



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

KALIA DÁVEL GRECCO

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E
FISIOLÓGICOS DOS FUNGICIDAS AZOXISTROBINA E
CARBENDAZIM EM *Lactuca sativa* L. e *Phaseolus vulgaris* L.**

VITÓRIA - ES

2020

KALIA DÁVEL GRECCO

EFEITOS TOXICOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DOS FUNGICIDAS AZOXISTROBINA E CARBENDAZIM EM *Lactuca sativa* L. E *Phaseolus vulgaris* L.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.^a. Dr.^a Silvia Tamie Matsumoto

Coorientador(a): Prof.^a. Dr.^a Diolina Moura Silva

VITÓRIA - ES

2020

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS, BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS
DOS FUNGICIDAS AZOXISTROBINA E CARBENDAZIM EM *Lactuca
sativa* L. E *Phaseolus vulgaris* L.**

KALIA DÁVEL GRECCO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em de de 2020.

Comissão Examinadora:

Prof^a Dr^a Camilla Rozindo Dias Milanez (UFES) por
Dr^a. Silvia Tamie Matsumoto (UFES)
Orientadora

Prof^a Dr^a Camilla Rozindo Dias Milanez (UFES)
Presidente da Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Maria do Carmo Pimentel Batitucci (UFES)
Examinadora Interna

Prof^a Dr^a Milene Miranda Praça Fontes (UFES)
Examinadora Externa

*“A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me conceder força contra os obstáculos e fraquezas, e por me abençoar em todos os passos dessa conquista.

À Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade de realização do curso em Ciências Biológicas, e o Mestrado em Biologia Vegetal.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro fundamental para a realização deste estudo.

À professora Dra. Silvia Tamie Matsumoto, pela orientação e ensinamentos recebidos na trajetória da realização desse trabalho.

À professora Dra. Diolina Moura Silva, pela parceria nas análises de fluorescência da clorofila.

À Professora Dra. Marisa Narciso Fernandes por disponibilizar o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da Universidade Federal de São Carlos/SP, para a realização das análises bioquímicas.

Aos membros examinadores, professora Dra. Maria do Carmo Pimentel Batitucci e Professora Dra. Milene Miranda Praça Fontes por aceitarem o convite em participar da banca, e pelas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Àqueles que são a base da minha conquista: meus pais Marília e Arnildo, e minha irmã Kênia, por todo apoio, ajuda nos momentos difíceis e pelas orações.

Ao meu melhor amigo, companheiro e noivo Jakson por estar sempre ao meu lado me dando força, pela paciência, compreensão, apoio e por me alegrar nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Juliana Trindade, pela ajuda na compreensão dos resultados deste trabalho, por tirar minhas dúvidas sempre com muito carinho.

Aos meus colegas da pós-graduação: Laiza, Juliana, Basílio, Angélica, Rosiane, Nair, Sávio, Romário, pelos momentos que compartilhamos, que certamente não serão esquecidos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Mutagênese *in vitro* e *in vivo*, Monick, Francielen, Kristian, Iasmini, Enzo, Edvar, Lívia, pelos momentos de descontração e pela convivência agradável.

À minha fiel amiga de quatro patas Susi, agradeço. A sua sensibilidade e companheirismo felino foram essenciais durante as incontáveis horas de análises de dados, estudo, escrita e elaboração desta dissertação e pós-graduação.

A todos que contribuíram de algum modo para a realização desse trabalho.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Fórmula química do Carbendazim. 22
- Figura 2: Fórmula química do Azoxistrobina. 24
- Figura 3: Germinação (A) e Crescimento radicular (B) de *L. sativa* exposta à diferentes concentrações do azoxistrobina e carbendazim. CN: controle negativo. CP: controle positivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal Wallis..... 45
- Figura 4: Células meristemáticas representativas das raízes de *L. sativa* tratadas com as diferentes concentrações do azoxistrobina e carbendazim. (A) perda cromossômica, (B) ponte cromossômica, (C) C-metáfase, (D) aderência cromossômica. Barra = 10 μ m 50
- Figura 5: Análise do estresse oxidativo de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim. Onde: A: Catalase; B: Peroxidase do ascorbato; C: Superóxido dismutase; D: Glutathiona reduzida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. CN: controle negativo..... 51
- Figura 6: Índice de clorofila total (Unid. SPAD) de folhas jovens totalmente expandidas de *P. vulgaris* exposta a diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. CN: controle negativo..... 52
- Figura 7: Curvas de indução de fluorescência variável relativa da clorofila a [$V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$] (A e C) e diferença cinética normalizadas ($\Delta V_t = V_t(\text{tratamento}) - V_t(\text{controle negativo})$) (B e D) de folhas de *P. vulgaris* tratadas com azoxistrobina (A e B) e carbendazim (C e D). O tempo está representado em escala logarítmica (ms)... 54
- Figura 8: Mudanças na forma do radar desenhado pelos valores normalizados de parâmetros do teste JIP induzidos pela exposição de *P. vulgaris* a diferentes

concentrações dos fungicidas azoxistrobina (A) e carbendazim (B). CN:
controle negativo 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos.....	19
Tabela 2: Descrição dos fungicidas e de seus princípios ativos.....	37
Tabela 3: Concentração dos fungicidas utilizados	38
Tabela 4: Parâmetros de índice mitótico e divisão celular normal de células meristemáticas radiculares de <i>Lactuca sativa</i> L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.....	47
Tabela 5: Alterações cromossômicas observadas nas células meristemáticas radiculares de <i>Lactuca sativa</i> L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.....	48
Tabela 6: Alterações nucleares observadas nas células meristemáticas radiculares de <i>Lactuca sativa</i> L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.....	49

RESUMO

Os fungicidas são agrotóxicos frequentemente empregados na agricultura, em virtude de sua ação de combate à doenças fúngicas. No entanto, a ampla aplicação de agrotóxicos em todo o mundo aumenta a preocupação ambiental e de saúde pública, já que estes compostos são tóxicos e podem representar riscos para os ecossistemas e a saúde humana. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos fitotóxicos, citogenotóxicos e bioquímicos do azoxistrobina e carbendazim em *Lactuca sativa* L. e os efeitos fisiológicos destes fungicidas em *Phaseolus vulgaris* L. A fitotoxicidade foi avaliada por meio de análises de germinação e crescimento radicular, a citogenotoxicidade por meio de análises do ciclo celular e de alterações cromossômicas e nucleares de *L. sativa*; os efeitos bioquímicos por meio da análise da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD), e da quantificação de glutathiona reduzida (GSH) em *L. sativa*; e os efeitos fisiológicos por meio da análise do teor de clorofila e da fluorescência da clorofila a em *P. vulgaris*. Foram utilizadas seis concentrações de cada fungicida, sendo para o azoxistrobina (0,56; 0,28; 0,14; 0,07; 0,035 e 0,0175 g/L), e para o carbendazim (2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,0625 mL/L). Como controle positivo foi utilizado a trifluralina (0,84 g/L) e como controle negativo, água destilada. As médias foram submetidas à análise de variância e comparadas pelos testes de Tukey e Kruskal Wallis ($p < 0.05$). Concentrações avaliadas do azoxistrobina e carbendazim reduziram o crescimento radicular, alteraram o índice mitótico, aumentaram a frequência de alterações cromossômicas em *L. sativa*, como aderências, perdas e pontes cromossômicas, e aumentaram a atividade das enzimas CAT, SOD e APX, e a GSH, induzindo estresse oxidativo em *L. sativa*. Em relação aos efeitos sobre a fotossíntese, observou-se que o carbendazim diminuiu o teor de clorofila de *P. vulgaris*, ambos fungicidas aumentaram a indução de fluorescência na etapa O-J da curva OJIP, o que evidenciou a ineficiência na capacidade de redução da primeira quinona do lado aceptor de elétrons do FSII (Q_A), sendo que o azoxistrobina também induziu fluorescência na etapa J-I, que está envolvida com a redução dos transportadores de elétrons do inter-sistema, como a quinona secundária (Q_B), pool de plastoquinona (PQ), o citocromo b6f e a

plastocianina. Segundo os resultados do teste JIP, ambos fungicidas afetaram a absorção de energia pelos fotossistemas II de *P. vulgaris*. Diante dos testes realizados observou-se que os fungicidas azoxistrobina e carbendazim foram fitotóxicos e citotóxicos por diminuir o crescimento radicular e o índice mitótico, citogenotóxicos por aumentar a ocorrência de alterações cromossômicas, induziram estresse oxidativo, aumentaram a emissão de fluorescência da clorofila, e alteraram a absorção de energia das plantas utilizadas como sistema-teste.

Palavras-chave: Citotoxicidade • estresse oxidativo • fitotoxicidade • fluorescência da clorofila a • genotoxicidade

ABSTRACT

Fungicides are pesticides frequently used in agriculture, due to their action to combat fungal diseases. However, the widespread application of pesticides worldwide raises environmental and public health concerns, as these compounds are toxic and can pose risks to ecosystems and human health. The present work aimed to evaluate the phytotoxic, cytogenotoxic and biochemical effects of azoxystrobin and carbendazim in *Lactuca sativa* L. and the physiological effects of these fungicides in *Phaseolus vulgaris* L. Phytotoxicity was evaluated by means of germination and root growth analyzes, cytogenotoxicity by means of cell cycle analysis and chromosomal and nuclear changes of *L. sativa*; the biochemical effects by analyzing the activity of the antioxidant enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD), and the quantification of reduced glutathione (GSH) in *L. sativa*; and the physiological effects through the analysis of chlorophyll content and chlorophyll a fluorescence in *P. vulgaris*. Six concentrations of each fungicide were used, being for azoxystrobin (0.56; 0.28; 0.14; 0.07; 0.035 and 0.0175 g / L), and for carbendazim (2.0; 1, 0; 0.5; 0.25; 0.125 and 0.0625 mL / L). As a positive control, trifluralin (0.84 g / L) was used and as a negative control, distilled water. The averages were subjected to analysis of variance and compared using the Tukey and Kruskal Wallis tests ($p < 0.05$). Evaluated concentrations of azoxystrobin and carbendazim reduced root growth, altered the mitotic index, increased the frequency of chromosomal changes in *L. sativa*, such as adhesions, losses and chromosomal bridges, and increased the activity of the enzymes CAT, SOD and APX, and GSH, inducing oxidative stress in *L. sativa*. Regarding the effects on photosynthesis, it was observed that carbendazim decreased the chlorophyll content of *P. vulgaris*, both fungicides increased the fluorescence induction in the O-J stage of the OJIP curve, which evidenced the inefficiency in the reduction capacity of the first quinone of the electron acceptor side of FSII (Q_A), and azoxystrobin also induced fluorescence in step J-I, which is involved with the reduction of electron transporters in the inter-system, such as secondary quinone (Q_B), plastoquinone pool (PQ), cytochrome b6f and plastocyanin. According to the results of the JIP test, both fungicides affected the energy absorption by *P. vulgaris* photosystems

II. In view of the tests carried out, it was observed that the fungicides azoxystrobin and carbendazim were phytotoxic and cytotoxic for decreasing root growth and mitotic index, cytogenotoxic for increasing the occurrence of chromosomal alterations, induced oxidative stress, increased the chlorophyll fluorescence emission, and altered the energy absorption of the plants used as a test system.

Keywords: cytotoxicity • oxidative stress • phytotoxicity • chlorophyll fluorescence a • genotoxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 AGROTÓXICOS	17
2.1.1 <i>Regulamentação de agrotóxicos no Brasil</i>	18
2.1.2 <i>Resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos durante o período de 2013 a 2015</i>	20
2.1.3 <i>Fungicidas</i>	21
2.1.4 <i>Fungicidas Bendimidazóis: Carbendazim e seus efeitos toxicológicos</i>	22
2.1.5 <i>Fungicidas Estrobilurinas: Azoxistrobina e seus efeitos toxicológicos</i>	23
2.2 <i>Bioensaios vegetais</i>	24
2.2.1 <i>Germinação e crescimento radicular</i>	26
2.2.2 <i>Citogenética</i>	26
2.2.3 <i>Estresse oxidativo</i>	30
2.2.4 <i>Índice de clorofila total e fluorescência da clorofila a</i>	33
3. OBJETIVO GERAL	35
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 <i>Material vegetal</i>	36
5.2 <i>Soluções teste</i>	36
5.3 <i>Análise da germinação e do crescimento radicular</i>	38
5.4 <i>Análise citogenética</i>	39
5.5 <i>Análise do estresse oxidativo</i>	39
5.5.1 <i>Obtenção do extrato</i>	40
5.5.2 <i>Concentração de proteína</i>	40
5.5.3 <i>Atividade da enzima catalase</i>	41
5.5.4 <i>Atividade da enzima superóxido dismutase</i>	41
5.5.5 <i>Atividade da enzima peroxidase do ascorbato</i>	42
5.5.6 <i>Quantificação da glutathione reduzida</i>	42
5.6 <i>Análise do índice de clorofila total e da fluorescência da clorofila a</i>	43
5.7 <i>Análise estatística</i>	44
6. RESULTADOS.....	45

6.1 <i>Germinação e crescimento radicular</i>	45
6.2 <i>Análise citogenética</i>	46
6.3 <i>Análise do estresse oxidativo</i>	50
6.4 <i>Análise do índice de clorofila total e da fluorescência da clorofila a</i>	52
7. DISCUSSÃO	57
8. CONCLUSÕES	62
9. REFERÊNCIAS.....	63

1. INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são produtos que possuem substâncias químicas ou biológicas, destinadas ao controle de pragas nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas (ANVISA, 2012), e sua ampla aplicação gera uma preocupação ambiental e de saúde pública, pois são compostos tóxicos para os organismos e contaminam os ecossistemas (MEREL et al., 2018). O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008 (RIGOTTO et al. 2014), sendo que os principais agrotóxicos encontrados no mercado são os fungicidas (SINDIVEG, 2016).

O carbendazim e o azoxistrobina são fungicidas que tem sido utilizados de maneira excessiva devido ao seu amplo espectro, e são potenciais contaminantes da água, solo, alimentos e organismos não-alvo, afetando a saúde animal e humana e gerando grande preocupação em relação aos seus possíveis efeitos sobre os organismos (SINGH et al., 2016; JIANG et al., 2018). Além disso, ambos fungicidas estão entre os 10 mais encontrados em amostras de alimentos disponibilizadas ao consumidor, de acordo com o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (ANVISA, 2016).

Os testes utilizando vegetais permitem avaliar os efeitos de poluentes ambientais, como fungicidas, em diferentes aspectos e níveis de organização, como: fisiologia, bioquímica, célula, DNA, etc, e, por meio da observação de alterações durante a germinação, crescimento radicular e ciclo celular, possibilitam identificar se o composto testado apresenta ação fitotóxica, citotóxica, genotóxica e/ou mutagênica (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA, 2016). Além disso, não necessitam de aprovação em comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) e mostram-se tão eficientes quanto os ensaios realizados em modelos animais (ÇELIK et al., 2007), incluindo células humanas (PALMIERI et al., 2016).

Uma vez que danos ao DNA e estresse oxidativo são as principais consequências observadas após a exposição das células à poluentes ambientais, as avaliações do estresse oxidativo complementam as análises toxicogenéticas (HAGHIGHI et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011;

HONG et al., 2015; ARAGÃO, 2017; DUARTE, 2017). Assim, avalia-se a atividade de enzimas antioxidantes que desencadeiam cascatas de reações enzimáticas a fim de proteger as células do estresse oxidativo, causado por desequilíbrios entre a produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Além das análises toxicogenéticas e bioquímicas, análises fisiológicas complementam o estudo de efeitos de agroquímicos. Entre as diversas medidas experimentais disponíveis para o estudo do comportamento do sistema fotossintético de uma planta, e de suas alterações devido a aplicação de produtos fitossanitários, a avaliação da fluorescência da clorofila *a* e do teor de clorofila se destacam como parâmetros para a compreensão dos efeitos desses produtos sobre a fotossíntese (NELSON; COX, 2005; BAKER, 2008; ALVES et al., 2016).

Considerando o extensivo uso de fungicidas na agricultura e os danos que estes compostos causam sobre os ecossistemas e aos organismos, os estudos dos efeitos de fungicidas são de grande importância, pois permitem entender o mecanismo de ação dos mesmos, sua capacidade de causar danos às células, ao DNA, ao metabolismo e à fisiologia (ARAGÃO, 2017). Sendo assim, a hipótese defendida neste estudo é de que os fungicidas azoxistrobina e carbendazim são capazes de provocar danos fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos, além de alterar o metabolismo antioxidante, o índice de clorofila total e a fluorescência da clorofila *a* de plantas utilizadas como sistema-teste.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta, veneno, são algumas das inúmeras denominações relacionadas a um grupo de substâncias químicas utilizadas no controle de pragas (animais e vegetais) e doenças de plantas. São utilizados nas florestas nativas e plantadas, nos ambientes hídricos, urbanos e industriais e, em larga escala, na agricultura e nas pastagens para a pecuária (PERES et al., 2003). A Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989, que trata sobre esse grupo de substâncias/agentes no país, em seu Artigo 2, Inciso I, considera agrotóxicos e afins:

os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Estes produtos possuem diversas formulações e podem ser classificados, de acordo com o organismo alvo, em fungicidas, herbicidas, inseticidas, microbiocidas, acaricidas, nematocidas, raticidas, desfoliantes, molusquicidas e fumigantes, e ainda quanto à finalidade, ao modo de ação, à origem e à toxicidade (KRÜGER, 2009). Essas formulações são compostas por princípios ativos, que representam as substâncias responsáveis pela atividade biológica. Um mesmo princípio ativo pode ser comercializado sob diversas formulações e diferentes nomes comerciais, e alguns produtos podem conter mais de um princípio ativo (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo desde 2008, seguido pelos Estados Unidos (RIGOTTO et al., 2014), sendo que entre 2007 e 2013 o uso de agrotóxicos dobrou. As culturas de soja, milho, cana-de-açúcar e algodão concentram 85% do total de agrotóxicos utilizados no País. Esse cenário tem causado grande preocupação em relação à contaminação dos alimentos, poluição ambiental e redução da biodiversidade. Os impactos na saúde pública são amplos, atingindo trabalhadores em diversos ramos e atividades, moradores do entorno de fábricas e fazendas, além dos consumidores dos alimentos contaminados (AUGUSTO et al., 2015; ATLAS DO AGRONEGÓCIO, 2018).

Os efeitos causados pela intoxicação com agrotóxicos podem ser agudas ou crônicas, sendo que as intoxicações agudas afetam principalmente as pessoas expostas em seu ambiente de trabalho e são caracterizadas por efeitos como irritação da pele e dos olhos, coceira, vômitos, diarreias, dificuldades respiratórias, convulsões e morte. Já as intoxicações crônicas podem aparecer muito tempo após a exposição e afetar toda a população, pois são decorrentes da presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos e no ambiente, geralmente em doses baixas. Os efeitos associados à exposição crônica incluem: infertilidade, impotência, abortos, malformações, neurotoxicidade, desregulação hormonal, efeitos sobre o sistema imunológico e câncer (INCA, 2015; ATLAS DO AGRONEGÓCIO, 2018).

2.1.1 Regulamentação de agrotóxicos no Brasil

No Brasil, o processo de regulamentação dos agrotóxicos é estabelecido pela Lei Federal no 7.802, de 11 de julho de 1989 – Lei dos Agrotóxicos – que estabelece que os mesmos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores de saúde, do meio ambiente e agricultura (ANVISA, 2016).

Portanto, segundo a atual legislação, compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realizar a avaliação da eficácia agrônômica, ao

Ministério da Saúde executar a avaliação e classificação toxicológica e ao Ministério do Meio Ambiente, por meio do Ibama, avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental. Os órgãos governamentais envolvidos no processo de registro dos agrotóxicos também tem a incumbência de estabelecer as restrições e recomendações de uso necessárias para uma maior segurança na utilização dos agrotóxicos. Os órgãos estaduais e do Distrito Federal, dentro de sua área de competência, devem realizar o controle e a fiscalização da comercialização e uso desses produtos na sua jurisdição (PERES et al., 2003; ANVISA, 2018).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos é realizada em função da toxicidade aguda e deve ser determinada e identificada com os respectivos nomes das categorias e cores nas faixas do rótulo do produtos (Tabela 1). Essa classificação corresponde ao resultado de testes ou estudos realizados em laboratórios, que estabelecem a dosagem letal (DL) do agrotóxico em 50% dos animais expostos na concentração testada (ANVISA, 2018).

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL₅₀	Faixa colorida
I	Produto extremamente tóxico	≤ 5 mg/kg	Vermelha
II	Produto altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/kg	Amarela
III	Produto moderadamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/kg	Azul
IV	Produto pouco tóxico	Entre 500 e 5000mg/kg	Verde

Fonte: Adaptado de Anvisa (2018).

A avaliação do potencial de periculosidade ambiental é baseada no estudo das características intrínsecas de cada produto bem como no seu comportamento e destino ambiental, além dos efeitos sobre organismos não-alvo, e resulta na classificação destes produtos em uma das seguintes quatro classes: Classe I – produto altamente perigoso ao meio ambiente; Classe II - produto muito perigoso ao meio ambiente; Classe III - produto perigoso ao meio ambiente; e

Classe IV - produto pouco perigoso ao meio ambiente (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2019).

O registro dos agrotóxicos nas instituições governamentais competentes (Ministérios da Agricultura, Meio Ambiente e Saúde) constitui-se no instrumento básico do processo de controle governamental sobre essas substâncias/produtos, visando à importação, exportação, produção, transporte, armazenamento, comercialização e uso. Trata-se de uma etapa obrigatória em vários países com a finalidade de maximizar os benefícios para o usuário e minimizar os riscos à saúde humana e ambiental. Além disso, a expectativa da sociedade é de que a aprovação do registro de um agrotóxico signifique o reconhecimento e a garantia de que o produto, quando utilizado da maneira recomendada, esteja dentro dos limites de segurança aceitos para a saúde e o ambiente (PERES et al., 2003).

2.1.2 Resultados do Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos durante o período de 2013 a 2015

O Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) foi criado em 2000 e instituído em 2003, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, conforme Resolução RDC nº 119, de 19 de maio de 2003. Tem como objetivo contribuir para a segurança alimentar, com finalidade de prevenir intoxicações alimentares agudas ou crônicas resultantes da ingestão de alimentos com resíduo de agrotóxicos. Nele, são analisadas amostras de alimentos coletadas pelos órgãos estaduais e municipais de vigilância sanitária e laboratórios estaduais de saúde pública (ANVISA, 2016).

No relatório das análises monitoradas no período de 2013 a 2015, foram analisadas 12.051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal representativos da dieta da população brasileira, como alface, arroz, banana, batata, cenoura, feijão, maçã, mamão, mandioca (farinha), milho (fubá), tomate, trigo (farinha), dentre outros. Do total das amostras monitoradas, 19,7% foram consideradas insatisfatórias, por apresentarem resíduos de produtos não autorizados, ou autorizados, mas em concentrações acima do permitido (ANVISA, 2016).

Ao todo, foram pesquisados 232 agrotóxicos diferentes. Destes, foram detectados resíduos de 134 agrotóxicos nas 12.051 amostras analisadas. Dentre os agrotóxicos detectados, o relatório mostrou um expressivo número de detecções do Carbendazim e do Azoxistrobina, que ficaram entre os 10 agrotóxicos mais encontrados nas amostras alimentares.

2.1.3 Fungicidas

Os fungicidas são os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, ocupando aproximadamente 33% do mercado. Além disso, foi a classe de agrotóxicos que apresentou maior aumento percentual nas importações (59,72%) em 2016, atingindo 94.126 toneladas. A liderança de uso e comercialização dos fungicidas perante outras classes de agroquímicos se deve ao fato da complexidade agrícola em um clima tropical que favorece a aparição de doenças fúngicas nas lavouras brasileiras (SINDIVEG, 2016).

Os fungicidas podem ser classificados quanto ao modo de ação em sistêmicos ou de contato, sendo que os sistêmicos são aqueles que circulam por meio da seiva da planta por todos os tecidos vegetais, de forma a ampliar o seu tempo de ação, e são amplamente utilizados na agricultura, principalmente no tratamento pré e pós-colheita. Devido a isso, são muito detectados durante os programas de monitoramento para avaliar a exposição destes fungicidas nos alimentos (KUSSUMI, 2007). Os fungicidas de contato são aqueles que agem externamente no vegetal, tendo necessariamente que entrar em contato com o alvo biológico, podendo adentrar no interior da planta por meio de suas porosidades. Os fungicidas também são classificados de acordo com o grupo químico, em benzimidazóis, estrobilurinas, triazóis, ditiocarbamatos e dicarboximidas (ZAMBOLIM; JESUS, 2008).

2.1.4 Fungicidas Benzimidazóis: Carbendazim e seus efeitos toxicológicos

Os fungicidas do grupo dos benzimidazóis possuem ação sistêmica, sendo introduzidos no mercado para o controle de doenças de plantas entre as décadas de 1960 e 1970, como tratamento foliar, em pós-colheita e sementes. No Brasil, os benzimidazóis são aplicados em culturas de algodão (sementes), citros (folhas), feijão (sementes e folhas), soja (sementes e folhas), trigo (folhas) e numa grande variedade de frutas e vegetais. Os principais compostos da família dos benzimidazóis são: benomil, carbendazim, tiabendazol e tiofanato metílico (GHINI; KIMATI, 2002).

O carbendazim (Methyl benzimidazol-2-ylcarbamate) (Figura 1) constitui o princípio ativo mais utilizado do grupo dos fungicidas benzimidazóis (BOUDINA et al., 2003) contra grande variedade de doenças, como as causadas pelos fungos *Ascomycetos* spp., *Basidiomycetos* e *Deuteromycetos* spp. em culturas de frutas e vegetais (HUTSON; JEWESS, 1999).

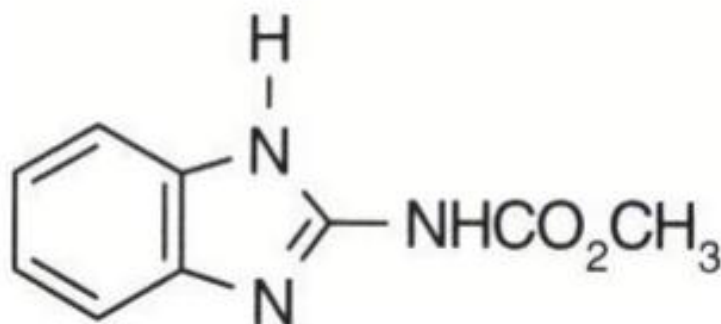


Figura 1 – Fórmula química do Carbendazim. Fonte: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/c24.pdf/a019eb91-b52d-492d-8140-ae82f54d5698>>. Acesso em 04 de junho de 2019.

O carbendazim atua nos fungos por meio da inibição de proteínas específicas, chamadas de α e β tubulinas, que mediante polimerização constituem os microtúbulos. Assim, quando o carbendazim se liga à β tubulina livre no citoplasma, ele inibe a formação dos dímeros de α e β tubulinas, impedindo, desta forma, a formação das fibras dos microtúbulos e a movimentação dos

cromossomos para a divisão mitótica do fungo, levando o mesmo à morte (COUTINHO et al., 2006).

O uso excessivo do carbendazim tem levantado preocupação crescente de poluição ambiental e saúde pública, pois ele pode contaminar o solo, animais aquáticos, e organismos não-alvo, afetando a saúde humana e animal (SINGH et al., 2016). Devido a isso, a comercialização e utilização do carbendazim já foram proibidos na Austrália, na maior parte da União Europeia e nos Estados Unidos (SINGH et al., 2016), no entanto, este fungicida é legalmente comercializado no Brasil e representa a 8ª substância química mais vendida no país (IBAMA, 2016).

O carbendazim é classificado na categoria perigosa de produtos químicos pela Organização Mundial da Saúde, sendo que estão sendo relatados diversos estudos sobre sua toxicidade (RAMA et al., 2014; BANYIOVA et al., 2016; SINGH et al. 2016; MEREL et al., 2018). Além disso, como relatado anteriormente, o carbendazim foi o agrotóxico mais encontrado em amostras de alimentos disponibilizadas ao consumidor entre os anos de 2013 e 2015, de acordo com o relatório do PARA (ANVISA, 2016).

2.1.5 Fungicidas Estrobilurinas: Azoxistrobina e seus efeitos toxicológicos

O azoxistrobina (Methyl (E)-2-{2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl}-3-methoxyacrylate) (Figura 2) é um fungicida sistêmico, utilizado em pulverizações preferencialmente preventivas, para o controle das doenças de parte aérea das culturas do algodão, arroz, aveia, banana, feijão, cevada, soja, trigo, etc. O azoxistrobina foi a primeira patente das estrobilurinas, e, por ser empregado em uma ampla gama de culturas, é utilizado em todo o mundo, desde o primeiro mercado em 1996 (RODRIGUES et al., 2013; SYNGENTA, 2018).

Como a maioria das estrobilurinas, o mecanismo de ação do azoxistrobina ocorre por meio da inibição da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e o citocromo c₁, no sítio de

oxidação do ubiquinol (Q_o) do complexo III, interferindo na produção de adenosina trifosfato, energia vital para as células (RODRIGUES, 2009).

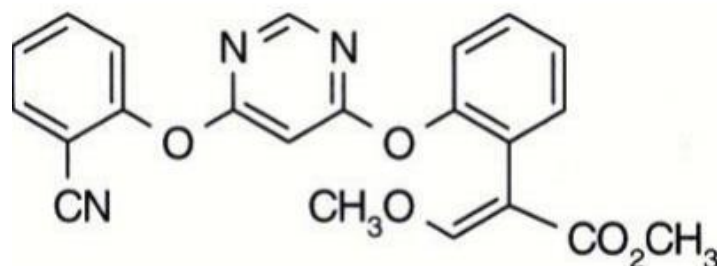


Figura 2 – Fórmula química do Azoxistrobina. Fonte: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A26%2B%2BAzoxistrobina.pdf/6b3c8202-7ef3-47be-8a04-5f60e380bbd1>. Acesso em 04 de junho de 2019.

O azoxistrobina é altamente solúvel em água, degrada lentamente no solo e na água (RODRIGUES et al., 2013), e é considerado altamente tóxico para os organismos aquáticos (SYNGENTA, 2018). Sua extensa aplicação tem gerado grande preocupação em relação à poluição ambiental e aos seus efeitos adversos sobre os organismos não-alvo (JIANG et al., 2018).

Diversos trabalhos utilizando bioensaios estão sendo realizados a fim de avaliar a toxicidade deste fungicida (GARANZINI et al., 2015; CAO et al., 2016; JIANG et al., 2018). Além disso, como relatado anteriormente, o azoxistrobina foi o 9º agrotóxico mais encontrado em amostras de alimentos, dos 232 agrotóxicos pesquisados, de acordo com o relatório do PARA (ANVISA, 2016).

2.2 Bioensaios vegetais

Os testes com bioensaios vegetais permitem avaliar o potencial tóxico de poluentes ambientais, como fungicidas, em diferentes aspectos e níveis de organização, como: fisiologia, bioquímica, célula, DNA, etc (SILVEIRA, 2016). Além disso, os testes com bioensaios vegetais não necessitam de aprovação em comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) e mostram-se tão eficientes quanto os ensaios realizados em modelos animais (ÇELIK et al., 2007; SANTIAGO, 2015), incluindo células humanas (PALMIERI et al., 2016).

A *Lactuca sativa* L. é uma eudicotiledônea que pertence à família Asteraceae, com número cromossômico ($2n=2x=18$) e tamanho variando de 2,8 a 5,5 μ m (MATOBA et al., 2007), sendo facilmente visualizados ao microscópio de luz. Sua aplicação destaca-se por possuir sementes pequenas, o que contribui para uma maior área de superfície de contato com a substância avaliada; apresentar alta sensibilidade aos compostos mutagênicos e genotóxicos; rápida germinação e crescimento; baixo custo; além de permitir a análise de fitotoxicidade e a determinação da frequência de células em divisão e aberrações no ciclo celular (CAMPOS et al., 2008; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Além disso, as agências de proteção ambiental e padronizações de bioensaios recomendam espécimes de *L. sativa* para a determinação dos efeitos de substâncias tóxicas (OECD, 2006; US EPA, 2012).

A espécie *L. sativa* é comumente utilizada como modelo para avaliar a genotoxicidade de compostos químicos por meio da avaliação do ciclo celular e suas possíveis alterações (SOUSA et al., 2009; SILVEIRA, 2016; ARAGÃO et al., 2017). Trabalhos envolvendo estudos sobre resíduos industriais ou químicos potencialmente tóxicos, agrotóxicos, água de rios contaminados, relataram a sensibilidade do modelo *L. sativa* na detecção dos mecanismos de ação dos mesmos (CAMPOS et al., 2008; HAGHIGHI et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; PALMIERI et al., 2014; SILVEIRA, 2016; ARAGÃO, 2017; DUARTE, 2017).

A espécie *Phaseolus vulgaris* L. é uma planta cultivada utilizada em avaliações de efeitos fisiológicos de diferentes agrotóxicos, como fungicidas, herbicidas, acaricidas, inseticidas, dentre outros (COSTA, 2001; VEIGA, 2009; FERNANDES et al., 2011; CIESLIK, 2012; PRIOR et al., 2017). Segundo Veiga (2009), observa-se que há relatos de efeitos significativos de tratamentos com fungicidas na fisiologia fotossintética de plantas cultivadas, como *P. vulgaris*, porém, outros apontam neutralidade sobre os parâmetros avaliados. Dessa maneira, o autor aponta a importância da realização de estudos de efeitos fisiológicos sobre a fotossíntese dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim, em *P. vulgaris*.

2.2.1 Germinação e crescimento radicular

Nos primeiros dias da germinação, o embrião pode ter sua fisiologia e morfologia alterada por fatores ambientais, substâncias tóxicas, dormência, hormônios inibidores, etc, o que pode influenciar no desenvolvimento e crescimento normal da planta. A avaliação da toxicidade em sementes de plantas superiores permite o estudo do efeito fitotóxico dos processos de germinação, e também do desenvolvimento da raiz, sendo que estes testes estão entre os mais utilizados para avaliar o potencial toxicológico de substâncias (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; BERNARDES, 2014; GALTER, 2016; ARAGÃO et al., 2017; DUARTE, 2017).

Os testes de germinação e crescimento radicular permitem avaliar a toxicidade tanto de resíduos orgânicos (YOUNG et al., 2012) como também de resíduos inorgânicos (ANDRADE et al., 2010). Inclusive, o modelo vegetal *L. sativa* se destaca nesse tipo de análise, demonstrando alta sensibilidade aos compostos testados, além de permitir a análise de fitotoxicidade em amostras com metais pesados (PEREIRA et al., 2013; MORAES et al., 2015), agrotóxicos (BERNARDES et al., 2015; ARAGÃO, 2017) e até mesmo produtos do metabolismo secundário de plantas (ARAGÃO et al., 2015).

2.2.2 Citogenética

Os estudos citogenéticos de avaliação de efeitos tóxicos são empregados para análise de diversos compostos a partir de estudos do ciclo celular e índice mitótico de células meristemáticas radiculares de bioensaios vegetais (GALTER, 2016; ARAGÃO, 2017; DUARTE, 2017; VERMA et al., 2018). A raiz é a primeira parte de um vegetal a ser exposta aos agentes químicos dispersos no ambiente, o que faz com que sua utilização em estudos de toxicidade seja relevante (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). A região meristemática da raiz, por ser composta por células em intensa divisão celular, possibilita as avaliações do índice mitótico e da frequência de alterações no ciclo celular quando as raízes são submetidas a compostos químicos (GUERRA, 1998).

O estudo do ciclo celular, que compreende a intérfase (G1, S e G2) e a mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase), permite o conhecimento sobre a estrutura e organização dos cromossomos e como eles se comportam durante a divisão celular. Além disso, em análises de efeitos tóxicos, o estudo do ciclo celular permite a detecção de anormalidades, como as alterações cromossômicas e nucleares que, geralmente, são consequência do efeito de agentes tóxicos (GRANT, 1994; SILVEIRA, 2016).

O índice mitótico refere-se ao número total de células em divisão durante o ciclo celular, e qualquer alteração nesse índice, aumento ou redução, auxilia na determinação do grau de citotoxicidade de um agente ou composto (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O aumento do índice mitótico pode estar relacionado à distúrbios causados no crescimento e desenvolvimento do organismo exposto à um contaminante, enquanto o acréscimo representa a origem de um possível tumor (CAMPOS et al., 2008). Alterações como estas são utilizadas para prospectar o potencial tóxico de diferentes compostos químicos (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008).

Os agentes genotóxicos são aqueles que causam danos ao DNA, que podem ser reparados pelos mecanismos de reparo da célula, ou serem fixados levando ao comprometimento celular, e a um dano mutagênico, os quais podem ser expressos como alterações cromossômicas e nucleares observadas no ciclo celular. Estas alterações podem ter como consequência, dentre outras, a formação de células poliploides e a eliminação do material genético, resultando na formação de anomalias nucleares (ANDRADE-VIEIRA, 2012).

Vários compostos químicos são mutagênicos e produzem modificações no material genético, como alterações no número e estrutura do cromossomo, e nas estruturas individuais do gene (CAMPOS et al., 2008). Segundo Leme e Marin-Morales (2009), vários *endpoints* podem ser monitorados na divisão de células meristemáticas, como alterações cromossômicas e formação de micronúcleos.

As alterações cromossômicas são definidas como quaisquer anormalidades na estrutura ou no número dos cromossomos e originadas por quebras, inativação

de estruturas, inibição da síntese ou replicação alterada do DNA de modo espontâneo ou induzida por exposição a agentes químicos. Várias dessas alterações são altamente prejudiciais à célula, muitas vezes irreversíveis fazendo com que a célula entre em processo de morte celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009; PALMIERI et al., 2014).

A avaliação de alterações no ciclo celular pode indicar o mecanismo de ação da substância testada, que pode ser clastogênico, quando a quebra do cromossomo resulta em danos como pontes e fragmentos cromossômicos, ou de efeito aneugênico, caracterizado pela segregação anormal dos cromossomos que resultam em danos como perdas cromossômicas, aderências cromossômicas, c-metáfases, multipolaridade e atraso (LEME; MARIN-MORALES, 2009; FREITAS et al., 2016).

O fuso mitótico é formado pelos microtúbulos que executam funções celulares importantes durante o ciclo celular. Alterações na dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos, bem como a não ligação destes aos cromossomos por problemas na região centromérica, afetam a segregação dos cromossomos para as células filhas e tem como consequência, a formação de células poliploides; a interrupção no ciclo celular em metafase, originando as c-metáfases; e anáfase multipolar ou segregação anormal/tardia dos cromossomos/cromátides em anáfase/telófase (FREITAS et al., 2016).

Quando há interferências na polimerização e despolimerização dos microtúbulos, pode ocorrer a paralisação do ciclo celular em metafase e os cromossomos são vistos bem condensados, com o centrômero bem definido e espalhados no interior da célula (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Em laboratório, esta situação é provocada com substâncias denominadas de bloqueadoras de ciclo celular, como é o caso da Colchicina, que é a responsável pelo nome desta alteração (c-metáfase). Estes cromossomos extremamente condensados e separados são utilizados para estudos do cariótipo das espécies, pois permitem observar a morfologia de cada cromossomo, individualmente (GUERRA, 1988; FREITAS et al., 2016). As C-metáfases são consideradas alterações reversíveis, porém caso seus reparos não ocorram, pode haver a formação de células poliploides (ODEGAH et al., 1997).

As células poliploides são descritas como uma consequência da ausência do fuso mitótico sob efeito prolongado, e, na impossibilidade de segregação dos cromossomos, por estes não estarem ligados ao fuso, a célula retorna para a intérfase permanecendo com número de cromossomos duplicado. Sendo assim, as células poliploides são caracterizadas pela presença de número cromossômico superior a $2x$, no caso do presente trabalho, maior que 18 cromossomos, pois o número diploide de cromossomos em células de *L. sativa* é $2n = 2x = 18$ cromossomos (COSTA et al., 2017).

A aderência cromossômica é resultante do efeito de substâncias tóxicas sobre a estrutura da cromatina que podem causar a contração e a condensação cromossômica ou a despolimerização do DNA e dissolução parcial de nucleoproteínas, e com isso contribuir para a ocorrência do emaranhamento de fibras de cromatina entre cromossomos não relacionados (SALAM et al., 1993; TÜRKOĞLU, 2012). Esta alteração é considerada um indício de alta toxicidade, estando intimamente relacionada à frequência expressiva de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011). Fernandes et al. (2008) classifica a aderência cromossômica como uma alteração aneugênica, por considerar que é um tipo de anormalidade que envolve a matriz proteica da cromatina e não o DNA propriamente dito.

As anormalidades nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, como resultado da ação do agente testado. Geralmente, essas alterações são observadas como núcleos lobulados, núcleos portadores de brotações nucleares, células polinucleares, micronúcleos, entre outros. Destas alterações nucleares citadas, o micronúcleo é utilizado como mais eficaz para analisar o efeito mutagênico promovido por produtos químicos. Isso se deve ao fato de o micronúcleo resultar de danos não reparados erroneamente nas células parentais, sendo observado com facilidade nas células filhas como estrutura semelhante ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA, 2016).

Assim, os micronúcleos surgem do desenvolvimento de algumas alterações celulares, por exemplo, quebras e perdas cromossômicas. Além disso, o

micronúcleo ainda pode derivar de outros processos como poliploidização, nos quais eles se originam da eliminação do DNA excedente do núcleo principal na tentativa de restaurar as condições normais de ploidia (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA, 2016; SILVEIRA et al., 2017).

A avaliação das alterações nucleares, juntamente com as alterações cromossômicas, constitui uma análise eficaz em toxicologia, por tornar a investigação das ações dos agentes testados ainda mais precisa em relação aos seus efeitos no DNA e nas células dos organismos expostos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

2.2.3 Estresse oxidativo

Uma vez que danos ao DNA e estresse oxidativo são as principais consequências observadas após a exposição das células à poluentes ambientais, as avaliações do estresse oxidativo complementam as análises toxicogenéticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011), como demonstrado em diversos estudos, utilizando *L. sativa* como bioensaio (HAGHIGHI et al., 2010; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; HONG et al., 2015; ARAGÃO, 2017; DUARTE, 2017). Assim, avalia-se a atividade de enzimas antioxidantes que desencadeiam cascatas de reações enzimáticas a fim de proteger as células do estresse oxidativo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são formas reduzidas de oxigênio, energeticamente mais reativas que o oxigênio molecular, e compreendem o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH^-) e oxigênio singleto (1O_2). As EROs são produzidas normalmente pelo metabolismo celular, como subprodutos dos processos metabólicos normais, como a respiração e a fotossíntese, em cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Elas também podem ser produzidas sobre a membrana plasmática. As EROs atuam como sinais que ativam rotas de expressão gênica geneticamente programadas que conduzem a eventos regulados de morte

celular. Além disso, são consideradas compostos químicos tóxicos que causam dano oxidativo ao DNA, proteínas e lipídeos de membrana (TAIZ et al., 2017).

O nível de estado estacionário de EROs na célula é governado pelo balanço entre reações de geração e reações de inativação de EROs. Nesse aspecto, o estresse oxidativo corresponde ao estado em que há maior produção de EROs, ou seja, momentos em que ocorre desequilíbrio entre a produção de EROs e a sua remoção através de um sistema antioxidante complexo que as plantas possuem. Muitos tipos de estresses bióticos e abióticos desencadeiam o acúmulo de EROs nas células, como radiação UV, luminosidade intensa, condições de seca e salinidade, bem como contaminantes como agrotóxicos e metais (SCANDALIOS et al., 2000; TAIZ, et al., 2017). Os eventos de estresse oxidativo provocam danos no DNA, RNA, lipídeos e proteínas (HALLIWELL, 2006), além de causar mau funcionamento nos mecanismos de reparo de DNA, desencadeando diversos problemas às células, como divisão descontrolada e morte celular (SOSA et al., 2013).

Para eliminar as EROs e evitar danos celulares, os organismos aeróbicos possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de defesa. Os mecanismos não enzimáticos, ou antioxidantes biológicos, são compostos orgânicos pequenos ou peptídeos que podem aceitar elétrons das EROs e neutralizá-los. Os antioxidantes comuns em plantas abrangem o ascorbato hidrossolúvel (vitamina C), o tripeptídeo glutathiona reduzida (GSH na forma reduzida, GSSG na forma oxidada), o α -tocoferol (vitamina E) e o β -caroteno (vitamina A) lipossolúveis. As defesas enzimáticas incluem a ação das enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, entre outras (TAIZ et al., 2017).

As superóxido dismutases (SOD) são as enzimas que atuam como a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das EROs (GILL; TUTEJA, 2010), e podem ser encontradas em cloroplastos, peroxissomos, mitocôndrias, citosol e apoplasto. A enzima SOD simultaneamente oxida e reduz o O_2^- para produzir H_2O_2 e O_2 , de acordo com a reação: $O_2^- + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$. O O_2 e o H_2O_2 são então eliminados pela ação de peroxidases (TAIZ, et al., 2017). A redução na atividade da SOD ocorre de acordo com o aumento

da acumulação de O_2^- , sendo este radical um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídeos e o conseqüente aumento na permeabilidade de membranas (APEL; HIRT, 2004).

A catalase (CAT) é uma enzima tetramétrica que contém um grupo heme, e é encontrada em todos os organismos aeróbicos, sendo uma das mais ativas enzimas catalíticas produzidas na natureza. As CATs estão presentes em mitocôndrias, cloroplastos, e, principalmente nos peroxissomos. Elas catalisam a decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , nos peroxissomos, de acordo com a reação: $2 H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$. São as únicas enzimas que degradam o H_2O_2 sem a utilização de redutores celulares e sua atividade é incrementada linearmente à concentração de substrato (SCANDALIOS, 2005; TAIZ et al., 2017).

A peroxidase do ascorbato (APX) é classificada como peroxidase classe I e pode ser encontrada tanto nos cloroplastos quanto no citosol. Como os cloroplastos, mais especificamente os centros de reação dos fotossistemas I e II, são os maiores centros de geração de EROs, a APX exerce um papel importante na eliminação do H_2O_2 nestes locais. Ela apresenta uma maior afinidade ao H_2O_2 em relação à CAT, mas requer um substrato, o ascorbato (ASADA, 2006). Sendo assim, a APX catalisa a redução do H_2O_2 , utilizando o ascorbato como agente redutor na seguinte reação: $2 L\text{-ascorbato} + H_2O_2 + 2 H^+ \rightarrow 2 \text{monodesidroascorbato} + 2 H_2O$ (TAIZ et al., 2017).

A glutatona reduzida (GSH) está presente em todos os organismos aeróbicos e possui um papel essencial na biotransformação e eliminação de compostos químicos e na defesa de células contra o estresse oxidativo. A GSH possui um agrupamento sulfidril (SH) em sua composição, e isso permite que ela seja um excelente redutor de EROs (HUBER et al., 2008). As GSHs, por meio da ação da enzima glutatona S-transferase, podem ser conjugadas a xenobióticos, que geralmente são citotóxicos, produzindo-se conjugados solúveis em água, o que reduz sua toxicidade (KREUZ et al., 1996).

As glutatona S-transferases também promovem a conjugação de GSH com produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila

citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação (DUDLER et al., 1991; BARTLING et al., 1993). A GSH também é utilizada como agente redutor pela enzima glutathione peroxidase, que catalisa a destoxificação do peróxido de hidrogênio, conforme a reação: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{GSH} \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$ (TAIZ et al., 2017).

2.2.4 Índice de clorofila total e fluorescência da clorofila a

Em organismos que realizam a fotossíntese, a energia luminosa é absorvida pelos complexos coletores de luz, comumente conhecidos como antenas, que formam uma complexa rede de pigmentos incorporados a proteínas (fotossistemas). Dentro do fotossistema II (FSII) a energia de excitação do complexo antena é eficientemente transferida de um centro de reação ativo onde tem início a fase fotoquímica da fotossíntese, levando a hidrólise da água, e redução de plastoquinonas (PQ-pool) (STIRBET et al., 2014).

Como qualquer outro processo de troca de energia, a conversão de energia luminosa em energia química no processo fotossintético não é perfeita, nem todos os elétrons que estão em um nível energético elevado (molécula de clorofila excitada) são passados para os aceptores. Parte desses elétrons retornam ao estado inicial de excitação sem a produção de ATP e NADPH, e a energia pode ser dissipada sob a forma de calor ou emissão de um fóton de energia luminosa, fenômeno conhecido por fluorescência (STIRBET et al., 2014).

Todos os componentes da cadeia de elétrons fotossintéticos, particularmente os FSII, são muito sensíveis aos estresses bióticos e abióticos, e sofrem contínuas mudanças estruturais e conformacionais, para manter sua função em patamares ótimos em um ambiente em constante alteração (YUSUF et al., 2010; ZHANG et al., 2010). É reconhecido que muitos produtos fitossanitários, como os agrotóxicos, podem interferir na dinâmica dos fotossistemas, que podem se associar a grupos químicos, metais tóxicos e outras substâncias que afetam sua atividade e o rendimento da fotossíntese (GIARDI et al., 2001; FRANKART et al., 2003; GEOFFROY et al., 2004; KANUNGO; JOSHI, 2014).

Entre as diversas medidas experimentais disponíveis para o estudo do comportamento do sistema fotossintético de uma planta, e de suas alterações devido a aplicação de produtos fitossanitários, a avaliação da fluorescência da clorofila *a* e do índice total de clorofila se destacam como parâmetros para a compreensão dos efeitos desses produtos sobre a fotossíntese (NELSON; COX, 2005; BAKER, 2008; ALVES et al., 2016).

Várias pesquisas demonstraram a capacidade da avaliação da fluorescência da clorofila *a* para detectar alterações na etapa fotoquímica, como por exemplo mutações e status nutricional (KALAJI et al., 2017a), estresse luminoso (KALAJI et al., 2012), influências químicas (XIANG et al., 2013), toxicidade (KALAJI et al., 2017b) ou metal pesado (LI; ZHANG, 2015).

O aumento típico da curva de fluorescência transiente da clorofila *a* mostra uma sequência de fases a partir de um ponto inicial (Fluorescência Inicial = F_0) até o ponto máximo (Fluorescência Máxima = F_M). Esta curva de indução de fluorescência de clorofila *a* é, portanto, polifásica e fornece informações consideráveis sobre a estrutura e função do aparelho fotossintético (SCHREIBER et al., 1994). As fases O-J-I-P são conhecidas como Passo O [ocorre aos 20 ms e é considerado o momento quando todos os Centros de Reação (CR) estão oxidados (abertos)], Passo J (ocorre em cerca de 2 ms), Passo I (ocorre aproximadamente ao 30 ms) e Passo P [igual a F_M , é considerado o momento quando todos os CR estão reduzidos (fechados) e ocorre a aproximadamente 300 ms] (STRASSER E STRASSER, 1995).

A fase OI da fluorescência está relacionada com a redução da primeira quinona do lado aceptor de elétrons do FSII (QA). A fase JI está envolvida com a redução dos transportadores de elétrons do inter-sistema, como a quinona secundária (QB), pool de plastoquinona (PQ), o citocromo *b6f* e a plastocianina, enquanto que a fase IP reflete a redução dos receptores finais de elétrons no lado aceptor do FSI, ou seja, ferredoxina, outros intermediários e $NADP^+$ (YUSUF et al., 2010).

Para investigar as correlações entre as reações fotoquímicas da fotossíntese e a fluorescência da clorofila *a* foi criado um procedimento a partir do aumento polifásico da curva OJIP denominado Teste JIP. Este teste baseia-se na teoria

do fluxo de energia através das membranas dos tilacóides do cloroplasto, permitindo a análise quantitativa da estrutura e conformação do aparato fotossintético, ou seja, ele fornece equações algébricas simples que representam o equilíbrio entre o influxo de energia total e o fluxo de energia de cada um dos complexos coletores de luz examinados, fornecendo informações sobre a provável distribuição de energia absorvida (STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos toxicogenéticos, bioquímicos e fisiológicos dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim, por meio de análises utilizando *Lactuca sativa* L. e *Phaseolus vulgaris* L.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar o potencial fitotóxico e citotóxico dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim por meio da avaliação da germinação, crescimento radicular e ciclo celular em *L. sativa*.
- b. Determinar o potencial citogenotóxico dos fungicidas por meio da identificação dos diferentes tipos de alterações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *L. sativa* expostas aos fungicidas.
- c. Avaliar o nível de estresse oxidativo causado às células radiculares de *L. sativa* expostas aos fungicidas.
- d. Analisar os efeitos do azoxistrobina e carbendazim no índice total de clorofila e na fluorescência da clorofila *a* de *P. vulgaris*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

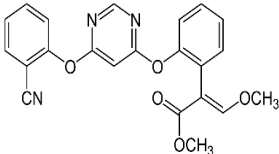
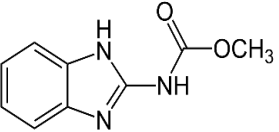
5.1 *Material vegetal*

Para realizar as análises fitotóxicas, toxicogenéticas e bioquímicas dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim, sementes de *Lactuca sativa* L. da variedade Crespa repolhuda, da marca Topseed e do lote 054916, foram utilizadas como sistema-teste nos bioensaios realizados. Para as análises do teor relativo de clorofila e da fluorescência da clorofila *a*, foram utilizadas sementes de *Phaseolus vulgaris* L. da variedade Pérola, da marca Di Solo, e do lote 2301.

5.2 *Soluções teste*

A descrição dos fungicidas carbendazim e azoxistrobina, e de seus princípios ativos, está na tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos fungicidas e de seus princípios ativos.

Nome comercial/ Fabricante/ Classe	Grupo químico	Princípio ativo	Nome químico	Classificação toxicológica	Classificação do potencial de periculosidade ambiental	Estrutura química	Referências
Amistar WG/ Syngenta/ Fungicida sistêmico	Estrobilurina	Azoxistrobina	(E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo	Classe III – Medianamente tóxico	Classe III – produto perigoso ao meio ambiente	 The chemical structure of Azoxystrobin consists of a central pyrimidopyrimidin ring system. It is substituted with a 2-cyanophenoxy group at the 2-position, a phenoxy group at the 4-position, and a (E)-3-methoxyacrylate group at the 6-position.	SYNGENTA, 2018
Carbendazim /Nortox/ Fungicida sistêmico	Benzimidazol	Carbendazim	metil 1H benzimidazol-2-ilcarbamato	Classe II – Altamente tóxico	Classe III – produto perigoso ao meio ambiente	 The chemical structure of Carbendazim features a benzimidazole ring system. At the 2-position of the imidazole ring, there is a methyl carbamate group (-NH-C(=O)-OCH3).	NORTOX, 2018

Foram realizadas seis concentrações de cada fungicida, com base na concentração recomendada pelo fabricante, duas concentrações acima e três concentrações abaixo do recomendado (BERNARDES et al., 2015; ARAGÃO, 2017) (Tabela 3).

Tabela 3 – Concentrações dos fungicidas utilizados.

Concentração utilizada	Relação com a concentração recomendada pelo fabricante	Azoxistrobina (g/L)	Carbendazim (mL/L)
C1	4 x	0,56	2,0
C2	2 x	0,28	1,0
C3	1 x	0,14	0,5
C4	½ x	0,07	0,25
C5	¼ x	0,035	0,125
C6	1/8 x	0,0175	0,0625

As soluções foram preparadas diluindo os fungicidas em água destilada, em um volume final de 100 ml. Água destilada foi utilizada como controle negativo, e trifluralina (0,84 g/L) como controle positivo nas análises de germinação, crescimento radicular e citogenética. A trifluralina é um herbicida que pertence ao grupo químico Dinitroanilinas, utilizada como controle positivo, pois os seus mecanismos de ação são conhecidos (FERNANDES et al., 2007).

5.3 Análise da germinação e do crescimento radicular

Foram germinadas 30 sementes de *L. sativa* em placas de Petri forradas com papel filtro contendo as soluções teste conforme o item 5.2. O experimento foi mantido à temperatura de 24°C, em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições por tratamento.

Após 48 horas de exposição (aproximadamente 6 ciclos celulares de *L. sativa*), as sementes germinadas foram contabilizadas e as radículas foram mensuradas com auxílio de paquímetro digital, fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), e armazenadas a - 18° C para a realização dos ensaios citogenéticos.

5.4 Análise citogenética

Para a preparação das lâminas, as raízes previamente fixadas em solução Carnoy passaram pelo processo de coloração conforme método tradicional de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), com hidrólise em HCl 1M (60°C) por 9 minutos, seguida de imersão em reativo de Schiff por 2 horas, na ausência de luz. Após a coloração, os meristemas radiculares foram dissociados, cobertos com lamínulas e esmagados em ácido-acético 45%, sendo que as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido para a retirada da lamínula e finalizadas com verniz.

Foram avaliadas 5 lâminas por tratamento, e 1000 células por lâmina, totalizando 5000 células meristemáticas por tratamento, sendo observadas e quantificadas as diferentes fases da divisão mitótica, alterações cromossômicas e nucleares. O índice mitótico foi obtido dividindo o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo total de células avaliadas em cada tratamento. As frequências das alterações cromossômicas totais foram obtidas dividindo o número de alteração cromossômica pelo número total de células em divisão. Já as frequências das alterações nucleares foram obtidas dividindo o número de alterações nucleares pelo número total de células avaliadas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014).

Foram contabilizadas as porcentagens das alterações cromossômicas e nucleares de maneira isolada, sendo as alterações cromossômicas: perdas cromossômicas, quebras cromossômicas, aderências cromossômicas, c-metáfases, c-metáfases poliploides e pontes cromossômicas; e as alterações nucleares: micronúcleo, microcito, núcleo lobulado, célula binucleada e célula multinucleada.

5.5 Análise do estresse oxidativo

A análise do estresse oxidativo foi realizada por meio da quantificação indireta de proteínas totais, enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX), e por meio da quantificação do nível de glutathione reduzida (GSH). As enzimas CAT, SOD e APX participam de rotas biossintéticas antioxidantes que regulam os níveis de EROs nas células, onde a SOD converte

radicais superóxido em H_2O_2 , que é decomposto em H_2O e O_2 pela CAT, ou em H_2O pela APX. A GSH possui um papel essencial na biotransformação e eliminação de compostos químicos e na defesa de células contra o estresse oxidativo (TAIZ et al., 2017).

O material vegetal para realização das análises foi obtido por meio da germinação de setenta sementes de *L. sativa* em placas de Petri contendo papel filtro e os tratamentos conforme o item 5.2, com 5 repetições por tratamento. Após 48 horas de exposição, as sementes foram removidas com o intuito de analisar as enzimas provenientes apenas da parte radicular, além de facilitar a homogeneização do material. Em seguida, as raízes foram pesadas e acondicionadas em ultra freezer à $-80^{\circ}C$.

5.5.1 Obtenção do extrato

As amostras foram diluídas 10x (9x peso mg das raízes para 1x volume μl de tampão fosfato pH 7,8) e homogeneizadas utilizando homogeneizador ultrassônico, com amplitude de 20%, durante 4 minutos. O extrato obtido foi centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a $4^{\circ}C$, sendo o sobrenadante realocado em microtubos e armazenado em ultrafreezer ($-80^{\circ}C$).

5.5.2 Concentração de proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado para microplaca, onde 10 μl do extrato foi adicionado em 250 μl de Coomassie Brilliant Blue G-250 (Reativo de Bradford), em triplicata. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 595 nm, utilizando-se, como padrão, a curva de albumina de soro bovina (0; 0,062; 0,125; 0,250; 0,500; 1,0 mg).

5.5.3 Atividade da enzima catalase

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Beutler (1975), no qual a velocidade de consumo do H_2O_2 é mensurada pelo decaimento da absorbância a 240 nm, no primeiro minuto da reação. Para a leitura da atividade em microplaca, foram adicionados 15 μl de extrato obtido conforme item 5.5.1, ao meio de reação 100 mM (H_2O_2 , água destilada e tampão de reação (Tris-Base 1M e EDTA 5mM)). Para o branco, utilizou-se 15 μl de tampão de homogeneização (tampão fosfato pH 7,8). A leitura foi realizada durante 2 minutos, com intervalos de 15 segundos, em leitora de microplaca SpectraMax M5. A atividade específica foi expressa em nmol mg^{-1} de proteína min^{-1} .

5.5.4 Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria com base no protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), no qual o radical superóxido é gerado por meio do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo c é monitorada a 550 nm. Para a leitura da atividade em microplaca foram adicionados 5 μl de extrato, obtido conforme item 5.5.1, 285 μl de meio de reação (tampão de reação fosfato de potássio 0,2 M; EDTA 1 mM; cianeto de potássio (KCN) 200 μM ; citocromo c 100 μM ; xantina 500 μM) e 10 μl de solução de xantina oxidase, em cada poço. Para o branco, utilizou-se as mesmas alíquotas de xantina oxidase e meio de reação, e 5 μl de tampão fosfato pH 7,8.

A leitura foi realizada durante 1 minuto com intervalos de 20 segundos, em leitora de microplaca SpectraMax M5. A atividade enzimática foi expressa por unidade de SOD, onde uma unidade de SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo c - por minuto - por mg de proteína a 25°C e pH 7,8.

5.5.5 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981), modificado por Koshiha (1993). No qual, o decréscimo da absorbância a 290 nm, à 25°C, é medido durante o primeiro minuto da reação, sendo a atividade da APX determinada com base na inclinação da reta nos primeiros segundos, após o início da reação. Para a leitura da atividade, 10 µl de extrato preparado conforme o item 5.5.1, foram adicionados a tampão fosfato de sódio 50 mM, EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM e H₂O₂ 0,1 mM. Para o branco, foi utilizado 10 µl de tampão fosfato pH 7,8. A leitura foi realizada em leitora de microplaca SpectraMax M5 e o resultado expresso em µmol de ácido ascórbico min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

5.5.6 Quantificação da glutathiona reduzida

A quantificação do nível de glutathiona reduzida (GSH) seguiu o protocolo descrito por White et al. (2003). A determinação da concentração de GSH foi realizada por meio da separação dos dipeptídeos por meio de centrifugação e posterior reação dos complexos dipeptídicos com o naftalenedicarboxialdeído (NDA), o qual gera um complexo fluorescente que é medido a 528 nm, após excitação a 472 nm.

Para realizar a análise foi necessário construir uma curva padrão com diferentes diluições de GSH (40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 nM). Para a leitura da atividade, inicialmente foram adicionados 20 µl do extrato, obtido conforme item 5.5.1, a ácido sulfosalicílico 200mM, em microplaca de fundo cônico, que foi incubada por 20 minutos. Após esse período, a microplaca foi centrifugada a 4000 rpm, por 7 minutos, a 4°C. Em seguida, 20 µl do sobrenadante foram transferidos para microplaca branca, e adicionou-se 180 µl de solução fluorescente (TrisBase 50 mM, NaOH 500 mM e NDA 10 mM). Para o branco utilizou-se 20 µl de tampão de homogeneização fosfato pH 7,8. A microplaca foi incubada por 30 minutos e posteriormente a leitura foi realizada em leitora de microplaca SpectraMax M5. A concentração de GSH foi expressa em µM por mg de proteína.

5.6 Análise do índice de clorofila total e da fluorescência da clorofila a

Sementes de *P. Vulgaris* foram plantadas em vasos com capacidade de 3L, com substrato constituído de latossolo vermelho, areia e terra vegetal (na proporção de 1:1:1), na área experimental da Universidade Federal do Espírito Santo, *campus* Goiabeiras, situado no município de Vitória-ES (Lat. 20°16'S, Lon. 40°18'W).

A disponibilidade de umidade foi obtida por meio de irrigação manual uma vez ao dia (entre 7:00min e 8:00min da manhã) e o desbaste foi efetuado na segunda semana do experimento, permanecendo apenas 2 plantas de *P. vulgaris* por vaso.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições para cada tratamento. Os tratamentos consistiram na aplicação das concentrações C2, C3 e C4 dos fungicidas, conforme o item 5.2, por meio de pulverizador manual, após 30 dias da semeadura, e no controle negativo (ausência de pulverização).

Os dados de emissão da fluorescência da clorofila a foram determinados entre 07h00min – 09h00min da manhã, em duas folhas jovens totalmente expandidas, 48 horas após a aplicação dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim. A medição foi feita após pré-adaptação da região a ser medida ao escuro, por 40 min, período suficiente para a oxidação completa do sistema fotossintético de transporte de elétrons, utilizando um fluorômetro portátil (Handy PEA-Plant Efficiency Analyzer, Hanstech, King's Lynn, Norkfol, UK). Logo após, as folhas foram submetidas a um flash de luz saturante ($3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os resultados da cinética da fluorescência transiente foram, posteriormente, tabulados em uma planilha eletrônica com o software PEA Plus v1.10.

Para normalizar as curvas OJIP foram usados os passos O ($F_1=F_0 = 20 \mu\text{s}$) e P (fluorescência máxima expressa por cada acesso, $F_M = \sim 300\text{ms}$), possibilitando uma base de comparação entre as diferentes curvas. Estas curvas foram expressas como a fluorescência variável relativa da clorofila [$V_t = (F_T-F_0)/(F_M-F_0)$].

Ao calcular a diferença cinética entre as curvas normalizadas da fluorescência variável relativa da clorofila a [$\Delta V_t = V_{t(\text{tratamento})} - V_{t(\text{controle})}$], evidenciou-se curvas

acima (positivas) e abaixo (negativas) da média geral. As curvas positivas indicam que houve perda (emissão) de energia sob a forma de fluorescência.

Os dados da fluorescência transiente foram detalhados, usando-se o Teste JIP (STRASSER; STRASSER, 1995), com o software PEA Plus v1.10, obtendo-se o índice de desempenho fotoquímico total (PI_{total}). Este índice foi calculado a partir da densidade do centro de reação (RC/ABS), da eficiência de captura dos fótons, $\phi P_0/(1 - \phi P_0)$, da eficiência de transporte de elétrons do FSII, $\psi E_0 / (1 - \psi E_0)$, e da eficiência do fluxo de transporte de elétrons até os aceptores finais do FSI, $\delta R_0/(1 - \delta R_0)$ com a equação: $PI_{total} = (RC/ABS) \cdot [\phi P_0/(1 - \phi P_0)] \cdot [\psi E_0 / (1 - \psi E_0)] \cdot [\delta R_0/(1 - \delta R_0)]$ (STRASSER et al., 2010). Além disso, foi calculado o fluxo de energia absorvida por centro de reação ativo ou tamanho aparente da antena de um centro de reação ativo do FSII: $ABS/RC = (dV/dt_0/V_J) \times (1/\phi P_0)$ (YUSUF et al.; 2010; CHEN et al., 2016).

O Índice de clorofila total foi estimado com o uso de um clorofilômetro portátil (SPAD-502, Konica Minolta Optics, Inc.) e expresso como índice SPAD, segundo (CASSOL et al., 2008). As medições foram realizadas nas mesmas folhas utilizadas na análise da fluorescência da clorofila *a*. A cada cinco medições por folha uma média foi gerada, obtendo-se duas médias por planta.

5.7 Análise estatística

Os dados da análise estatística dos testes realizados foram expressos em média \pm desvio padrão; e submetidos a análises de variância ANOVA e à comparação entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$) para os dados que seguiram uma distribuição normal. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Germinação e crescimento radicular

Os resultados da germinação e crescimento radicular das sementes de *L. sativa* expostas ao azoxistrobina e carbendazim são apresentados na figura 3. Apesar de não ter sido observado declínio na taxa de germinação das sementes expostas aos fungicidas, as raízes de *L. sativa* apresentaram diminuição no crescimento radicular nas concentrações C1, C2, C3 e C4 do azoxistrobina, e C1 e C2 do carbendazim (Figura 3).

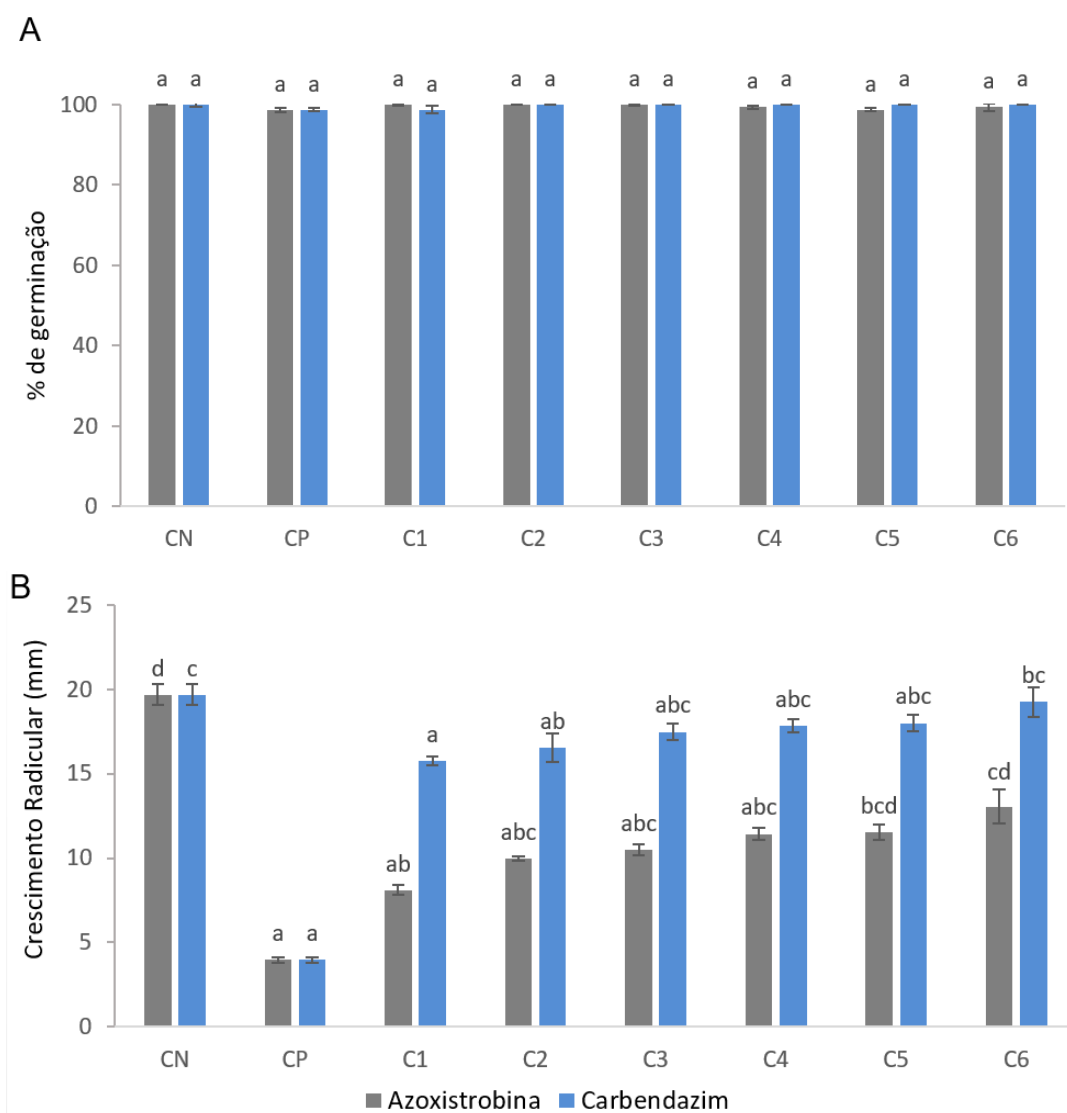


Figura 3 – Germinação (A) e Crescimento radicular (B) de *L. sativa* exposta à diferentes concentrações do azoxistrobina e carbendazim. CN: controle negativo. CP: controle positivo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Kruskal Wallis.

6.2 Análise citogenética

O índice mitótico das concentrações C1 e C2 do azoxistrobina, e C1, C2 e C3 do carbendazim apresentaram diminuição significativa em relação ao CN. Em relação às fases de divisão, foi possível observar a ocorrência de um aumento no número de prófases na C2, e diminuição de anáfases na C3, nas células tratadas com o azoxistrobina (Tabela 4).

Com relação às alterações cromossômicas do ciclo celular (Tabela 5), observou-se que, a concentração C1 do azoxistrobina apresentou índice elevado de alterações cromossômicas (15,95%) e pontes cromossômicas (3,41%) (Figura 4B), enquanto as concentrações C2 (10,32%), C3 (9,69%) e C5 (9,71%) apresentaram aumento de aderências cromossômicas (Figura 4D).

Em relação ao carbendazim, observou-se que a concentração C1 apresentou aumento das alterações cromossômicas (24,30%), sendo perdas cromossômicas (6,5%) (Figura 4A), aderências cromossômicas (8,86%) e pontes cromossômicas (2,35%), enquanto as concentrações C2 (11,10%) e C3 (7,82%) apresentaram aumento de aderências cromossômicas, em relação ao CN (Tabela 5).

As alterações cromossômicas mais frequentes foram observadas durante a metáfase, destacando-se a ocorrência de aderências cromossômicas e perdas cromossômicas; e durante a anáfase, destacando-se as pontes cromossômicas e perdas cromossômicas (Tabela 5). As alterações nucleares encontradas no controle positivo não foram observadas nas concentrações dos fungicidas pesquisados (Tabela 6).

Tabela 4 - Parâmetros de índice mitótico e divisão celular normal de células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.

	Tratamentos	Índice Mitótico (%)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)
Azoxistrobina	CN	9,22 ± 0,51 ^{cd}	47,81 ± 0,76 ^{ab}	24,89 ± 1,52 ^{ab}	18,03 ± 1,66 ^c	11,78 ± 1,06 ^b
	CP	11,76 ± 0,15 ^d	10,88 ± 1,03 ^a	85,37 ± 1,24 ^b	3,04 ± 0,53 ^a	1,09 ± 0,97 ^a
	C1	4,76 ± 0,17 ^a	60,96 ± 1,41 ^{bc}	20,60 ± 1,28 ^a	13,02 ± 1,62 ^{abc}	3,56 ± 1,49 ^{ab}
	C2	5,04 ± 0,18 ^{ab}	61,14 ± 1,14 ^c	21,78 ± 1,04 ^a	11,53 ± 1,70 ^{abc}	3,84 ± 1,27 ^{ab}
	C3	5,16 ± 0,11 ^{abc}	57,77 ± 1,90 ^{bc}	24,80 ± 2,03 ^{ab}	10,81 ± 1,74 ^{ab}	4,66 ± 1,56 ^{ab}
	C4	5,42 ± 0,97 ^{abcd}	56,83 ± 0,87 ^{abc}	25,12 ± 1,36 ^{ab}	14,01 ± 2,01 ^{bc}	3,01 ± 1,50 ^{ab}
	C5	5,56 ± 0,27 ^{abcd}	54,78 ± 1,16 ^{abc}	27,33 ± 2,00 ^{ab}	11,82 ± 1,38 ^{abc}	4,66 ± 1,29 ^{ab}
	C6	6,6 ± 0,16 ^{bcd}	54,53 ± 1,54 ^{abc}	27,28 ± 1,52 ^{ab}	13,95 ± 0,86 ^{abc}	3,84 ± 0,80 ^{ab}
Carbendazim	CN	9,90 ± 0,61 ^{cd}	50,06 ± 0,76 ^{ab}	23,51 ± 0,92 ^a	19,78 ± 1,66 ^b	9,04 ± 1,06 ^b
	CP	12,12 ± 0,15 ^d	9,40 ± 1,03 ^a	87,46 ± 1,24 ^b	2,64 ± 0,53 ^a	0,82 ± 0,97 ^a
	C1	6,24 ± 0,11 ^a	49,34 ± 1,63 ^b	30,15 ± 0,19 ^a	15,68 ± 1,84 ^{ab}	4,11 ± 0,97 ^{ab}
	C2	6,42 ± 0,13 ^{ab}	49,80 ± 1,09 ^{ab}	29,30 ± 1,06 ^{ab}	15,91 ± 1,92 ^{ab}	4,38 ± 1,60 ^{ab}
	C3	6,56 ± 0,21 ^{ab}	50,02 ± 1,42 ^b	28,35 ± 0,77 ^{ab}	16,17 ± 1,76 ^{ab}	4,93 ± 1,56 ^{ab}
	C4	6,96 ± 1,21 ^{abc}	48,53 ± 1,73 ^{ab}	27,59 ± 1,04 ^{ab}	16,40 ± 1,08 ^{ab}	7,12 ± 1,15 ^b
	C5	7,44 ± 0,56 ^{abcd}	50,93 ± 0,52 ^{ab}	25,43 ± 1,17 ^{ab}	16,62 ± 1,63 ^b	7,14 ± 1,55 ^b
	C6	8,58 ± 0,66 ^{bcd}	47,39 ± 1,58 ^{ab}	24,84 ± 1,29 ^{ab}	18,55 ± 0,97 ^b	10,96 ± 0,74 ^{ab}

As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$). CN: Controle negativo. CP: controle positivo.

Tabela 5 - Alterações cromossômicas observadas nas células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.

Tratamentos		AC (%)	Perda (%)	Quebra (%)	Aderência (%)	C-Metáfase (%)	C-Metáfase Poliploide (%)	Ponte (%)
Azoxistrobina	CN	0,42 ± 0,58 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	0 ± 0 ^a	0,22 ± 0,49 ^a
	CP	71,90 ± 1,86 ^c	4,44 ± 0,86 ^b	0,36 ± 0,00 ^a	8,09 ± 0,88 ^{ab}	45,17 ± 0,76 ^b	12,62 ± 0,41 ^b	0,69 ± 0,43 ^{ab}
	C1	15,95 ± 0,72 ^{bc}	3,36 ± 1,80 ^{ab}	0 ± 0 ^a	8,39 ± 1,51 ^{ab}	2,10 ± 2,13 ^{ab}	0 ± 0 ^a	3,41 ± 2,00 ^b
	C2	15,11 ± 1,62 ^{abc}	1,18 ± 1,08 ^{ab}	0,42 ± 0,93 ^a	10,32 ± 2,07 ^b	1,17 ± 1,75 ^{ab}	0 ± 0 ^a	1,63 ± 1,71 ^{ab}
	C3	14,22 ± 1,01 ^{abc}	1,95 ± 1,96 ^{ab}	0 ± 0 ^a	9,69 ± 1,08 ^b	3,23 ± 1,28 ^{ab}	0 ± 0 ^a	1,52 ± 1,46 ^{ab}
	C4	14,80 ± 0,93 ^{abc}	1,87 ± 1,87 ^{ab}	0,38 ± 0,86 ^a	8,53 ± 1,20 ^{ab}	1,46 ± 0,82 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0,36 ± 0,81 ^a
	C5	14,42 ± 1,53 ^{abc}	0,75 ± 1,49 ^{ab}	0 ± 0 ^a	9,71 ± 1,47 ^b	0,75 ± 1,03 ^a	0 ± 0 ^a	1,06 ± 0,97 ^{ab}
	C6	7,98 ± 1,89 ^{ab}	1,67 ± 1,38 ^{ab}	0,28 ± 0,62 ^a	2,74 ± 1,34 ^{ab}	0,82 ± 0,75 ^a	0 ± 0 ^a	1,35 ± 0,79 ^{ab}
Carbendazim	CN	0,40 ± 0,55 ^a	0,20 ± 0,45 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0,20 ± 0,44 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	CP	70,35 ± 1,01 ^c	4,96 ± 0,44 ^{bc}	0,17 ± 0,37 ^a	8,25 ± 1,64 ^{ab}	67,52 ± 1,35 ^b	12,71 ± 1,05 ^b	0,50 ± 0,45 ^{ab}
	C1	24,30 ± 1,13 ^{bc}	6,50 ± 1,46 ^c	0,42 ± 0,93 ^a	8,86 ± 1,84 ^b	2,15 ± 1,36 ^{ab}	1,00 ± 1,50 ^{ab}	2,35 ± 1,43 ^b
	C2	18,37 ± 1,30 ^{abc}	2,77 ± 2,00 ^{abc}	0,29 ± 0,65 ^a	11,10 ± 1,66 ^b	0,63 ± 0,86 ^{ab}	0,60 ± 0,82 ^{ab}	1,48 ± 1,75 ^{ab}
	C3	17,04 ± 0,89 ^{abc}	5,26 ± 1,13 ^{abc}	0,27 ± 0,60 ^a	7,82 ± 2,01 ^b	0,78 ± 1,17 ^{ab}	0,78 ± 0,71 ^{ab}	0,55 ± 0,75 ^{ab}
	C4	11,68 ± 0,62 ^{abc}	2,33 ± 1,12 ^{abc}	0 ± 0 ^a	5,48 ± 0,85 ^{ab}	0,51 ± 1,15 ^a	0 ± 0 ^a	0,52 ± 1,15 ^a
	C5	10,65 ± 1,70 ^{abc}	0,81 ± 1,35 ^{abc}	0 ± 0 ^a	6,09 ± 1,91 ^{ab}	1,51 ± 0,54 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0,51 ± 0,70 ^{ab}
	C6	6,81 ± 1,19 ^{ab}	0,25 ± 0,57 ^{ab}	0 ± 0 ^a	5,18 ± 0,65 ^{ab}	1,20 ± 0,33 ^a	0 ± 0 ^a	0,46 ± 0,63 ^{ab}

As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$). Média das alterações visualizadas a cada 1.000 células contabilizadas. Onde: AC (%): porcentagem de alterações cromossômicas por divisão. CP: Controle positivo; CN: Controle negativo.

Tabela 6 - Alterações nucleares observadas nas células meristemáticas radiculares de *Lactuca sativa* L. expostas às concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim.

	Tratamentos	AN (%)	Micronúcleo (%)	Microcito (%)	Núcleo Lobulado (%)	Célula Binucleada (%)	Célula Multinucleada (%)
Azoxistrobina	CN	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	CP	11,16 ± 1,12 ^b	1,42 ± 0,09 ^b	1,20 ± 1,30 ^b	1,20 ± 0,83 ^b	1,92 ± 0,20 ^b	7,58 ± 0,35 ^b
	C1	0,18 ± 0,25 ^a	0,18 ± 0,25 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C2	0,08 ± 0,11 ^a	0,08 ± 0,11 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C3	0,05 ± 0,04 ^a	0,05 ± 0,04 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C4	0,06 ± 0,05 ^a	0,06 ± 0,05 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C5	0,06 ± 0,09 ^a	0,06 ± 0,09 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C6	0,04 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,05 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
Carbendazim	CN	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	CP	11,62 ± 0,73 ^b	1,40 ± 0,33 ^b	1,60 ± 1,51 ^b	1,5 ± 0,57 ^b	2,01 ± 0,08 ^b	8,04 ± 0,29 ^b
	C1	0,14 ± 0,15 ^{ab}	0,14 ± 0,15 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C2	0,06 ± 0,13 ^a	0,06 ± 0,13 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C3	0,10 ± 0,10 ^{ab}	0,10 ± 0,10 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C4	0,20 ± 0,10 ^{ab}	0,20 ± 0,10 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C5	0 ± 0 ^{ab}	0 ± 0 ^{ab}	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a
	C6	0,04 ± 0,05 ^a	0,04 ± 0,05 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a

As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Kruskal Wallis ($P > 0,05$). Média das alterações visualizadas a cada 1.000 células contabilizadas. Onde: AN (%): porcentagem de alterações nucleares por total de células. CP: Controle positivo; CN: Controle negativo.

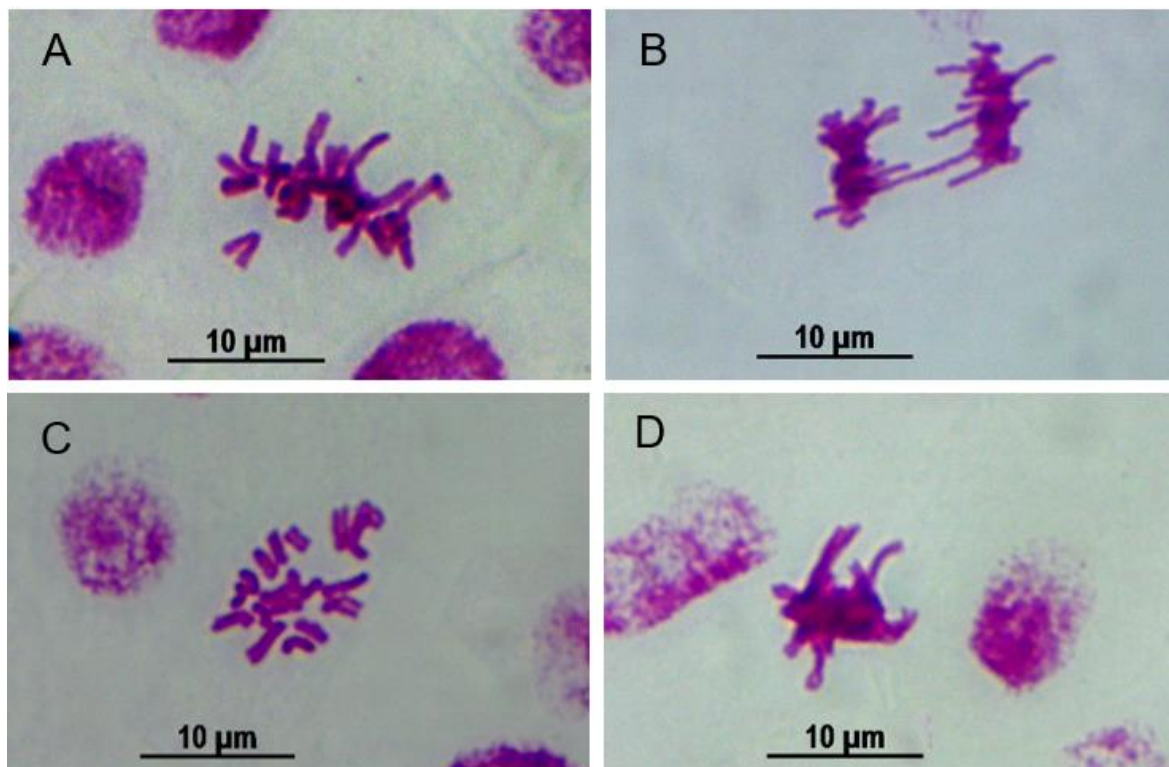


Figura 4 - Células meristemáticas representativas das raízes de *L. sativa* tratadas com as diferentes concentrações do azoxistrobina e carbendazim. (A) perda cromossômica, (B) ponte cromossômica, (C) C-metáfase, (D) aderência cromossômica. Barra = 10µm.

6.3 Análise do estresse oxidativo

A avaliação das atividades das enzimas CAT, SOD, APX, e do nível de GSH, nas raízes de *L. sativa*, permitiu constatar atividades significativas destes marcadores bioquímicos nas amostragens realizadas com o azoxistrobina e carbendazim (Figura 5).

Em relação à enzima CAT, as concentrações C1, C2, C3 e C4 do azoxistrobina e C1, C2 e C3 do carbendazim apresentaram aumento significativo da atividade (Figura 5A). Já para a APX, apenas a C1 do azoxistrobina e C1 e C2 do carbendazim apresentaram aumento significativo da atividade da enzima (Figura 5B). A SOD apresentou aumento em C1, C2 e C3 para ambos fungicidas (Figura 5C), e o nível de GSH apresentou aumento significativo em C1, C2, C3, C4 e C5 do azoxistrobina e em todas as concentrações testadas do carbendazim (Figura 5D).

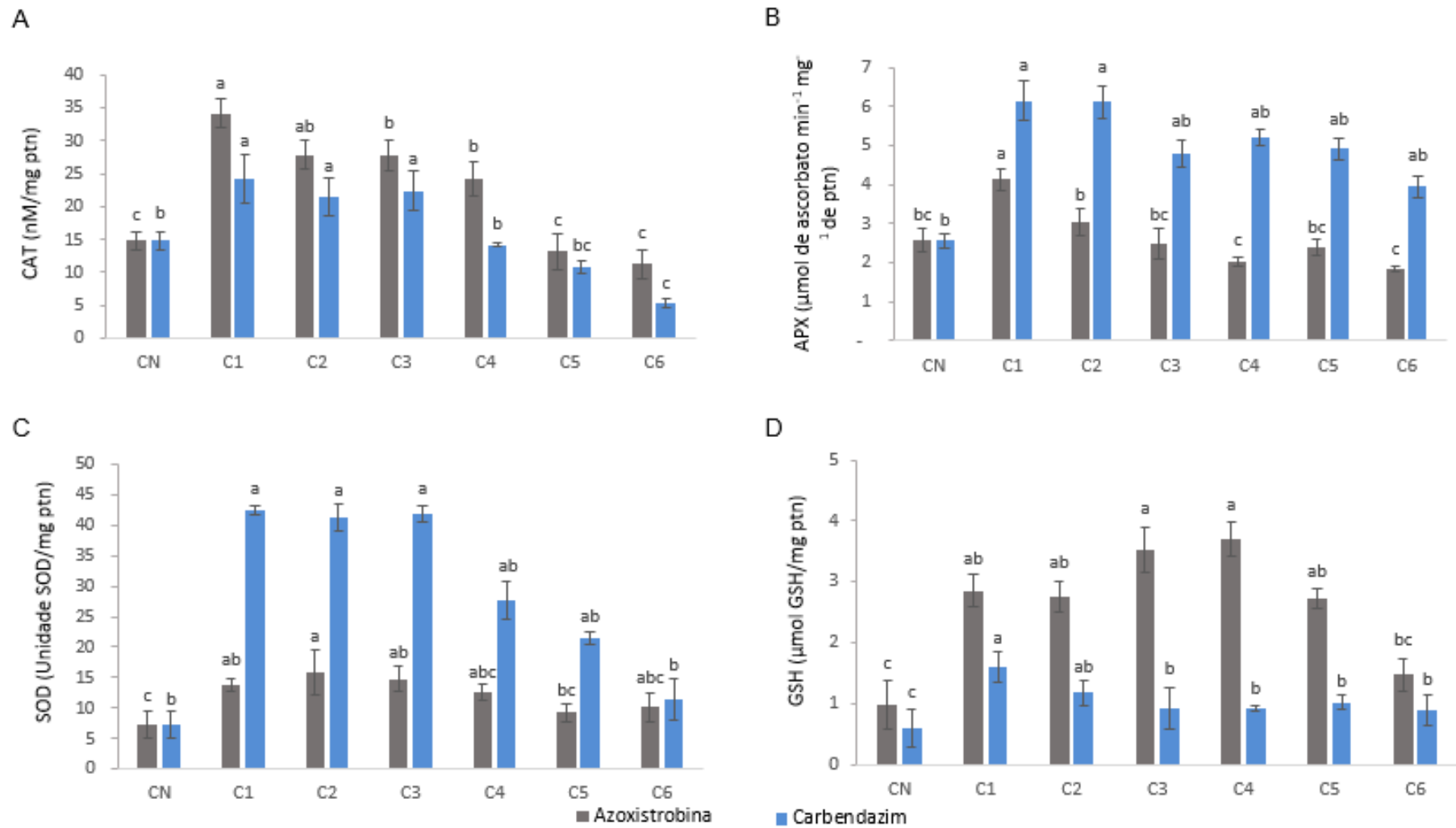


Figura 5 - Análise do estresse oxidativo de *L. sativa* exposta a diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim. Onde: A: Catalase; B: Peroxidase do ascorbato; C: Superóxido dismutase; D: Glutaciona reduzida. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. CN: controle negativo.

6.4 Análise do índice de clorofila total e da fluorescência da clorofila a

A análise do índice de clorofila total realizada em *P. vulgaris* demonstrou que as concentrações do carbendazim diminuíram o teor relativo de clorofila, já as concentrações do azoxistrobina não apresentaram diferenças significativas do CN (Figura 6).

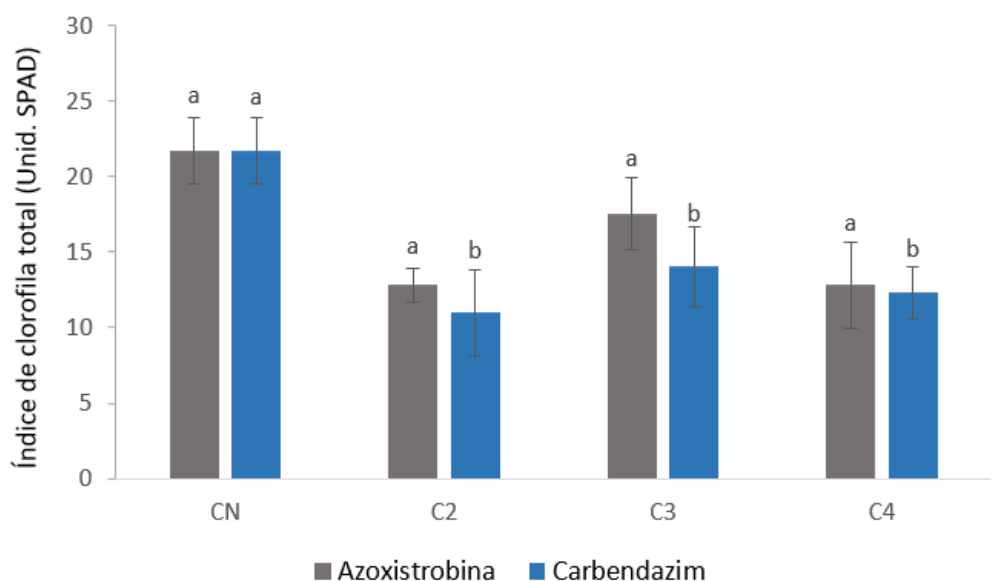


Figura 6 – Índice de clorofila total (Unid. SPAD) de folhas jovens totalmente expandidas de *P. vulgaris* exposta a diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina e carbendazim. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade de acordo com o teste de Tukey. CN: controle negativo.

A Figura 7 representa uma curva O-J-I-P da cinética de emissão da fluorescência da clorofila *a* para todos os tratamentos, o que demonstra que todos estavam fotossinteticamente ativos. Foi possível visualizar e caracterizar as fases que correspondem aos processos fotoquímicos de captura da energia de excitação e o fluxo de elétrons no aparato fotossintético das plantas de *P. vulgaris* submetidas aos tratamentos com azoxistrobina (Figura 7A) e carbendazim (Figura 7C). Observou-se que o azoxistrobina influenciou a etapa fotoquímica nos passos O-J e J-I, e o carbendazim apenas no passo O-J.

As diferenças entre as curvas normalizadas puderam ser analisadas por meio das diferenças cinéticas observadas com os tratamentos do azoxistrobina (Figura 7B) e carbendazim (Figura 7D). Assim, observou-se aumento da indução de fluorescência na etapa O-J para ambos fungicidas, o que evidencia a ineficiência na capacidade de redução da primeira quinona do lado acceptor de elétrons do FSII (Q_A), sendo que o azoxistrobina também aumentou a indução de fluorescência na etapa J-I, que está envolvida com a redução dos transportadores de elétrons do inter-sistema, como a quinona secundária (Q_B), pool de plastoquinona (PQ), o citocromo $b6f$ e a plastocianina.

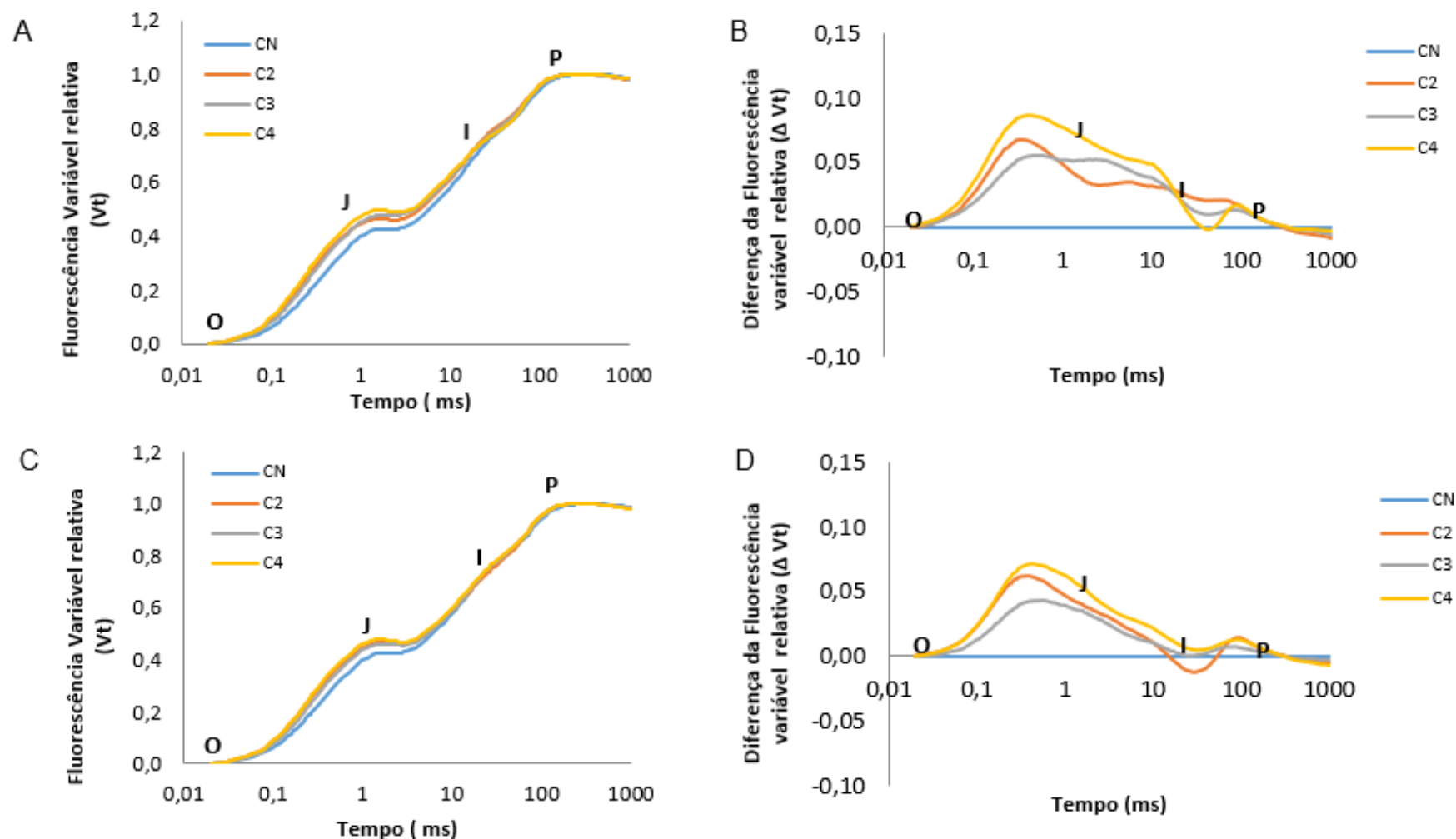


Figura 7 – Curvas de indução de fluorescência variável relativa da clorofila *a* [$V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$] (A e C) e diferença cinética normalizadas ($\Delta V_t = V_t(\text{tratamento}) - V_t(\text{controle negativo})$) (B e D) de folhas de *P. vulgaris* tratadas com azoxistrobina (A e B) e carbendazim (C e D). O tempo está representado em escala logarítmica (ms).

Os parâmetros do Teste-JIP que transcrevem as intensidades de fluorescência da clorofila são representados na figura 8, sendo os dados normalizados em relação aos respectivos controles. Cada desvio do comportamento-padrão demonstra um impacto fracionário das concentrações dos fungicidas testados em *P. vulgaris*.

Os parâmetros avaliados demonstraram comportamentos semelhantes em ambos fungicidas, sendo que a eficiência que um éxciton capturado no centro de reação pode mover um elétron na cadeia de transporte de elétrons após QA ($\Psi E_0 = ET_0/TR_0$), o rendimento quântico primário da fotoquímica no tempo zero ($\phi P_0 = TR_0/ABS = F_V/F_M$), a densidade do centro de reação (RC/ABS), e a eficiência do fluxo de transporte de elétrons até os aceptores finais do FSI ($\delta R_0 = RE_0/ET_0$) tiveram aumento de seus valores em relação ao controle. Já o parâmetro relacionado com o fluxo de absorção por RC (ABS/RC) diminuiu, o qual também diz respeito ao tamanho aparente do sistema antena.

Para o índice de performance de absorção (PI_{abs}) e o índice de performance total da cadeia de transporte de elétrons, o qual mede a performance até os aceptores finais de elétrons do FSI (PI_{total}), houve uma redução para as concentrações, quando comparadas com o controle. Isso pode indicar um efeito negativo na maquinaria fotossintética, visto que esses parâmetros estão relacionados com fluxo de energia em toda a cadeia de transporte de elétrons fotossintética.

O índice de desempenho total (PI_{total}) pode ter apresentado resultados abaixo da média em todas as concentrações testadas, por consequência do menor desempenho do FSII (PI_{abs}). O menor desempenho do FSII pode estar relacionado com a diminuição do fluxo de absorção de energia por centro de reação (ABS/RC), ou seja, as concentrações avaliadas de ambos fungicidas interferiram na absorção de energia pelos FSII das plantas de *P. vulgaris*.

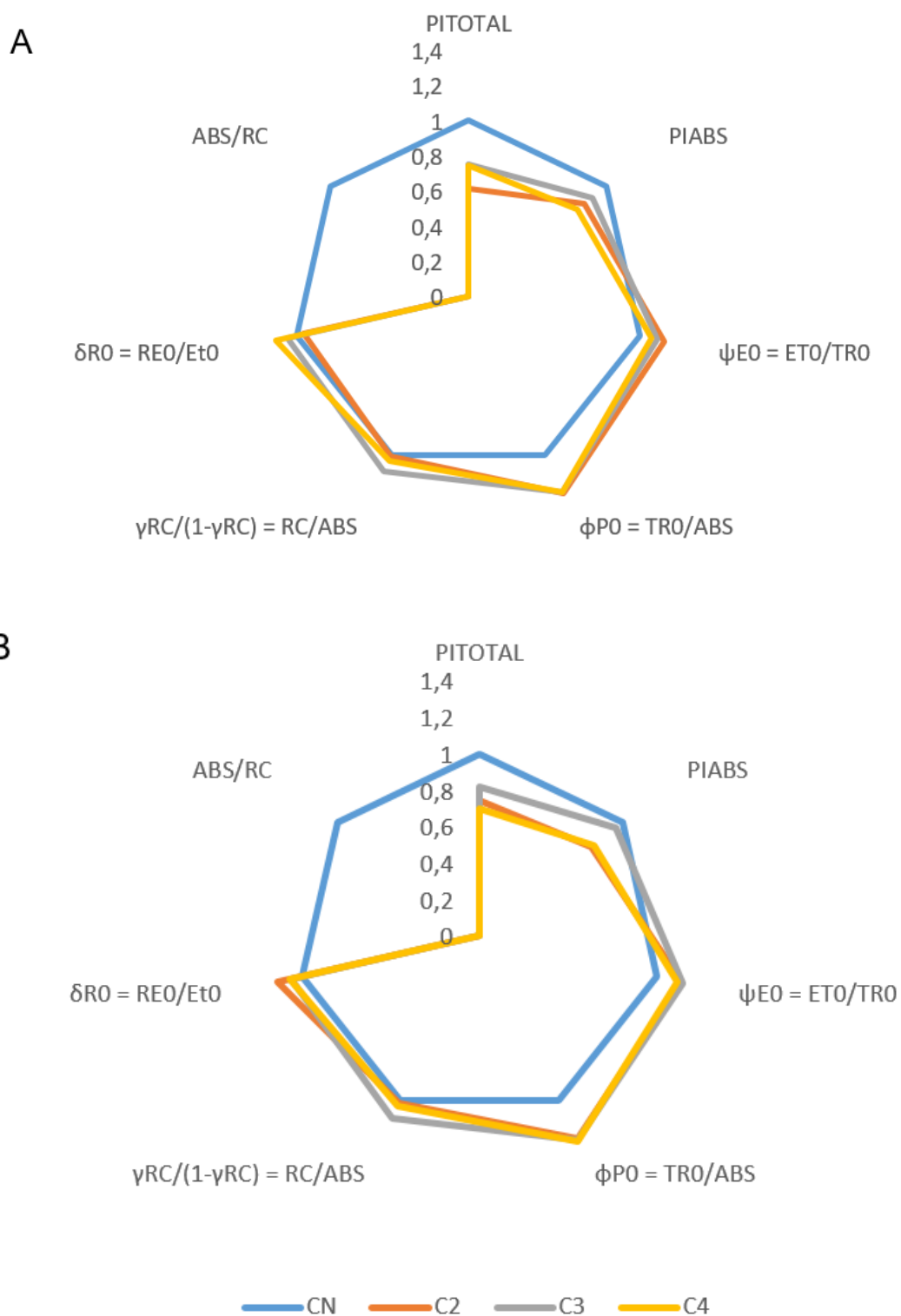


Figura 8 – Mudanças na forma do radar desenhado pelos valores normalizados de parâmetros do teste JIP induzidos pela exposição de *P. vulgaris* a diferentes concentrações dos fungicidas azoxistrobina (A) e carbendazim (B). CN: controle negativo.

7. DISCUSSÃO

As concentrações avaliadas do azoxistrobina e carbendazim reduziram o crescimento radicular e índice mitótico, e aumentaram a frequência de alterações cromossômicas em *L. sativa*, como aderências, perdas e pontes cromossômicas, sendo assim, os fungicidas apresentaram potenciais fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos. A inibição do índice mitótico e a indução de anormalidades cromossômicas em células vegetais devido aos efeitos citogenotóxicos de fungicidas também foram relatados em vários estudos (PAUL et al. 2013; ŞUTAN et al. 2014; AKYIL et al. 2015; BERNARDES et al., 2015; KUCHY et al. 2016; ARAGÃO, 2017; FATMA et al. 2018).

Os resultados citotóxicos e genotóxicos apresentados pelo fungicida carbendazim corroboraram com os observados por Verma et al. (2018) e Truta et al. (2010). Verma et al. (2018) relataram que o carbendazim causou a diminuição do índice mitótico e anormalidades cromossômicas, como pontes cromossômicas, c-metáfases, aderência cromossômica, perda cromossômica, fragmentos, distúrbios no fuso mitótico, em células meristemáticas de *A. cepa* cultivadas em amostras de solo tratadas com diferentes concentrações do fungicida. Truta et al. (2010) também descreveram que o carbendazim induziu baixo índice mitótico e anormalidades na metáfase e anáfase no feno-grego, semelhante ao observado neste estudo.

Em relação ao azoxistrobina, os resultados observados corroboraram com o trabalho de Nithyameenakshi et al. (2006), que avaliaram os efeitos do fungicida em células radiculares de *Allium cepa*, com base em alterações no índice mitótico e alterações cromossômicas e nucleares. Os autores relataram declínio do índice mitótico com o aumento da concentração do fungicida, e relacionaram essa redução na atividade mitótica com a inibição da síntese de DNA, que é considerada um dos principais pré-requisitos para uma célula se dividir. Os autores também relataram alterações cromossômicas como pontes cromossômicas, perdas cromossômicas, c-metáfases, entre outras, alterações semelhantes ao presente estudo.

A aderência cromossômica é resultante do efeito de substâncias tóxicas sobre a estrutura da cromatina que podem causar a contração e a condensação cromossômica ou a despolimerização do DNA e dissolução parcial de nucleoproteínas, e com isso contribuir para a ocorrência do emaranhamento de fibras de cromatina entre cromossomos não relacionados (SALAM et al., 1993; TÜRKOĞLU, 2012). Esta alteração é considerada um indício de alta toxicidade, estando intimamente relacionada à frequência expressiva de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

Além disso, a aderência impede a separação completa das cromátides durante a anáfase, indicando um provável evento mutagênico na célula que resulta nas pontes cromossômicas (SALAM et al., 1993). No entanto, nem todas as pontes cromossômicas, especialmente aquelas que aparecem em baixa concentração em estudos que avaliam o efeito de agrotóxicos, são devidas à aderência dos cromossomos, mas podem ser causadas pela quebra e reunião dos cromossomos (FERNANDES et al., 2007).

As perdas cromossômicas e células poliploides também são alterações causadas por substâncias aneugênicas que interferem no aparato normal do fuso mitótico (FERNANDES et al., 2007). Segundo Verma et al. (2018), o carbendazim inibe a polimerização da proteína tubulina interferindo na formação dos microtúbulos que constituem o fuso mitótico. Dessa maneira, a ocorrência de perdas cromossômicas nos tratamentos utilizando o fungicida sugere que a formação do fuso foi alterada pela ação do carbendazim (VERMA et al., 2018).

A avaliação de alterações no ciclo celular pode indicar o mecanismo de ação da substância testada, que pode ser clastogênico, quando a quebra do cromossomo resulta em danos como pontes e fragmentos cromossômicos, ou de efeito aneugênico, caracterizado pela segregação anormal dos cromossomos que resultam em danos como perdas cromossômicas, aderências cromossômicas, c-metáfases, multipolaridade e atraso (FERNANDES et al., 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; FREITAS et al., 2016). Desse modo, os fungicidas azoxistrobina e carbendazim apresentaram modo de ação aneugênico e clastogênico, uma vez que esses tipos de alterações foram observados após a exposição das células aos tratamentos.

As concentrações dos fungicidas também causaram estresse oxidativo, que pôde ser observado a partir do aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD, e na GSH, em relação ao controle nas amostragens realizadas. Esses resultados podem indicar uma resposta inicial da planta à presença de contaminantes, considerando o papel dessas enzimas na proteção a radicais livres e xenobióticos (SINGH et al., 2004; ANDRADE-VIEIRA et al., 2011).

As SODs são consideradas enzimas da primeira linha de defesa das plantas contra os efeitos tóxicos das EROs (radicais livres), e catalisam a dismutação de dois radicais O_2^- , gerando O_2 e H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010). Considerando a alta toxicidade do H_2O_2 para a integridade celular, devido ao seu caráter oxidante, este necessita de uma rápida neutralização, sendo este papel exercido pela ação da CAT e da APX (MISHRA et al., 2006; SHARMA et al., 2012; CHIU-YUEH et al., 2019). Dessa forma, a liberação do H_2O_2 constitui um sinal sistêmico para a indução da atividade dessas enzimas, que atuam no importante processo de desintoxicação celular. Além disso, a CAT atua independentemente de agente redutor, sendo eficiente energeticamente na remoção de H_2O_2 , sobretudo em concentrações elevadas dessa ERO que caracteriza estresse severo (GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012; CHIU-YUEH et al., 2019).

Dessa forma, o aumento da produção destas enzimas antioxidantes pelas células de *L. sativa* pode ter ocorrido devido ao possível aumento da produção de EROs e estresse oxidativo causado pela exposição ao azoxistrobina e carbendazim. Segundo Aragão (2017), a produção de EROS induzida pela exposição a fungicidas pode ser um mecanismo de defesa dos organismos contra esses agroquímicos, e, nesse caso, a produção acima de determinado nível pode cessar o desempenho do papel protetor das enzimas antioxidantes, e induzir até mesmo a morte celular (BELENKI et al., 2013).

Além disso, as EROs produzidas pelo metabolismo celular podem causar danos a várias estruturas da célula, como membranas, proteínas e DNA (KOHANSKI et al., 2007), sendo induzindo 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).

Segundo Kim et al. (2007), o mecanismo de ação do azoxistrobina é a inibição específica da respiração mitocondrial, bloqueando a transferência de elétrons entre o citocromo b e citocromo c1 no sítio de oxidação do ubiquinol (Qo) do complexo III da cadeia transportadora de elétrons. Dessa maneira, o azoxistrobina pode causar estresse oxidativo celular induzido por elétrons saindo da cadeia respiratória (JIANG et al., 2018), como relatado por Han et al. (2016), onde o fungicida causou estresse oxidativo aumentando as EROs, induzindo atividade da CAT e alterando a atividade da SOD no invertebrado zebrafish.

Chiu-Yueh al. (2019) também afirmam que APX e CAT estão envolvidas no sistema antioxidante para proteger contra EROs induzidas por estresse. Os autores avaliaram o efeito do azoxistrobina em mudas de trigo sob calor extremo, e afirmam que o fungicida não teve efeito protetor contra a alta temperatura, e danificou o sistema antioxidante das folhas das plantas avaliadas, induzindo aumento da atividade da APX e CAT nas concentrações mais altas.

Além de interferir no índice mitótico, causar alterações cromossômicas, e induzir estresse oxidativo em *L. sativa*, os fungicidas azoxistrobina e carbendazim também interferiram na fisiologia fotossintética de *P. vulgaris*. A análise do índice total de clorofila realizada em *P. vulgaris* exposta às concentrações do carbendazim demonstrou que o fungicida diminuiu o teor de clorofila das folhas de *P. vulgaris* tratadas com o fungicida. Em relação ao azoxistrobina, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o CN.

As clorofilas são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH, por isso, estão intimamente relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, ao seu crescimento e adaptabilidade a diferentes ambientes. No metabolismo vegetal as clorofilas são constantemente sintetizadas e destruídas por meio de processos bioquímicos influenciados por fatores internos e externos (QUEIROZ et al, 2012). Entretanto, Kalaji et al. (2012) sugerem que os teores de pigmentos não expressam a estrutura do aparelho fotossintético nem informam a capacidade fotoquímica das plantas. E afirmam que a fluorescência da clorofila a é a forma mais confiável e simples para determinar a eficiência do transporte de elétrons e, a capacidade da atividade fotoquímica das plantas.

Em relação ao teste OJIP, observou-se aumento da indução de fluorescência na etapa O-J para ambos fungicidas, o que evidenciou a ineficiência na capacidade de redução da primeira quinona do lado aceptor de elétrons do FSII (Q_A), sendo que o azoxistrobina também aumentou a indução de fluorescência na etapa J-I, que está envolvida com a redução dos transportadores de elétrons do inter-sistema, como a quinona secundária (Q_B), pool de plastoquinona (PQ), o citocromo b6f e a plastocianina.

Chiu-Yueh et al. (2019) avaliaram os efeitos fisiológicos do azoxistrobina em mudas de trigo sob calor extremo, e constataram que os impactos do fungicida na fluorescência da clorofila deve-se ao bloqueio do transporte de elétrons entre PSII e PSI, devido à combinação da estrobilurina e Q_i no complexo citocromo b6f nos cloroplastos. Dessa maneira, os resultados encontrados no presente trabalho sugerem que o azoxistrobina pode estar atuando inibindo a cadeia de transporte de elétrons em nível de pool de plastoquinona (PQ) e/ou complexo citocromo b6f, considerando que o mesmo possui mecanismo de ação que atua no bloqueio de elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.

Por meio do teste JIP, avalia-se parâmetros como o PI_{abs} , que foi introduzido com um termo para expressar toda a atividade do FSII, sendo o produto de ϕP_0 , ΨE_0 e $\gamma RC/(1 - \gamma RC)$, ou seja, um desbalanço em um destes pode ocasionar um maior ou menor valor para esse índice (STRASSER et al., 2010). Dessa maneira, observou-se que após a aplicação do azoxistrobina e carbendazim, o índice de desempenho total (PI_{total}) pode ter apresentado resultados abaixo da média em todas as concentrações testadas, por consequência do menor desempenho do FSII (PI_{abs}).

O menor desempenho do FSII pode estar relacionado com a diminuição do fluxo de absorção de energia por centro de reação (ABS/RC), ou seja, as concentrações avaliadas de ambos fungicidas interferiram na absorção de energia pelos FSII das plantas de *P. vulgaris*, assim como no trabalho de Chiu-Yueh et al., (2019), que relataram que o azoxistrobina causa dano aos fotossistemas, o que pode influenciar a absorção de energia da planta.

8. CONCLUSÕES

As concentrações avaliadas do azoxistrobina e carbendazim reduziram o crescimento radicular e o índice mitótico, aumentaram a frequência de alterações cromossômicas em *L. sativa*, sendo mais frequentes aderências, perdas e pontes cromossômicas. Portanto, ambos fungicidas podem ser considerados fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos, além de apresentarem mecanismo de ação aneugênico e clastogênico.

Além disso, concentrações dos fungicidas testados aumentaram a atividade das enzimas CAT, SOD e APX, e a GSH, induzindo estresse oxidativo em *L. sativa*. Em relação aos efeitos sobre a fotossíntese, observou-se que o carbendazim interferiu no índice de clorofila de *P. vulgaris*, ambos fungicidas aumentaram a indução de fluorescência na etapa O-J da curva OJIP, sendo que o azoxistrobina também afetou a etapa J-I, e, segundo os resultados do teste JIP, ambos fungicidas afetaram a absorção de energia pelos fotossistemas II de *P. vulgaris*.

Observou-se que a concentração do azoxistrobina e do carbendazim utilizada na agricultura, e, inclusive, concentrações abaixo do recomendado, provocaram danos toxicogénéticos, bioquímicos e fisiológicos nos testes realizados. Sendo assim, estudos como o apresentado aqui são importantes para alertar sobre o uso indiscriminado de agrotóxicos, e seu impacto no DNA, bioquímica e fisiologia de organismos vegetais.

9. REFERÊNCIAS

AKYIL, D.; OZKARA, A.; ERDOGMUS, S. F.; EREN, Y.; KONUK, M.; SAGLAM, E. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Benodanil by using *Allium* and Micronucleus assays. **Drug Chemical Toxicology**, 3, 1–6. 2015.

ALVES, V. M., et al. Efeitos fisiológicos e produtividade de grãos decorrentes da aplicação de fungicidas em híbrido de milho transgênico. **XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo** “Milho e Sorgo: Inovações, mercados e segurança alimentar”. Bento Gonçalves – RS, 2016.

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.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology And Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.

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.; FERREIRA, M. F. S.; BERNARDES, P. M.; OLIVEIRA, W. B. S. Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. **Tópicos Especiais em Produção Vegetal III**. 1. ed. Alegre: UFES. v. 3, p. 39-79, 2012.

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, n. 1, p. 373-382, 2014.

ANVISA. 2012. **A regulação e o mercado de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/atividadelegislativa/comissoes/comissoes/perman>

entes/audiencias-publicas/audiencias-2012/anvisa>. Acesso em: 18 de jul. de 2018.

ANVISA. 2016. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117818/>>. Acesso em: 20 de abril de 2018.

ANVISA. 2018. **Guia para elaboração de rótulo e bula de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4016300/GUIA++Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+R%C3%B3tulo+e+Bula++vers%C3%A3o+28-92017+DIARE.pdf/85a0fb5f-a18b-478cb6eae6ae58d9202a?version=1.0>>. Acesso em: 21 de junho de 2019.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-99, 2004.

ARAGÃO, F.B.; PALMIERI, M.J.; FERREIRA, A.; COSTA, A.V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P.F.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAGÃO, F. B. Prospecção da toxicidade e atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa*. **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2017. 93p.

ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation**, v. 65, n. 2, 2017.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 141, n. 2, p. 391-396, 2006.

ATLAS DO AGRONEGÓCIO. **Fatos e números sobre as corporações que controlam o que comemos**. Fundação Rosa Luxemburgo. Editora Atlas Manufaktur. Rio de Janeiro, 2018.

AUGUSTO L. G. S. et al. Saúde, ambiente e sustentabilidade. In: CARNEIRO F. F., et al (Org(s)). **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2015.

BAKER, N.R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biology*, v. 59, p. 89-113, 2008.

BANYIOVA K. et al. New experimental data on the human dermal absorption of simazine and carbendazim help to refine the assessment of human exposure. **Chemosphere**. 145:148–156. 2016.

BARTLING, D.; RADZIO, R.; STEINER, U.; WEILER, E. W. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 216, n. 2, p. 579-86, set., 1993.

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 Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 7, p. 1-11, 2015.

BEUTLER, E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. **Grune & Stratton**, p. 8-18, 1975.

BOUDINA, A; EMMELIN, C.; BAALIOUAMER, A.; GRENIER-LOUSTALOT, M. F.; CHOVELON, J. M. Photochemical behaviour of carbendazim in aqueous solution. **Chemosphere**, v. 50, p. 649-655, 2003.

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.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A Química dos Agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, nº 1, p. 10-15, 2012.

CAMPOS, J. M. S. et al. Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. In: _____. **Plantbioassays**. Houston: Studium. 344 p, 2008.

CAO, F. et al. Reproductive toxicity of azoxystrobin to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Environ. Pollut.** 219, 1109-1121, 2016.

CASSOL, D. et al. An evaluation of non-destructive methods to estimate total chlorophyll content. **Photosynthetica**, 46.4: 634, 2008.

ÇELIK, T.A. et al. Cytotoxic 323 and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. **Biologia**. Berlin, v. 62, n. 3, p. 292-296, 2007.

CHEN, S.; YANG, J.; ZHANG, M.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. Classification and characteristics of heat tolerance in *Ageratina adenophora* populations using fast chlorophyll a fluorescence rise OJIP. **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 126-140, 2016.

CHIU-YUEH, L., et al. Physiological Effects of the Fungicide Azoxystrobin on Wheat Seedlings under Extreme Heat. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, 47.3: 683-690, 2019.

CIESLIK, L. F. Interferência de fatores morfoambientais e horários de aplicação de fluazifop-p-butyl e fomesafen no controle de infestantes, seletividade e lucratividade da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*). **(Dissertação) Mestrado em Agronomia**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2012.

COUTINHO, C.F.B. et al. Carbendazim e o meio ambiente: Degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**. Curitiba, v. 16, p. 63-70. 2006.

COSTA, J. da S. Compatibilidade de fungicidas e inseticidas no tratamento de sementes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris L.*) associadas ou não a polímeros: relatório técnico. **Embrapa Arroz e Feijão-Documentos** (INFOTECA-E), 2001.

COSTA, A. V. et al. Synthesis of Novel Glycerol-Derived 1, 2, 3-Triazoles and Evaluation of Their Fungicide, Phytotoxic and Cytotoxic Activities. **Molecules**, Gotemburgo, v. 22, n. 10, p. 1666, 2017.

DUARTE, I. D. Rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil): Avaliações ecofisiológicas e toxicogenéticas em amostras de água, sedimento e elutriato do sedimento. **Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, 2017.

DUDLER, R.; HERTIG, C.; REBMANN, G.; BULL, J.; MAUCH, F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione S-transferases. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, USA, v. 4, n. 1, p. 14-18, jan./fev., 1991.

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.

FATMA, F.; VERMA, S.; KAMAL, A.; SRIVASTAVA, A. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using +++ assay. **Chemosphere**, 195, 864–870. 2018.

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

FERNANDES T.; YUYAMA P.; MORAES A. P.; VANZELA A.L. An uncommon H3/Ser10 phosphorylation pattern in *Cestrum strigilatum* (Solanaceae), a species with B chromosomes. **Genome** 51:772-777. 2008.

FERNANDES, C. P. C. et al. Tolerância do feijoeiro a herbicidas aplicados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, 10.2: 121-133, 2011.

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

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. Comparative effects of four herbicides on nonphotochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 159-168, 2003.

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**. San Diego, v. 124, p. 426-434, 2016.

GALTER, I. N. Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos – Alegre, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2016. 88p.

GARANZINI, D. S. et. al. Azoxystrobin causes oxidative stress and DNA damage in the aquatic macrophyte *Myriophyllum quitense*. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 94, n. 2, p. 146-151, 2015.

GEOFFROY, L.; FRANKART, C.; EULAFFROY, P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**, v. 131, p. 233-241, 2004.

GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. **Embrapa Meio Ambiente**. 2ª edição. Mogi Mirim, SP. 2002.

GIARDI, M.T.; KOBLÍZEK, M.; MASOJÍDEK, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 1027-1033, 2001.

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.

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

GUERRA, M. dos S. (Ed.) **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 8-12, 1988.

HAGHIGHI, M. et. al. Humic acid decreased hazardous of cadmium toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 72, p. 49-61, 2010.

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

HAN, Y. et al. Genotoxicity and oxidative stress induced by the fungicide azoxystrobin in zebrafish (*Danio rerio*) livers. **Pestic. Biochem. Physiol.** 133, 13-19, 2016.

HONG, J. et. al. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 1, p. 177-185, 2015.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, Â. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUTSON, D. H., JEWESS, T. R. Carbendazim. **Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry**, 1999.

IBAMA. 2016. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/#boletinsanuais>>. Acesso em: 18 de jul. de 2018.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Posicionamento do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva acerca dos agrotóxicos**. Brasil, 2015. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//posicionamento-do-inca-sobre-os-agrotoxicos-06-abr-15.pdf>>. Acesso em: 20 out. 2019.

JIANG, J. et al. Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. **Chemosphere**, v. 202, p. 56-64, 2018.

KALAJI, H.M.; GOLTSEV, V.; BOSA, K.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; STRASSER, R.J.; Govindjee. Experimental in vivo measurements of light emission in plants: a perspective dedicated to David Walker. **Photosynthesis Research**, v.114, n.2, p.69-96, 2012.

KALAJI, H.M. et al. Chlorophyll fluorescence as a tool for nutrient status identification in rapeseed plants. **Photosynthesis Research**. v.14, n.5 p.124-131, 2017a.

KALAJI, H.M. et al. Chlorophyll a fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Photosynthesis Research**, v.132, p.13–66, 2017b.

KANUNGO, M.; JOSHI, J. Impact of Pyraclostrobin (F500) on crop plants. **Plant Science Today**, Trivandrum, n. 1, v. 3, p. 174-178, 2014.

KIM, J. H. et al. Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response. **Lett. Appl. Microbiol.** 45, 134-141, 2007.

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

KOSHIBA, T. Cytosolic ascorbate peroxidase in seedlings and leaves of maize (*Zea mays*). **Plant and Cell Physiology**, 34.5: 713-721. 1993.

KREUZ, K.; TOMMASINI, R.; MARTINOIA, E. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 111, n. 2, p. 349-53, jun., 1996.

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

KUCHY, A. H.; WANI, A. A.; KAMILI, A. N. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, 23, 6895–6906. 2016.

KUSSUMI, T. A. Desenvolvimento de método multirresíduo para determinação de pesticidas benzimidazóis, carbamatos e triazinas em milho por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem e sua certificação. **Dissertação (Mestrado em Ciências, Área de Tecnologia Nuclear – Materiais)**. Universidade de São Paulo, SP. 2007.

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

LI, X.; ZHANG, L. Endophytic infection alleviates Pb²⁺ stress effects on photosystem II functioning of *Oryza sativa* leaves. **Journal of Hazardous Materials**, v. 295, p. 79–85, 2015.

MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MEREL, S. et al. Occurrence and overlooked sources of the biocide carbendazim in wastewater and surface water. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 512-521, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2019. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/11294-quantidade-de-agrotoxico>> Acesso em: 02/06/2019.

MISHRA, S. et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere** 65, 1027–1039, 2006.

MORAES, R. M.; SANTOS FILHO, P. R.; CARVALHO, M.; NOGUEIRA, M. L.; BARBOSA, S. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.

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.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger **Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: Worth, 2005. 1200 p.

NITHYAMEENAKSHI S.; JEYARAMRAJA P.R.; MANIAN S. Cytotoxicity of the Fungicides Azoxystrobin and Difenoconazole in Root Tips of *Allium cepa* L. **Asian Journal of Cell Biology**. Volume 1 (1): 65-80, 2006.

NORTOX, 2018. Nortox S/A. **Bula comercial do produto Carbendazim**. Disponível em:<<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/carbendazimnortox.pdf>> Acesso em: 21/06/2019.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, n. 2, p. 161-167, 1997.

OECD - Organization For Economic Cooperation And Development **Guidelines For The Testing Of Chemicals**. Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 2006.

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

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut**. Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PAUL, A.; NAG, S.; SINHA, K. Cytological effects of blitox on root mitosis of *Allium cepa* L. **International Journal of Scientific and Research Publications**, 3(5), 1-7. 2013.

PEREIRA, M.P.; PEREIRA, F.J.; RODRIGUES, L.C.A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 7, n. 1, p. 36-46, 2013.

PERES, F. et al. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: **É veneno ou é remédio: Agrotóxico, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003.

PRIOR, R.; MITTELBAACH, M.; BEGEROW, D. Impact of three different fungicides on fungal epi-and endophytic communities of common bean (*Phaseolus vulgaris*) and broad bean (*Vicia faba*). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 52.6: 376-386, 2017.

QUEIROZ, N.L.; ROCHA, M.S.; ROCHA, M.S.; BELTRÃO, N.E.M., MENDES, B.S.S. Teor De Pigmentos Fotossintetizantes Nas Folhas Em Seis Linhagens De Algodoeiro Herbáceo. Congresso Brasileiro De Mamona. 5º Simpósio Internacional De Oleaginosas Energéticas & I Fórum Capixaba De Pinhão Manso, 2012, Guarapari. Desafios e Oportunidades: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, p. 194, 2012.

RAMA E. M. et. al. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim. **Regul Toxicol Pharmacol** v. 69, p. 476-486, 2014.

RIGOTTO, R. M. et. al. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro 30 (7):1–3. 2014.

RODRIGUES, M. A. T. Avaliação do efeito fisiológico do uso de fungicidas na cultura de soja. **Tese (Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Fitotecnia)** – Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2009.

RODRIGUES, E. T. et al. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review. **Environment international**, v. 53, p. 18-28, 2013.

SALAM, A. E. A. et al. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Guelph, v. 319, n. 2, p. 89-101, 1993.

SANTIAGO, J. de A. Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotogênica e citogenotóxica. **Tese (Doutorado em Agroquímica e Agrobioquímica)**. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2015.

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v.156, p. 103-110, 2000.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, jul., 2005.

SCHREIBER, G. et al. CommonKADS: A comprehensive methodology for KBS development. **IEEE expert**, 9.6: 28-37, 1994.

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012.

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.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 178, p. 359-367, 2017.

SINDIVEG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal (2016). **Sindiveg: Setor de defensivos agrícolas registra queda nas vendas**. Disponível em: <<http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolasregistra-queda-nas-vendas-em-2016/>>. Acesso em: 21/06/2019.

SINGH, S. et al. Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. **Chemosphere** 57, 91–99, 2004.

SINGH, S. et al. Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. **Environmental chemistry letters**, v. 14, n. 3, p. 317-329, 2016.

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**. Florence, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

STIRBET, A.; RIZNICHENKO, YU G.; RUBIN, A. B.; GOVINDJEE. Modeling Chlorophyll a Fluorescence Transient: Relation to Photosynthesis. **Biochemistry**. vol. 79, n. 4, 2014.

STIRBET A; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 104, p. 236-257, 2011.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: the JIP-test. In: MATHIS, P. (Ed.). **Photosynthesis: from light to biosphere**. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, p. 977-980, 1995.

STRASSER, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the fluorescence transient. **Chlorophyll fluorescence: A signature of photosynthesis**. Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Springer: Dordrecht, p. 321-362, 2004.

STRASSER, R. J., TSIMILLI-MICHAEL, M., QIANG, S., GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820 nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant

Haberlea rhodopensis. Biochim. **Biophys. Acta (BBA) – Bioenerg.**, p.1313-1326, 2010.

ȘUTAN, N. A.; POPESCU, A.; MIHAESCU, C.; SOARE, L. C.; MARINESCU, M. V. Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide ridomil in *Allium cepa* L. Analele Științifice ale Universității, Al. I. Cuza Iași s. II a. **Biologie vegetală**. 60(1), 5–12. 2014.

SYNGENTA, 2018. Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. **Bula comercial do produto Piori (Ingrediente ativo: Azoxistrobina)**. Disponível em: https://www.syngenta.com.br/sites/g/files/zhg256/f/piori_0.pdf?token=1562329140. Acesso em: 21/06/2019.

TAIZ, L., et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.

TRUTA, E.; CAPRARU, G.; ZAMFIRACHE, M. M.; ASAFTEI, M.; TOMA, C.; OLTEANU, Z.; IVANESCU, L. Estimation of genotoxic potential of carbendazim in fenugreek. Studia Universitatis “Vasile Goldiș”, **Seria Științele Vieții**, 20(2), 39–44. 2010.

TÜRKOĞLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide biochemistry and physiology**, Massachusetts, v. 103, n. 3, p. 224-230, 2012.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines**. OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, EPA 712-C-96-154, 2012.

VEIGA, J. S. Análise dos efeitos secundários decorrentes da aplicação de fungicidas sistêmicos à cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). **Dissertação de Mestrado em Agronomia**, Área de concentração: Fitopatologia. Universidade de São Paulo – USP, 2009. 100p.

VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, 2018.

WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D. T. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, p. 175-180, 2003.

XIANG, Q.; WANG, Z.; ZHANG, Y.; WANG, H. An oligopeptide transporter gene family in *phanerochaetechrysosporium*. **Gene** **522(2)**. p.133-141, 2013.

YOUNG, B.J.; RIERA, N.I.; BEILY, M.E.; BRES, P.A.; CRESCO, D.C.; RONCO, A.E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics**, v.1797, p.1428-1438, 2010.

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

ZHANG, M. P.; ZHANG, C. J.; YU, G. H.; JIANG, Y. Z.; STRASSER, R. J.; YUAN, Z. Y.; CHEN, G. X. Changes in chloroplast ultra-structure, fatty acid components of thylakoid membrane and chlorophyll a fluorescence transient in flag leaves of a super-high-yield hybrid rice and its parents during the reproductive stage. **Journal of plant physiology**, v. 167, p. 277-285, 2010.