proveniente do metabolismo secundário de plantas que capazes de provocar danos ao material genético (ANDRADE et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; ARAGÃO et al., 2015; LUBER et al., 2015; AGUIAR et al., 2016; FREITAS et al., 2016).

3.2.1 Crescimento radicular e ciclo celular

Os testes com vegetais superiores são métodos rápidos de monitoramento da toxicidade de poluentes ambientais. Nesse aspecto, destacam-se as raízes, por possuir alta sensibilidade aos contaminantes e ser a primeira parte dos organismos exposta aos agentes tóxicos dispersos no solo ou na água (FISKEJÖ, 1988; CLEMENS et al., 2002). A toxicidade em plantas envolve uma rede complexa de mobilização e absorção pelas raízes, além do transporte e distribuição por toda planta (CLEMENS et al., 2002). Estes processos provocam efeitos em níveis bioquímicos e moleculares, levando ao desequilíbrio na homeostase de metais essenciais (SHARMA; DUBEY, 2005) e consequentemente, desencadeando uma cascata de danos, podendo causar estresse oxidativo e consequentemente afetar o desenvolvimento da planta (HOSSAIN et al., 2011).

O teste de crescimento radicular consiste em expor sementes de determinado modelo vegetal ao tratamento a ser testado e avaliar o desenvolvimento da elongação radicular. Tendo em vista o seu método, é considerado o teste toxicológico mais simples de biomonitoramento ambiental, possibilitando a avaliação do efeito de amostras líquidas contaminadas sobre o crescimento da raiz (ARAÚJO et al., 2001). Além disso, é passível avaliar a toxicidade tanto de resíduos orgânicos (YOUNG et al., 2012) como também de resíduos inorgânicos (ANDRADE et al., 2010).

O modelo vegetal *Lactuca sativa* vem se destacando nesse tipo de análise, demonstrando alta sensibilidade e facilidade na aplicação do método para avaliar citogenotoxicidade em amostra com metais pesados (PEREIRA et al., 2013; MORAES et al., 2015), agroquímicos (BERNARDES et al., 2015) e até mesmo produtos do metabolismo secundário de plantas (ARAGÃO et al., 2015).

Segundo Andrade et al. (2010), a combinação de análises macroscópicas (crescimento radicular inicial) e microscópica (alterações no ciclo celular, cromossômicas e nucleares) demonstra-se como importante ferramenta de análise para determinar os efeitos tóxicos e sinergéticos de compostos lançados no ambiente. Além disso, essas análises apresentam-se inteiramente interligadas já que o desenvolvimento da planta depende da divisão e crescimento celular (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010).

A avaliação do ciclo celular permite a detecção da toxicidade por meio de anormalidades no índice mitótico e pela presença de alterações cromossômicas ou nucleares, possibilitando entender os efeitos mutagênicos, genotóxicos e carcinogênicos das substâncias avaliadas (LEME; MARIN-MORALES, 2009; ANDRADE et al., 2008; 2010; KUMARI et al., 2011). O índice mitótico é avaliado por meio da contagem de células em divisão pelo número total de células do tecido meristemático (FERNANDES et al., 2007), sendo que a redução desse índice pode ser ocasionada devido a exposição do organismo ao contaminante, causando danos no crescimento e desenvolvimento do organismo. Por outro lado, o acréscimo representa o aumento na divisão celular, originando até mesmo um possível tumor (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; MACHADO, 2013).

A análise de alterações cromossômicas possibilita entender as consequências das ações genotóxicas de agentes químicos sobre o DNA, assim como, permite avaliar os efeitos dos poluentes por meio da investigação dos mecanismos de ação dos agentes (NATARAJAN, 2002; MACEDO et al., 2014). Desse modo, a partir dos mecanismos de ação, as alterações cromossômicas podem ser de efeito em clastogênico, quando a quebra do cromossomo resulta em danos como pontes e fragmentos de cromossomos, ou de efeito aneugênico que são caracterizadas pela segregação anormal dos cromossomos e resultam em danos como perda de cromossomos, cromossomos pegajosos, c-metáfases, multipolaridade e atraso (LEME; MARIN-MORALES, 2009; COSTA et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A respeito dos danos citogenotóxicos, Fernandes et al. (2007) discute que o descontrole na divisão celular pode ocasionar alterações nucleares e consequentemente, a formação de células poliploides e a eliminação de parte do material genético celular, ocasionando a formação de anomalias nucleares (FERNANDES et al., 2007). As alterações nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico e resultantes da ação tóxica de compostos. São importantes quando analisadas em conjunto com as alterações cromossômicas, tornando os dados mais precisos em relação aos danos causados no DNA dos organismos testes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3.2.2 Cometa

O ensaio cometa também conhecido como ensaio de eletrofrese de gel de célula única (tradução da terminologia em inglês, Single Cell Gel Electrophoresis), foi realizado pela primeira vez por Ostling e Johanson em 1984, e possibilitou a detecção de danos diretos ao DNA de cada célula (OSTLING; JOHANSON, 1984).

A técnica consiste em isolar nucleóides do modelo de estudo exposto ao agente tóxico, colocá-los sobre lâminas previamente revestidas por gel de agarose e em seguida submetê-las à eletroforese. Consequentemente, os fragmentos de DNA, quando presentes, percorrem a lâmina formando figuras semelhantes a cometas, quando observados em microscopia de fluorescência (RITTER; KNEBEL, 2009). A avaliação ocorre por meio da análise da distância da migração do DNA, pelo

comprimento da cauda do cometa e também pela intensidade da fluorescência quantificando o grau de danos ao DNA (SIGHN, 2000; YILDIZ, 2009).

Segundo Brianezi (2009), o ensaio cometa é comumente utilizado na avaliação de danos e de reparos de DNA em células individuais. Sendo assim, amplamente utilizado para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, agrícolas e domésticos, além do biomonitoramento de organismos e em aplicações clínicas (WHITE; RASMUSSEN, 1998; HARTMANN et al., 2003; CAPRIGLIONE et al., 2011; PEREIRA et al., 2016). Desse modo, além das diversas aplicações, a técnica possui características que evidenciam sua utilidade, como a sua alta especificidade, simplicidade, rápido desempenho e alta sensibilidade para vários tipos de danos no DNA (GONÇALVES et al., 2003; YILDIZ et al., 2009; AZQUETA et al. 2011).

Essa técnica vem sendo utilizada em diversos trabalhos, porém geralmente é empregada em modelos animais, como linfócitos humanos (MARCUSSI et al., 2011), células epiteliais de humanos (CARBAJAL-LÓPEZ et al., 2016) e hepatócitos de camundongos (PERERA et al., 2016). Todavia, estudos recentes apresentaram a aplicação metodológica em modelos vegetais (YILDZ et al., 2009; REGO et al., 2015). Assim, observa-se que a técnica apresenta importância nos estudos de toxicidade, complementando, muitas vezes, os resultados de outros testes genotóxicos.

3.2.3 Teste de TUNEL

O teste de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick and labeling assay) tem sido amplamente utilizado para detecção de fragmentação de DNA e demais mecanismos relacionados ao processo de morte celular (GAVRIELI et al., 1992).

A técnica consiste na detecção das extremidades de fragmentos de DNA oriundos da incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) pela enzima denominada Transferase terminal de desoxinucleotídeos. Esses nucleotídeos modificados são marcados com corante fluorescente, no qual emitem a fluorescência ao se ligarem a extremidade 3’- OH livre onde ocorreu a quebra do DNA devido a exposição a algum agente quelante. A detecção da fluorescência ocorre por meio de microscopia de

fluorescência ou pelo laser de citômetro (VERMES et al., 2000; IKEGAMI et al., 2003).

Esse teste é comumente utilizado em análises de agentes genotóxicos, podendo ser útil para mais diversas funcionalidades, de monitoramento de dejetos industriais e agrícolas até mesmo a aplicações clínicas e teste de fármacos (GAVRIELI et al., 1992, IKEGAMI et al., 2003; FIGUEROA, 2012; BELENKI et al., 2013; HEIN et al., 2015).

3.2.4 Estresse Oxidativo

Os organismos aeróbicos surgiram encarando vantagens e desvantagens no uso do oxigênio, ele possibilita a eficiente produção energética por combustão enzimática de compostos orgânicos. Por outro lado, o oxigênio pode provocar diversos danos às células devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécie reativas de nitrogênio (ERN), que possuem alto poder de reação com outras classes de biomoléculas (BARTOSZ, 1997). Ao longo da evolução, os organismos aeróbicos desenvolveram ferramentas para combater os danos causados por essas moléculas, remediando-as e até mesmo utilizando-as para própria defesa (KHAN; WILSON, 1995).

Em organismos fotossintéticos, a produção de EROs ocorre em reações nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (FOYER; NOCTOR, 2000). Outras fontes produtoras menos citadas são encontradas nas plantas, como reações de desintoxicação catalisadas pelo citocromo P450 no citoplasma e o no retículo endoplasmático (GILL; TUTEJA, 2010). As células em estado normal produzem, durante o metabolismo do oxigênio e nitrogênio, as espécies reativas (EROs e ERN). Nesse processo, destacam-se o superóxido, hidroxil, peroxil, hidroperoxil, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito e o óxido nitroso (HUANG et al., 2000).

Como forma de manter o controle na produção de EROs as plantas produzem compostos anti-oxidades denominadas ROS (do inglês, Reactive Oxygen Species) que possuem a capacidade de neutralizar o efeito negativo sobre o metabolismo do organismo. Essas defesas podem ser de caráter enzimático como as enzimas

superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou não enzimáticas como a glutationa (GSH) e as vitaminas A, C e E (JOHANSEN et al., 2005).

Destaca-se entre os anti-oxidades produzidos pela planta, a superóxido dismutase (SOD) que é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs. A SOD, juntamente com o peróxido dismutase (POD), catalisam a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, protegendo as células dos efeitos tóxicos desses radicais evitando a formação do radical hidroxil (OH) (ALSCHER et al., 2002; DEL RIO et al., 2002). A catalase (CAT) é responsável pela inativação do peróxido de hidrogênio formado na conversão do glicolato a glioxalato durante a fotorrespiração, e pela decomposição do peroxido formado na reação de oxidação de ácidos graxos nos glioxissomos no tecido adiposo (HOLTMAN et al., 1994; IGAMBERDIEV; LEA, 2002). A ascorbato peroxidase (APX) atua degradando o peróxido de hidrogênio utilizando o ascorbato como substrato, de grande importância na defesa de tecidos fotossintéticos contra a fotoxidação (ASADA, 1992).

Apesar dos mecanismos de defesa da planta é possível a ocorrência de desequilíbrios entre a produção e eliminação de EROs, o que caracteriza os eventos de estresse oxidativo. Estes podem provocar danos no DNA, RNA, lipídios e proteínas (HALLIWELL, 2009), assim como causar mau funcionamento nos mecanismos de reparo do DNA, desencadeando diversos problemas às células, como divisão descontrolada e morte celular (SOSA et al., 2013).

As avaliações do estresse oxidativo podem complementar as análises mutagênicas, sendo possível realizar testes com o intuito de avaliar o estresse oxidativo que é uma das consequências da exposição dos organismos/células a poluentes ambientais. Assim, avalia-se a atividade de enzimas anti-oxidantes que desencadeiam cascatas de reações enzimática a fim de proteger a células do estresse abiótico (CAREGNATO, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; ESPOSITO, 2012).

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

O modelo vegetal utilizado neste trabalho foi o espécime *Lactuca sativa* (alface) cujas sementes da variedade Verônica foram cedidas pela Universidade Federal de Lavras. Em todos os testes realizados, as sementes foram germinadas em placas petri com papel filtro umedecido com água, de forma descontínua, onde as raízes após alcançarem protrusão de 1-2 mm após aproximadamente 16 horas de germinação, foram colocadas no tratamento com as soluções dos fungicidas (Tabela 2). O tempo do tratamento variou de acordo com os objetivos de cada metodologia, assim como a fixação do material.

4.2 SOLUÇÕES TESTE

Para a realização dos métodos propostos foram utilizadas cinco concentrações de cada fungicida com base na concentração recomendada pelo fabricante para o cultivo de tomate, sendo ainda utilizadas concentrações acima e abaixo do recomendado baseadas no trabalho de Bernardes et al (2015). As soluções foram preparadas a partir de concentrações dos fungicidas em 100 mL de água destilada conforme instruções encontradas na bula do produto comercial (Tabela 2).

Como controle positivo foi utilizado trifluralina na concentração 0,84 g/L cuja ação e mecanismos são conhecidos (FERNANDES et al., 2007, 2008) para análise do ciclo celular e crescimento radicular, e MMS (Metil Metano Sulfonato) na concentração $4x10^{-4}$ mol L^{-1} nos testes que avaliam quebra e fragmentação do DNA. Em todos os testes foram utilizadas alíquotas de água destilada como controle negativo.

Tabela 2 - Concentração (g/mL) dos princípios ativos dos fungicidas.

Concentração	**Relação com o recomendado**	**Fungicidas (g/mL)**	
		Difenoconazol (Score)	**Tebuconazol (Folicur)**
C1	$\frac{1}{8}$ x do recomendado	15,62	25
C2	$\frac{1}{4}$ x do recomendado	31,25	50
C3	$\frac{1}{2}$ x do recomendado	62,5	100
C4	1x do recomendado	125	200
C5	2x do recomendado	250	400

4.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado, a partir de 5 placas de Petri por tratamento. Foram tratadas 30 sementes enraizadas de *L. sativa*. As mesmas foram colocadas em placas de petri forradas com papel filtro contendo as cinco concentrações de cada fungicida, tebuconazol e difenoconazol. A exposição ocorreu à temperatura de 24°C em BOD. Após 24 horas, as raízes foram medidas com auxílio de paquímetro digital e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) para posterior confecção de lâminas.

4.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

As raízes fixadas foram lavadas com água destilada e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C por 9 minutos. Posteriormente, as raízes foram imersas no corante reativo de Schiff por 40 minutos. Após a coloração, as lâminas permanentes foram preparadas pela técnica de esmagamento suave onde para cada lâmina foram utilizados dois meristemas, sendo estas posteriormente coradas com carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. Após o esmagamento, a lâminas foram imersas em

nitrogênio líquido para a retirada da lamínula, sendo a lâmina, posteriormente, finalizada com bálsamo do Canadá.

Foram analisadas aproximadamente 1000 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por tratamento. Com o intuito de determinar a citogenotoxicidade dos fungicidas, as alterações cromossômicas e nucleares foram analisadas em diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Os seguintes parâmetros foram avaliados: índice mitótico (IM), porcentagem de cada fase da mitose, porcentagem de alterações cromossômicas e porcentagem de alterações nucleares. Para tanto foram consideradas alterações como: cromossomos perdidos, quebrados, pegajosos, pontes, C-metáfases e núcleo condensado.

4.5 COMETA

O cometa foi realizado seguindo o protocolo de Jovchtev et al. (2001) com algumas modificações. Para proceder a análise foi necessário obter material vegetal fresco seguindo a metodologia descrita no item 4.1, utilizando as concentrações C1, C2, C3 e C4. Foram realizadas 3 repetições por tratamento, não sendo utilizado a maior concentração (C5) devido a inviabilização do material para o teste do cometa devido a oxidação das raízes. Como controle positivo foi utilizado o MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}).

Inicialmente preparou-se uma solução de células, onde cerca de 20 raízes foram picotadas, com auxílio de uma lâmina para barbeadores, em 300 µl de PBS 1X (NaCl 130 Mm, Na2HPO4 7mM, NaH2PO4 3mM, EDTA 50mM, pH 7,5) para o isolamento das células. Essa suspensão foi filtrada em membrana de nylon com poros de 50 µm. Lâminas foram preparadas sendo cobertas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal 1%, e secas em temperatura ambiente. Misturou-se 30 µL de suspensão celular com 30 µL de gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% a uma temperatura de 42 °C. Essa mistura foi despejada sobre a lâmina revestida de agarose de forma uniforme, utilizando uma lamínula para espalhar o material sem romper a camada de agarose da lâmina.

Após secarem, as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaOH 30 mM e EDTA 0,5 mM, pH 11,8) durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida

as lâminas foram lavadas três vezes em TBE 1X gelado (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,4) por 5 minutos cada lavagem e colocadas em uma cuba de eletroforese com solução de corrida (EDTA 0,25 M e NaOH 2 M, pH 13). A eletroforese foi conduzida por 15 minutos a 15-17 mA (1V/ cm) em temperatura ambiente.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em álcool etílico 70% e 96% durante 5 minutos cada, e posteriormente secas por 1 hora à temperatura ambiente. Para a análise em microscopia de fluorescência, precedeu-se a coloração com iodeto de propídio e observadas em microscópio de fluorescência (Olympux BX 60) sob comprimento de onda de 520 a 560 nm. Foram analisadas 3 lâminas por tratamento, onde foram avaliados 100 nucleóides por lâminas, totalizando 300 nucleóides por tratamento. A quantificação de danos foi avaliada utilizando a classificação visual dos cometas/núcleóides proposta por Collins et al. (1995), e calculado o índice de danos (ID) conforme a fórmula: ID (ua) = (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD) + (4xE), onde: A, B, C, D e E correspondem ao número de células em cada uma das classes. (A) classe 0 = sem danos, (B) classe 1= danos mínimos, (C) classe 2= danos médios, (D) classe 3= danos intensos e (E) classe 4= danos máximos.

4.6 TESTE DE TUNEL

O material vegetal fresco foi germinado de acordo com o item 4.1, porém foi utilizada apenas a concentração recomendada pelo fabricante (C4) dos dois fungicidas. O controle positivo utilizado foi o MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}) como forma de confirmar danos ao DNA e possíveis mecanismos relacionados ao processo de morte celular. O teste de morte celular foi realizado com o kit Deadend^{TM} Fluorometric TUNEL System da Promega ®, seguindo o protocolo disponibilizado no produto.

Inicialmente as raízes foram lavadas com água destiladas e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C por 9 minutos. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento da região meristemática com uma gota de PBS 1X, a lamínula foi retirada com nitrogênio líquido. A fixação da lâmina foi realizada pela imersão em formaldeído 4% com PBS por 25 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 5 minutos.

Para permeabilização das lâminas, as mesmas foram imersas em Triton X-100 0,2% com PBS for 5 minutos, e novamente lavadas, duas vezes, em PBS por 5 minutos. As lâminas foram colocadas na solução de equilíbrio durante 5-10 minutos, e em sequência foi adicionado 50 µL de mix de reação TdT. Posteriormente, as lâminas foram cobertas com lamínulas plásticas do kit para uniformizar o reagente na lâmina. As mesmas foram colocadas em uma câmera úmida por 60 minutos a 37°C, sem interferência da luz.

As lamínulas foram retiradas e as laminas imersas em SSC 2X por 15 minutos para finalizar a reação. As lâminas foram novamente lavadas em PBS (3 vezes) por cinco minutos cada lavagem. Para a análise as lâminas receberam Vectashield® com 1 µg mL^{-1} de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), os núcleos foram avaliados em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 60) sob o comprimento de onda de 488 a 495 nm para a fluoresceína e de 345 a 358 nm para o DAPI, com a sobreposição das imagens com a luz verde e azul, que permitem a detecção de danos nos núcleos que emitem fluorescência, indicando a incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) nas extremidades de fragmentos de DNA. Os danos foram classificados como e sem danos, danos leves e danos graves. Foram analisados 100 núcleos por lâmina, sendo 3 lâminas por tratamento, totalizando 300 núcleos por tratamento.

4.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

A análise do estresse oxidativo foi realizada por meio da quantificação indireta de proteínas totais, enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (POD) e superóxido dismutase (SOD). A germinação das sementes ocorreu como descrita no item 4.1, sendo que após a germinação as raízes foram transferidas para os tratamentos onde permaneceram expostas por 5 dias, até alcançarem a estatura de plântulas (PAULA et al., 2015). Foram utilizadas as concentrações C3 (25 e 50 µL/mL) e C4 (50 e 100 µL/mL) de cada agrotóxico devido os resultados encontrados nos demais teste, além do controle negativo (água destilada), totalizando cinco repetições para cada tratamento.

Foi preparado o extrato bruto, para este, as plântulas foram pesadas (aproximadamente 0,2 g) e posteriormente congeladas com auxílio de nitrogênio líquido e maceradas. Neste macerado foi adicionado tampão fosfato de potássio (100 mM, ph 6,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM). O extrato obtido foi reservado em microtubos e centrifugado, sendo o sobrenadante realocado em micro tubos e armazenado em ultrafreezer (-70°C).

O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar as proteínas totais. Neste caso, foi utilizado o corante Coomassie brilhante blue G250. Para realizar a análise foi necessário construir uma curva padrão com soluções de proteína y-globulin (1mg/ml) em volumes de 10, 20, 30, 40, 60, 80 e 100 µL da proteína, completando com água o volume de 100 µL, e adicionando 5 ml do corante. Para análise dos extratos foram realizadas alíquotas em tubo de ensaio de 100 µL do extrato bruto e 5 ml do corante, deixando reagir por no mínimo 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

A CAT foi quantificada por meio da reação composta de 100 µL de extrato bruto, 200 µL de H_2O_2 (10 mM) e 1700 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (50 mM, pH 7,0) durante 3 minutos, onde foi realizada a verificação da absorbância inicial e final da reação no espectrofotômetro a 240 nm (IBRAHIM; SROU, 2015; AEBY, 1984).

Para a análise da enzima APX foi preparado uma solução contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), EDTA (0,1 mM), ácido ascórbico (0,5 mM) e H_2O_2 (0,1 mM). A reação permaneceu por 3 minutos, sendo as absorbâncias inicial e final analisadas após leitura em 290 nm no espectrofotômetro. Para isso foram adicionados 1900 µL de solução + 100 µL de extrato bruto (IBRAHIM; SROU, 2015, NAKANO; ASADA, 1981).

A reação para análise da POD foi composta de 100 µL de extrato bruto, 1mL de H_2O_2 (260 mM), 50 µL de guaiacol (20 mM) e 900 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (pH 6,0). A solução final reagiu por 3 minutos e foi lida a 470 nm no espectrômetro (HU et al., 2012; GULCIN, 2008).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Para isso a avaliação foi realizada de forma duplicada, onde metade da amostra permaneceu no escuro e a outra metade foi

exposta a luz. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 2900 µL de solução composta de 1500 µL tampão fosfato (100 mM, pH 7,5), 780 µL metionina (50 mM), 60 µL riboflavina (0,1 mM), 60 µL EDTA (5 mM), 225 µL NBT (1mM) e 275 µL água ultrapura, além de 100 µL de extrato bruto, totalizando 3 ml. A reação foi analisada em espectrofotômetro a 560 nm, após 40 minutos, seguindo o protocolo de Giannopolitis e Ries (1977).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os testes realizados, foram expressos em média ± desvio padrão, sendo que ocorreu a partir de análises de variância ANOVA, seguindo-se da comparação entre os tratamentos pelos testes de Tukey (P > 0,05) para os dados que seguiram uma distribuição normal, e os dados que não seguiram a distribuição normal foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (P > 0,05).

REFERÊNCIAS

ABAURRE, M. E. *Crescimento e produção de duas cultivares da alface sob malhas termorreflorestadas no cultivo de verão*. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 79f., 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://extranet.agricultura.go v.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de set. de 2016.

AGUIAR, L. L. et al. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366-372, 2016.

ALSCHER, R. G. et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1331–1341, 2002.

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, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, p. 626-631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L.F. et al. Spent Pot Linner (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*, n. 74, p. 822-828, 2011.

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

ANVISA. 2011. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%2BPARA%2B2010%2B-%2BVers%25C3%25A3o%2BFinal.pdf/f568427b-c518-4a68-85b9-dd7680e55e07>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

ANVISA. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasilia, 11 abril de 2012.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAÚJO, A.S.F. et al. Evaluation of toxicity of textile sludge compost on seed germination and root elongation of soybean and wheat. *Revista Ecossistema,* v.26, p.117-119, 2001.

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

AZQUETA, A. et al. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1, p. 41-45, 2011.

BARDENA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: Chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environmental Research*, v. 111, p. 603–613, 2011.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 19, p. 47-64, 1997.

BELENKY, P. et al. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, v. 3, p. 350–358, 2013.

BERNARDES, P. M. Prospecção de toxicidade de fungicidas por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares em Allium cepa. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) UFES, Alegre-ES, 2014.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa. Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. *Trends in Food Science & Technology*, v. 11, n. 4, p. 182-187, 2000.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. *Química Nova na Escola*, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Sistema integrado de informações sobre agrotóxicos –SIA. Decreto 4.074, 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp. Acesso em: 22 junho de 2015.

BRIANEZI, G. S. Desenvolvimento e Validação de Técnica Quantitativa de Análise de Imagem para Avaliação do Teste do Cometa Corado pela Prata. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, n. 4, 2009.

CAPRIGLIONE, T. et al. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 885, 2011.

CARBAJAL-LÓPEZ, Y. et al. Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, n. 3, p. 2513-2520, 2016.

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.

CARNEIRO, F. F. et al. *Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde*. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

CARSON, R. *Primavera Silenciosa*. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CLEMENS, S. et al. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant science*, v. 7, n. 7, p. 309-315, 2002.

COSTA, A. C. et al. Citotoxicidade das águas do rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de Allium cepa L. *Bioscience Journal*, v. 31, n. 1, p. 248- 258, 2015.

DEL RIO, L. A. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DUARTE, I. D. Qualidade da água da lagoa Juara (Serra/ES): avaliações físicas, químicas e respostas genéticas e fisiológicas em plantas. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2015.

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.

FERNANDES, T. C. C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C. et al. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, A.G.; AQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.12, p.175-204, 2000.

FIGUEROA, A. R. M. *Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá ayahuasca*. Tese (Doutorado em Toxicologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto/USP, São Paulo, 118 p. 2012.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research,* v. 197, n. 2, p. 243-260, Feb. 1988.

FORCELINI, C. A. Fungicidas inibidores da síntese de esteróis. I. Triazoles. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 2, p. 335-355, 1994.

FORCELINI, C. A. et al. Resistência de fungos a fungicidas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas,* v. 9, p. 339-381, 2001.

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

FREITAS, L. B. O. et al. A reação “click” na síntese de 1, 2, 3-triazóis: aspectos químicos e aplicações. *Quimica Nova*, v. 34, n. 10, p. 1791-1804, 2011.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 124, p. 426-434, 2016.

GALTER, I. N. Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alegre –ES, 2016.

GAVRIELI, Y. et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of cell biology*. v. 119, n. 3, p.493-501, 1992.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, p. 909-930, 2010.

GOMES, L. S. et al. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.7, p.89-96, 2012.

GONÇALVES, L. M. et al. Avaliação do potenial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão Perna perna através do Ensaio do Cometa. *II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL*, Itajaí, SC. Livro de Resumos, v. 1, p. 384, 2003.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

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

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, v.13, p.66–74, 2010.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HEIN, K. Z. et al. Disulphide-reduced psoriasin is a human apoptosis-inducing broad-spectrum fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* v. 112, n. 42, p. 13039-13044, 2015.

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.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (Allium cepa) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.

HOSSAIN, M. A. et al. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1-37, 2012.

HU, Z. et al. Discovery of pod shatter-resistant associated SNPs by deep sequencing of a representative library followed by bulk segregant analysis in rapeseed. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e34253, 2012.

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

IBRAHIM, M. A. R. et al. Effect of solar UV radiation on antioxidant enzymes and phenols biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, v. 23, n. 1, p. 101-108, Ar109, 2015.

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.

IKEGAMI, Y. et al. Increased TUNEL positive cells in human alcoholic brains. *Neuroscience Letters,* v. 341, p. 201-205, 2003.

IPPOLITO, A. et al. Evaluating pesticide effects on freshwater invertebrate communities in alpine environment: a model ecosystem experiment. *Ecotoxicology*, v. 21, n. 7, p. 2051–2067, 2012.

IQBAL, M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review. *Chemosphere*, v. 144, 2016.

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.

JOVTCHEV, G. et al. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 493, n. 1, p. 95-100, 2001.

KHAN, A. U.; WILSON, T. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry & Biology*, v. 2, p. 437-445, 1995.

KOKSAL, E.; GULCIN, I. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) buds. *Protein and Peptide Letters*, v. 15, n. 4, p. 320-326, 2008.

KRÜGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa.* Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. *Journal of Hazardrous Materials*, v. 190, p. 613-621, 2011.

LAH, B. et al. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary Tradescantia micronucleus assay. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 139, p. 107–118, 2008.

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

LONDRES, F. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: AS-PTA - Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 190 p.: il. 2011.

LUBER, J. et al. Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, p. 903-913, 2015.

MACEDO, J. F. M. et al. Estudo da genotoxicidade do extrato de Abelmoschus esculentus (quiabo) pelo teste Allium cepa. *Revista Saúde em Foco*, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2014.

MACHADO, A. T. avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório – RS – Brasil) através do sistema teste de Allium cepa. Monografia – Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MACHADO, M. R. F. et al. Qualidade embrionária e sua influência nas repostas de testes de toxicidade em zebrafish- *Danio rerio*. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 4, n. 1, 2016.

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.

MATEJCZYK, M. et al. Estimation of the environmental risk posed by landfills using chemical, microbiological and ecotoxicological testing of leachates.*Chemosphere*, v. 82, p. 1017–1023, 2011.

MORAES, R. M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in Lactuca sativa L. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 13, n. 2, 2015.

MOSS, B. Water pollution by agriculture. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1491, p. 659-666, 2008.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of Crotalus durissus terrificus snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1, p. 59-63, 2011.

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.

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 504, n. 1, p. 3-16, 2002.

OSTILING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical Research Communication*, v.123, p. 291-298, 1984.

PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of the total environment*, v. 363, n. 1, p. 114-125, 2006.

PAULA, C. V. et al. Estudos do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia ungulata* 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.

PERERA, L. M. S. et al. Further Pharmacological Evidence Supporting the Development of an Antiulcerogenic Drug Based on Rhizophora mangle L. Aqueous Extract. HPLC Method Proposed for Determinating. *Open Access Library Journal*, v. 3, p. 1625, 2016.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agroambiente*, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

PEREIRA, B. K. et al. Avaliação do efeito fotoprotetivo de Polytrichum juniperinum Hedw, Colobanthus quitensis (Kunth.) Bartl. e Deschampsia antarctica Desv. através de ensaio cometa em Helix aspersa (Müller, 1774). *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, n. 3, 2016.

REGO, S. C. et al. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade da dipirona sódica e do paracetamol em células meristemáticas de raízes de Allium cepa. *Boletim Informativo Geum*, v. 6, n. 4, p. 7-15, 2015.

RIBEIRO, L. O. et al. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. *Revista Brasileira de Biociências*, v.10, p.220-225, 2012.

RITTER, D.; KNEBEL, J. Genotoxicity testing in vitro–development of a higher throughput analysis method based on the comet assay. *Toxicology in Vitro*, v. 23, n. 8, p. 1570-1575, 2009.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SILVA, A. E. P. et al. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da turnera Ulmifolia L. (Chanana) em células eucarióticas. *Revista Saúde em foco*, v. 2, n. 1, art. 3, p. 25-48, 2015.

SILVEIRA, G. L. *Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre Allium cepa L. e Lactuca sativa L*. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2016.

SINGH, N. P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis**.** *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,* v. 455, n. 1, p. 111-127, 2000.

SYNGENTA. 2016. *Score 250 EC*. Disponível em: <http://www.syngenta.pt/product/crop-protection/fungicida/score-250-ec>. Acesso em: 10 de jan de 2017.

SOARES, A. F. S. *Uso de agrotóxicos, contaminação de mananciais e análise da legislação pertinente [manuscrito]: um estudo na região de Manhuaçu – MG.* Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 294 f. 2011.

SOARES, J. S.; MARTIN, M. R. C. Toxicidade materna e fetotoxicidade de ratas wistar tratadas com Tebuconazol, durante o período organogênico. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 16, n. 7, p. 19, 2015.

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

SOUSA, S. M. et al*.* Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia,* v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SOUZA, L. F. B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of Artemisia verlotorumon the cell cycle of Allium cepa. *International Journal of Environmental Studies*, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.

THEOPHILO, C. F. et al. Agrotóxicos permitidos no cultivo das frutas e verduras mais consumidas pela população brasileira e algumas de suas implicações na saúde. *Revista da Graduação*, v. 7, n. 1, 2014.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Agricultura*, v. 379, n. 3, p. 145-152, 2007.

VERMES, A. et al. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, n. 2, p. 171-179, 2000.

VIRGENS, A. C. et al. Alterações histológicas em brânquias de *Orechromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida. *Natureza on line*, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

WAICHMAN, A. V. et al. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 9, n. 6, p. 423-428, 2002.

WAICHMAN, A. V. et al. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, v. 26, n. 4, p. 576-583, 2007.

WERF, M.G. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 60, p. 81-96, 1996.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 410, n. 3, p. 223-236, 1998.

YANG, J. et al. Expression and homology modelling of sterol 14α-demethylase of Magnaporthe grisea and its interaction with azoles. *Pest management science*, v. 65, n. 3, p. 260-265, 2009.

YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere*, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 76, p. 182-186, 2012.

ZAMBOLIM, L. et al. Produtos Fitossanitários (fungicidas, inseticidas, acaricidas e herbicidas). *Viçosa: DFP*, 2008.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram utilizados na produção de dois capítulos, conforme apresentados a seguir.

CAPÍTULO I: **Fungicida Tebuconazol: Avaliação toxigenética por meio de bioensaios em *Lactuca sativa.***

RESUMO

O aumento na demanda de alimentos devido ao crescimento da população mundial acarretou na intensificação da utilização de substâncias sintéticas, procurando ampliar a produtividade dos alimentos. Entretanto, o emprego desenfreado destas substâncias podem ocasionar sérios problemas ambientais, pois podem ser lixiviados contaminando lençóis freáticos e águas superficiais, afetando a micro e macro biota locais. O trabalho objetivou avaliar o efeito do fungicida tebuconazol (TBZ), grupo químico triazol, por meio de análises morfológicas, bioquímicas, citogenéticas e biomoleculares no modelo vegetal *Lactuca sativa*. Para tanto, sementes de alface foram previamente germinadas em água até a protrusão da raiz (1 - 2 mm) e então tratadas com 25 (C1); 50 (C2); 100 (C3); 200 (C4) e 400 g/L (C5) do fungicida TBZ, por 24 h a 24°C em câmera de germinação (B.O.D). Como controle positivo (CP) foi utilizado trifluralina (0,84 g/L) e MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}), e como controle negativo (CN) água. Após a exposição, foram realizadas análises de crescimento radicular, avaliação do potencial citogenotóxico por meio da análise de ciclo celular, quantificação dos danos ao DNA por meio do teste do cometa e teste de TUNEL, bem como avaliação do estresse oxidativo por meio da quantificação das enzimas antioxidantes CAT, APX, SOD e POD. Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA seguida de teste de média: Tukey ($p<0.05$) para os resultados que apresentaram distribuição normal, e Kruskal Wallis ($p<0.05$) para àqueles de distribuição não normal. Os resultados demonstraram que as concentrações do TBZ testadas afetam o crescimento radicular, exceto C2. Com relação ao IM, C1 apresentou redução em relação ao CN, enquanto as demais concentrações apresentaram elevação deste índice. As concentrações C3, C4 e C5 apresentaram as maiores frequências de alterações cromossômicas, destacando-se entre as alterações cromossomos perdidos e quebrados, c-metáfases, pontes e, sobretudo, cromossomos pegajosos. O teste do cometa e TUNEL indicou aumento da fragmentação de DNA para todas as concentrações avaliadas. Com relação ao estresse oxidativo, observou-se que apenas APX apresentou diferença em relação ao CN. Os danos observados parecem remeter-se às propriedades químicas do princípio ativo, sendo possível concluir que o TBZ, nas concentrações avaliadas, apresenta efeitos fitotóxicos, citotóxico e genotóxicos sobre *L. sativa.* Deste modo o seu emprego na agricultura deve ocorrer de forma cautelosa, quanto à exposição de trabalhadores, como no uso desenfreado nas culturas.

Palavras-chave: Cometa. Crescimento Radicular. Estresse Oxidativo. Genotoxicidade. TUNEL.

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos têm ganhado cada vez mais espaço na agricultura, atuando no controle de pragas, no aumento da produtividade e na durabilidade pós-colheita dos alimentos. Dessa forma, cresce o número de agricultores que fazem o uso de grandes quantidades de produtos químicos sintéticos (GENTZ et al., 2009; CASTLE et al., 2009). Esses produtos, também chamados de defensivos agrícolas, podem ser denominados como fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocida, acaricida e nematicida, de acordo com os organismos alvos (KRÜGER, 2009).

A classe química dos triazóis apresenta substâncias sintéticas denominadas hetero-aromáticas, possuindo grande importância para indústria farmacêutica e agroquímica (MELO et al., 2006). O tebuconazol, representante derivado dos triazóis com atividade fungicida e mecanismo de ação sistêmico, é muito utilizado em culturas como tomate, uva, batata, cacau, café, maçã, entre outras (GIAVINI; MENEGOLA, 2010; ANVISA, 2011). Ele atua inibindo a biossíntese de ergosterol, importante componente da membrana plasmática dos fungos, consequentemente alterando a fluidez e permeabilidade da membrana. Processo este que prejudica passagem de nutrientes para dentro das células, impossibilitando o crescimento e desenvolvimento do fungo, levando-o à morte (GIAVINI; MENEGOLA, 2010).

A utilização descontrolada desses produtos químicos pode ocasionar uma série de transtornos e modificações nos ecossistemas já que essas substâncias, quando lixiviadas afetam lençóis freáticos, águas superficiais, organismos-alvo e não-alvo como insetos, outros organismos aquáticos e terrestres, e até mesmo danos à saúde humana (BRASIL, 2002; CARSON, 2010). A contaminação de alimentos e da água pelos agrotóxicos possibilita a ação dos compostos químicos do formulado que podem ser acumulados nos organismos causando alterações no material genético, apresentando assim, potenciais teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos (LEMES; MARIN-MORALES, 2009; LIMAN et al., 2011).

Nesse panorama de grande utilização de potencial contaminação, avaliações dos efeitos dos agroquímicos, bem como o tebuconazol, tornam-se imprescindíveis (BERNARDES et al., 2015; VIRGENS et al., 2015; MACHADO et al., 2016). Nesse sentido, destacam-se os testes com vegetais superiores que permitem detectar a

citogenotoxicidade dos poluentes pela avaliação do ciclo celular de células de ponta de raízes (MACEDO et al., 2014; AGUIAR et al., 2016), já que este órgão é o primeiro a ser exposto aos agentes tóxicos dispersos no solo e na água (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Portanto a análise das células radiculares constitui um método rápido para o monitoramento da toxidade (FISKEJÖ, 1988). *Lactuca sativa* que compõe a família das Asteraceae, dicotiledônea, é um dos modelos vegetais que vem ganhando destaque para avaliação de risco de contaminação ambiental SOUZA FILHO et al., 2010; GOMES et al., 2012; RIBEIRO et al., 2012; FREITAS et al., 2016). Sua grande utilização deve-se à sua alta sensibilidade a fatores externos, por ser organismo eucarioto, apresentar alta correlação com organismos teste animal, possuir cromossomos de fácil visualização, rápida proliferação celular, e além de permitir a realização de testes macro e microscópico simultaneamente (SOUSA et al., 2009; SILVEIRA et al., 2016).

Além dos testes de genética toxicológica, as avaliações do estresse oxidativo também são de grande importância, tendo em vista sua resposta à agroquímicos nos mais diversos organismos, como a avaliação do estrese oxidativo acometido pela espécie *Rhamdia quelen* em contato com diferentes agrotóxicos (PERSCH, 2015), o estresse oxidativo observado em *Drosophila melanogaster* por meio do aumento de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica em tratamentos com organofosforados (BATISTA et al., 2016), bem como a avaliação em modelos vegetais como *Allium cepa* e *Tradescantia pallida* expostas ao inseticida imidacloprido (RODRIGUEZ, 2016).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar o potencial tóxico e citogenotóxico do princípio ativo tebuconazol da classe química dos triazóis, por meio de bioensaios vegetais em *L. sativa* associando diferentes ferramentas para análise.

2 MATERIAIS E METÓDOS

2.1 SOLUÇÕES TESTE

O estabelecimento das concentrações das soluções teste de tebuconazol ocorreu por diluição do produto comercial com base na concentração recomendada pelo

fabricante para o cultivo de tomate. Assim, foram estabelecidas concentrações com base no recomendado pelo fabricante, além disso, foram utilizadas concentrações acima e abaixo do recomendado, sendo as seguintes concentrações finais 25 (C1), 50 (C2), 100 (C3), 200 (C4) e 400 g/mL (C5).

Como controle positivo foi utilizado trifluralina (0,84 g/L) cuja ação e mecanismos são conhecidos para análise de ciclo celular e crescimento radicular (FERNANDES et al., 2007, 2008) e MMS (Metil Metano Sulfonato) na concentração $4x10^{-4}$ mol L^{-1} nos testes que avaliaram quebra e fragmentação do DNA. Como controle negativo (CN), utilizou-se água destilada.

2.2 MATERIAL VEGETAL

O modelo vegetal utilizados nos testes de toxicidade foi *L. sativa* (alface) variedade Verônica. Em todos os testes realizados, as sementes foram germinadas em placas petri com papel filtro umedecido com água, de forma descontínua: após a germinação e protrusão da raiz de 1-2 mm, estas foram expostas ao tratamento com as concentrações de tebuconazol. A exposição ocorreu a 24°C em câmera de germinação sem a presença de luz. A duração do tratamento variou de acordo com os objetivos de cada método, assim como a fixação do material.

2.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR

O experimento foi montado em Delineamento Inteiramente Casualizado, consistindo-se de 5 placas de Petri por tratamento, sendo cada placa uma repetição. Cada placa continha 30 sementes de *L. sativa* com raízes medindo de 1-2 mm, expostas as concentrações de tebuconazol (item 2.1). Neste ensaio, como controle positivo foi utilizado a trifluralina (0,84 g/L). Após 24 horas de exposição, as raízes foram medidas com auxílio de paquímetro digital.

2.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Para análise do ciclo celular, após avaliação do crescimento (item 2.3), as raízes foram coletadas e fixadas em solução de Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético). Para o

preparo das lâminas as raízes fixadas foram lavadas com água destilada e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C por 9 minutos e coradas em reativo de Schiff por 40 minutos. Após a coloração, as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. As lamínulas foram retiradas após congelamento com nitrogênio líquido precedendo a finalização com bálsamo do Canadá, tornando-as permanentes.

Foram analisadas aproximadamente 1000 células por lâmina, considerando cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por tratamento. Para a determinação da citogenotoxicidade, foram consideradas as alterações cromossômicas e nucleares nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Foram avaliadas as seguintes variáveis: índice mitótico (IM) sendo, porcentagem de cada fase da mitose, porcentagem de alterações cromossômicas (AC%), porcentagem de alterações nucleares (AN%). Para tanto foram consideradas alterações como: cromossomos perdidos, quebrados, pegajosos, pontes, c-metáfases e núcleo condensado.

2.5 COMETA

Para o ensaio cometa foi utilizado material vegetal fresco. Assim, as sementes de *L. sativa* foram germinadas inicialmente m água destilada e posteriormente expostas por 24 horas às concentrações de tebuconazol C1, C2, C3 e C4, sendo realizadas 3 repetições por tratamento. Como controle positivo foi utilizado o MMS ($4x10^{-4}$ mol $^{L-1}$). A análise seguiu o protocolo de Jovchtev e colaboradores (2001). Foram preparadas suspensão celular a partir das raízes, em PBS 1X (NaCl 130 Mm, Na2HPO4 7mM, NaH2PO4 3mM, EDTA 50mM, pH 7,5), e filtradas em membrana de nylon com poros de 50 µm.

As soluções obtidas foram misturadas com 1% de agarose de ponto de fusão normal (1:1) e 30 µL dessa mistura foram adicionados às lâminas previamente cobertas com uma fina camada de agarose, tendo sido espalhada com auxílio de uma lamínula. Posteriormente as lâminas foram mantidas sob refrigeração para solidificação do material. Em seguida, as lâminas passaram por um processo de lise (NaOH 30 mM e EDTA 0,5 mM, pH 11,8) por 10 minutos. Após esse processo, foram estabilizadas em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,4) gelado, durante 5 min,

por 3 vezes. A corrida foi realizada em cuba de eletroforese horizontal preenchida com a solução de eletroforese (EDTA 0,25 M e NaOH 2 M, pH 10,1) por 15 min em uma corrente de 25 V (15-17 mA), em temperatura ambiente. Após a eletroforese as lâminas foram desidratadas em álcool 96% durante 5 min e secas ao ar.

Para a análise dos nucleóides, nas lâminas foram coradas com iodeto de propídio e observadas em microscópio de fluorescência (Olympux BX 60) sob comprimento de onda de 520 a 560 nm, as imagens foram capturadas na micro-câmera AxioCam HRm (ZEISS) acoplada ao microscópio através do programa AxioVision. Foram analisadas 3 lâminas por tratamento, sendo avaliados 100 nucleóides por lâminas, totalizando 300 nucleóides por tratamento. A quantificação de danos foi avaliada utilizando a classificação visual dos cometas/núcleóides proposta por Collins et al. (1995), e calculado o índice de danos (ID) conforme a fórmula: ID (ua) = (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD) + (4xE), onde: A, B, C, D e E correspondem ao número de células em cada uma das classes. (A) classe 0 = sem danos, (B) classe 1= danos mínimos, (C) classe 2= danos médios, (D) classe 3= danos intensos e (E) classe 4= danos máximos.

2.6 TESTE DE TUNEL

O teste de morte celular foi realizado a partir do kit Deadend^{TM} Fluorometric TUNEL System da Promega ®. Neste caso, foram avaliadas amostras referentes à concentração C4 (recomendada) e aos controles negativo (água) e positivo (MMS).

As raízes tratadas de modo descontínuo (item 2.2), após 24h de exposição foram coletadas, lavadas com água destiladas e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C. As lâminas foram preparadas pelo método de esmagamento, e a lamínula retirada por congelamento em nitrogênio líquido. Após o preparo, as lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% e submetidas aos procedimentos descritos na bula do protocolo do produto.

Para a análise as lâminas receberam Vectashield® com 1 µg mL^{-1} de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) e foram cobertas com lamínulas, foram analisadas em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 60) sob o comprimento de onda de 488

a 495 nm para a fluoresceína e de 345 a 358 nm para o DAPI. As análises dos núcleos foram realizadas com a sobreposição das imagens com a luz verde e azul, possibilitando a detecção de danos nos núcleos por meio da emissão de fluorescência. Os danos foram classificados como sem danos, danos leves e danos graves. Foram analisados 100 núcleos por lâmina, sendo 3 lâminas por tratamento, totalizando 300 núcleos por tratamento.

2.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Foi realizado a análise do estresse oxidativo por meio da quantificação de proteínas totais e enzimas ativadas na produção de espécies reativas de oxigênio. As sementes foram previamente germinadas em água e transferidas para o tratamento por 5 dias até alcançarem a estatura de plântulas (PAULA et al., 2015). Neste método, foram avaliadas as concentrações C3 e C4. Como base para as análises foi preparado o extrato bruto, por meio da maceração das plântulas em nitrogênio líquido, solubilizando-as em tampão fosfato de potássio (100 mM, ph 6,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM), com acréscimo de PVPP. O extrato foi colocado em microtubos e centrifugado. O sobrenadante foi realocado em micro tubos novos e armazenado em ultrafreezer (-70°C) até análise.

Para a quantificação de proteína total foi seguido o método de Bradford (1976), sendo utilizado o corante Coomassie brilhante blue G250. Para tanto, 100 µL de extrato bruto foi particionado em tubo de ensaio junto a 5 ml do corante, deixando reagir por no mínimo 5 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

A catalase (CAT) foi analisada por meio da reação composta por 100 µL de extrato bruto, 200 µL de H_2O_2 (10 mM) e 1700 µL de tampão Na_2PO_4 (50 mM, pH 7,0) durante 3 minutos. A verificação da absorbância inicial e final da reação ocorreu em espectrofotômetro a 240 nm (IBRAHIM; SROU 2015; AEBY, 1984).

Para a análise da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi analisado a reação de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), EDTA (0,1 mM), ácido ascórbico (0,5 mM), H_2O_2 (0,1 mM) e o 100 µL de extrato bruto. Esta reação foi analisada por 3 minutos a

partir da absorbância inicial e final constatadas após leitura a 290 nm em espectrofotômetro (IBRAHIM; SROU, 2015; NAKANO; ASADA, 1981).

A reação para análise da enzima peróxido dismutase (POD) foi composta de 100 µL extrato bruto, H_2O_2 (260 mM), Guaiacol (20 mM) e de Tampão Fosfato Na_2PO_4 (pH 6,0). A solução final reagiu por 3 minutos, sendo lida a absorbância em 470 nm no espectrômetro (HU et al., 2012; GULCIN, 2008).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada seguindo o protocolo de Giannopolitis e Ries (1977), onde avaliou-se a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo solução composta de tampão fosfato (100 mM, pH 7,5), metionina (50 mM), riboflavina (0,1 mM), EDTA (5 mM), NBT (1mM), água ultrapura e o 100 µL de extrato bruto. A reação foi lida em espectrofotômetro após 40 minutos a 560 nm.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados avaliados em *L. sativa* pelo teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$), sendo estes expressos em média ± desvio padrão. Já para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo estes expressos em média ± desvio padrão.

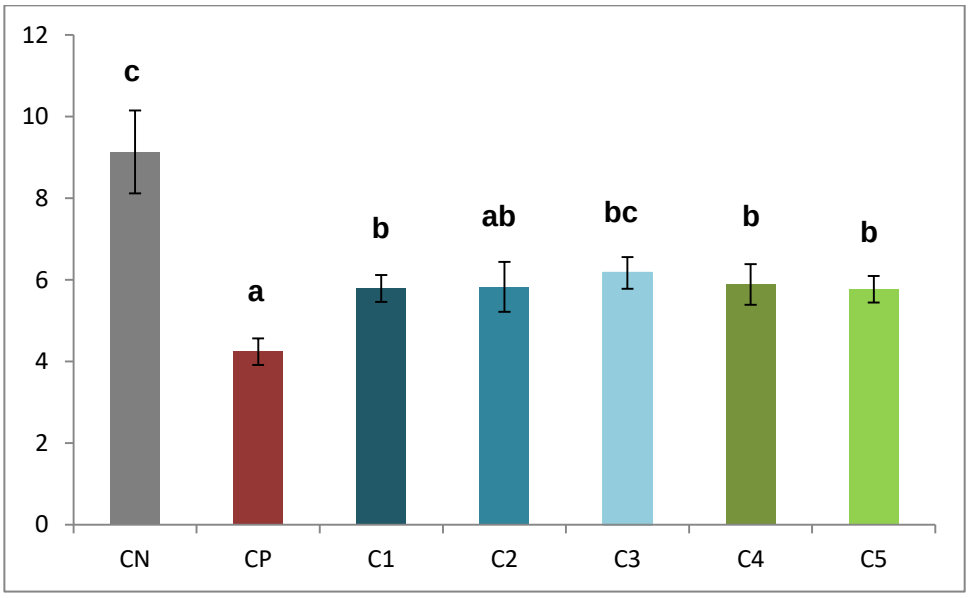
3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR E CICLO CELULAR

Os resultados demonstraram que o princípio ativo tebuconazol apresenta ação fitotóxica, pois reduziu o comprimento das raízes em relação ao controle negativo na maior parte das concentrações. Apesar de C3 não apresentar uma diferença significativa, observou-se um comportamento similar com as demais concentrações, exibindo valores aproximados e não apresentando diferença estatística entre as concentrações do fungicida. A concentração C5, que apresentou o menor

crescimento em relação ao controle negativo, indicou uma inibição no crescimento da raiz de 37% de em relação ao controle negativo (Figura 1).

Figura 1 - Crescimento radicular de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas com a mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis. CN: controle negativo e CP: controle positivo.



A análise do ciclo celular de células meristemáticas de *L. sativa* possibilitou identificar alterações, assim como o mecanismo de ação do tebuconazol sobre o material genético dessas células. Neste acaso, o IM apresentou uma redução de 24,41% na concentração C1 em relação ao controle negativo, sendo que as demais concentrações não apresentaram diferença estatística (Tabela 1).

Em relação às fases do ciclo celular, foi possível observar o aumento na ocorrência de metáfases durante a divisão celular em C5 que foi de 36,74 ± 1,66. Nesta concentração também foi constatado elevado número de telófases significativo em relação ao controle negativo, além disso, C3 e C4 também apresentaram aumento para variável telófase, onde a porcentagem de aumento dessa variável foi respectivamente de 23,56 ± 6,23; 22,74 ± 4,90 (Tabela 1).

As alterações cromossômicas apresentaram-se com maior frequência nas concentrações C3 (10,11 ± 3,2), C4 (13,24 ± 2,52) e C5 (15,92 ± 3,16) em relação controle negativo (0,87 ± 0,63), sugerindo o aumento crescente destas alterações

com o aumento da concentração. As menores concentrações não apresentaram uma percentagem de alterações cromossômicas significativamente diferentes do controle negativo (Tabela 1).

Dentre as alterações cromossômicas, as mais encontradas neste estudo, em proporção de alteração por número total de células em divisão, foram: pontes, cromossomo pegajoso e c-metáfase (Tabela 2, Figura 2). Já com relação às alterações nucleares, observou-se acréscimo na frequência de núcleo condensado. Neste caso, excetuando-se C3, as concentrações apresentaram frequência superior em relação ao controle negativo.

Figura 2 - Principais alterações cromossômicas encontradas em células meristemáticas tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. **A**: C-metáfase, **B**: Ponte cromossômica, **C**: cromossomo pegajoso.

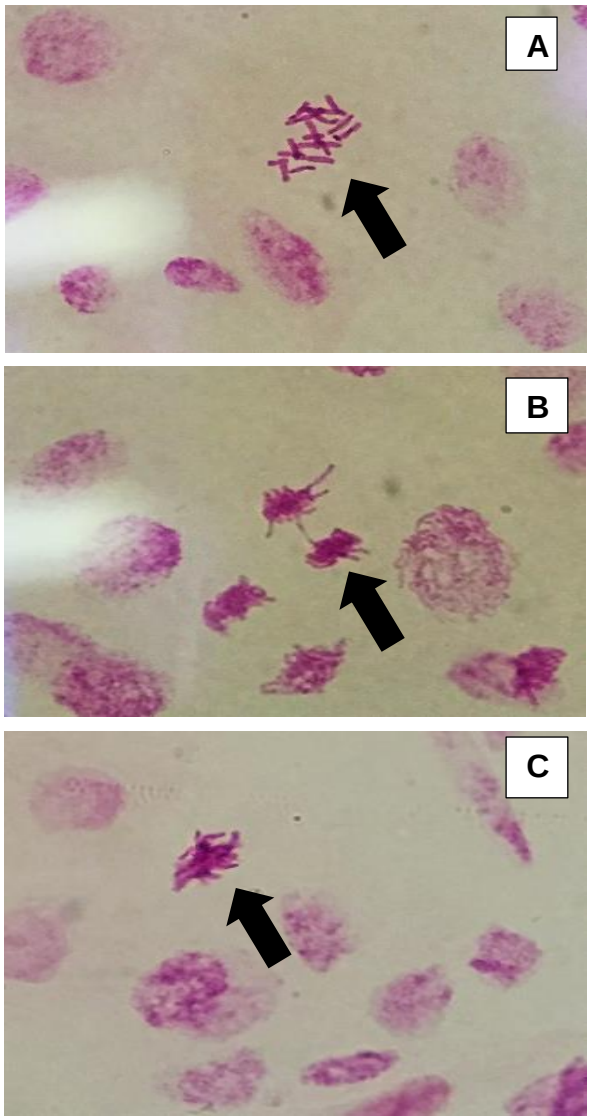


Tabela 1 - Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol.

Concentrações	Índice mitótico (IM %)	Relação do IM com o controle negativo (%)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anafáse (%)	Telófase (%)	Alterações Cromossômicas (%)	Alterações Nucleares (%)
Controle negativo	11,55 ± 0,31 b	-	52,78 ± 9,49 c	25,97 ± 7,65 a	13,48 ± 1,62 ab	12,33 ± 3,35 ab	0,87 ± 0,63 a	0 ± 0 a
Controle positivo	19,92 ± 2,59 c	+ 72,47	25,19 ± 8,25 a	69,73 ± 6,83 c	2,03 ± 1,64 a	8,49 ± 4,88 ab	70,11 ± 7,96 d	0,08 ± 0,18 a
C1	8,73 ± 2,60 a	- 24,41	46,53 ± 12,25bc	30,41 ± 10,05ab	17,68 ± 11,04 b	6,30 ± 3,15 a	8,96 ± 2,61 abc	1,32 ± 0,77 b
C2	10,46 ± 1,38 ab	- 9,44	40,76 ± 5,72 bc	33,47 ± 5,20 ab	16,49 ± 2,21 b	12,60 ± 5,07 ab	7,21 ± 1 ab	4,14 ± 2,21 b
C3	11,84 ± 1,05 b	+ 2,51	42,19 ± 5,14 bc	28,93 ± 3,29 ab	14,49 ± 1,73 b	23,56 ± 6,23 c	10,11 ± 3,2 bc	0,04 ± 0,09 a
C4	10,84 ± 1,33 ab	- 6,14	40,31 ± 5,10 bc	28,83 ± 4,51 ab	15,38 ± 2,48 b	22,74 ± 4,90 c	13,24 ± 2,52bcd	1,98 ± 0,83 b
C5	11,90 ± 1,23 bc	+ 3,03	37,74 ± 5,30 bc	36,74 ± 1,66 b	14,67 ± 3,31 b	17,81 ± 6,78 bc	15,92 ± 3,16 cd	1,52 ± 0,70 b

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis.

Tabela 2 - Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol, em relação ao total de células em divisão analisadas.

Tratamento/ Concentrações	cromossomo quebrado(%)	Ponte (%)	cromossomo perdido (%)	cromossomo pegajoso (%)	C- metáfase (%)
Controle negativo	0a	0a	0a	0,87±0,63a	0a
Controle positivo	0a	0,11±0,24a	0,54±0,4a	1,62±0,63a	65,83±7,80d
C1	0a	0,19±0,42a	0,62±0,9a	7,48±2,24bc	0,66±1,05ab
C2	0a	0,45±0,61a	0,39±0,5a	4,73±1,15ab	1,43±1,63abc
C3	0a	0,7±0,76a	0,32±0,4a	8,05±2,97bc	1,04±0,72abc
C4	0,21±0,5a	0,21±0,48a	0a	9,77±3,21bc	3,05±1,46cd
C5	0a	0,65±1,09a	0,71±0,8a	11,27±3,97c	3,29±4,11bcd

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis.

3.2 COMETA

Os resultados do ensaio cometa indicaram que o fungicida tebuconazol apresenta potencial genotóxico, tendo em vista o aumento de danos encontrados nos nucleóides das células expostas em todas as concentrações avaliadas em comparação com o controle negativo. Nesse sentido, observa-se o indício de relação direta entre o aumento de danos e a concentração tebuconazol (Tabela 3). Também foi possível observar que os danos foram similares com o controle positivo (MMS), já conhecido pelo seu mecanismo de quebra do DNA, nas concentrações C4 e C5.

Tabela 3 - Avaliação da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa em células de raízes de *L. sativa* tratadas com o princípio ativo tebuconazol.

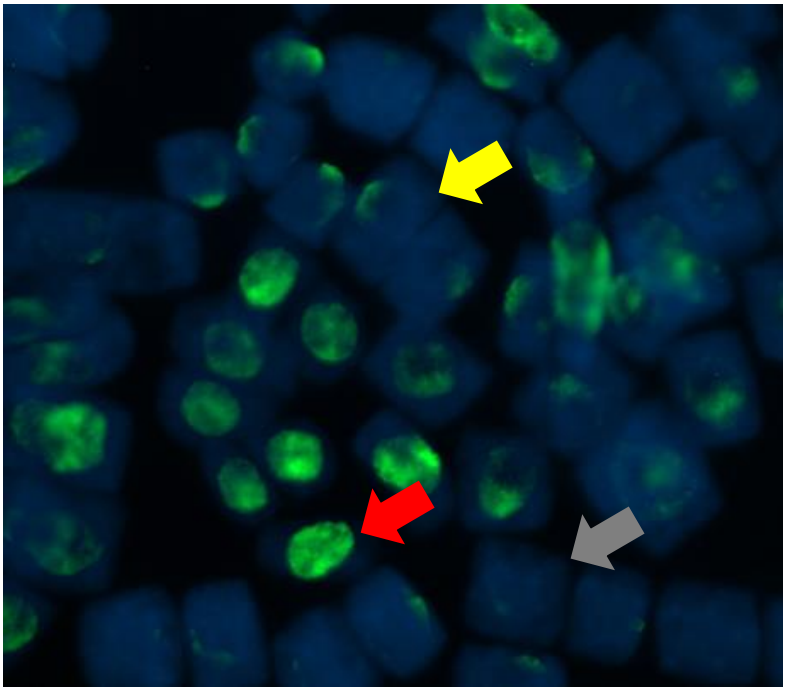
Tratamento/ concentrações	Classificação tipo de Dano					
	0	1	2	3	4	ID
Controle negativo	87,33	12	0,67	0	0	13,33±6,66 d
Controle positivo	0,33	9,33	22,33	62	6	264±9,54 a
C1	25,67	49,33	22,67	2,33	0	101,67±22,03 c
C2	3,33	19	36,33	38	3,33	219±8,54 b
C3	2,67	14,67	31	45,33	6,33	238±18,33 ab
C4	3	12	27,67	46	10,33	246,67± 15,28 ab

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de médias Tukey. ID: índice de danos.

3.3 TESTE DE TUNEL

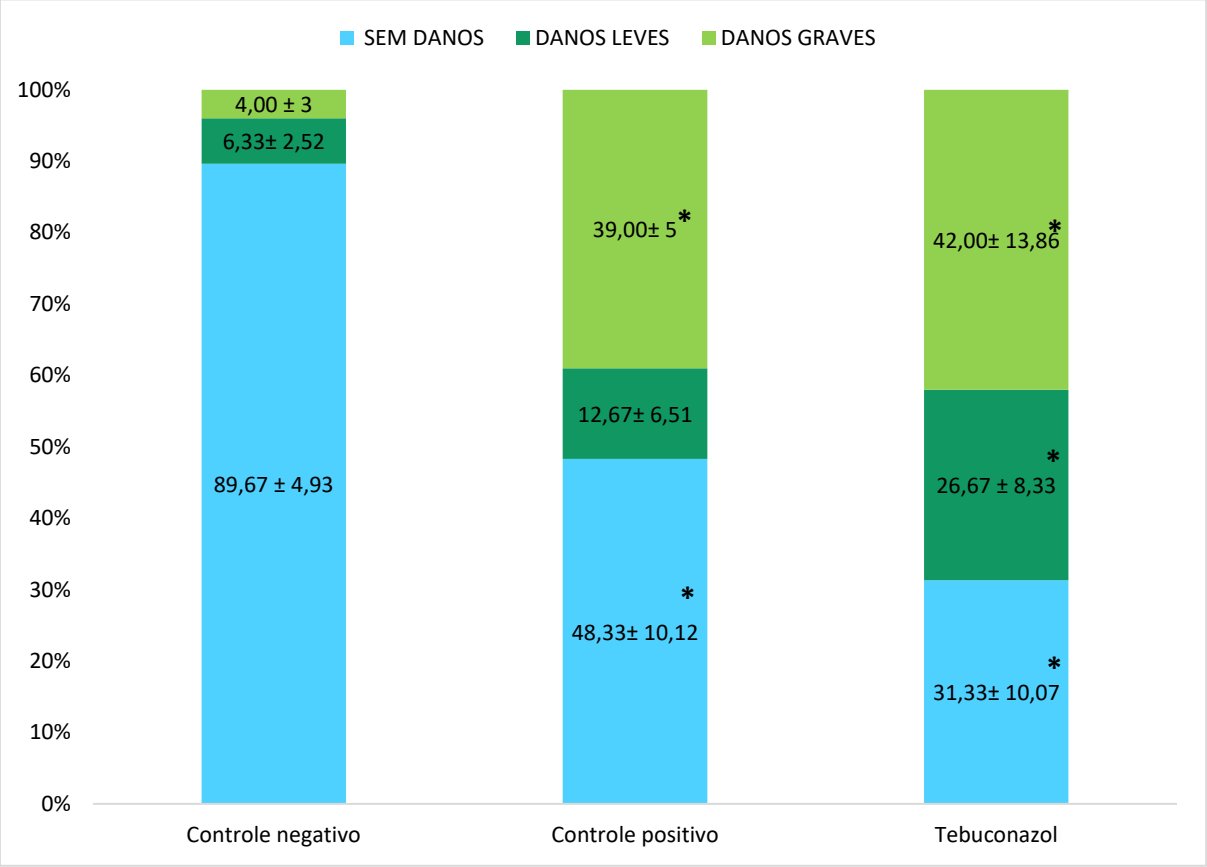
A análise de morte celular em células meristemáticas de *L. sativa* forneceu dados que corroboram os resultados na análise do cometa, demonstrando a alta fragmentação do material genético nas células tratadas com o fungicida tebuconazol (figura 3). A avaliação foi feita de forma a contabilizar as células sem danos, com danos leves e danos graves.

Figura 3 - Células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol no teste de TUNEL. As setas coloridas representam os tipos de danos encontrados, cinza: sem danos, amarela: danos leves e vermelha: danos graves.



Os resultados do TUNEL permitiram observar que as células tratadas com o tebuconazol apresentaram maior fragmentação de DNA, sendo que todos os tipos de danos foram estatisticamente superiores ao controle negativo. Neste caso, os danos leves e graves apresentaram valores de 26,67 %, 42,00 %, respectivamente, enquanto que o tratamento com água apresentou 4 % de danos leves e 6,33% de danos graves (Figura 4).

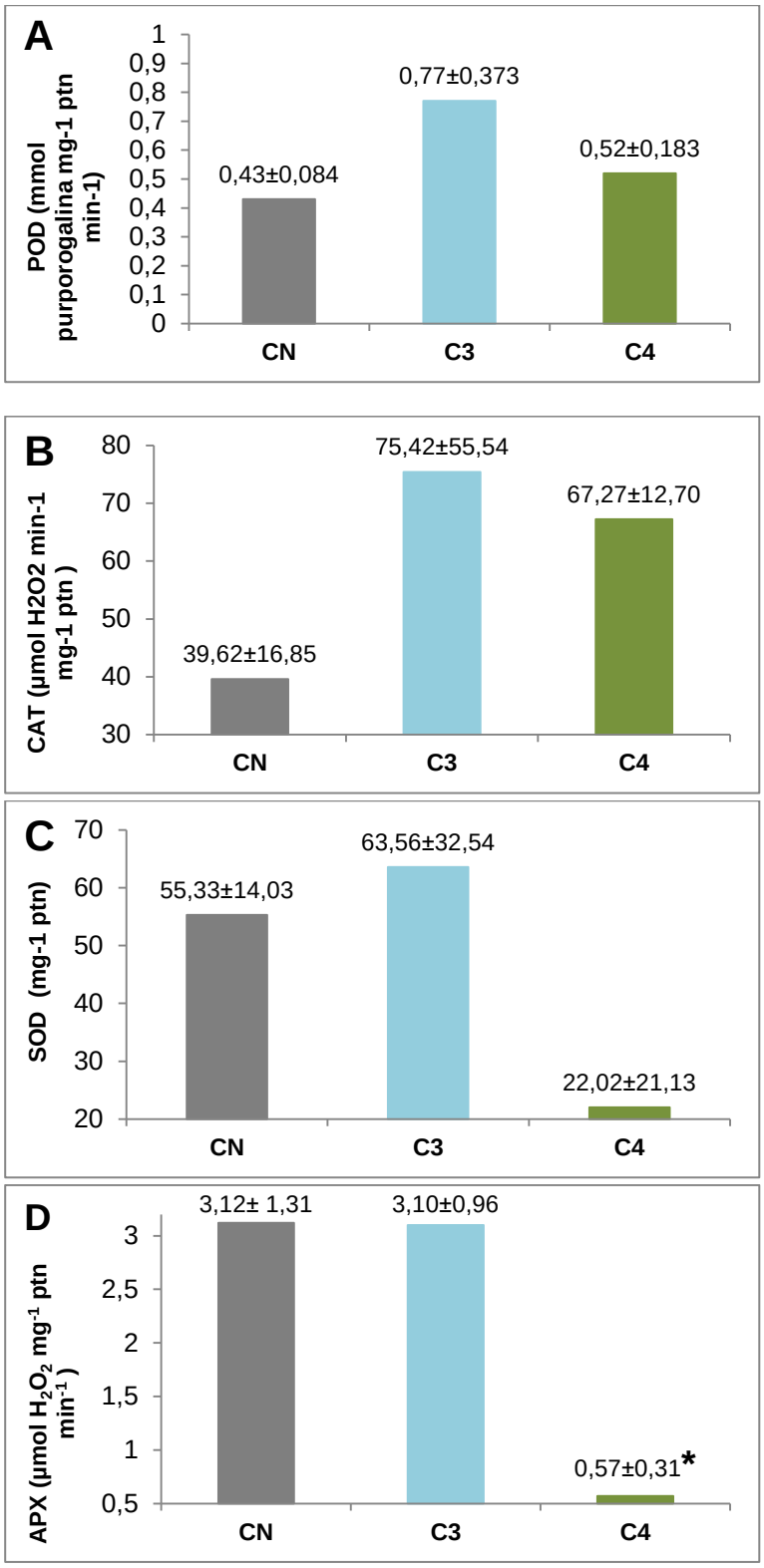
Figura 4 - Análise de morte celular por meio do teste de TUNEL em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.



3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

As enzimas POD, CAT e SOD não apresentaram diferença significativa em suas atividades nas plântulas tratadas com o tebuconazol (Figura 5 A, B, C), apesar de ocorrer indício de aumento na atividade após exposição a algumas concentrações. Entretanto, avaliando-se a APX, observa-se menor atividade em relação controle negativo na concentração C4 (Figura 5 D), na qual a APX apresentou um valor médio de 0,57 comparando com a média de 3,12 apresentada pelo controle negativo.

Figura 5 - Atividade enzimática de plântulas de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo tebuconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância. CN: controle negativo.



4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, os efeitos tóxicos do princípio ativo tebuconazol do grupo químico triazol, presente em fungicidas comercias foi avaliado por meio de diversos testes com o modelo vegetal *L. sativa.* O princípio ativo reduziu o crescimento radicular, alterou o índice mitótico, aumentou a frequência de células em divisão com alterações cromossômicas, induziu a formação de núcleos condensados e a fragmentação do DNA, demonstrando ser fitotóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico. Além disso, causou estresse no metabolismo oxidativo, representado pela diminuição da enzima APX como defesa pela planta ao contaminante.

Deste modo, os resultados do presente trabalho corroboram com aqueles observados por Bernardes et al. (2015) que avaliaram o efeito do tebuconazol em *Allium cepa.* Neste caso, os autores observaram o reduzido crescimento radicular e o baixo número de células em divisão, bem como a elevada frequência de alterações cromossômicas e nucleares.

Diversos trabalhos discutem a citoxicidade de poluente ambientais por meio do crescimento radicular de *Lactuca sativa*, como o chumbo (PEREIRA et al., 2013), cobre e peróxido de hidrogênio (MORAES, 2015), efluentes da indústria de cerâmica (BORGES, 2011) e resíduos da indústria de alumínio (FREITAS et al., 2016). Nestes trabalhos é evidente a sensibilidade desta medida aos mais diversos poluentes ambientais.

Um dos fatores mais importantes que influenciam no crescimento radicular é a atividade de divisão celular do tecido meristemático que combinado com a elongação celular, promove o crescimento do tecido (SHISHKOVA et al., 2008). Dessa forma, junto ao crescimento radicular, é importante avaliar o índice mitótico do meristema das radículas. Segundo Souza (2010) a redução no índice mitótico pode fornecer informações sobre a atividade citotóxica da substância. Todavia, o mesmo autor destaca que aumento de IM pode ser prejudicial, já que pode indicar processos de tumorização. No presente estudo, C1 foi a concentração de menor IM, evidenciando uma possível redução do crescimento das raízes devido a diminuição de células em divisão celular, tratadas com o princípio ativo tebuconazol.

Além do índice mitótico, o potencial citotóxico de um poluente pode ser avaliado por meio da quantificação e análise das fases de divisão celular, expostas à agentes mutagênicos. Nesse caso, é possível detectar os eventos de interrupção de prófases, metáfases, anáfases e telófases seja o aumento na frequência de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, seja pelas alterações nucleares (NORA et al., 2010). Destarte, neste estudo foi possível avaliar o aumento de células na fase de prófase e metáfase, possivelmente ocasionado devido ao grande número de alterações cromossômicas em metáfase, o que contribuiu para que as células permanecessem por mais tempo em metáfase, não dando sequência ao ciclo normal de divisão celular. Efeito similar foi observado por Aragão et al. (2015) que constatou elevado número de metáfases em células meristemáticas de alface tratadas com óleo essencial de eucalipto, que impossibilitavam a continuação do ciclo de divisão celular.

O ciclo celular é regulado por proteínas quinases e ciclinas, que atuam nos pontos de checagem nas fases de divisão, sinalizando e possibilitando a entrada em uma nova fase do ciclo (ALBERTS, 2014). Desse modo, a célula só passará para a fase de anáfase, após a verificação do alinhamento correto dos cromossomos na placa equatorial das células. Em muitos casos o erro é detectado em metáfase onde há um ponto de checagem para passagem para anáfase, conhecido como Complexo Promotor da Anáfase (CPA) na qual quando é inibido impede a progressão da divisão celular (ACQUAVIVA; PINES, 2006), possivelmente uma consequência do aumento do número de alterações cromossômicas em metáfase.

No presente estudo, foi possível observar maior frequência de alterações cromossômicas nas maiores concentrações avaliadas de tebuconazol, sendo presumível sugerir o potencial mutagênico da substância estudada, além de possibilitar a mensuração dos danos causados (SILVA et al., 2003). Além disso, foi possível afirmar o mecanismo de ação do tebuconazol sobre o indivíduo teste, na qual alterações abrangendo a estrutura do cromossomo como pontes e quebras cromossômicas indicam uma ação clastogênica, porém quando se envolve alterações numéricas no conjunto cromossômico como perdas, atrasos, aderências multipolaridade e c-metáfases, indicam uma ação aneugênica do poluente (VIDAKOVIÉ-CIFREK et al., 2002; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Distinguindo o

mecanismo de ação aneugênico como predominante no estudo, devido a grande quantidade de cromossomos pegajosos e c-metáfases (Tabela 2).

Ademais, vários trabalhos relatam a ação de agrotóxicos nos mais diferentes modelos vegetais, como o tiabendazol que induziu toxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* (ANDRIOLI; MUDRY, 2011), carbamatos metomil e oxamil que induziramm alterações cromossômicas como fragmentos e pontes em *Vicia faba* (VALENCIA-QUINTANA et al., 1993) e o herbicida trifluralina que possibilitou observar a formação de micronúcleos e células poliplóidizadas em *Allium cepa* (FERNANDES et al., 2007).

Em relação ao ensaio do cometa, o efeito genotóxico foi evidenciado nesse estudo devido ao aumento de danos no material genético das células tratadas com o tebuconazol. Além disso, a ampliação da fragmentação do DNA aparenta relação com o aumento das concentrações, evidenciando a atuação direta do mesmo sobre o material genético. Outros autores evidenciaram danos do DNA por meio do teste do cometa em tratamentos com defensivos agrícolas em diferentes bioensaios, como o fungicida metil-tiofanato em *Podarcis sicula* (CAPRIGLIONE et al., 2011), carbendazim e clorotalonil em linfócitos humanos (LEBAILLY et al., 1997) e glifosato em eritrócitos periféricos de peixe dourado (CAPRIGLIONE et al., 2011).

O ensaio do cometa é muito utilizado na avaliação genotóxica, sendo amplamente utilizado em estudos com dejetos industriais, domésticos e agrícolas, além disso, no biomonitoramento de populações expostas e aplicações clínicas (HARTMANN et al., 2003; CAPRIGLIONE et al., 2011; PEREIRA et al., 2016). O teste permite a observação da indução de danos e possíveis reparos no DNA (HARTMANN et al., 2003). Além disso, possui diversas vantagens na qual se destacam a sua simplicidade, rápido desempenho e alta sensibilidade para diversos tipos de danos no DNA (DA SILVA et al., 2003; GONÇALVES et al., 2003). Além do ensaio do cometa, o teste de TUNEL é muito importante em estudo de genotoxicidade uma vez que ele avalia o andamento do processo de morte celular por meio da fragmentação do material genético das células (BELENKY et al., 2013).

As análises em células tratadas com o tebuconazol demonstraram que o mesmo possui uma ação genotóxica sobre o DNA, já discutido com o teste do cometa, porém o resultado foi enfatizado com o teste de TUNEL resultado nos elevados

números de células com danos leves e graves. Sendo este fato uma possível consequência da fragmentação do DNA devido a exposição ao fungicida. Outros autores evidenciaram esse processo de morte celular pelo teste de TUNEL em outros modelos biológicos expostos a fungicidas, como por exemplo, bactérias e fungos (BELENKY et al., 2013), células de defesa humana (HEIN et al., 2015) e linfócitos bovinos (SCHWARZBACHEROVÁ et al., 2017). Nestes casos, todos os trabalhos observaram a danos ao material genético das células analisadas. O processo de morte também foi evidenciado pelo aumento significativo de núcleos condensados, citado em trabalhos como sendo um bom indicador do início do processo de morte celular, caracterizado por núcleos arredondados de tamanho menor que os núcleos interfásicos e de coloração mais evidente (ANDRADE-VIEIRA et al. 2011; ANDRADE-VIEIRA et al., 2012b).

Segundo Belenky et al. (2013), a fragmentação de DNA está diretamente relacionada com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs produzidas pelo metabolismo celular podem causar danos a várias estruturas da célula, como membranas, proteínas e DNA (KOHANSKI et al., 2007; SALMON et al., 2004). Independente do organismo, tanto procariotos quanto eucariotos, as EROs induzem a ruptura das fitas duplas de DNA, além de outros danos celulares, bloqueando o reparo do DNA lesado e até mesmo promovendo a morte celular (DWYER et al., 2012, FOTI et al., 2012).

Desse modo, as EROs surgiram ao longo da evolução como mecanismo de defesa dos organismos vivos, importante para tolerar o estresse ambiental, uma vez que as EROs em baixas concentrações promovem ativação de múltiplas respostas protetoras, abrangendo a regulação positiva de enzimas e a indução de mutações benéficas (BELENKY; COLLINS, 2011; KOHANSKI et al., 2010). No presente trabalho, a análise do estresse oxidativo foi realizada indiretamente por meio da quantificação de enzimas antioxidantes POD, SOD, CAT e APX. Neste caso, apenas a APX se resposta significativa ao se comparar C4 e CN, a enzima APX atua catalisando a decomposição do peróxido de hidrogênio em água, utilizando o ascorbato como substrato, que geralmente se encontra em tecidos fotossintéticos atuando contra a fotoxidação (ASADA, 1992). Provavelmente essa diminuição se deu pela toxicidade do princípio ativo para as células do tecido, um possível mecanismo de defesa da planta, por meio da diminuição brusca de APX devido o

processo avançado de morte celular causada pelo fungicida, observada por meio da análise de fragmentação do DNA.

Desse modo, a produção de EROS induzida pela exposição aos fungicidas pode ser um mecanismo de defesa dos organismos-alvo contra esses agroquímicos. Nesse caso, a produção acima de determinado patamar pode cessar o desempenho do papel protetor das enzimas antioxidantes e induzir até mesmo a morte celular e o reparo de DNA (BELENKI et al., 2013).

5 CONCLUSÃO

Os parâmetros avaliados no modelo vegetal *L. sat*iva permitem concluir que as concentrações avaliadas do fungicida tebuconazol resultam em interferências no crescimento radicular e índice mitótico, promove elevada frequência das aberrações cromossômicas como c-metáfase e cromossomos pegajosos, evidenciando a atividade citotóxica do fungicida e ação sobre o fuso mitótico. Além disso, foi possível constatar a ação genotóxica devido à fragmentação do DNA mensurada pela técnica do cometa e TÚNEL. Sendo este processo possivelmente devido a produção de EROs como forma de defesa de *L. sativa*. Dessa maneira destaca-se a utilização de *L. sativa* como modelo sensível para estudos de mutagenicidade com agroquímicos. Além disso, recomenda-se o uso controlado dos agrotóxicos para evitar acidentes de trabalho e ambientais, assim como avaliar o combate de fungos com menores concentrações, afim de reduzir os efeitos tóxicos em organismos não-alvo.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALBERTS, B. et al. *Fundamentos da Biologia Celular*. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

AGUIAR, L. L. et al. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 133, p. 366-372, 2016.

.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (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, n. 4, p. 882–888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. In: Diceu Pratissoli e colaboradores. (Org.). *Tópicos Especiais em Produção Vegetal III*. 1ed. Alegre: UFES, v. 3, p. 39-79, 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. *Journal of Environmental Management*. Sint-Katelijne-Waver, v. 107, p. 140-146, 2012b.

ANDRIOLI, N. B.; MUDRY, M. D. Cytological and cytogenic effects induced by thiabendazole on *Allium cepa* root meristema. *Journal of basic and applied genetics*, v. 22, n. 2, 2011.

ANVISA. 2011. *Sistema de Informações sobre Agrotóxicos.* Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home/Agrotóxicotoxicologia>. Acesso em: 10 de setembro de 2016.

ACQUAVIVA, C.; PINES, J. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *Journal of cell science*, v. 119, n. 12, p. 2401-2404, 2006.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Allelopathy Journal*, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

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

BATISTA, J. E. S. et al. *Drosophila melanogaster* como modelo experimental para estudos de toxicidade do organofosforado clorpirifós. *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, v. 7, n. 2, 2016.

BELENKY, P.; COLLINS, J. J. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*, v. 334, p. 915–916, 2011.

BELENKY, P. et al. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, v. 3, p. 350–358, 2013.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa. Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.

BORGES, C. Avaliação da toxicidade do efluente do lavador de gases de olaria, utilizando os bioindicadores: Lactuca sativa, Allium cepa L., Artemia sp. e Eisenia foetida. Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado para obtenção do grau de Bacharel no Curso de Engenharia Ambiental da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Unesc. 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Sistema integrado de informações sobre agrotóxicos –SIA. Decreto 4.074, 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp. Acesso em: 22 junho de 2015.

CAPRIGLIONE, T. et al. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. *Ecotoxicology*, v. 20, p. 885, 2011.

CARSON, R. *Primavera Silenciosa*. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.

CASTLE, S. et al. Newer insecticides for plant virus disease managment. *Virus Research*, v. 141, p. 131-139, 2009.

DALLA NORA, G. et al. Antiproliferative and genotoxic effects of Mikania glomerata (Asteraceae). *Biocell*, v. 34, n. 3, p. 95-101, 2010.

DWYER, D. J. et al. Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis. *Molecular Cell*, v. 46, p. 561–572, 2012.

FERNANDES, T. C. C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C. et al. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent- Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research,* v. 197, n. 2, p. 243-260, Feb. 1988.

FOTI, J.J. et al. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science*, v. 336, p. 315–319, 2012.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L.. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 124, p. 426-434, 2016.

GENTZ, M. C. et al. Tandem use of selective insecticides and natural enemies for effective, reduced-risk pest management. *Biological Control*, v. 52, p. 208-215, 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GIAVINI, E.; MENEGOLA, E. Are azole fungicides a teratogenic risk for human conceptus?. *Toxicol Lett*, v.198, n. 2, p. 106-111, 2010.

GONÇALVES, L. M. et al. Avaliação do potenial genotóxico das águas do Rio Itajaí-Açú e zona costeira sobre os hemócitos do mexilhão Perna perna através do Ensaio do Cometa. *II SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL*, Itajaí, SC. Livro de Resumos, v. 1, p. 384, 2003.

GOMES, L. S. et al. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. *Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology*, v.7, p.89-96, 2012.

GOMES, K. M. S. et al. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on Allium cepa L. root meristematic cells. *Food Science and Technology (Campinas),* v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HEIN, K. Z. et al. Disulphide-reduced psoriasin is a human apoptosis-inducing broad-spectrum fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences,* v. 112, n. 42, p. 13039-13044, 2015.

HU, Z. et al. Discovery of pod shatter-resistant associated SNPs by deep sequencing of a representative library followed by bulk segregant analysis in rapeseed. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e34253, 2012.

IBRAHIM, M. A. R. et al. Effect of solar UV radiation on antioxidant enzymes and phenols biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, v. 23, n. 1, p. 101-108, Ar109, 2015.

JOVTCHEV, G. et al. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 493, n. 1, p. 95-100, 2001.

KOHANSKI, M. A. et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, v. 130, p. 797–810, 2007.

KOHANSKI, M. A. et al. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Molecular Cell*, v. 37, p. 311–320, 2010.

KOKSAL, E.; GULCIN, I. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) buds. *Protein and Peptide Letters*, v. 15, n. 4, p. 320-326, 2008.

KRÜGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa.* Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

LEBAILLY, P. et al. Assessment of DNA damage induced in vitro by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the

comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 375, n. 2, p. 205-217, 1997.

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

LIMAN, R. et al. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests**.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99, p. 61-64, 2011.

MACEDO, J. F. M. et al. Estudo da genotoxicidade do extrato de Abelmoschus esculentus (quiabo) pelo teste Allium cepa. *Revista Saúde em Foco*, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2014.

MACHADO, M. R. F. et al. Qualidade embrionária e sua influência nas repostas de testes de toxicidade em zebrafish- *Danio rerio*. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, v. 4, n. 1, 2016.

MELO, J. O. F. et al. Heterociclos 1,2,3-triazólicos: histórico, métodos de preparação, aplicações e atividades farmacológicas. *Química Nova*, v. 29, n. 3, p. 569-579, 2006.

PAULA, C. V. et al. Estudos do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia ungulata* 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.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agroambiente*, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.

PEREIRA, B. K. et al. Avaliação do efeito fotoprotetivo de Polytrichum juniperinum Hedw, Colobanthus quitensis (Kunth.) Bartl. e Deschampsia antarctica Desv. através de ensaio cometa em Helix aspersa (Müller, 1774). *Revista de Iniciação Científica da ULBRA*, n. 3, 2016.

PERSCH, T. S. P. Efeito dos herbicidas Roundup®, Primoleo® e Facet® sobre o metabolismo intermediário, o estresse oxidativo e a sobrevivência de *Rhamdia quelen* em diferentes fases de desenvolvimento. Tese (Doutorado em Zoologia). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio grande do Sul – BR, 2015.

RIBEIRO, J. P. N. et al. Allelopathic effects of aqueous extracts of *Crinum americanum* L. *Revista Brasileira de Botanica,* v. 32, p. 183-188, 2009.

RODRIGUEZ, I. A. Potencial tóxico e genotóxico do inseticida imidacloprido em organismos não alvos. Tese (Doutorado em Ciência Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro – SP, 2016.

SALMON, T. B. et al. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Research*, v. 32, p. 3712–3723, 2004.

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.

SHISHKOVA, S. et al. Determinate root growth and meristem maintenance in angiosperms. *Annals of Botany*, v. 101, p. 319-340, 2008.

SILVA, J. da et al. Genética toxicológica. *Porto Alegre: Alcance*, p. 422, 2003.

SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. *Caryologia,* v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SOUZA, T.S. et al. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, p.1363-1368, 2009.

SOUZA, L. F. B. et al. Genotoxic potential of aqueous extracts of Artemisia verlotorumon the cell cycle of Allium cepa. *International Journal of Environmental Studies*, v. 67, n. 6, p. 871-877, 2010.

SOUZA-FILHO, A. P. S. et al. Metodologias empregadas em estudos de avaliação da atividade alelopática em condições de laboratório – Revisão Crítica. *Planta Daninha*, v. 28, n. 3, p. 689-697, 2010.

VALENCIA-QUINTANA, R. et al. Cytological effects of some carbamate insecticides. I. Methomyl and oxamyl in Vicia faba. *Revista Internacional de Contaminación. Ambiental, v.* 9, p. 65-69, 1993.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z. et al. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. *Environmental Contamination and Toxicology,* v. 43, p. 284-291, 2002.

VIRGENS, A. C. et al. Alterações histológicas em brânquias de *Orechromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida. *Natureza on line*, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

CAPITULO II: **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FUNGICIDA DIFENOCONAZOL POR MEIO DE BIOENSAIOS EM *Lactuca sativa.***

Resumo

Os agrotóxicos possuem grande importância agronômica por contribuir com o aumento da produtividade e conservação de alimentos, porém o seu uso desenfreado pode levar à danos ambientais, bem como prejuízos à saúde humana. Assim, têm sido despertado interesse na comunidade científica em compreender e avaliar os efeitos biológicos dessas substâncias em vários organismos. O trabalho teve por objetivo avaliar o potencial genotóxico e os mecanismos de ação do fungicida difenoconazol, do grupo químico triazol, por meio de análises morfológicas, bioquímicas, citogenéticas e biomoleculares no modelo vegetal *Lactuca sativa*. Foram germinadas 30 sementes de *L. sativa* em placas de petri, sendo cinco repetições por tratamento, forradas com papel filtro apenas em água até atingirem 1-2 mm, posteriormente as raízes foram tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol nas concentrações 15,62; 31,25; 62,5; 125 e 250 g/mL, mantidas a 24°C em câmera de germinação com ausência de luz. Trifluralina (0,84 g/L) e MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}) foram utilizados como controle positivo (C+) e água destilada como controle negativo (C-). Foram realizadas análises de crescimento radicular, do ciclo celular, quantificação dos danos ao DNA por meio do ensaio cometa e teste de TUNEL, além da avaliação do estresse oxidativo por meio da quantificação das enzimas antioxidantes CAT, APX, SOD e POD. As médias foram submetidas à ANOVA seguida de Tukey ($P < 0.05$) ou ao teste de Kruskal Wallis. O fungicida causou redução do crescimento radicular nas concentrações C3, C4 e C5. Não houve diferença estatística na variável índice mitótico, porém observou-se aumento significativo de células com alterações cromossômicas (AC) nas concentrações C4 e C5 em relação com o controle negativo. Considerando os tipos de AC observadas houve grande ocorrência de C-metáfase e cromossomo pegajoso, sendo a última observada em maior frequência. As concentrações C2, C4 e C5 aumentaram a porcentagem de alterações nucleares. Observou-se que os tratamentos aumentaram a fragmentação de DNA, avaliados pelo teste de TUNEL, constatando-se o aumentou da quantidade de danos leves e a diminuição das células sem danos em relação ao controle negativo. Houve evidências de estresse oxidativo, por meio da quantificação da enzima SOD. Desse modo, o princípio ativo difenoconazol apresentou efeito citotóxico, diminuindo o crescimento radicular e efeito genotóxico, aumentando a ocorrência de aberrações nucleares e aberrações cromossômicas. Além disso, resultou no aumento da fragmentação do DNA e alterou a atividade da enzima SOD.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Cometa. Estresse oxidativo. TUNEL.

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são compostos químicos utilizados na agricultura com o intuito de aumentar a produtividade e qualidade dos alimentos. Inicialmente eram utilizadas substâncias de origem natural, como piretro e a nicotina, além de outros compostos inorgânicos a base de mercúrio, enxofre ou cobre (COUTINHO et al., 2005). Com o avanço da tecnologia, novas substâncias sintéticas foram sendo desenvolvidas, aumentando o poder de ação e até mesmo sua aplicabilidade na lavoura. Como exemplo, há os organofosforados e organoclorados que são os mais utilizados atualmente, além de outras diversas classes compreendendo uma grande variedade de substâncias químicas, com diferentes mecanismos de ação, biotransformação e eliminação (GALLI et al., 2006).

Os triazóis, um grupo químico dos fungicidas, possuem ação sistêmica e atuam na inibição na produção do ergosterol da parede celular dos fungos, rompendo-a impedindo seu crescimento e desenvolvimento (SYNGENTA, 2013). Um representante importante dessa classe é o difenoconazol, citado em estudos recentes por provocar danos no material genético de vegetais (KRÜGER, 2009; BERNARDES et al., 2015), além de alterações estruturais em animais aquáticos (VIRGENS et al., 2015).

Segundo dados da ANVISA (2012), foram realizados análises em 1665 amostras de alimentos, nas quais 29% dessas amostras apresentavam resíduos de agroquímicos não autorizados ou autorizados acima do limite permitido pela ANVISA. Nestes casos os fungicidas triazóis representavam grande parcela dos agrotóxicos encontrados. Entretanto, dados mais recentes, elaborados a partir de estudos de risco agudo para saúde onde se avalia o risco de intoxicação nas primeiras 24 horas após o consumo do alimento contaminado com agroquímicos, demostraram que entre 744 amostras analisadas, 684 se apresentavam dentro do padrão aceitável pela agência para o consumo humano. Neste caso os estudos não descartaram a necessidade de avaliações em longo prazo da exposição a agrotóxicos (ANVISA, 2016).

Além de desencadearem possíveis danos à saúde humana, parcela considerável dos produtos químicos aplicados nas lavouras podem ser lixiviados, atingindo

frequentemente corpos d'agua (rios e lagos) e até mesmo alcançando lençóis freáticos (CORSOLINI, 2009). Não bastassem, estes compostos favorecem uma pressão antrópica nos ecossistemas aquáticos e terrestre, acarretando danos a organismos-alvo e não alvos, desencadeando diferentes mecanismos de toxicidade sobre os organismos que habitam esses ambientes (RABOUILLE et al., 2006; CARSON, 2010).

Neste contexto, é de extrema importância elucidar os mecanismos de ação e os efeitos destes compostos nos organismos vivos, que provocam a toxicidade dos mesmos (BIANCHI et al., 2015). Dentre as das ferramentas disponíveis para o biomonitoramento desses poluentes, os bioensaios em plantas superiores são de grande valia, pois permitem avaliar os efeitos de agentes tóxicos e mutagênicos presentes em seu ambiente natural (SANDALIO et al., 2001). Os bioensaios vegetais detectam danos genéticos, em nível de DNA, cromossômico e genômico (MALUSZYNSKA; JUCHIMIUK, 2005). Assim, são apontados como ótimos modelos genéticos devido a sua alta sensibilidade, boa correlação com sistemas teste animais, cromossomos grande e de fácil visualização e baixo custo na realização do teste (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994; LEME; MARIN MORALES, 2009; ARAGÃO et al., 2015). *Lactuca sativa* é considerado um excelente modelo vegetal para avaliação de contaminantes ambientais, devido sua alta sensibilidade a fatores externos, grande número de sementes, rápida germinação e alta proliferação celular (SILVEIRA, 2016).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial genotóxico e os mecanismos de ação do fungicida difenoconazol, do grupo químico dos triazóis, associando diferentes ferramentas de análise no modelo vegetal *L. sativa*.

2 MATERIAIS E METÓDOS

2.1 SOLUÇÕES TESTE

As soluções foram elaboradas utilizando as seguintes concentrações 15,62 (C1); 31,25 (C2); 62,5 (C3); 125 (C4) e 250 (C5) g/mL. Essas foram estabelecidas com base na recomendação do fabricante para o cultivo de tomate. Como controle positivo foi utilizado respectivamente, a trifluralina (0,84 g/L) (FERNANDES et al.,

2007, 2009) para a análise de crescimento radicular e ciclo celular, e MMS (Metil Metano Sulfonato) na concentração $4x10^{-4}$ mol L^{-1} nos testes que avaliaram quebra e fragmentação do DNA, sendo que para todos os testes utilizou-se água destilada como controle negativo.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Como modelo vegetal foi utilizado sementes de *Lactuca sativa* (alface) da variedade Verônica, na qual foram germinadas 30 sementes em placas de preti, sendo cinco placas por tratamento. Inicialmente as sementes foram colocadas para germinar em água até as raízes atingirem o comprimento de 1-2 mm, em seguida foram transferidas para os tratamentos com as concentrações do fungicida e os controles.

2.3 ANÁLISE DO CRESCIMENTO RADICULAR

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, onde cada tratamento possuía cinco placas como repetições. Foram tratadas 30 sementes enraizadas de *L. sativa* como descritas anteriormente em 2.2, contendo as cinco concentrações do fungicida difenoconazol e como controle positivo, trifuralina (0,84 g/L). As sementes foram mantidas a 24°C em câmera de germinação com ausência de luz e após 24 horas de exposição as raízes foram medidas com auxílio de paquímetro digital.

2.4 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

Após a análise de crescimento radicular as raízes foram armazenadas em fixador Carnoy 3:1 para serem utilizadas no preparo de lâminas citogenéticas seguindo protocolo de Grant (1994). Assim, as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N por 9 minutos a 60 °C. Posteriormente as raízes foram coradas pela metodologia de Feulgen, após a coloração as lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. Para essa análise, todas as cinco concentrações do fungicida foram testadas, o controle positivo utilizado foi a trifluralina (0,84 g/L).

Foram analisadas aproximadamente 1000 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por tratamento. Com o intuito de determinar a citogenotoxicidade dos fungicidas, as alterações cromossômicas e nucleares foram analisadas em diferentes estágios da divisão celular, onde foram avaliados: índice mitótico (IM), porcentagem de cada fase da mitose, porcentagem de alterações cromossômicas (AC%), porcentagem de alterações nucleares (AN%). Para tanto foram consideradas alterações como: cromossomos perdidos, quebrados, pegajosos, pontes, c-metáfases e núcleo condensado.

2.5 COMETA

A análise genotóxica do difenoconazol, foi avaliada pelo ensaio cometa seguindo o protocolo de Jovchtev et al. (2001). Foram avaliadas as concentrações C1, C2, C3 e C4, sendo três repetições por tratamento, não sendo utilizada a maior concentração devido a inviabilização do material para o teste do cometa devido a oxidação das raízes. Neste caso, como controle positivo foi utilizado o MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}).

A suspensão celular de material fresco foi preparada utilizando aproximadamente 20 raízes, picotadas em 300 µl de PBS 1X (NaCl 130 Mm, Na2HPO4 7mM, NaH2PO4 3mM, EDTA 50mM, pH 7,5), essa suspensão celular foi filtrada filtradas em membrana de nylon com poros de 50 µm. A quantidade de 30 µL de suspensão nuclear foi ressuspendida em 30 µL de gel de agarose de baixo ponto de fusão 1% a uma temperatura de 42 °C, e espalhou-se em lâminas pré gelatinadas com agarose.

Após secarem, as lâminas foram colocadas em solução de lise (NaOH 30 mM e EDTA 0,5 mM, pH 11,8) durante 10 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas três vezes em TBE 1X (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,4) gelado por 5 minutos cada lavagem e colocadas em uma cuba de eletroforese com solução tampão (EDTA 0,25 M e NaOH 2 M, pH 13). A eletroforese foi conduzida por 15 minutos a 15-17 mA (1V/ cm) a temperatura ambiente. Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em álcool etílico e secas à temperatura ambiente.

A coloração foi realizada com iodeto de propídio, e os nucleóides observados em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 60), sob comprimento de onda de 520 a 560 nm. Foram analisadas três lâminas por tratamento, onde foram avaliados 100

nucleóides por lâminas, totalizando 300 nucleóides por tratamento. A quantificação de danos foi avaliada utilizando a classificação visual dos cometas/núcleóides proposta por Collins e colaboradores (1995), e calculado o índice de danos (ID) conforme a fórmula: ID (ua) = (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD) + (4xE), onde: A, B, C, D e E correspondem ao número de células em cada uma das classes. (A) classe 0 = sem danos, (B) classe 1= danos mínimos, (C) classe 2= danos médios, (D) classe 3= danos intensos e (E) classe 4= danos máximos.

2.6 TESTE DE TUNEL

A prospecção de morte celular foi realizada utilizando o kit Deadend^{TM} Fluorometric TUNEL System da Promega ®, seguindo o protocolo disponibilizado no produto. O material vegetal fresco foi obtido de acordo com o item 2.2, porém foi utilizada apenas a concentração recomendada pelo fabricante (C4), e o controle positivo utilizado foi o MMS ($4x10^{-4}$ mol L^{-1}).

As raízes foram lavadas e hidrolisadas em HCl 1N à 60°C por 9 minutos, apenas a região meristemática da raiz foi utilizada para o preparo da lâmina, pelo método de esmagamento com uma gota de PBS 1X, a lamínula foi retirada com congelamento em nitrogênio líquido. Posteriormente as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% e submetidas aos procedimentos descritos na bula do protocolo do produto.

A coloração foi realizada com uma alíquota Vectashield® com 1 µg mL^{-1} de DAPI (4’,6-diamidino-2-phenylindole) e foram cobertas com lamínulas, foram analisadas em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 60) sob o comprimento de onda de 488 a 495 nm para a fluoresceína e de 345 a 358 nm para o DAPI. As análises dos núcleos foram realizadas com a sobreposição das imagens com a luz verde e azul, onde foram detectados danos aos núcleos que emitiram fluorescência, indicando a incorporação de nucleotídeos modificados (dUTP) nas extremidades de fragmentos de DNA. Os danos foram classificados como sem danos, danos leves e danos graves. Foram analisados 100 núcleos por lâmina, sendo três lâminas por tratamento, totalizando 300 núcleos por tratamento.

.

2.7 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

Para realização da análise do estresse oxidativo foi obtido material fresco em estágio de desenvolvimento de plântulas (PAULA et al., 2015). As plântulas foram pesadas e posteriormente maceradas em nitrogênio líquido e adicionado um tampão fosfato de potássio (100 mM, ph 6,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM). O extrato foi acomodado em micro tubos e centrifugados, onde o sobrenadante foi realocado em micro tubos e armazenado em ultrafreezer (-70°C).

O método de Bradford (1976) foi utilizado para quantificar proteínas totais, 100 µL do extrato bruto foi misturado com 5 mL do corante Coomassie brilhante blue G250, deixando reagir por cinco minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. A catalase (CAT) foi analisada por meio da reação composta de 100 µL de extrato geral, 200 µL de H_2O_2 (10 mM) e 1700 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (50 mM, pH 7,0) durante 3 minutos, onde foi realizada a verificação da absorbância inicial e final da reação no espectrofotômetro a 240 nm (IBRAHIM; SROU, 2015; AEBY, 1984).

Para a análise da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi preparado uma solução contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), EDTA (0,1 mM), ácido ascórbico (0,5 mM) e H_2O_2 (0,1 mM). Para a reação foi adicionado 1900 µL de solução + 100 µL de extrato geral, sendo a reação analisada por 3 minuto e as absorbâncias inicial e final a 290 nm no espectrofotômetro registradas (IBRAHIM; SROU, 2015; NAKANO; ASADA, 1981). A reação para análise da peróxido dismutase (POD) foi preparada uma solução de 100 µL de extrato bruto, 1mL de H_2O_2 (260 mM), 50 µL de guaiacol (20 mM) e 900 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (pH 6,0), onde a solução final reagiu por 3 minutos e quantificada em espectrômetro a 470 nm (HU et al., 2012; KOKSAL; GULCIN, 2008).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Para tanto, a análise foi realizada de duas formas, onde metade das amostras permaneceu na ausência de luz e a outra metade foi exposta a luz. A reação foi realizada em tubos de ensaio contendo 2900 µL de solução composta de 1500 µL tampão fosfato (100 mM, pH 7,5), 780 µL metionina (50 mM), 60 µL riboflavina (0,1 mM), 60 µL EDTA (5 mM),

225 µL NBT (1mM) e 275 µL água ultrapura, além de 100 µL de extrato geral totalizando 3 ml dentro do tubo de ensaio. A reação foi lida em espectrofotômetro após 40 minutos a 560 nm, seguindo o protocolo de Giannopolitis e Ries (1977).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados avaliados em *L. sativa* foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ($P < 0,05$), sendo estes expressos em média ± desvio padrão. Já para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Tukey ($P < 0,05$), sendo estes expressos em média ± desvio padrão.

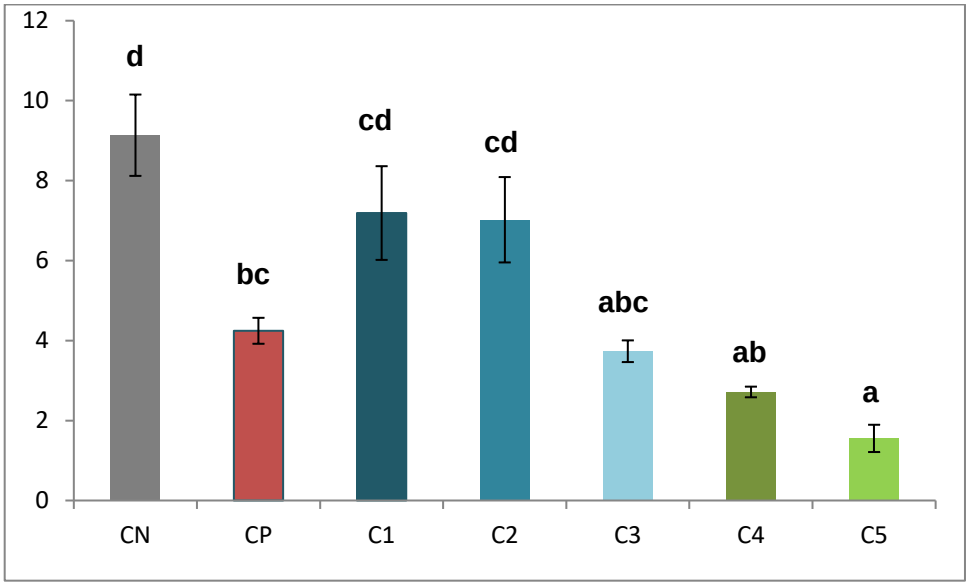
3 RESULTADOS

3.1 CRESCIMENTO RADICULAR E CICLO CELULAR

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, foi possível observar uma ação citotóxica do fungicida sobre o crescimento radicular de *L. sativa*, devido à redução significativa do tamanho das raízes nas concentrações C3, C4 e C5, quando comparadas com o controle negativo. O aumento das concentrações provocou a diminuição do crescimento, essa redução no crescimento teve uma média de 1,55 mm na maior concentração (C5) em relação com a média de 9,13 mm do controle negativo (Figura 1).

Na análise do ciclo celular das células meristemáticas, tratadas com as cinco concentrações do fungicida difenoconazol, foi possível observar que os tratamentos não interferiram no índice mitótico das células. Porém, análises das fases mitóticas apresentou diferença significativa nas maiores concentrações em relação ao controle negativo, como em prófase ocorreu uma redução nas concentrações C4 e C5. A fase de metáfase apresentou diferença apenas na maior concentração (C5) com média de 42,08 comparando com média de 25,97 do controle negativo, assim como a telófase, na qual o aumento ocorreu somente na concentração C4 (Tabela 1).

Figura 1 - Crescimento radicular de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas com a mesma letra nas barras não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Kruskal Wallis. CN: controle negativo e CP: controle positivo.



Na análise das alterações cromossômicas foi observado, de modo geral, que houve aumento significativo na porcentagem de alterações nas concentrações C4 e C5, quando comparadas com o controle negativo, assim como o aumento foi crescente acoplado ao aumento das concentrações do fungicida (Tabela 1).

Durante a avaliação das alterações cromossômicas foi possível observar uma tendência para a ação aneugênica do difenoconazol devido ao alto índice de alterações do tipo cromossomo pegajoso e c-metáfase (Figura 2), seguido por uma ação clastogênica mais discreta, representada por pontes (Tabela 2).

As alterações nucleares avaliadas na forma de núcleos condensados mostrou-se evidente nas concentrações C2, C4 e C5, sendo diferente estatisticamente do controle negativo, apesar de ocorrer em menor frequência que as alterações cromossômicas, um aumento representativo foi observado na concentração C4 (Tabela 1).

Figura 2 - Principais alterações cromossômicas (apontadas pela seta) encontradas em células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. **A**: C-metáfase, **B**: ponte cromossômica, **C**: cromossomo pegajoso.

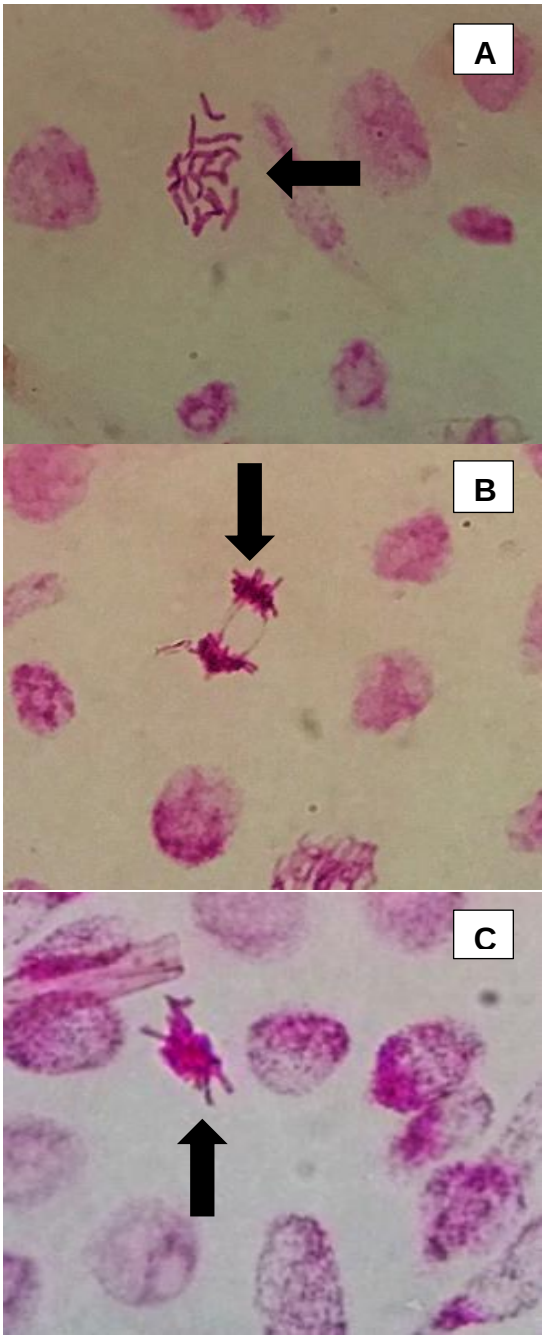


Tabela 1 - Alterações no ciclo celular em células meristemáticas de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol.

Concentrações	Índice mitótico (IM %)	Relação do IM com o controle negativo (%)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)	Alterações Cromossômicas (%)	Alterações Nucleares (%)
Controle negativo	11,55 ± 0,31 ab	(-)	52,78 ± 9,49 d	25,97 ± 7,65 a	13,48 ± 1,62 ab	12,33 ± 3,35 ab	0,87 ± 0,63 a	0 ± 0 a
Controle positivo	19,92 ± 2,59 c	(+) 72,47	25,19 ± 8,25 a	69,73 ± 6,83 c	2,03 ± 1,64 a	8,49 ± 4,88 a	70,11 ± 7,96 c	0,08 ± 0,18 a
C1	12,64 ± 1,05 bc	(+) 9,44	43,21 ± 5,65 cd	30,52 ± 7,36 ab	17,17 ± 2,90 b	15,89 ± 6,82 abc	7,44 ± 2,95 ab	0,22 ± 0,23 ab
C2	13,02 ± 1,14 bc	(+) 12,72	41,42 ± 3,48 cd	32,04 ± 3,91 ab	15,77 ± 4,65 b	19,18 ± 3,75 bc	8,02 ± 3,30 ab	0,46 ± 0,29 b
C3	11,66 ± 0,53 ab	(+) 0,95	40,94 ± 8,25 bcd	32,49 ± 3,07 ab	15,72 ± 2,31 b	17,53 ± 7,89 bc	8,42 ± 2,32 ab	0,26 ± 0,24 ab
C4	9,20 ± 0,48 a	(-) 20,35	29,64 ± 2,31 ab	37,04 ± 6,32 ab	15,32 ± 5,27 b	22,74 ± 5,00 c	14,57 ± 4,40 bc	0,76 ± 0,42 b
C5	10,76 ± 2,08 ab	(-) 6,83	33,41 ± 8,22 abc	42,08 ± 9,54 bc	15,60 ± 3,81 b	13,42 ± 6,60 ab	16,48 ± 5,66 bc	0,68 ± 0,28 b

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis.

Tabela 2 - Frequência das alterações cromossômicas observadas em células de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol, em relação ao total de células em divisão analisadas.

Tratamento/ Concentrações	Cromossomo quebrado(%)	Ponte (%)	Cromossomo perdido (%)	Cromossomo pegajoso (%)	C- metáfase (%)
Controle negativo	0 a	0 a	0 a	0,87±0,63 a	0 a
Controle positivo	0 a	0,11±0,24 a	0,54± 0,44 a	1,62±0,63 ab	65,83±7,80 b
C1	0 a	0,84±0,87 a	0,18± 0,40 a	4,74±2,53 abc	1,68±1,71 ab
C2	0 a	0,30±0,67 a	0,18±0,41 a	6,76±2,66 bcd	0,77±0,53 ab
C3	0 a	0,17±0,38 a	0,53±0,80 a	7,72±2,08 cd	0 a
C4	0 a	1,06±1,05 a	0 a	11,78±4,41 d	1,73± 1,44 b
C5	0,16±0,35 a	0,65±0,92 a	0,57±1,28 a	11,76±4,23 d	3,34±2,45 bc

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste Kruskal Wallis.

3.2 COMETA

Os resultados do ensaio cometa indicaram que o fungicida difenoconazol não apresenta potencial genotóxico (Tabela 3), nos nucleóides das concentrações avaliadas em comparação com o controle negativo. Foi possível observar que os danos foram na concentração C3 maiores que o controle positivo (MMS), já conhecido pelo seu mecanismo de quebra do DNA.

Tabela 3 - Avaliação da fragmentação do DNA pelo ensaio cometa em células de raízes de *L. sativa* tratadas com o princípio ativo difenoconazol.

Tratamento/ concentrações	Classificação tipo de Dano					
	0	1	2	3	4	ID
Controle negativo	95,33	4,66	0	0	0	4,67±1,15 a
Controle positivo	33,67	40	20,67	5,67	0	98,33±64,22 a
C1	45,33	51,67	3	0	0	57,67±14,19 a
C2	46,00	47	6,67	0	0	60,67±15,95 a
C3	32,33	42	14,33	8	3,33	108,00±72,79 a
C4	43	41	14	1,33	0	73,00±25,00 a

As médias seguidas com a mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância, pelo Teste de médias Tukey. ID: índice de danos.

3.3 TESTE DE TUNEL

A análise de morte celular realizado pelo teste de TUNEL em células meristemáticas de *L. sativa*, forneceu dados que demonstrando a fragmentação de material genético das células tratadas com o princípio ativo difenoconazol (Figura 3).

Foi evidenciado um aumento na fragmentação de DNA pelo tratamento com o fungicida, apenas a classe de danos graves não diferiu estatisticamente do controle negativo. A classe de dano leve teve um aumento significativo com média de 25,33±5,03, diferente do controle negativo com média de 6,33±2,52 (Figura 4).

Figura 3 - Células meristemáticas de raízes de *L. sativa* tratadas com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol no teste de TUNEL. As setas coloridas representam os tipos de danos encontrados, cinza: sem danos, amarela: danos leves e vermelha: danos graves.

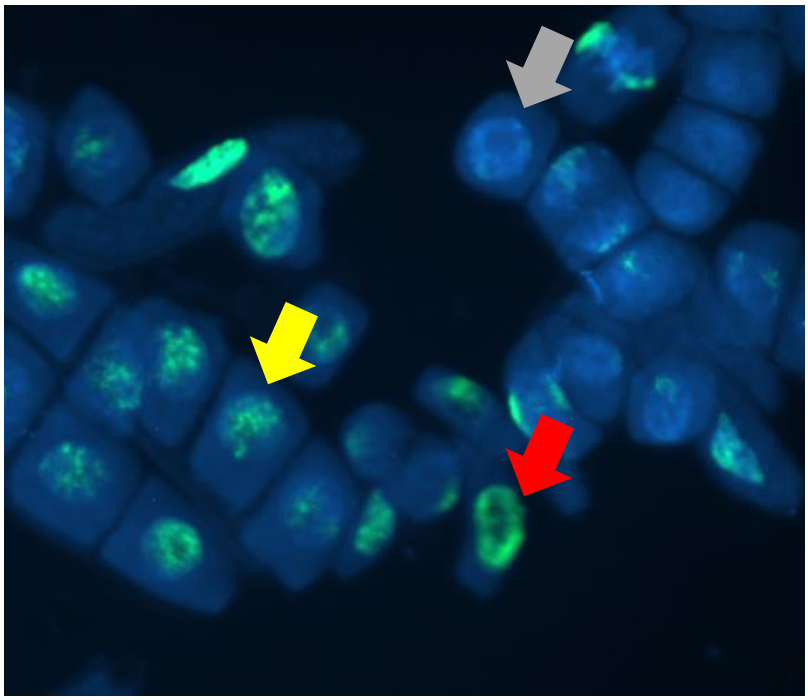
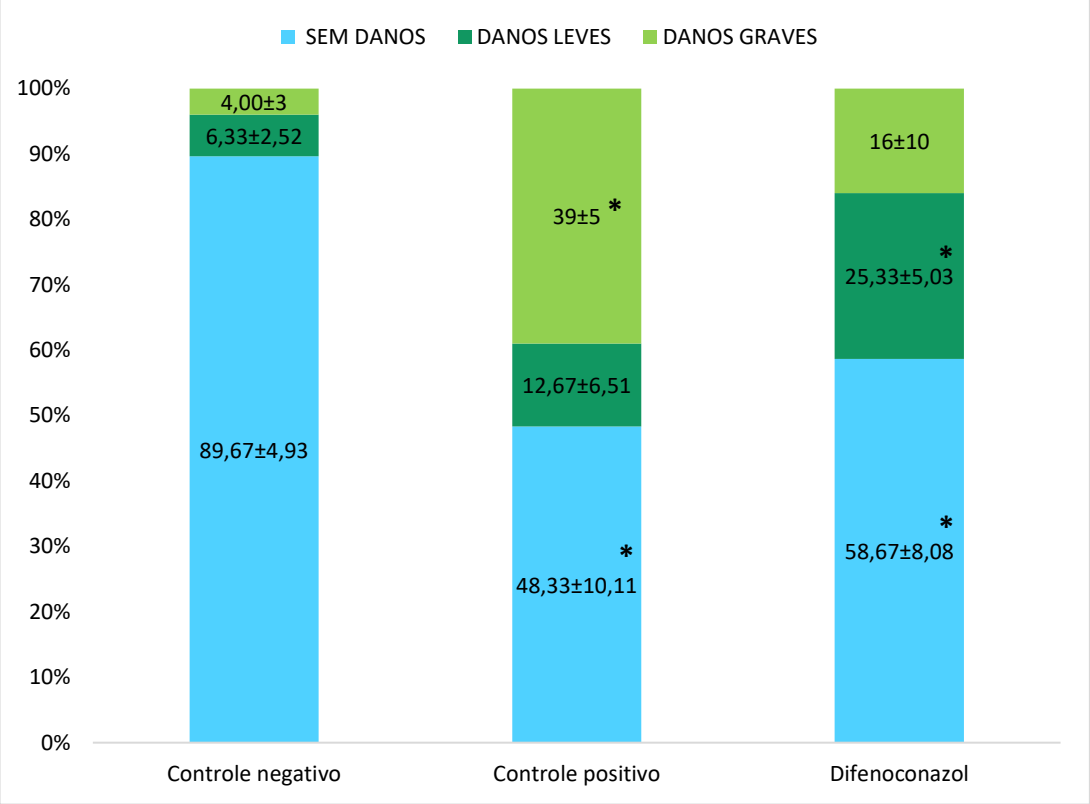


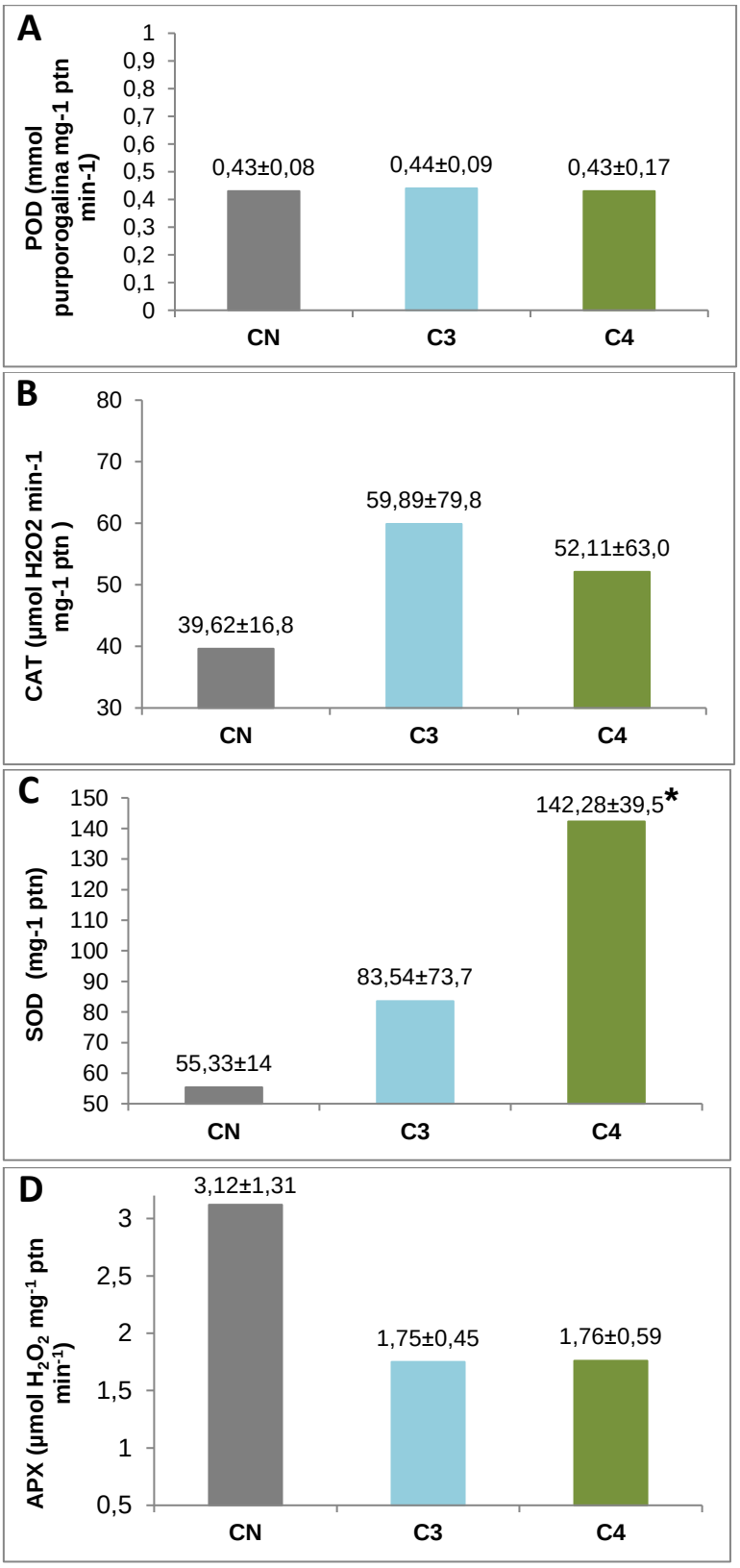
Figura 4 - Análise de morte celular por meio do teste de TUNEL em células meristemáticas de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância.



3.4 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

O tratamento de plântula de *L. sativa* com diferentes concentrações do princípio ativo difenoconazol possibilitou observar um aumento na atividade da enzima SOD na concentração C4, que apresentou um valor médio de 142,28 ± 39,5 em relação ao apresentado pelo controle negativo (55,33 ± 14) (Figura 5 C). A enzima CAT apresentou um aumento na atividade enzimática nessa situação de estresse, porém não houve uma diferença significativa entre os tratamentos e o controle negativo (Figura 5 B).

Figura 5 - Atividade enzimática de plântulas de alface em diferentes concentrações com o princípio ativo difenoconazol. As médias seguidas por (*) diferem estatisticamente das médias respectivas para cada tipo de dano em relação ao controle negativo, segundo o teste de médias Tukey a 5% de significância. CN: controle negativo.



4 DISCUSSÃO

O efeito tóxico do fungicida difenoconazol do grupo químico triazol, foi avaliado por meio de diversos testes com o modelo vegetal *Lactuca sativa.* O fungicida estudado se mostrou citotóxico, genotóxico e mutagênicos por meio da observação da redução no crescimento radicular, um aumento significativo da frequência de alterações cromossômicas e nucleares, aumento na fragmentação do DNA observada pelo teste de TUNEL e aumento da enzima SOD como mecanismo de defesa da planta.

As análises do crescimento radicular mostraram que o fungicida provoca uma ação citotóxica, devido a redução no comprimento das raízes de alface, sendo que a partir da concentração C3 a redução foi significativa comparando com o controle negativo, e conforme o aumento das concentrações do fungicida foi observado diminuição no comprimento das raízes. A fase inicial do crescimento das raízes é muito sensível a substâncias estranhas ao metabolismo da planta, ocasionando possíveis plântulas anormais, alterações no crescimento e até mesmo necroses radiculares (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), as causas da redução do crescimento radicular pode ser devido a inibição de divisão celular, inibição do alongamento das células, inibição da absorção de nutriente e atém mesmo devido a morte celular (KOCHIAN, 1995; RENGEL et al., 1996; IKEGAWA et al., 1998; HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). Porém os resultados demonstram que o difenoconazol não causa redução no índice mitótico, possivelmente a redução do comprimento da raiz observada foi devido à inibição de alongamento celular ou morte celular, uma vez que foi observado morte celular nas células meristemáticas de *L. sativa* analisadas no teste de TUNEL.

Não foi observada diferença significativa no índice mitótico, apesar de ser uma variável confiável para se definir a presença de substâncias citotóxicas, onde a redução desse índice pode ser um indício de uma interação entre o DNA com as substâncias citotóxicas, provocando um distúrbio celular ou uma disfunção da cromatina (GLINSKÁ et al., 2007), assim como o aumento também pode ser prejudicial, pois acarreta proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de anormalidades no individuo (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Os resultados apontam que o índice mitótico não foi um bom parâmetro de análise de

citotóxicidade do difenoconazol. Porém outras variáveis se mostraram evidentes ao analisar o ciclo celular, como por exemplo, as fases da divisão celular, onde ocorreu uma diminuição na quantidade de células em prófases e um aumento significativo na porcentagem de células em metáfases e telófases, sendo uma evidência da alteração do ciclo celular, caracterizando a ação citotóxica do fungicida difenoconazol. Estudos anteriormente realizado por Bernardes et al. (2015), demonstrou que o difenoconazol causava distúrbios em células meristemáticas de *Allium cepa,* como o aumento do índice mitótico, alterações cromossômicas (C-metáfases e cromossomos pegajosos) e alterações nucleares, reafirmando a citotóxicidade e genotóxicidade do fungicida estudado.

Nos estudos de monitoramento de poluentes ambientais, a análise de alterações cromossômicas como forma de avaliar o efeito citogenotóxico do poluente, assim como o seu mecanismo de ação. Segundo Costa e Teixeira (2012), as alterações cromossômicas são caracterizadas por modificações estruturais ou numéricas, podendo ocorrer espontaneamente ou induzida pela exposição a alguma substância tóxica. Neste estudo, observou-se um aumento significativo de alterações cromossômicas nas concentrações C4 e C5 do princípio ativo, evidenciando genotóxicidade do difenoconazol.

Dentre as alterações cromossômicas observadas, destacaram-se em maior frequência os cromossomos pegajosos e C-metáfases. Os cromossomos pegajosos ocorrem devido a alterações na estrutura dos cromossomos provocando a perda das características normais de condensação, provocando a formação de aglomerados (SILVA; FONSECA, 2003). Enquanto a C-metáfase resulta de uma má formação do fuso mitótico ou divisão anormal da célula (FENECH, 2000). Dessa forma, novamente o difenoconazol possui uma atividade aneugênica, que é caracterizada por alteração no fuso mitótico, sendo representado por C-metáfase, cromossomo perdido, cromossomo pegajoso e C-metáfase poliplóide (FERNANDES et al., 2009).

A análise de alterações nucleares foi realizada pela quantificação de núcleos condensados em células meristemáticas de alface, na qual foi observado um aumento significativo na porcentagem de núcleos condensados nas concentrações C2, C4 e C5 em relação com o controle negativo. As alterações nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico, e resultante da

ação tóxica de compostos. São importantes quando analisadas em conjunto com as alterações cromossômicas, tornando os dados mais precisos em relação aos danos causados no DNA dos organismos testes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, ressalta-se que muitas alterações cromossômicas e nucleares são prejudiciais à célula, fazendo com que a mesma entre em processo de morte celular (PALMIERI et al., 2014).

Neste trabalho foi possivel observar um aumento significativo na quantidade de danos leves e diminuição de células sem danos, por meio do teste de TUNEL, na qual foi possivel verificar a fragmentação de DNA, consequentemente uma possivel causa de morte celular, sendo posssivel até mesmo explicar a redução e brusca no crescimento radicular das raízes de alface tratadas com difenoconazol. O teste de TUNEL basea-se na incorporação de nucleotídeos modificados pela ação da enzima deoxinucleiotidil transferase terminal às terminações livre 3'-OH da molécula de DNA, na qual emite fluorescencia ao se ligar ao DNA (GAVRIELI et al., 1992). Dessa forma o alto índice de danos leve e graves pode ser indício de um possivel processo de morte celular pelas células expostas ao difenoconazol.

Uma das principais causas de danos de fragmentação do DNA é a produção desequilibrada de espécies reativas de oxigênio (EROs) em plantas sobre estresse, que são produzidas pelo metabolismo celular, principalmente, nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010; KARUPPANAPANDIAN et al., 2011). Acredita-se que as EROs surgiram em organismos procariotos e evoluíram sendo mantido tanto em procariotos quanto eucariotos como mecanismo de defesa contra o estresse ambiental. Sua baixa produção ativa canais de defesa da planta para tolerar as pressões impostas pelo ambiente, mas em casos de desequilíbrio, o aumento na concentração de EROs pode ser tóxica ao organismo, ocasionando a morte celular dependendo do tipo de EROs (BELENKY; COLLINS, 2011; BELENKY et al., 2013; KOHANSKI et al., 2010). Uma forma de defesa contra o aumento de desses radicais é a produção de enzimas antioxidantes, que neutralizam a ação das EROs sobre o DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares (BARREIROS; DAVID, 2006).

A avaliação do estresse oxidativo de uma planta pode ser realizada pela quantificação de enzimas antioxidantes, e neste caso detectou-se um aumento na

concentração de SOD na maior concentração (C4), inferindo que ocorreu um aumento na produção de EROs devido ao estresse causado na plântula exposta ao fungicida. A SOD é considerada a primeira linha de defesa contra as EROs, atua catalisando a transformação do superóxido em peróxido de hidrogênio, onde outras enzimas continuam o trabalho de desintoxicação celular (ALSCHER et al., 2002; DEL RIO et al., 2002). Desse modo, pode-se sugerir que a diminuição do crescimento radicular pode ter sido causada pela morte celular, consequência da fragmentação de DNA provocada pelo aumento na produção de EROs pelas plântulas de alface após exposição ao fungicida difenoconazol.

5 CONCLUSÃO

Com bases nas informações adquiridas neste estudo, no modelo vegetal *L. sativa*, conclui-se que o princípio ativo difenoconazol apresentou interferência no crescimento radicular e apesar de não causar distúrbios no índice mitótico, o aumento na quantidade de alterações cromossômicas foi expressivo, representado pelo aumento significativo de c-metáfases e cromossomos pegajosos. Estes fatos evidenciam a atividade citotóxica do fungicida e seu mecanismo de ação no fuso mitótico.

O aumento de danos leves observados pelo teste TUNEL provavelmente decorre da produção de EROs devido ao estresse causado pelo difenoconazol nas plântulas de alface analisadas, caracterizando a ação genotóxica e mutagênica do fungicida. Além disso, o modelo vegetal alface se mostrou muito sensível para estudos de mutagenicidade com agroquímicos, mostrando boa correlação com outros sistemas teste. Evidenciando que o seu uso deve ser feito de maneira controlada, como forma de evitar danos a organismos não-alvo e consequentemente ao ecossistema, próximo a locais de uso do fungicida.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALSCHER, R. G. et al. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.

ANVISA. 2012. *Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)*. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/Relat%25C3%25B3rio%2BPARA%2B2010%2B-%2BVers%25C3%25A3o%2BFinal.pdf/f568427b-c518-4a68-85b9-dd7680e55e07>. Acesso em: 15 de maio de 2015.

ANVISA. 2016. *Divulgado relatório sobre resíduos de agrotóxicos em alimentos*. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/divulgado-relatorio-sobre-residuos-de-agrotoxicos-em-alimentos/219201. Acesso em: 28 de nov. de 2016.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BELENKY, P.; COLLINS, J. J. Antioxidant strategies to tolerate antibiotics. *Science*, v. 334, p. 915–916, 2011.

BELENKY, P. et al. Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Reports*, v. 3, p. 350–358, 2013.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa. Water, Air, & Soil Pollution*, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*, p. 1-30, 2010.

BIANCHI, et al. Toxico genetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individualy and in combination in vitro tests with Hep G2 cells and Salmonella typhimurium. *Ecotoxicology and Environmental Safety, v.* 120, p. 174–183, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARSON, R. *Primavera Silenciosa*. 1 ed. São Paulo: Gaia, 2010.
CORSOLINI, S. Industrial contaminants in Antarctic biota. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 3, p. 598-612, 2009.

COSTA C.; TEIXEIRA J.P. Efeitos Genotóxicos dos Pesticidas. *Revista de Ciências Agrárias,* v. 35, n. 2, 2012.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: Mecanismos de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 15, p. 65-72, 2005.

DEL RIO, L.A. et al. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

FENECH, M., The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T. C. C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERNANDES, T. C. C. et al. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 323 p, 2004.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GALLI, A. et al. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.

GAVRIELI, Y. et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of cell biology*, v.119, n.3, p. 493-501, 1992.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant physiology*, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GLINSKÁ S. et al. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of Allium cepa L. roots treated with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* v. 68, p. 343-350, 2007.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A., The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology.* v. 13, p. 66–74, 2010.

HU, Z. et al. Discovery of pod shatter-resistant associated SNPs by deep sequencing of a representative library followed by bulk segregant analysis in rapeseed. PLoS One, v. 7, n. 4, p. e34253, 2012.

IBRAHIM, M. A. R. et al. Effect of solar UV radiation on antioxidant enzymes and phenols biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, v. 23, n. 1, p. 101-108, Ar109, 2015.

IKEGAWA, H. et al. Cell death caused by a combination of aluminum and iron in cultured tobacco cell. *Physiologia Plantarum,* v. 104, n. 3, p. 474-478, 1998.

KARUPPANAPANDIAN, T. et al. Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Science*, v. 5, n. 6, p. 709, 2011.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plant. *Annual Review of plant physiology and plant molecular biology*, v. 46, p. 237-260, 1995.

KOHANSKI, M. A. et al. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 6, p. 423-435, 2010.

KOKSAL, E.; GULCIN, I. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) buds. *Protein and Peptide Letters,* v. 15, n. 4, p. 320-326, 2008.

KRÜGER, R. A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa.* Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

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

MALUSZYNSKA, J.; JUCHIMIUK, J. Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Plant Genotoxicity*, v. 56, n. 2, p. 177-184, 2005.

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.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* v. 763, p. 30-35, 2014.

PAULA, C. V. et al. Estudos do potencial fitotóxico de extratos de *Bauhinia ungulata* 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.

RABOUILLE, C. et al. Biogeochemical and contaminant cycling in sediments from a human-impacted coastal lagoon – Introduction and summary. *Estuarine Coastal Shelf Science, v.* 72, p. 387-392, 2006.

RENGEL, Z. et al. Uptake of aluminum by plant cell. *New physiologist*, v. 134, n. 3, p. 389- 406, 1996.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of experimental botany*, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. M. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. *Genética toxicological*, p. 70-84, 2003.

SILVEIRA, G. L. *Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre Allium cepa L. e Lactuca sativa L*. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2016.

SYNGENTA. 2016. *Score 250 EC*. Disponível em: <http://www.syngenta.pt/product/crop-protection/fungicida/score-250-ec>. Acesso em: 10 de jan de 2017.

VIRGENS, A. C. et al. Alterações histológicas em brânquias de *Orechromis niloticus* (Tilapia-do-Nilo) expostas o Acefato, Difenoconazol e Sulfluramida. *Natureza on line*, v. 13, n. 1, p. 26-31, 2015.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após caracterizar o potencial tóxico dos princípios ativos tebuconazol e difenoconazol foi possível detectar interferência do crescimento radicular de *L. sativa.* O princípio ativo tebuconazol causou distúrbios no índice mitótico em relação com o controle negativo. Foi possível observar aumento de células com alterações cromossômicas e nucleares nas maiores concentrações de ambos os princípios ativos, representado pelo aumento significativo de C-metáfase, cromossomo pegajoso e núcleo condensado.

A atividade genotóxica foi detectado pela fragmentação do DNA constatada pelo ensaio cometa e TUNEL, no princípio ativo tebuconazol, e apenas no teste de TUNEL para o princípio ático difenoconazol.

Além disso, foi possível verificar estresse oxidativo nas plântulas de *L. sativa,* pois foi observado uma diminuição da atividade da enzima APX quando exposta ao tebuconazol, e um aumento da enzima SOD em tratamento com o princípio ativo difenoconazol. O acúmulo de EROs produzido pelo metabolismo de defesa da planta observado, provavelmente foi a causa da fragmentação do DNA observada.

Podemos concluir que ambos princípios ativos apresentaram potencial fitotóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico, em todas as concentrações estudadas, mesmo nas concentrações abaixo do recomendado para o uso em campo, devido a essas características são necessários cuidados no manejo dessas substâncias, para que possa evitar acidentes em humanos, assim como no ecossistema do entorno do uso do fungicida.