

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

**KRISTIAN RODOLFO SANTOS**

**EFEITO TOXICOGENÉTICO, BIOQUÍMICO E ANATÔMICO DO  
HERBICIDA CLETHODIM NO SISTEMA DE *ALLIUM CEPA* L**

VITÓRIA

2020

KRISTIAN RODOLFO SANTOS

**EFEITO TOXICOGENÉTICO, BIOQUÍMICO E ANATÔMICO DO  
HERBICIDA CLETHODIM NO SISTEMA DE *ALLIUM CEPA* L**

Dissertação 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.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Silvia Tamie Matsumoto

Coorientador (a): Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Camilla Rozindo Dias  
Milanez

VITÓRIA - ES

2020

Kristian Rodolfo Santos

**“EFEITO TOXICOGENÉTICO, BIOQUÍMICO E ANATÔMICO DO  
HERBICIDA CLETHODIM NO SISTEMA DE ALLIUM CEPA L.”**

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

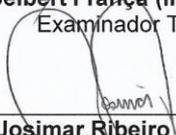
Aprovada em 28 de fevereiro de 2020.

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto (UFES)**  
Orientadora e Presidente da Comissão Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
**Prof.ª Dr.ª Camilla Rozindo Dias Milanez (UFES)**  
Coorientadora

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Hildegardo Seibert França (IFES/PPGBV)**  
Examinador Titular Interno

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Josimar Ribeiro (CCE/UFES)**  
Examinador Titular Externo

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, pela qualidade de ensino e infraestrutura.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao corpo docente e a todos os discentes e profissionais do Programa de Pós graduação em Biologia Vegetal, por todos os momentos compartilhados.

Agradeço especialmente a Professora Dr<sup>a</sup> Silvia Tamie Matsumoto, por todo o suporte durante essa etapa.

Aos membros da banca, por todas as considerações construtivas.

A todos os amigos do GEMUT (Iasmini, Kalia, Francielen, Enzo, Monique, Mariana, Livia, Edvar) que me ajudaram direta e indiretamente na realização desse trabalho. Obrigado por todos os momentos compartilhados, pela parceria, momentos descontraídos e felizes.

Agradeço ao LABAV, especialmente a Hiulana e o Ricardo por toda ajuda e paciência.

A Professora Dr<sup>a</sup> Camila Rozindo pela coorientação e toda a contribuição para o trabalho.

Aos meus amigos que estavam de “ouvidos abertos” para me ouvir e aconselhar nos momentos mais difíceis

A minha família que mesmo de longe sempre me deram todo o suporte, carinho, forças e amor.

A Deus, por todas as oportunidades e por sempre me fortalecer diante de todos os problemas e dificuldades.

## RESUMO

Os agrotóxicos são compostos que possuem variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos desenvolvidos de forma a potencializar uma ação biocida. Seu uso está correlacionado com a economia mundial e com o aumento da produtividade agrícola, porém os riscos de sua utilização acarretam danos para a saúde e meio ambiente. Clethodim é um herbicida de ação gramínida pós emergente e sistêmico, altamente seletivo para culturas de algodão, café, cebola, cenoura, soja, dentre outras. Os efeitos dos agrotóxicos podem se manifestar a curto ou a longo prazo, causando alterações fisiológicas ou genéticas de estruturas celulares. Assim, diversos métodos de avaliação têm sido desenvolvidos para compreender as propriedades e mecanismos de ação desses químicos. O trabalho objetivou avaliar os efeitos do herbicida Clethodim, por meio do modelo vegetal *Allium cepa*. Sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri com os tratamentos contendo as concentrações; 1,92 g/L, 0,96 g/L, 0,48 g/L, 0,24 g/L, 0,12 g/L e 0,06 g/L do herbicida até atingirem aproximadamente de 1 a 2 mm de comprimento cada um. A trifluralina (0,84 g/L) foi utilizada como controle positivo (C+) e água destilada como controle negativo (C-). Foram realizadas análises de germinação, crescimento radicular, avaliação do potencial citotóxico por meio da análise de ciclo celular (índice mitótico, alterações cromossômicas (AC) e nucleares (AN), avaliação do estresse oxidativo por meio da quantificação das enzimas antioxidantes; Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbato peroxidase (APX) e avaliação de alterações anatômicas causadas as plântulas. Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilks e submetidos a ANOVA, seguidas por comparação entre os tratamentos pelos testes de Tukey, Teste T e Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ). Os resultados demonstram que houve inibição significativa do índice germinativo nas concentrações 1,92 g/L, 0,96 g/L e 0,48 g/L pelo princípio ativo clethodim. Para o crescimento radicular foi possível observar diminuição significativa do crescimento das raízes nas concentrações mais elevadas; 1,92 g/L, 0,96 g/L e 0,48 g/L. Para análise do ciclo celular, apenas a concentração de 1,92 g/L apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos e para as fases do ciclo celular não foi observado diferença estatística significativa entre os tratamentos. A análise do estresse oxidativo demonstrou que houve aumento significativo da atividade enzimática para a CAT nas concentrações: 1,92 g/L, 0,96 g/L e APX nas concentrações: 1,92 g/L, 0,96 g/L, 0,48 g/L. Também foi observado aumento no número de nucléolos nos núcleos interfásicos, além de atraso na diferenciação celular identificado por análises anatômicas nas concentrações: 1,92 g/L, 0,48 g/L e 0,06 g/L. Diante dos testes observou-se que o herbicida clethodim foi fitotóxico por inibir o índice de germinação e o crescimento radicular, genotóxico por aumentar a ocorrência de alterações nucleares, além de ter alterado a atividade enzimática e diferenciação celular.

**Palavras-chave:** Cebola. Citogenotoxicidade. Estresse Oxidativo. Herbicida. Mutagênese.

## ABSTRACT

Pesticides are compounds that have a variety of chemical substances or biological products developed to enhance biocidal action. It is known that its use is correlated with the world economy and with the increase in agricultural productivity, but the risks of its use cause damage to health and the environment, harming the existing biota. Clethodim is a post emergent and systemic graminicidal action herbicide, highly selective for cotton, coffee, onion, carrot, soybean crops, among others. The effects of pesticides can manifest in the short or long term, causing physiological or genetic changes in cellular structures. Thus, several evaluation methods have been developed to understand the properties and mechanisms of action of these chemicals. The work aimed to evaluate the effects of the herbicide Clethodim, using the vegetable model *Allium cepa*. *A. cepa* seeds were germinated in Petri dishes with the treatments containing the concentrations; 1,92 g / L, 0,96 g / L, 0,48 g / L, 0,24 g / L, 0,12 g / L and 0,06 g / L of the herbicide until they reach approximately 1 to 2 mm in length. Trifluralin (0.84 g / L) was used as a positive control (C +) and distilled water as a negative control (C-). Analyzes of germination, root growth, evaluation of cytogenotoxic potential by means of cell cycle analysis (mitotic index, chromosomal (AC) and nuclear (AN) changes, evaluation of oxidative stress by quantifying antioxidant enzymes; Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT), Ascorbate peroxidase (APX) and evaluation of anatomical changes caused by seedlings. The data were analyzed by the Shapiro-Wilks test and submitted to ANOVA, followed by comparison between the treatments by the Tukey tests, Test T and Kruskal Wallis ( $P < 0.05$ ). The results demonstrate that there was a significant inhibition of the germinative index in the concentrations 1,92 g / L, 0,96 g / L and 0,48 g / L by the active ingredient clethodim. For root growth it was possible to observe a significant decrease in root growth at the highest concentrations. For the analysis of the cell cycle, only the concentration of 1,92 g / L showed a significant increase in the frequency of micronuclei and for the phases of the cell cycle there was no statistical difference between treatments. The analysis of oxidative stress showed that there was a significant increase in enzyme activity for CAT in the concentrations: 1,92 g / L, 0,96 g / L and APX in the concentrations: 1,92 g / L, 0,96 g / L, 0,48 g / L. An increase in the number of nucleoli in the interphasic nuclei was also observed, in addition to a delay in cell differentiation identified by anatomical analyzes. In the face of the tests it was observed that the herbicide clethodim was phytotoxic for inhibiting the germination index and the root growth, genotoxic for increasing the occurrence of nuclear alterations, besides having altered the enzymatic activity and cell differentiation

**Keywords:** Onion. Cytogenotoxicity. Oxidative stress. Herbicide. Mutagenesis

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Índice de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do princípio ativo Clethodim	55
Figura 2: Crescimento radicular de raízes de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do princípio ativo Clethodim.	56
Figura 3: Atividade enzimática da enzima Superóxido dismutase (SOD) em plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do princípio ativo Clethodim.	57
Figura 4: Atividade enzimática da enzima Catalase (CAT) em plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do princípio ativo Clethodim.	58
Figura 5: Atividade enzimática da enzima Ascorbato Peroxidase (APX) em plântulas de <i>Allium cepa</i> expostas a diferentes concentrações do princípio ativo Clethodim	59
Figura 6: Corte transversal em raízes de <i>Allium cepa</i> L exposta a diferentes concentrações do herbicida Clethodim	60
Figura 7: Células de <i>Allium cepa</i> coradas pela metodologia de Feulgen, expostas a diferentes concentrações do herbicida Clethodim	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração (g/L) do princípio ativo do herbicida.....	62
Tabela 2: Parâmetros de divisão celular normal e índice mitótico (IM%) de células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas durante 96 h aos tratamentos com o herbicida Clethodim.....	63
Tabela 3: Alterações cromossômicas e nucleares observadas nas análises citogenéticas realizadas nas células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> exposta durante 96 h ao herbicida Clethodim.....	64

## SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	IX
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Agrotóxicos.....	11
2.1.1 Herbicidas.....	13
2.2 Bioensaios vegetais.....	14
2.2.1 Crescimento radicular e ciclo celular.....	16
2.2.2 Estresse oxidativo.....	18
2.2.3 Análise anatômica da raiz.....	20
3. OBJETIVO GERAL.....	21
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
5.1 Material vegetal.....	21
5.2 Solução teste.....	21
5.3 Análise do índice de germinação e crescimento radicular.....	22
5.4 Análise do ciclo celular.....	22
5.5 Análise do estresse oxidativo.....	24
5.6 Análise anatômica da raiz.....	25
5.7 Análise estatística.....	25
6. REFERÊNCIAS.....	27
7. RESULTADOS.....	37
ARTIGO 1: Efeito toxicogenético, bioquímico e anatômico do herbicida Clethodim no sistema de <i>allium cepa</i> L.....	38

## 1.INTRODUÇÃO

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2018), o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. Existem hoje 366 ingredientes ativos de agrotóxicos registrados pertencentes a mais de 200 grupos químicos distintos (LONDRES, 2011), e de acordo com Pelaez et al. (2010) os herbicidas representam 48% deste mercado, seguidos pelos inseticidas (25%) e pelos fungicidas (22%). De acordo com o Ministério da Agricultura (2019), o número total de agrotóxicos liberados chega em torno de 325.

Os agrotóxicos são compostos que possuem uma grande variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos que foram desenvolvidos de forma a potencializar uma ação biocida (VEIGA, 2007). Londres (2011), destaca que existem dois tipos de intoxicações causadas por agrotóxicos. A primeira é a intoxicação do tipo aguda que consiste no contato recente e direto com o produto químico. O segundo de acordo com a autora é a intoxicação crônica, ocasionada pelo contato direto e prolongado com o produto, que a longo prazo pode gerar problemas tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente.

O Clethodim é um herbicida de ação graminicida pós-emergente e sistêmico pertencente ao grupo químico oxima ciclohexanodiona, altamente seletivo para culturas de algodão, alho, batata, café, cebola, cenoura, soja tomate, dentre outras (Nortox ®). O grupo químico das ciclohexanodionas (CDHs) são inibidores da ACCase (Acetil Coenzima-a) (PEDROLLO et al., 2015). Segundo Burke et al. (2006), os herbicidas desse grupo inibem a síntese de lipídios, interferindo o desenvolvimento das gramíneas. Devido sua alta efetividade e seletividade seu uso torna-se cada vez mais comum.

Os efeitos causados por esses compostos se manifestam na maioria das vezes em longo prazo, causando alterações fisiológicas (SILVEIRA, 2016). Segundo Carson et al. (2010) traços desses defensivos podem permanecer nos alimentos, mesmo após a colheita, o que pode levar a ingestão humana de substâncias potencialmente tóxicas.

Devido ao potencial tóxico apresentado pelos resíduos industriais, domésticos e agrícolas, nos últimos 20 anos tem-se desenvolvido técnicas para avaliação dos efeitos toxicológicos dos mesmos (BADERNA et al., 2011). Dentre

essas técnicas, destaca-se a utilização de organismos vegetais para testar a toxicidade de seus resíduos. De acordo com Monteiro et al. (2007), as plantas são sistemas excelentes para indicar efeitos genotóxicos, proporcionando vantagens no monitoramento e na detecção de possíveis danos genéticos resultantes da exposição a produtos químicos.

Considerando que os herbicidas são os agroquímicos mais utilizados para os cultivos são indispensáveis estudos para caracterização de seu potencial toxicogenético, uma vez que esses estudos possibilitam dimensionar os efeitos de sua periculosidade no ambiente, determinando seu nível de agressão e possibilitando alternativas que diminuam sua aplicação em larga escala.

Sendo assim, a hipótese defendida neste estudo é de que o herbicida Clethodim do grupo químico oxima ciclohexanodiona é capaz de provocar danos, citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e anatômicos em células de plântulas em desenvolvimento de *Allium cepa* L.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Agrotóxicos**

Segundo a Lei 7.802/89 agrotóxicos são definidos como: “os produtos e 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 fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.” (BRASIL, 1989). De acordo com Pelaez et al. (2010) a classificação quanto o uso do agrotóxico é definido pela ação do ingrediente ativo sobre o organismo-alvo, como: inseticidas, herbicidas, nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscidas, formicidas, reguladores e inibidores de crescimento.

O uso de agrotóxicos vem aumentando de forma exponencial e os efeitos de sua utilização podem ocorrer a curto ou a longo prazo (LONDRES, 2011). De acordo com Londres (2011) os indivíduos que permanecem em contato direto

com os agrotóxicos no campo estão mais sujeitos a exposição aos perigos de sua contaminação, e também os trabalhadores por meio do contato indireto ao realizar capinas, roçadas, colheitas etc. Parte dos agrotóxicos utilizados tem a capacidade de se dispersar no ambiente e a outra parte pode se acumular no organismo humano, inclusive no leite materno (CASSAL et al., 2014).

Além dos riscos para a saúde humana, esses químicos podem causar danos ao meio ambiente. Segundo Aragão, (2017) durante a aplicação dos agrotóxicos, os mesmos podem sofrer dispersão ou degradação, na maioria das vezes eles são volatizados e acabam sendo lixiviados para os corpos d'água locais podendo ainda contaminar águas subterrâneas.

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2018), o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos em número absoluto. O relatório divulgado pela organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) evidenciou que o total de defensivos agrícolas utilizados por hectare cultivado no país no ano de 2016 foi de 4,31 quilos, de acordo com o relatório esse total de defensivos utilizado é devido ao número de safras no país, havendo a necessidade de sua utilização para o controle da produção.

Londres (2011) destaca que há no Brasil 366 princípios ativos de uso agrícola registrados utilizados como matéria prima para produtos. Dados do Ministério do Meio Ambiente apontam que até maio de 2019 169 agrotóxicos foram registrados, sendo que 48% classificados como alto ou extremamente tóxicos.

Sabe-se que o uso de agroquímicos estão correlacionados com a economia mundial e com a aumento da produtividade, porém os riscos de sua utilização acarretam danos para a saúde e meio ambiente, tanto de forma direta quanto indireta. De acordo com o Relatório de Análise de resíduos de Agrotóxicos em alimentos (PARA) da ANVISA para detecção de resíduos de agrotóxicos, realizado de 2013 a 2015, foram analisadas 12.051 amostras de alimentos, desse total 2.371 (19,7 %) foi insatisfatória, contendo presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura.

### **2.1.1 Herbicidas**

Herbicidas são agentes biológicos ou substâncias químicas capazes de matar ou suprimir o crescimento de espécies específicas (ROMAN et al., 2005). De acordo com os autores esses químicos possuem locais específicos de ação, chamados de sítios de ação, onde se ligam inibindo funções vitais da planta. Esses sítios possuem uma gama de enzimas que ao entrarem em contato com a molécula de herbicida tem suas reações bioquímicas afetadas. Segundo Karam et al. (2018), a utilização de herbicidas pelos agricultores como ferramenta de controle para plantas daninhas tem se tornado frequente devido a sua praticidade, eficiência e economia.

Os herbicidas são classificados de acordo com seu mecanismo de ação, ou seja, onde o herbicida irá atuar para matar a planta daninha (KARAM et al., 2018). Atualmente existem três classificações de mecanismos de ação dos herbicidas de acordo com o Serviço Internacional de Sistemas de Classificação de Ação de Herbicidas. Em 1990 foi criado um sistema de classificação de ação de herbicidas que foi publicado em 1991 por meio de uma ficha técnica com dois grupos principais: Grupo 1 = Inibidores da ACCase e Grupo 2 = Inibidores da Acetolactato sintase (ALS).

Essa ficha técnica serviu de base para a criação dos três sistemas utilizados para classificação de Ação dos herbicidas. São eles: O sistema de classificação Weed Science Society of America (WSSA) usado apenas nos Estados Unidos da América e no Canadá. O sistema de classificação australiano (AUSSIE), usado apenas na Austrália e o Herbicide Resistance Action Committee (HRAC) usado em todos os outros países, incluindo o Brasil.

O herbicida Clethodim pertence ao grupo químico dos ciclohexanodiona (DIMs) utilizados para o controle de gramíneas anuais e perenes, em condições de pós emergência e registrado para diversas culturas dicotiledôneas (ARYSTA, 2015). Segundo dados da Anvisa sua classificação toxicológica pertence a Classe II.

De acordo com Costa (2016) clethodim atua inibindo a enzima acetil-coenzima-A Carboxilase (ACCase), encontrada no estroma de plastídios. Segundo Yu et al. (2007) Acetil-CoA carboxilase é uma enzima chave envolvida

no primeiro passo da biossíntese dos ácidos graxos, tornando-se alvo para utilização de herbicidas. Nas plantas existem duas isoformas da ACCase: O ACCase plastídico essencial na biossíntese de ácidos graxos e o ACCase citosólico envolvida na biossíntese de ácidos graxos de cadeia longa (YU et al., 2007).

Alguns estudos demonstram a atividade de alguns herbicidas como a trifluralina, em seres vivos. Fernandes (2005) descreveu que o herbicida trifluralina caracteriza-se como uma substância de grande toxicidade em peixes, além de causar alterações em células de *Allium cepa*, inviabilizando-as: Koifman e Hatagima (2003) destacam que muitos agrotóxicos apresentam atividade capaz de causar desregulação do equilíbrio endócrino de seres humanos e animais, tendo sua exposição associada a cânceres, modificações na razão entre sexos ao nascimento, infertilidade, má-formações congênitas dentre outras.

Brêda-Alves et al. (2019) realizam estudos com o herbicida clethodim em duas espécies de cianobactérias, onde descreveram que baixas concentrações do herbicida estimularam o crescimento das espécies. Esse mesmo estudo evidenciou aumento do estresse oxidativo em *Raphidiopsis raciborskii* durante sua exposição ao clethodim, levando a um aumento das atividades de POD e SOD.

Existem poucos estudos na literatura com informações sobre os efeitos do clethodim no solo. Diante disso, ainda são desconhecidos os possíveis efeitos causados pelo herbicida em plantas e seres vivos, e estudos de seus efeitos tornam-se essenciais para identificação de sua ação congênita nos organismos.

## **2.2 Bioensaios Vegetais**

A toxicologia é a ciência responsável pelo estudo dos efeitos causados pelas substâncias químicas e os efeitos físicos no organismo, determinando os riscos que uma determinada substância oferece e em quais condições (SILVA, 2018). A utilização de diferentes organismos em bioensaios para testar a toxicidade de resíduos ambientais pode fornecer informações importantes

acerca do mecanismo de ação dos mesmos, sendo uma ferramenta valiosa na identificação dos riscos potenciais aos seres vivos (SILVEIRA, 2016).

Uma série de organismos como; cebola (RODRIGUEZ et al., 2015; GARCIA et al., 2017), moluscos (OLIVEIRA et al., 2014), diplópodos (SOUZA et al., 2014; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2017) e peixes (LEDY et al., 2003; SOUZA; FONTANETTI, 2006; SIMONATO et al., 2008), vem sendo empregados como bioindicadores ambientais. De acordo com Rubinger (2009) o princípio para escolha do organismo teste refere-se à sua sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, de modo que possibilite resultados, exatidão e reprodução dos mesmos. Assim, as plantas são excelentes para indicar efeitos genotóxicos de misturas complexas, proporcionando vantagens únicas no monitoramento *in situ* e na detecção de possíveis danos genéticos resultantes da exposição a produtos químicos em seu ambiente (GRANT, 1999; MONTEIRO et., 2007).

Os primeiros testes utilizando vegetais para avaliação de efeito da toxicidade de poluentes, segundo Fiskesjö (1985) ocorreram em 1938 pelo cientista Levan, que utilizou pontas de raízes de *Allium cepa* para identificação dos efeitos citotóxicos da colchicina. O sistema teste utilizando vegetais possui muitas vantagens, sendo uma das principais o seu baixo custo (FISKESJÖ, 1985). Além de sua grande utilização nos testes de citotoxicidade/mutagenicidade de plantas medicinais, o sistema teste de *Allium cepa* pode ser utilizado para o monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (BAGATINI et al., 2007)

Leme e Marin-Morales (2009) destacam que o teste pode ser empregado para avaliar diversos agentes, como: metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resíduos industriais e domésticos, extratos biológicos, entre outros, além de permitirem a avaliação de diferentes biomarcadores como as aberrações cromossômicas utilizadas na detecção da genotoxicidade, o índice mitótico na detecção da citotoxicidade e a frequência de micronúcleos para a verificação da mutagenicidade. Fiskesjö (1985), ressalta que a espécie pode ser utilizada também tanto para estudos de mecanismos básicos quanto para indicação de efeitos ocasionados por produtos químicos.

Dessa forma é fundamental a escolha do organismo teste para ensaios que avaliem o grau de toxicidade de determinado agente. Sendo assim, o teste com *A. cepa* se torna vantajoso pelo fato de a espécie ser acessível durante o ano todo e com um baixo custo (FISKESJÖ, 1985).

### **2.2.1 Crescimento radicular e ciclo celular**

A raiz é o principal órgão da planta a entrar em contato com o meio externo, permanecendo exposta a diversos agentes. As plantas superiores são excelentes modelos genéticos para detectar mutágenos ambientais e são usados em estudos de monitoramento (FERNANDES, 2005). Segundo Bernardes et al. (2015) bioensaios com vegetais compreendem a testes macroscópicos envolvendo avaliação no índice de germinação e o desenvolvimento inicial da planta, como o crescimento radicular e da parte aérea, além de avaliações microscópicas envolvendo a observação do ciclo celular.

Existem diversos parâmetros que podem ser avaliados pelos bioensaios vegetais com a finalidade de averiguar os efeitos tóxicos dos compostos e/ou substâncias químicas testadas (SANTOS, 2016). Destacam-se entre esses parâmetros: a taxa de germinação, índice de velocidade de geminação e alongamento de raiz (SILVEIRA et al., 2014, MORAES et al., 2015). O teste para avaliação de crescimento radicular e índice de germinação é simples e consiste na exposição do vegetal ao poluente a qual será analisado. Portanto, a raiz é o órgão vegetal comumente utilizado para os testes toxicológicos, pois é a primeira parte da planta a ser exposta a poluentes ambientais tanto na água como no solo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012).

De acordo com Andrade et al. (2010), a combinação das análises macroscópicas e microscópicas são ferramentas importantes para determinar os efeitos tóxicos e sinérgicos de compostos lançados no ambiente. Dentre os vegetais modelos utilizados em bioensaio de prospecção de efeito biológico de poluentes ambientais a hortaliça *Allium cepa* L. (cebola) se destaca por apresentar um pequeno número cromossômico ( $2n=16$ ) e por estes serem grandes, além de exibir alta sensibilidade nos testes, facilitando as análises do ciclo celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Segundo Bagatini et al. (2007), a análise de alterações cromossômicas é utilizada como teste de mutagenicidade e é um método direto para mensurar danos em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para possibilitar a avaliação dos efeitos ou danos que os agentes podem causar, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica, objetivando identificar os efeitos tóxicos e alterações ao longo do ciclo celular (SILVA et al., 2003). Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença dos agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes de seu metabolismo (BAGATINI et al., 2007). Essas alterações podem ter como consequência a formação de células poliploides e a eliminação do material genético, resultando na formação de anomalias nucleares (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Segundo Pfeiffer et al. (2000), quebras que ocorrem no DNA são as lesões primárias fundamentais para a formação de aberrações cromossômicas, elas podem ocorrer de forma induzida ou espontânea, e o seu mecanismo de reparação envolve uma variedade de tipos de mecanismos, levando na maioria das vezes, a reunião não homóloga do DNA lesado. Desse modo, alterações cromossômicas podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebra do DNA) ou aneugênico (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIÉ-CIFREK et al., 2002).

Além disso Gadano et al. (2002) destaca que o índice mitótico e o índice de replicação são utilizados como indicadores de proliferação das células. O índice mitótico é avaliado por meio da contagem de células em divisão pelo número total de células do tecido meristemático (FERNANDES et al., 2007). A variação no índice mitótico pode ser um importante indicador de qualidade das amostras, e pode ser utilizado para quantificar os níveis de poluição em diferentes ambientes, especialmente por compostos tóxicos e citotóxicos (SMAKA-KINCL et al., 1996). Hoshina (2002) destaca que valores dos Índices mitóticos inferiores ao controle negativo podem indicar presença de agentes tóxicos que comprometem crescimento o desenvolvimento dos organismos a

eles expostos, já índices mitóticos superiores ao controle podem ser resultados de indução da divisão celular.

A ocorrência de micronúcleo (MN), ou seja, uma estrutura semelhante ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido, tem sido utilizada para avaliar danos no DNA causados pela exposição a agentes mutagênicos (TEIXEIRA, 2014). O micronúcleo é o resultado da perda de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por agentes que afetam o fuso mitótico (KRÜGER, 2009).

Segundo Leme e Marin-Morales (2008), o tamanho do MN pode ser uma forma de avaliar os efeitos clastogênicos (quebra cromossômica) e aneugênicos (distúrbios do fuso mitótico) em *A. cepa* e dessa forma MN grandes indicariam efeitos aneugênicos como resultado de perda cromossômica, enquanto MN pequenos podem indicar ação clastogênica decorrente de ruptura cromossômica.

### **2.2.2 Estresse oxidativo**

O oxigênio molecular é essencial a vida dos organismos aeróbios, isto inclui a quase totalidade dos organismos superiores (SOUZA, 2006). Ao serem sujeitas a condições adversas, as plantas vão aumentar a produção de ROS, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ), que são espécies químicas bastante reativas capazes de provocar danos oxidativos nas células (JIN et al., 2006). Injúrias no tecido vegetal e processos oxidativos normais das células são provavelmente responsáveis pela geração de ( $O_2^{\bullet-}$ ) (SOUZA, 2006). São muitos os fatores estressores, como radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, seca, elementos-traço, concentração elevada de sais, poluição diversas e outros (SCANDALIOS et al., 2000).

A exposição em longo prazo de um organismo a um poluente resulta primeiramente no acúmulo desse xenobiótico nos órgãos e tecidos e, secundariamente, mantida a exposição, alterações moleculares irreversíveis

podem ocorrer devido à contínua ação deletéria (SOUZA, 2006). Os radicais livres formados pela presença de compostos tóxicos no organismo reagem com lipídeos, proteínas ou ácidos nucleicos e resultam em diversas injúrias bioquímicas ou genéticas (COGO et al., 2009). Segundo Ashraf, (2009) as plantas apresentam a capacidade de desintoxicar EROs, produzindo diferentes tipos de antioxidantes dentre eles a superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato, redutase monodehydroascorbato, redutase desidroascorbato e glutathione redutase.

A superóxido dismutase (SOD) é uma das principais enzimas utilizadas no combate ao dano oxidativo das espécies reativas de oxigênio (CHANDRAN et al., 2005). Essas enzimas participam da modulação do nível de  $H_2O_2$  em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010). São classificadas de acordo com seus cofatores metálicos: cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), manganês (Mn-SOD) e ferro (Fe-SOD) (GILL; TUJETA, 2010).

As plantas possuem várias isoformas de catalase (CAT), as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas (SOUZA, 2006). De acordo com Aebi (1984) essa enzima é um dos principais componentes de defesa primária da célula, exercendo a função de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a água e oxigênio ( $H_2O + O_2$ ). De acordo com Breusegem et al. (2001) a CAT pode dismutar diretamente o ( $H_2O_2$ ) ou oxidar substratos com o metanol, etanol formaldeído e ácido fórmico.

Assim como a catalase a Ascorbato peroxidase desempenha papel contra o estresse oxidativo. Ascorbato peroxidases são enzimas essenciais para a eliminação de peróxido de hidrogênio no cloroplasto e citosol de plantas (ASADA, 1992). O ascorbato (AsA) é encontrado no citoplasma, no cloroplasto, na mitocôndria e no apoplasto e pode se ligar diretamente com os radicais livres ou podem ser usados como fonte de poder redutor pelas enzimas antioxidantes (MACH & GREENBERG, 2004).

### **2.2.3 Análise anatômica da raiz**

As modificações anatômicas e plantas observadas após a exposição a poluentes, mesmo sem alterações macroscópicas, reforçam a importância de estudos anatômicos para o diagnóstico de injúrias por poluentes e o entendimento dos mecanismos de fitotoxicidade (TEIXEIRA, 2014). Os estudos anatômicos assumem grande importância quando associados aos aspectos ecológicos e fisiológicos, pois fornecem detalhes da resposta estrutural da planta a determinado fator, contribuindo com informações adicionais e relevantes que auxiliam na interpretação de outros dados obtidos, e no comportamento da planta (SEGATTO et al., 2004).

Alguns estudos realizados por Reinhardt & Roswt (1995), Lux et al., (2004), demonstram alterações na estrutura da raiz induzida por salinidade e metais pesados. Turkmen et al., (2009) identificaram ocorrência de danos anatômicos em tecido radicular de *Allium cepa*, como acúmulo de compostos químicos no parênquima cortical, células com núcleo de formato atípico, tecidos vasculares com estruturas poucos evidentes e morte celular.

De acordo com Degenhardt; Gimmler, (2000), as plantas desenvolveram mecanismos e estratégias para reagirem as mudanças do ambiente, além de adaptações anatômicas e fisiológicas que permitem o seu crescimento em condições desfavoráveis. As plantas apresentam várias propriedades naturais que podem ser utilizadas como perspectivas para a absorção de poluentes do ambiente (GOMES et al., 2001). Segundo Degenhardt; Gimmler (2000) a raiz da planta por estar em contato com o solo é o primeiro órgão a entrar em contato com o contaminante. Diversos estudos realizados com metais pesados têm mostrado, segundo Gomes et al. (2011) que as plantas ao serem expostas apresentam modificações morfológicas e anatômicas, como maior espessura da epiderme, exoderme e endoderme e diminuição do número de elementos condutores do xilema.

Contudo, estudos anatômicos assumem grande importância quando associados aos aspectos ecológicos e fisiológicos, pois fortalecem detalhes da resposta estrutural da planta a determinado fator, contribuindo com informações

adicionais e relevantes que auxiliam na interpretação de outros dados obtidos, e no comportamento da planta (SEGATTO et al., 2004)

### **3. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o potencial toxicogenético, bioquímico e anatômico do herbicida Clethodim, por meio do sistema teste de *Allium cepa*.

### **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o potencial fitotóxico, genotóxico e mutagênico do herbicida clethodim na germinação, crescimento radicular e no ciclo celular em *Allium cepa*;
- Avaliar o grau de estresse oxidativo causado às plântulas de *Allium cepa* expostas ao herbicida clethodim por meio de atividades enzimáticas;
- Avaliar alterações anatômicas causadas às plântulas de *Allium cepa*.

### **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1 Material vegetal**

O modelo vegetal utilizado neste estudo, como organismo teste, foi a espécie *Allium cepa* (cebola) com sementes da variedade Baia Periforme da marca Topseed. Nos testes realizados, as sementes foram distribuídas em placas de petri com papel filtro contendo os tratamentos com as soluções do herbicida (Tabela 1), permanecendo até o tempo de germinação de 4 ciclos celulares (96 horas) à temperatura de aproximadamente 24°C.

#### **5.2 Solução teste**

O experimento foi elaborado em Delineamento Inteiramente Casualizado, a partir de seis placas de Petri por tratamento, contendo concentrações diferentes do herbicida clethodim de acordo com a concentração recomendada

pelo fabricante do produto (0,48 g/L), utilizada para aplicação na agricultura (Tabela 1). Foram expostas 30 sementes de *Allium cepa* em placas de Petri forradas com papel filtro contendo as concentrações do herbicida, juntamente com os controles negativo e positivo. Como controle positivo foi utilizado a trifluralina na concentração de 0,84 g/L cuja ação e mecanismos são conhecidos para análise do ciclo celular e crescimento radicular (Fernandes et al., 2007). Para o controle negativo foi utilizado alíquotas com água destilada. O material permaneceu exposto à temperatura de 24 °C por aproximadamente 96 horas (4 ciclos celulares)

Tabela 1 – Concentração (g/L) do princípio ativo do herbicida.

Concentração	C1	C2	C3	C4	C5	C6
g/L	1,92	0,96	0,48	0,24	0,12	0,06

### 5.3 Análise do índice de germinação e crescimento radicular

A fitotoxicidade foi avaliada após 96 horas (4 ciclos celulares) de exposição, onde foi estimado o índice de germinação pela contabilização do número de sementes germinadas em relação ao total em exposição. Para o crescimento radicular, as raízes foram medidas com auxílio de paquímetro e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) para confecção de lâminas.

### 5.4 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular as raízes fixadas foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1M à 60 °C por 9 minutos em banho maria. A coloração foi realizada pelo método de Feulgen. Após o procedimento de coloração, as lâminas permanentes foram preparadas pela técnica de esmagamento suave, utilizando um meristema para cada lâmina, em seguida

foram coradas com carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. Após essa etapa, as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido para retirada das lamínulas, sendo então finalizadas com Bálsamo do Canadá.

Foram analisadas 1000 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por tratamento. A citogenotoxicidade do herbicida foi determinada por meio das alterações cromossômicas e nucleares analisadas em diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Índice mitótico (IM), porcentagem de cada fase da mitose, porcentagem de alterações cromossômicas (AC) e porcentagem de alterações nucleares segundo Aragão et al., (2017).

Para a análise do índice mitótico (IM), que avalia a citotoxicidade, foi calculado pela razão:

$$IM = \left( \frac{n^{\circ} \text{ total de células em divisão}}{n^{\circ} \text{ total de células em divisão}} \right) \times 100$$

Para a genotoxicidade, foram consideradas alterações cromossômicas nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como: ponte, c-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência e perda cromossômica.

$$AC = \left( \frac{n^{\circ} \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{n^{\circ} \text{ total de células em divisão}} \right) \times 100$$

O índice da mutagenicidade (IMUT) foi obtido pela frequência de células portadoras de quebras cromossômicas e micronúcleo.

$$IMUT = \left( \frac{n^{\circ} \text{ de células com MNe quebra cromossômica}}{n^{\circ} \text{ total de células em divisão}} \right) \times 100$$

## 5.5 Análise do estresse oxidativo

Para avaliação da análise do estresse oxidativo, foram geminadas 30 sementes em 5 placas de Petri por tratamento, incluindo o controle negativo, até que as raízes atingissem 1cm de comprimento. Seguida a germinação, as raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas refrigeradas a (-80 °C) até o momento das análises

### 5.5.1 Concentração de proteínas

Para realização da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), com modificações para microplacas. Foi pipetado 10 µl da amostra, acrescido de 10 µl da solução de homogeneização das amostras e 10 µl da curva padrão (albumina de soro bovina (BSA)/mL). Foi pipetado em todos os poços 250 µl do reativo de Bradford. As microplacas permaneceram de 5 min até no máximo 1 h em ausência de luz. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas.

### 5.5.2 Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), onde o radical superóxido é gerado pelo do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo c é monitorada a 550 nm. Foi utilizado 0,05 g de amostra vegetal e adicionado 900 µl de solução de tampão fosfato (pH 7,8). A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante analisado. Para a leitura foi adicionado 5 µl do sobrenadante em 288 µl de meio de reação (50 µl xantina, 20 µl KCN, 10 µl Citocromo C, 100 µl EDTA). A leitura foi feita a 550 nm de absorbância em espectrofotômetro, durante 1 minuto com intervalo de 20 segundos.

### 5.5.3 Atividade da enzima Catalase (CAT)

A atividade da enzima Catalase foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Beutler (1975). A determinação de sua atividade foi realizada através de elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm de absorbância. Para preparação do extrato foi utilizado 0,015 g de amostra vegetal e adicionado 950

$\mu$ l de tampão fosfato (pH 7,8). A leitura foi realizada em 204 nm de absorvância, durante 2 minutos com intervalos de 15 segundos.

#### *5.5.4 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)*

A atividade da APX foi realizada seguindo o método proposto por (IBRAHIM; SROU, 2015; NAKANO; ASADA, 1981). Foi utilizado uma solução tampão contendo fosfato 50mM, EDTA (0,1mM), ácido ascórbico (0,5mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação teve duração de 3 minutos e a leitura da absorvância inicial e final ocorreu 290 nm em espectrofotômetro.

### **5.6 Análise anatômica da raiz**

Para análise anatômica da raiz, foram germinadas 30 sementes em 5 placas de Petri por tratamento, sendo considerados as concentrações: 1,92 g/L; 0,48 g/L 0,06 g/L e controle negativo (água destilada). As raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento a partir do ápice foram fixadas em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol), permanecendo por um período de 72 horas e posteriormente armazenadas em etanol 70%.

Para montagem das lâminas as raízes fixadas passaram por desidratação etílica: etanol 70%, 92%, 100%, em seguida o material foi emblocado em historesina Leica ®. As lâminas foram confeccionadas a partir de secções transversais, utilizando micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% e observadas em microscópio Zeis Axio com sistema de captura de imagem. Foi realizada análise anatômica qualitativa para observação de alterações entre os tratamentos.

### **5.7 Análise estatística**

Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilks para checar normalidade dos dados. Todos os dados conferiram distribuição normal ( $P < 0,05$ ). Para análise do crescimento radicular foi utilizado o teste de Tukey

( $P < 0,05$ ), para as análises enzimáticas foi utilizado o teste T ( $P < 0,05$ ) e para a análise do ciclo celular e índice mitótico o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ). As colunas seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância.

## 6.REFERÊNCIA

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**. v 105, p. 121-126, 1984.

ASHRAF, M. Biotechnological Annual Review in Plant Biology approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009.

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

ANDRADE, L.F; DAVIDE, L.C; GEDRAITE, L.S. 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; GEDRAITE, L.S; CAMPOS, J.M; DAVIDE, L.C. Spent Pot Linner (SPL) Induced DNA Damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 822-828, 2011.

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

ANVISA. 2016. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA), disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/programa-de-analise-de-registro-de-agrotoxicos-para>>. Acesso em 24 de outubro de 2019.

ARAGÃO, F. B. **Prospecção da toxicidade e atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa***. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.

ARYSTA. Bula Select 240 EC. Disponível em <[http://www.arystalifescience.com.br/arysta/upload/arysta/130605464681458857\\_Select240EC-Bula.pdf](http://www.arystalifescience.com.br/arysta/upload/arysta/130605464681458857_Select240EC-Bula.pdf)> Acesso em 30 de novembro de 2019.

BADERNA, D; MAGGIONI, S; BORIANE, E; GEMMA, S; MOLTENI, H; LOMBARDO, UM; COLOMBO, UM; BORDONALI, S; ROTELLA, L; LODI, H; BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res. San Diego*, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

BAGATINI, M. D. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* v.17, n. 3, p. 444-447, 2007.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. *Water, Air and Soil Pollution*. Amsterdam, v. 226, n.207, p. 1-11, 2015.

BEUTLER, E. Red cell metabolism: **A manual of biochemical a methods**. Grune & Stron, New York, 1975.

BHATTACHARJEE, S. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfield: **Science Publishers**, 2010. p.1-30

BRASIL (1989). Lei 7802, de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da União, República Federativa do Brasil, Brasília, 12/07/1989. URL: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm)>. Acesso em: 24 de outubro de 2019

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, p. 248-254, 1976.

BREDA-ALVES, F; MILITÃO, F. P; ALVARENGA, B. F; MIRANDA P. F; FERNANDES, V, O; CORDEIRO-ARAÚJO, M. K; CHIA, M. A. Clethodim (herbicide) alters the growth and toxins content of *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*. **Jornal Pre-proof**. v. 243, p 36, 2019.

BREUSEGEM, F.V; VRANORÁ, E; DAT, J.F; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161, p.279-631, 2001.

BURKE, I. C; WALTER, E.T; BURTON, J.D, SPEARS, J. F. A seedling assay to screen aryloxyphenoxypropionic acid and cyclohexanedione resistance in johnsongrass (*Sorghum halepense*). **Weed Technol**, v. 20, n. 4, p. 950-955, 2006.

CARSON, R. **Primavera silenciosa** (Traduzido por Cláudia Sant'Anna Martins), São Paulo: Gaia, 2010.

CASSAL, V.B; AZEVEDO, L. F; FERREIRA, R. P; SILVA, D. G; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, n. 1, p.437-445, 2014.

CHANDRAN, R; SIVAKUMAR, A. A; MOHANDASS, S & ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v. 140, p. 422-426, 2005.

COGO, A. J. D; SIQUEIRA, A. F; RAMOS, A. C, CRUZ, Z. M.A & SILVA, A. G Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**. v.7, p. 37-42, 2009.

COSTA, L. D. Tolerância do milho ao herbicida Clethodim em aplicação de manejo. **Trabalho de conclusão de curso**. Universidade Federal do Mato Grosso, 2016, 29 p.

DEGENHARDT, B.; GIMMLET, H. Cell wall adaptativos to multiple environmental stress in maize roots. **Journal Of Experimental Botany**. v, 51, p. 595-603, 2000.

FERNANDES, T. C. C. Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas testes. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

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

GARCIA, C. F. H.; SOUZA, R.B.; SOUZA, C.P.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C.S. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 216-221, 2017.

GADANO A, GURNI A, LOPEZ P, FERRARO G, CARBALLO M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **J Ethnopharmacol** v, 81, p.11–16, 2002.

GIL, 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. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C; NOGUEIRA, M. O. G.; SILVA, G. H.; CASTRO, E. M.: SOARES, A. M. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e

crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, v. 38, p. 135-142, 2011.

HEAP, I. **The international survey of herbicide resistant weeds**. Disponível em:< <http://www.weedscience.org>>. Acesso em: 25 de outubro de 2019.

HOSHINA, M.M.; MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Avaliação da possível ação genotóxica de efluentes domésticos despejados no Ribeirão Claro/Município de Rio Claro, usando *Allium cepa* como organismo teste. **Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética**, 48., 2002

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

JIN, J., SHAN, N., MAA, N., BAI, J. E GAOA, J. Regulation of ascorbate peroxidase at the transcript level is involved in tolerance to postharvest water deficit stress in the cut rose (*Rosa hybrida* L.) cv. Samantha. **Postharvest Biology and Technology**, v 40, p. 236-243, 2006.

KARAM, D; SILVA, A.F. da; GAZZIERO, D.L.P; ADEGAS, F.S; VARGAS, L. Situação atual da resistência de plantas daninhas a herbicidas nos sistemas agrícolas. In: PAES, M.C.D (org.). **Soluções integradas para os sistemas de produção de milho no Brasil**. Sete Lagoas: ABMS, 2018. p. 900-932.

KOIFMAN, S.; HATAGIMA A. Disruptores endócrinos no ambiente: efeitos biológicos potenciais. **Revista Brasileira de Mastologia**, v 13. n, 1. p.9-11, 2003.

KRÜGER, R.A. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando Bioensaios com *Allium cepa*. 2009. **Dissertação. (Mestrado em Qualidade Ambiental)** - Centro Universitário Feevale, Rio Grande do Sul.

LEDY, K; GIAMBÉRINI, L; PIHAN, J.C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium containing streamwater. **Dis. Aquat. Org**, v.56, p.235–240, 2003.

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

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research**, v. 650, p 80-86, 2008.

LONDRES, Flávia. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. 1 ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LUX, A; SOTTNIKOVÁ, A., OPATRŇÁ, J. & GREGER, M. 2004. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 537-545, 2004.

MACH, F. M; GREENBERG, J. T. Free Radicals and Oxidative Stress. **Plant Cell Death Processes**, Hardbound, 392 pages, 2004.

MCCORD JM & FRIDOVICH I (1969) Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocyanin). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n.22, p. 6049-6055, 1969.

Ministério do Meio Ambiente, 2018, disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/11294-quantidade-de-agrotoxico>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019, disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/defensivos-agricolas>>. Acesso em 24 de outubro de 2019.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MONTEIRO, M. SANTOS, C; MANN, R. M; SOARES, A. M. V. M; LOPES, T. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 421–427, 2007.

MORAES, R.M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.

MOREIRA DE SOUSA, C. M.; IAMONTE, M.; FONTANETTI, C.S. Midgut of the diplopod *Urostreptus atrobrunneus*: structure, function, and redefinition of hepatic cells. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, p. 1-7, 2017.

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.

OLIVEIRA, G.F.M., LIMA, M.F., BOMFIM, T.C.B. Perna perna Mussels as Bioindicators of Aquatic Contamination by *Cryptosporidium* spp. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p.124- 128, 2014.

PEDROLLO, N.T; SANCHOTENE, S.H.B; CARLOTO, B.W; SPATT, L.L; SCHERER, M.B; RODRIGUES, S.N. Eficiência e seletividade de Clethodim no controle de plantas daninhas quando aplicados em pós-emergência na cultura do girassol (*Helianthus annuus*). **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**, v. 11, n. 21, p. 206-214, 2015.

PELAEZ, V.; TERRA, F.H.B; SILVA, L.R. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de economia**, v. 36 n.1, p. 27-48, 2010.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 5, p. 289-302, 2000.

REINHARDT, D.H. & ROST, T.L. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, p. 563-674, 1995.

ROMAN, E.S; VARGAS, L; RIZZARDI, M. A; HALL, L; BECKIE, H; WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. 21 edição. Passo Fundo. Editora Berthier, 2005.

RODRÍGUEZ, Y.A., CHRISTOFOLETTI, C.A, PEDRO, J, BUENO, O.C, MALASPINA, O, FERREIRA, R.A.C, FONTANETTI, C.S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.

RUBINGER, C.F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação de efluentes industriais**. 2009 Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, S.C. **Caracterização e ranqueamento de cultivares de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae) e *Allium cepa* L. (Alliaceae) na padronização de bioensaios para fitotoxicidade**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas.

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.

SEGATTO, F.B.; BISOGNIN, D.A.; BENEDETTI, M.; COSTA, L.C.; RAMPELOTTO, M.V.; NICOLOSO, F.T. Técnica para o estudo da anatomia da epiderme foliar de batata. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1597-1561, 2004.

SILVA, D. C. R. Avaliação da ecotoxicidade no solo entorno de uma fonte natural de água pelo teste *Allium cepa* L. e sua correlação com a presença de resíduos de agrotóxicos. **Trabalho de conclusão de curso**, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018. 17p.

Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP 2003. Genética toxicológica. Porto Alegre, Alcance, 422p

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 69, p.112-120, 2008.

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

SILVEIRA, B. D; HOSOKAWA, R. T; NOGUEIRA, A. C; WEBER, V. P. Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze allelopathic activity on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 79-85, 2014.

SMAKA-KINCL, V. *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, 1996.

SOUZA, T.S; CHRISTOFOLETTI, C.A; BOZZATTO, V; FONTANETTI, C.S. The use of diplopods in soil ecotoxicology - A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 103, p. 68-73, 2014.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research, Amsterdam**, v.605, p.87-93, 2006.

SOUZA, V. H. E. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa***. 2006. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

TEIXEIRA, M. B. **Genotoxicidade e modificações anatômicas radiculares em *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) provocadas pelo efluente do beneficiamento de rochas ornamentais**. 2014. Dissertação. (Mestrado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TURKMEN, Z.; ÇAVUSGLU, K.; YAPAR, K.; YALÇIN, E. Protective role of royal jelly (honeybee) on genotoxicity and lipid peroxidation, induce by petroleus wastewater, in *Allium cepa* L. root tips. **Environmental Technology**. v. 30, p. 1205-1214, 2009.

YU, Q; COLLAVO, A; ZHENG, M. Q; OWEN, M; SATTIN, M; POWLES, S, B. Diversity of Acetyl-Coenzyme A carboxylase Mutations in Resistense *Lolium* Populations: Evaluation Using Clethodim. **Plant Physiology**, v. 145, p. 547–558, 2007.

VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.145-152, 2007.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z; PAVLICA, M; REGULA, I; PAPE, D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, v.43, n. 3, p. 284-291, 2002.

## **7.RESULTADOS**

Os resultados obtidos foram utilizados para a produção de um capítulo, conforme apresentado a seguir.

## 7.RESULTADOS

### Artigo 1

Após tradução este artigo será submetido à revista “Environmental Science and Pollution Research”

ISSN: 0944-1344 (versão para impressão)

ISSN: 1614-7499 (versão online)

Autores: Kristian Rodolfo Santos e Silvia Tamie Matsumoto.

### **Efeito toxicogenético, bioquímico e anatômico do herbicida Clethodim no sistema de *Allium Cepa L.***

Departamento de Ciências Biológicas/CCHN, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Artigo nos padrões da revista para submissão.

Resumo: Os agrotóxicos são compostos que possuem uma variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos desenvolvidos de forma a potencializar uma ação biocida. Sabe-se que seu uso está correlacionado com a economia mundial e com o aumento da produtividade agrícola, porém os riscos de sua utilização acarretam danos para a saúde e meio ambiente, prejudicando a biota existente. Clethodim é um herbicida de ação gramínica pós emergente e sistêmico, altamente seletivo para culturas de algodão, café, cebola, cenoura, soja, dentre outras. Logo, o trabalho objetivou avaliar os efeitos do herbicida Clethodim, por meio do modelo vegetal *Allium cepa*. Sementes de *A. cepa* foram germinadas em placas de Petri com os tratamentos contendo as concentrações do herbicida até atingirem aproximadamente de 1 a 2 mm de comprimento. A trifluralina (0,84 g/L) foi utilizada como controle positivo (C+) e água destilada, como controle negativo (C-). Foram realizadas análises de germinação, crescimento radicular, avaliação do potencial citogenotóxico por meio da análise de ciclo celular e nucleolar, avaliação do estresse oxidativo por meio da quantificação das enzimas antioxidantes e análise histológica das raízes. Os resultados demonstram que houve inibição significativa do índice germinativo nas concentrações 1,92 g/L, 0,96 g/L e 0,48 g/L pelo princípio ativo clethodim. Para o crescimento radicular foi possível observar diminuição significativa do crescimento das raízes nas concentrações mais elevadas em relação ao controle negativo. Para análise do ciclo celular, apenas a concentração 1,92 g/L apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos e para as fases do ciclo celular não foi observado diferença estatística entre os tratamentos. A análise do estresse oxidativo demonstrou que houve aumento significativo da atividade enzimática para a catalase e ascorbato peroxidase em relação ao controle negativo. Também foi observado aumento no número de nucléolos nos núcleos interfásicos, além de atraso na diferenciação celular identificado pelas análises anatômicas. Diante dos testes observou-se que o herbicida clethodim foi fitotóxico por inibir o índice de germinação e o crescimento radicular, genotóxico por aumentar a ocorrência de alterações nucleares, além de ter alterado a atividade enzimática e a diferenciação celular

Palavras-chave: Cebola. Citogenotoxicidade. Estresse Oxidativo. Herbicida. Mtagênese.

## 1- INTRODUÇÃO

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2018), o Brasil é um dos maiores consumidores mundiais de agrotóxicos. De acordo com o Ministério da Agricultura (2019), o número total de agrotóxicos liberados chega em torno de 325. Em consequência dos interesses de ordem econômica para a produção agrícola a qualquer custo, o Brasil também lidera a importação de agrotóxicos, utilizando cerca de 10% de todo produto do mundo a partir de 2013, aplicados para o controle de doenças de plantas e “pragas” animais ou vegetais (PELAEZ et al., 2015)

Os agrotóxicos são compostos que possuem uma grande variedade de substâncias químicas ou produtos biológicos que foram desenvolvidos de forma a

potencializar uma ação biocida (VEIGA, 2007). Londres (2011), destaca que existem dois tipos de intoxicações causadas por agrotóxicos. A primeira é a intoxicação do tipo aguda que consiste no contato recente e direto com o produto químico. O segundo de acordo com a autora é a intoxicação crônica, ocasionada pelo contato direto e prolongado com o produto, que a longo prazo pode gerar problemas tanto a saúde humana quanto ao meio ambiente.

O Clethodim é um herbicida de ação gramínida pós-emergente e sistêmico pertencente ao grupo químico oxima ciclohexanodiona, altamente seletivo para culturas de algodão, alho, batata, café, cebola, cenoura, soja tomate, dentre outras (Nortox®). O grupo químico das ciclohexanodionas (CDHs) são inibidores da ACCase (Acetil Coenzima-a) (PEDROLLO et al., 2015). Segundo Burke et al. (2006), os herbicidas desse grupo inibem a síntese de lipídios, interferindo o desenvolvimento das gramíneas. Devido sua alta efetividade e seletividade seu uso torna-se cada vez mais comum.

Os efeitos causados por esses compostos se manifestam na maioria das vezes em longo prazo, causando alterações fisiológicas (SILVEIRA, 2016). Segundo Carson et al. (2010) traços desses defensivos podem permanecer nos alimentos, mesmo após a colheita, o que pode levar a ingestão humana de substâncias potencialmente tóxicas.

Devido ao potencial tóxico apresentado pelos resíduos industriais, domésticos e agrícolas, nos últimos 20 anos tem-se desenvolvido técnicas para avaliação dos efeitos toxicológicos dos mesmos (BADERNA et al., 2011). Dentre essas técnicas, destaca-se a utilização de organismos vegetais, dentre eles; cebola (RODRIGUEZ et al., 2015; GARCIA et al., 2017), moluscos (OLIVEIRA et al., 2014), diplópodos (SOUZA et al., 2014; MOREIRA-DE-SOUSA et al., 2016) e peixes (LEDY et al., 2003; SOUZA; FONTANETTI, 2006; SIMONATO et al., 2008), vem sendo empregados como bioindicadores ambientais. De acordo com Rubinger (2009) o princípio para escolha do organismo teste refere-se à sua sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, de modo que possibilite resultados, exatidão e reprodução dos mesmos.

Os primeiros testes utilizando vegetais para avaliação de efeito da toxicidade de poluentes, segundo Fiskesjö (1985) ocorreram em 1938 pelo cientista Levan, que utilizou pontas de raízes de *Allium cepa* para identificação dos efeitos citotóxicos da colchicina. O sistema teste utilizando vegetais possui muitas vantagens, sendo uma das principais o seu baixo custo (FISKESJÖ, 1985). Além de sua grande utilização nos testes de citotoxicidade/mutagenicidade de plantas medicinais, o sistema teste de *Allium cepa* pode ser utilizado para o monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos (BAGATINI et al.,

2007). De acordo com Monteiro et al. (2007), as plantas são sistemas excelentes para indicar efeitos genotóxicos, proporcionando vantagens no monitoramento e na detecção de possíveis danos genéticos resultantes da exposição a produtos químicos.

Tendo em vista que os herbicidas são os agroquímicos mais utilizados para os cultivos, faz-se necessário estudos que possibilitem dimensionar os efeitos de sua periculosidade no ambiente, determinando seu nível de agressão e possibilitando alternativas que diminuam sua aplicação em larga escala. Assim, esse estudo objetivou avaliar o potencial toxicogenético, o grau de estresse oxidativo e de alterações anatômicas do herbicida Clethodim, por meio de bioensaio vegetal em *Allium cepa* L.

## 2- MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material vegetal

O modelo vegetal utilizado neste estudo, como organismo teste, foi a espécie *Allium cepa* (cebola) com sementes da variedade Baia Periforme da marca Topseed. Nos testes realizados, as sementes foram distribuídas em placas de petri com papel filtro contendo os tratamentos com as soluções do herbicida (Tabela 1), permanecendo até o tempo de germinação de 4 ciclos celulares (96 horas) à temperatura de aproximadamente 24°C.

### 2.2 Solução teste

O experimento foi elaborado em Delineamento Inteiramente Casualizado, a partir de seis placas de Petri por tratamento, contendo concentrações diferentes do herbicida clethodim de acordo com a concentração recomendada pelo fabricante do produto (0,48 g/L) (Tabela 1). Foram expostas 30 sementes de *Allium cepa* em placas de Petri forradas com papel filtro contendo as concentrações do herbicida, juntamente com os controles negativo (água destilada) e positivo. Como controle positivo foi utilizado a trifluralina na concentração de 0,84 g/L cuja ação e mecanismos são conhecidos para análise do ciclo celular e crescimento radicular (Fernandes et al., 2007).

### 2.3 Análise do índice de germinação e crescimento radicular

A fitotoxicidade foi avaliada após 96 horas (4 ciclos celulares) de exposição, onde foi estimado o índice de germinação pela contabilização do número de sementes germinadas em relação ao total em exposição de acordo com Martins; Campos-Pereira (2018). Para o crescimento radicular, as raízes foram medidas com auxílio de

paquímetro e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) para confecção de lâminas.

#### 2.4 Análise do ciclo celular

Para a análise do ciclo celular as raízes fixadas foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1M à 60 °C por 9 minutos em banho maria. A coloração foi realizada pelo método de Feulgen. Após o procedimento de coloração, as lâminas permanentes foram preparadas pela técnica de esmagamento suave, utilizando um meristema para cada lâmina, em seguida foram coradas com carmim acético 2% para evidenciar o citoplasma. Após essa etapa, as lâminas foram imersas em nitrogênio líquido para retirada das lamínulas, sendo então finalizadas com Bálsamo do Canadá.

Foram analisadas 1000 células por lâmina e cinco lâminas por tratamento, totalizando 5000 células por tratamento. A citogenotoxicidade do herbicida foi determinada por meio das alterações cromossômicas e nucleares analisadas em diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Foram avaliados os seguintes parâmetros: Índice mitótico (IM), porcentagem de cada fase da mitose, porcentagem de alterações cromossômicas (AC) e porcentagem de alterações nucleares segundo Aragão et al. (2017). Também foram avaliadas presença de células apresentando núcleo com um ou mais nucléolos.

#### 2.5 Análise do estresse oxidativo

Para avaliação da análise do estresse oxidativo, foram geminadas 30 sementes em 5 placas de Petri por tratamento, incluindo o controle negativo, até que as raízes atingissem 1cm de comprimento. Seguida a germinação, as raízes foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas refrigeradas a (-80 °C) até o momento das análises

##### *2.5.1 Concentração de proteínas*

Para realização da concentração de proteínas totais foi utilizado o método de Bradford (1976), com modificações para microplacas. Foi pipetado 10 µl da amostra em triplicata, acrescido de 10 µl da solução de homogeneização das amostras e 10 µl da curva padrão (albumina de soro bovina (BSA)/mL). Foi pipetado em todos os poços 250 µl do reativo de Bradford. As microplacas permaneceram de 5 min até no máximo 1 h em ausência de luz. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm em espectrofotômetro de microplacas.

### *2.5.2 Atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD)*

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria de acordo com o protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), onde o radical superóxido é gerado pelo do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo c é monitorada a 550 nm. Foi utilizado 0,05 g de amostra vegetal e adicionado 900 µl de solução de tampão fosfato (pH 7,8). A mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante analisado. Para a leitura foi adicionado 5 µl do sobrenadante em 288 µl de meio de reação (50 µl xantina, 20 µl KCN, 10 µl Citocromo C, 100 µl EDTA. A leitura foi feita a 550 nm de absorvância em espectrofotômetro, durante 1 minuto com intervalo de 20 segundos

### *2.5.3 Atividade da enzima Catalase (CAT)*

A atividade da enzima Catalase foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Beutler (1975). A determinação de sua atividade foi realizada através de elevadas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240nm de absorvância. Para preparação do extrato foi utilizado 0,015 g de amostra vegetal e adicionado 950 µl de tampão fosfato (pH 7,8). A leitura foi realizada em 204 nm de absorvância, durante 2 minutos com intervalos de 15 segundos

### *2.5.4 Atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX)*

A atividade da APX foi realizada seguindo o método proposto por (IBRAHIM; SROU, 2015; NAKANO; ASADA, 1981). Foi utilizado uma solução tampão contendo fosfato 50mM, EDTA (0,1mM), ácido ascórbico (0,5mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A reação teve duração de 3 minutos e a leitura da absorvância inicial e final ocorreu 290 nm em espectrofotômetro.

## 2.6 Análise anatômica da raiz

Para análise anatômica da raiz, foram germinadas 30 sementes em 5 placas de Petri por tratamento, sendo considerados as concentrações: 1,92 g/L; 0,48 g/L; 0,06 g/L e controle negativo (água destilada). As raízes com aproximadamente 1 cm de comprimento a partir do ápice foram fixadas em FAA 70 (Formaldeído, ácido acético e etanol), permanecendo por um período de 72 horas e posteriormente armazenadas em etanol 70%.

Para montagem das lâminas as raízes fixadas passaram por desidratação etílica: etanol 70%, 92%, 100%, em seguida o material foi emblocado em historesina Leica ®. As lâminas foram confeccionadas a partir de secções transversais, utilizando micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com azul de toluidina 0,05% e observadas em microscópio Zeis Axio com sistema de captura de imagem. Foi realizada análise anatômica qualitativa para observação de alterações entre os tratamentos.

## 2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro-Wilks para checar normalidade dos dados. Todos os dados conferiram distribuição normal ( $P < 0,05$ ). Para análise do crescimento radicular foi utilizado o teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), para as análises enzimáticas foi utilizado o teste T ( $P < 0,05$ ) e para a análise do ciclo celular e índice mitótico o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ). As colunas seguidas com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5% de significância.

## 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises realizadas no presente estudo em raízes de *Allium cepa* L, após sua exposição ao princípio ativo Clethodim, revelam que o herbicida inibiu o índice de germinação e crescimento radicular das raízes e causou estresse no metabolismo oxidativo, representado pelo aumento da atividade enzimática das enzimas CAT e APX, como resposta de defesa da planta ao contaminante, além de ter aumentado o número de nucléolos dos núcleo de células em interfase. Por outro lado, não foi observado alterações significativas no ciclo celular como, alterações cromossômicas, formação de núcleo condensado, fragmentação de DNA e alteração no índice mitótico (Tabela 1 e 2), porém foi observado frequência significativa de MN na concentração mais alta. Também foi observado alterações na anatomia da raiz que apresentaram atraso no processo diferenciação celular depois da exposição ao Clethodim (Figura 7).

O potencial fitotóxico do produto foi observado nas concentrações 1, 2 e 3 respectivamente 1,92 g/L, 0,96 g/L e 0,48 g/L (Figura 1), sendo a última a concentração recomendada pelo fabricante. A inibição da germinação e crescimento também foi observado em estudos com diferentes agroquímicos como os realizados por Martins; Campos-Pereira, (2018) que avaliaram os efeitos do herbicida Tordon sobre os organismos testes *Lactuca sativa* e *Allium cepa*, e observaram que inibição de

germinação de sementes nas concentrações mais elevadas do produto e redução no índice germinativo nas demais concentrações. Em nossos estudos não foi observada diminuição do índice de germinação nas menores concentrações, indicando não interferência do herbicida nessas concentrações. Segundo Martins; Campos-Pereira (2018) “índices de germinação superiores a 20 sementes de um total de 30 sementes, indicam menor impacto ambiental da substância, enquanto índices menores alertam para um potencial tóxico da substância”.

As análises do crescimento radicular também indicaram que o herbicida provoca uma ação fitotóxica, devido a redução significativa no comprimento das raízes em todas as concentrações avaliadas quando comparadas ao controle negativo (Figura 2). De acordo com Sobrero e Ronco (2004) a inibição de crescimento de raiz é um indicador de efeito subletal, pois algumas doses não são tão altas para inibir a germinação, mas podem retardar o crescimento da raiz. Ferreira; Borghetti (2004), destacam que a fase inicial de crescimento de raízes é muito sensível a substâncias estranhas ao metabolismo da planta, o que pode afetar o seu desenvolvimento, acarretando em plântulas anormais. Ainda segundo o autor, os resultados obtidos pela avaliação do índice germinativo e do crescimento radicular são complementares fornecendo parâmetros importantes de toxicidade.

Considera-se que o índice mitótico (IM) identifica de forma confiável a presença de poluentes citotóxicos no ambiente (FISKEJÖ, 1985). Segundo Souza, (2006) quando o IM apresenta valor superior ao controle, significa que ocorreu indução no processo de divisão celular, podendo ocasionar proliferação descontrolada das células, enquanto a redução do IM pode comprometer o desenvolvimento e crescimento do organismo. Contudo, apesar do herbicida Clethodim ter causado a inibição do índice de germinação e do crescimento radicular, não foi observado diferença significativa no IM. Em relação as fases do ciclo celular, não foi observado diferença significativa entre as concentrações com o controle negativo (Tabela 1), assim como não houve alterações cromossômicas significativas sobre o material genético que indicassem ação aneugênica e clastogênica do herbicida (Tabela 2). Porém, observou-se aumento na frequência de micronúcleos na concentração 1 (1,92 g/L) em relação ao controle negativo. Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (SCHMIDT, 1976; AL-SABTI & METCALFE, 1995). De acordo com Ventura-Camargo et al. (2011) a formação de micronúcleo pode ocorrer durante a anáfase, sendo

caracterizado pelo mau funcionamento do eixo e presença de fragmentos acentrados devido a resposta clastogênica. Ventura-Camargo; Marin Morales (2016) estudando a ação do herbicida Atrazina em células de *Allium cepa*, afirmam que substâncias químicas podem induzir a formação de micronúcleos por meio de distúrbios do eixo ou quebras cromossômicas. Os autores ainda sugerem que os micronúcleos se originam por fragmentos correspondentes a perda das regiões teloméricas envolvidas no intervalo da divisão.

Nas análises citológicas, também foi observado um aumento nas concentrações C1 (1,92 g/L), C2 (0,96 g/L) e C3 (0,48 g/L) no número e tamanho de nucléolo em seus núcleos interfásicos (Figura 7). O nucléolo é uma região nuclear acromática que atua na formação dos ribossomos, e seu número pode variar de 1 ou mais por células dependendo da sua atividade. Células com maior número e tamanho de nucléolo indicam maiores atividade de síntese proteica da célula (ALBERTS, 2017). Estudos realizados por Arkhipchuk et al. (2000), Ventura-Camargo (2016), apontam essas variações como respostas aos agentes potencialmente genotóxicos. Esses resultados sugerem que o Herbicida pode se estar influenciando no processo da transcrição do rRNA.

Com relação aos resultados do estresse oxidativo a enzima CAT apresentou um aumento na atividade enzimática nessa situação de estresse apenas nas concentrações C1 (1,92 g/L) e C2 (0,96 g/L) em relação ao controle negativo (Figura 4). A enzima APX apresentou um aumento das atividades nas concentrações C1 (1,92 g/L), C2 (0,96 g/L) e C3 (0,48 g/L) em relação ao apresentado pelo controle negativo (Figura 5). APX e CAT estão envolvidas no sistema antioxidante para proteger contra espécies reativas de oxigênio induzidas por estresse (ROS) (LAN et al., 2019). O aumento da atividade da CAT diante da exposição a poluentes tem sido demonstrado por diversos trabalhos. WILHELM et al. (1997), observaram aumento na atividade da CAT em tilápias expostas a efluentes de papel e celulose. SIJARJ e RANI (2003), detectaram aumento na atividade de CAT no fígado de tilápias expostas ao cádmio. Por outro lado, Fatima e Ahmad (2005) observaram valores de CAT próximo aos do controle em células merismáticas de cebola expostas a metais pesados. Níveis elevados de ascorbato endógeno são essenciais para manter o sistema antioxidante enzimático que protege as plantas dos danos oxidativos do estresse biótico e abiótico (SHIGEOKA et al., 2002). O aumento da atividade de APX pode ter ocorrido em resposta a toxicidade do herbicida ao tecido da plântula. Segundo Asada (1992) a APX atua decompondo o peróxido de hidrogênio em água, utilizando o ascorbato como principal substrato, encontrado nos tecidos fotossintéticos. Contudo, a produção de EROs pela exposição das plântulas ao

herbicida pode ser um mecanismo de defesa contra esse agroquímico, causando conseqüentemente aumento da atividade enzimática em resposta a sua exposição.

A análise qualitativa da anatomia em raízes de *Allium cepa* evidenciou que o herbicida Clethodim causou atraso na expansão celular na região do cilindro vascular nas concentrações C1 (1,92 g/L), C3 (0,48 g/L) e C6 (0,06 g/L) em relação ao controle negativo (Figura 6). De acordo com Costa (2016) clethodim atua inibindo a enzima acetil-coenzima-A Carboxilase (ACCase), a qual Acetil-CoA carboxilase e está envolvida no primeiro passo da biossíntese dos ácidos graxos, tornando-se alvo para utilização de herbicida (YU et al., 2007). Dessa forma, ocorre a paralisação da síntese de ácidos graxos, constituintes de membranas celulares, necessárias para o crescimento celular, portanto, há paralisação da síntese de membranas necessárias para o crescimento (CARVALHO, 2013). Esses resultados corroboram com os encontrados na análise de crescimento radicular, onde observou-se inibição do crescimento da raiz em todas as concentrações do químico.

Os resultados obtidos no trabalho demonstram que o herbicida apresenta um efeito no metabolismo da célula, entretanto não foi observado modificações no DNA, o que sugere a atuação de mecanismo epigenético. Modificações epigenéticas constituem um mecanismo especial de controle transcricional, permitem que ocorram mudanças na expressão gênica e no fenótipo sem que haja alterações na sequência de DNA, desempenham um papel crucial na regulação de células normais e podem ser influenciadas por variação genética e ambiental (TEH et al., 2014). Alguns trabalhos sugerem que pode haver mudanças na expressão gênica e no fenótipo sem ocorrer alterações no DNA; Kahl et al. (2018) sugere que os pesticidas usados nos campos de tabaco estão associados a instabilidade genômica, que propõe ser sensível a ingestão nutricional e podem induzir alterações epigenéticas. Plaat et al. (2018), demonstraram em seus estudos que a exposição ocupacional a pesticidas pode estar relacionada por meio de um mecanismo epigenético, com a metilação do DNA. Contudo, faz-se necessário estudos mais aprofundados para avaliar se os efeitos do herbicida Clethodim podem estar relacionados ao mecanismo epigenético.

#### 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes toxicogenéticos sugerem que o herbicida Clethodim apresentou potencial fitotóxico pela inibição da germinação nas concentrações mais elevadas e inibição do crescimento radicular em todas as concentrações, além de atividade mutagênica na concentração 1 (1,92 g/L) identificado pela presença de micronúcleos.

Não foi observado genotoxicidade do herbicida em nenhum dos tratamentos, porém identificou-se variação no tamanho e número de nucléolos, sugerindo influência do herbicida na produção de rRNA. A produção de EROs como forma de defesa de *Allium cepa* em resposta ao estresse causado pelo químico foi identificado pelo aumento da atividade enzimática. Além disso, houve atraso no processo de expansão das células meristemáticas, observados pelas análises anatômicas, possivelmente pelo mecanismo de ação do herbicida. Embora o herbicida clethodim tenha causado alterações no metabolismo de *Allium cepa*, não foi observado potencial genotóxico desse agroquímico, sugerindo que seus efeitos possam estar relacionados aos mecanismos epigenéticos.

## 5 – AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro. A Universidade Federal do Espírito Santo e a Universidade Federal de São Carlos (Laboratório de Zoologia e Bioquímica Comparada) pelas colaborações.

## Referências

- ALBERTS, Bruce et al. *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research*, v. 343, p. 121-135, 1995
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase- a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, v. 85, p. 235-241, 1992.
- ARKHIPCHUK., V. V.; GARANKO NN. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicol Environ Safety*. v. 62, p. 42-52, 2005.
- ARAGÃO, F. B. Prospecção da toxicidade e atividade enzimática de fungicidas por meio de bioensaios com *Lactuca sativa*. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória.
- BADERNA, D; MAGGIONI, S; BORIANE, E; GEMMA, S; MOLTENI, H; LOMBARDO, U.M; COLOMBO, UM; BORDONALI, S; ROTELLA, L; LODI, H; BENFENATI, E. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. *Environ. Res. San Diego*, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.
- BAGATINI, M. D. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.* v.17, n. 3, p. 444-447, 2007
- BEUTLER, E. *Red cell metabolism: A manual of biochemical a methods*. Grune & Stron, New York, 1975.
- 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, p. 248-254, 1976.
- BURKE, I. C; WALTER, E.T; BURTON, J.D, SPEARS, J. F. A seedling assay to screen aryloxyphenoxypropionic acid and cyclohexanedione resistance in johnsongrass (*Sorghum halepense*). *Weed Technol*, v. 20, n. 4, p. 950-955, 2006.

CARSON, R. Primavera silenciosa (Traduzido por Cláudia Sant'Anna Martins), São Paulo: Gaia, 2010.

CARVALHO, L. B. Herbicidas. Edição do autor, Vol. N.1 pp, 62, 2013.

COSTA, L. D. Tolerância do milho ao herbicida Clethodim em aplicação de manejo. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Mato Grosso, 2016, 29 p.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*. v, 346, p. 256 – 273, 2005.

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

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

GARCIA, C. F. H.; SOUZA, R.B.; SOUZA, C.P.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; FONTANETTI, C.S. Toxicity of two effluents from agricultural activity: Comparing the genotoxicity of sugar cane and orange vinasse. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 216-221, 2017.

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

KAHL, V.F.S.; DHILLON, V.; FENECH, M.; M. R. DE SOUZA.; F. N DA SILVA.; MARRONI. N.A.P.; NUNES, E.A.; CERCHIARO, G.; PEDRON, T.; BATISTA, B.L.; CAPPETTA, M.; MÁRTINEZ-LÓPEZ, W.; SIMON, D.; SILVA, J. Occupational Exposure to Pesticides in Tobacco Fields: The Integrated Evaluation of Nutritional Intake and Susceptibility on Genomic and Epigenetic Instability. v. 2018, p. 13, 2018.

LAN, CHIU-YUEH.; LIN, KUAN-HUNG.; HUANG, WEN-DAR.; CHEN, CHANG-CHANG. Physiological Effects of the Fungicide Azoxystrobin on Wheat Seedlings under Extreme Heat. *Not Bot Horti Agrobo*. v. 3, p. 683-690, 2019.

LEDY, K; GIAMBÉRINI, L; PIHAN, J.C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium containing streamwater. Dis. Aquat. Org, v.56, p.235–240, 2003.

LONDRES, Flávia. Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida. 1 ed. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MARTINS, P. CAMPOS-PEREIRA, F. D. Avaliação dos efeitos tóxicos do agroquímico Tordon sobre os organismos teste *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. Visão acadêmica, Curitiba, v.19 n.2, 2018.

MASCHIO, L. R. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP. Tese (Programa de Pós Graduação em Genética) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista, 2009.

MCCORD JM & FRIDOVICH I (1969) Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry. Vol. 244, N.22, p 6049-6055, 1969.

Ministério do Meio Ambiente, 2018, disponível em: <<http://www.mma.gov.br/informma/item/11294-quantidade-de-agrotoxico>>. Acesso em 18 de julho de 2018.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019, disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/defensivos-agricolas>>. Acesso em 24 de outubro de 2019.

MONTEIRO, M. SANTOS, C; MANN, R. M; SOARES, A. M. V. M; LOPES, T. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. Environmental and Experimental Botany, v. 60, p. 421–427, 2007.

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.

OLIVEIRA, G.F.M., LIMA, M.F., BOMFIM, T.C.B. Perna perna Mussels as Bioindicators of Aquatic Contamination by *Cryptosporidium* spp. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 42, p.124- 128, 2014.

PEDROLLO, N.T; SANCHOTENE, S.H.B; CARLOTO, B.W; SPATT, L.L; SCHERER, M.B; RODRIGUES, S.N. Eficiência e seletividade de Clethodim no controle de plantas daninhas quando aplicados em pós-emergência na cultura do girassol (*Helianthus annuus*). *Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI*, Vol. 11, n.21: p.206-214, 2015.

PELAEZ, V. et al. (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. *Revista Brasileira de Inovação*, v. 14, n. esp., p. 153 -178, 2015.

RODRÍGUEZ, Y.A., CHRISTOFOLETTI, C.A, PEDRO, J, BUENO, O.C, MALASPINA, O, FERREIRA, R.A.C, FONTANETTI, C.S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. *Chemosphere*, v. 120, p. 438–442, 2015.

RUBINGER, C.F. Seleção de métodos biológicos para a avaliação de efluentes industriais. Dissertação de mestrado – Programa de Pós Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: *Principles and Methods for Their Detection* (Hollanender, A., ed.) Plenum Press, v. 4, p31-53. 1976

SHIGEOKA, S., ISHIKAWA, T., TAMOI, M., MIYAGAWA, Y., TAKEDA, T., YABUTA, Y. E YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes, *Journal of Experimental Botany*, Vol.53, n°372, pp:1305-1319, 2002.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, p.112-120, 2008.

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

SOBRERO, M. S. & RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga. In: Ensayos Toxi- cológicos y Métodos de Evaluación de calidad de Aguas: Estandarización, intercalibración, resulta- dos y aplicaciones. Facultad de Ciencias Físicas e Matemáticas Ed. Chile, cap. 4, 2004.

SOUZA, T. S ; CHRISTOFOLETTI,C.A; BOZZATTO, V ; FONTANETTI, C.S. The use of diplopods in soil ecotoxicology - A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 103, p. 68-73, 2014.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research, Amsterdam*, v.605, p.87-93, 2006.

SOUZA, V. H. E. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de Santa Catarina em *Allium cepa*. 2006. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina.

TEH, A. L.; Pan, H.; Chen, L.; Ong, M.L.; DOGRA, S.; WONG, J.; MACISAAC, J.L.; MAH, S.M.; MCEWEN, L.M.; SAW, S.M.; GODFREY, K.M.; CHEONG, C.Y.; BUSCHDORF, JP.; STUNKEL, W.; KOBOR, M.S.; MEANEY, M.J.; GLUCKMAN, P.D.; HOLBROOK, J.D. The effect of genotype and in útero environment on interindividual variation in neonate DNA methylomes. *Genome Research*, v. 24, n. 7, p. 1064-74, 2014.

VAN DER PLAAT, D.A., DE JONG, K., DE VRIES, M., VAN DIEMEN, C.C., NEDELJKOVIĆ, I., et al. Occupational exposure to pesticides is associated with differential DNA methylation. *Occup. Environ. Med.* V. 75, n. 6, p. 427–435, 2018

VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. *Ciência & Saúde Coletiva*, vol.12, n.1, pp.145-152, 2007.

VENTURA-CAMARGO, B.C. MALTEMPI, P.P.; MARIN-MORALES, M.A. The use of the cytogenetic to identify mechanisms of action of an azo dye in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, v 1, p. 1-12, 2011.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MARIN-MORALES, M.A. Micronuclei and chromosome aberrations derived from the action of Atrazine herbicide in *Allium cepa* meristematic cells. *Journal of Earth Sciences & Environmental Studies*. v.1, p.22-28, 2016.

WILHELM FILHO, D; BAPTISTA, I.E, SOARES, C.H.L; PEDROSA, R.C. The effect of pulp mill effluent on two fish species. *Fifth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components*. Curitiba: v. 32, p.612 – 619, 1997.

## ANEXO

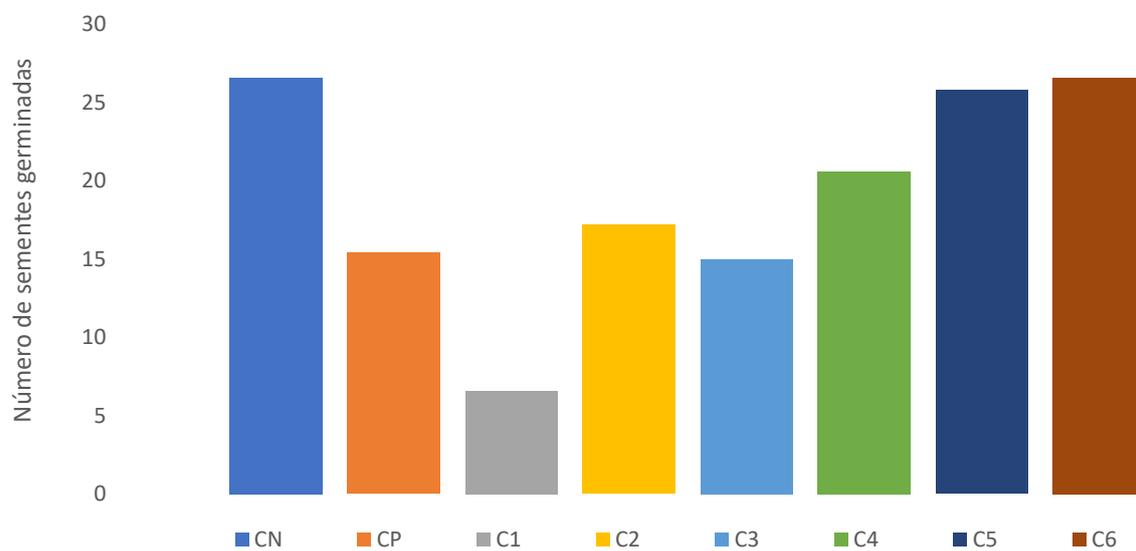


Figura 1 – Índice de germinação de sementes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo clethodim. CN: controle negativo e CP: controle positivo.

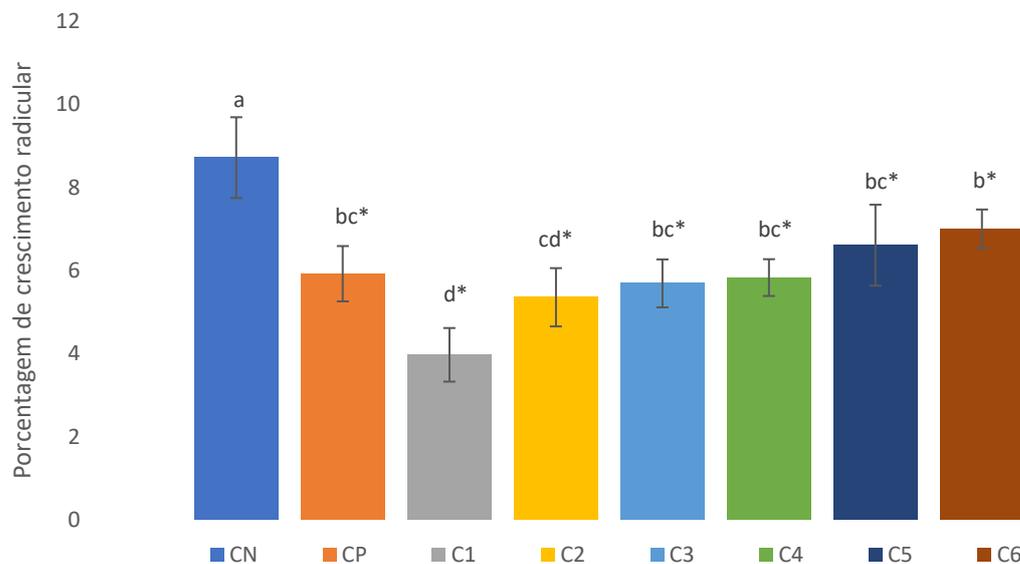


Figura 2 – Crescimento radicular de raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo clethodim. As colunas contendo o (\*) na barra diferem estatisticamente em relação com controle negativo, a nível de normalidade de 5% de significância, pelo teste de Tukey. CN: controle negativo e CP: controle positivo.

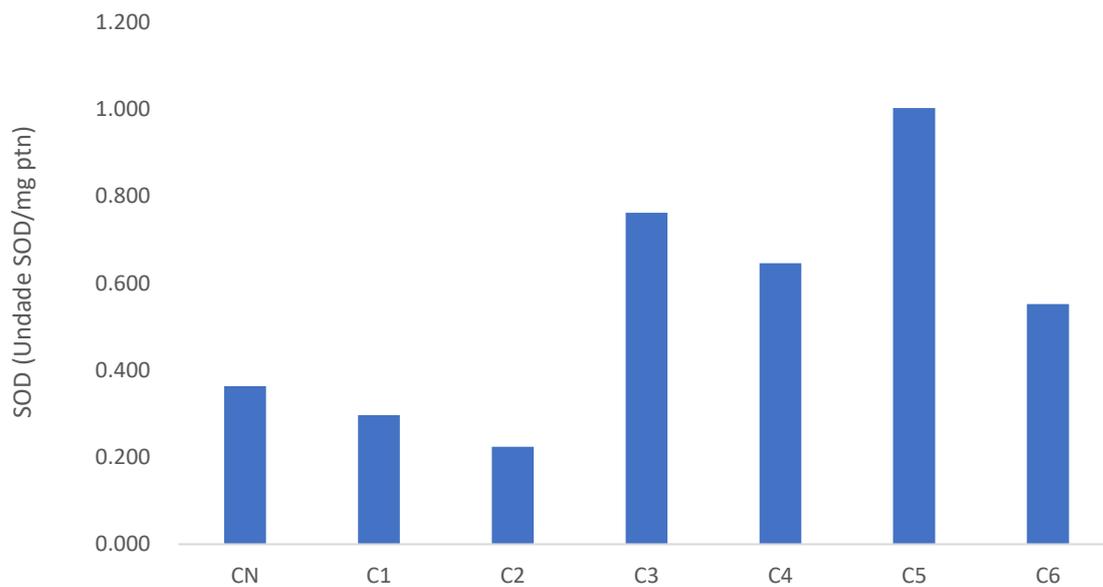


Figura 3 – Atividade enzimática da enzima Superóxido dismutase (SOD) em plântulas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo clethodim. As colunas com (\*) nas barras diferem estatisticamente em relação ao controle negativo, segundo o teste T a 5% de significância. CN: controle negativo.

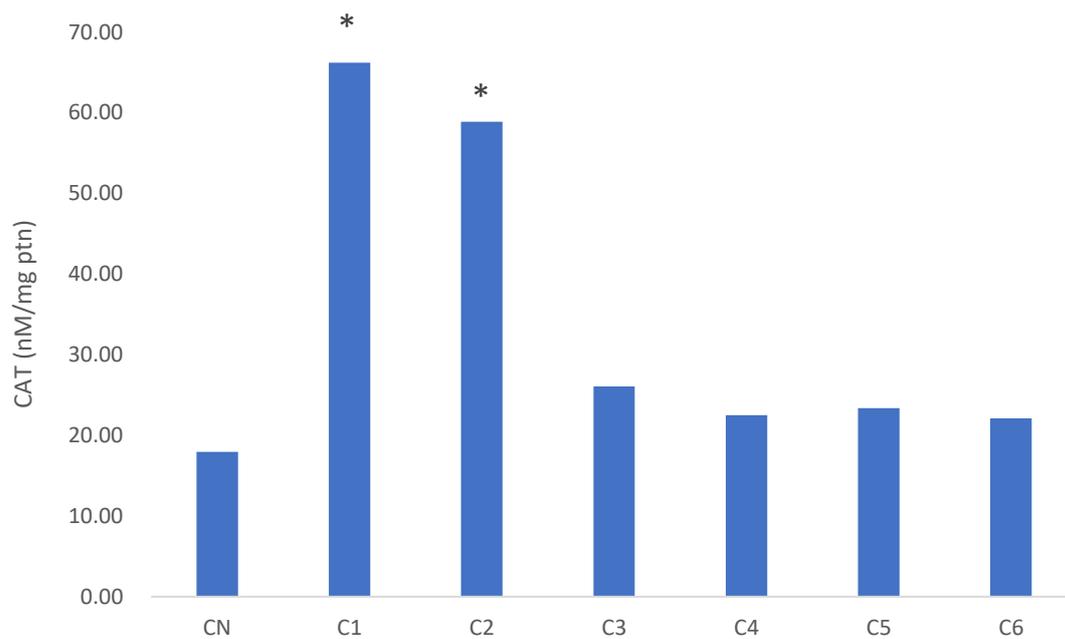


Figura 4 – Atividade enzimática da enzima Catalase (CAT) em plântulas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo clethodim. As colunas com (\*) nas barras diferem estatisticamente em relação ao controle negativo, segundo o teste T a 5% de significância. CN: controle negativo.

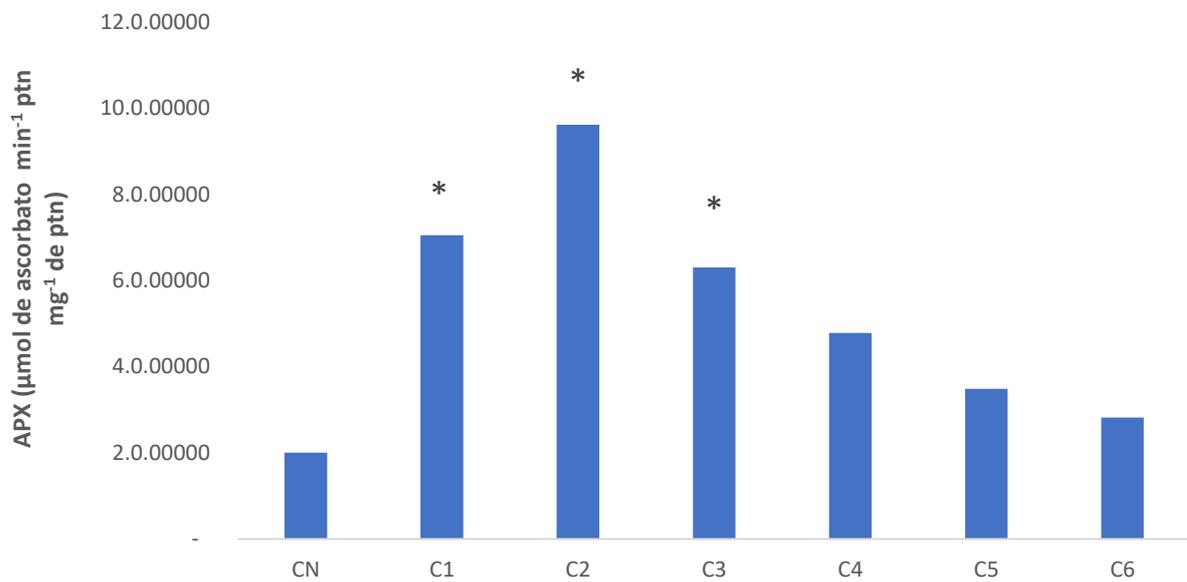


Figura 5 – Atividade enzimática da enzima Ascorbato Peroxidase (APX) em plântulas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações do princípio ativo clethodim. As colunas com (\*) nas barras diferem estatisticamente em relação ao controle negativo, segundo o teste T a 5% de significância. CN: controle negativo

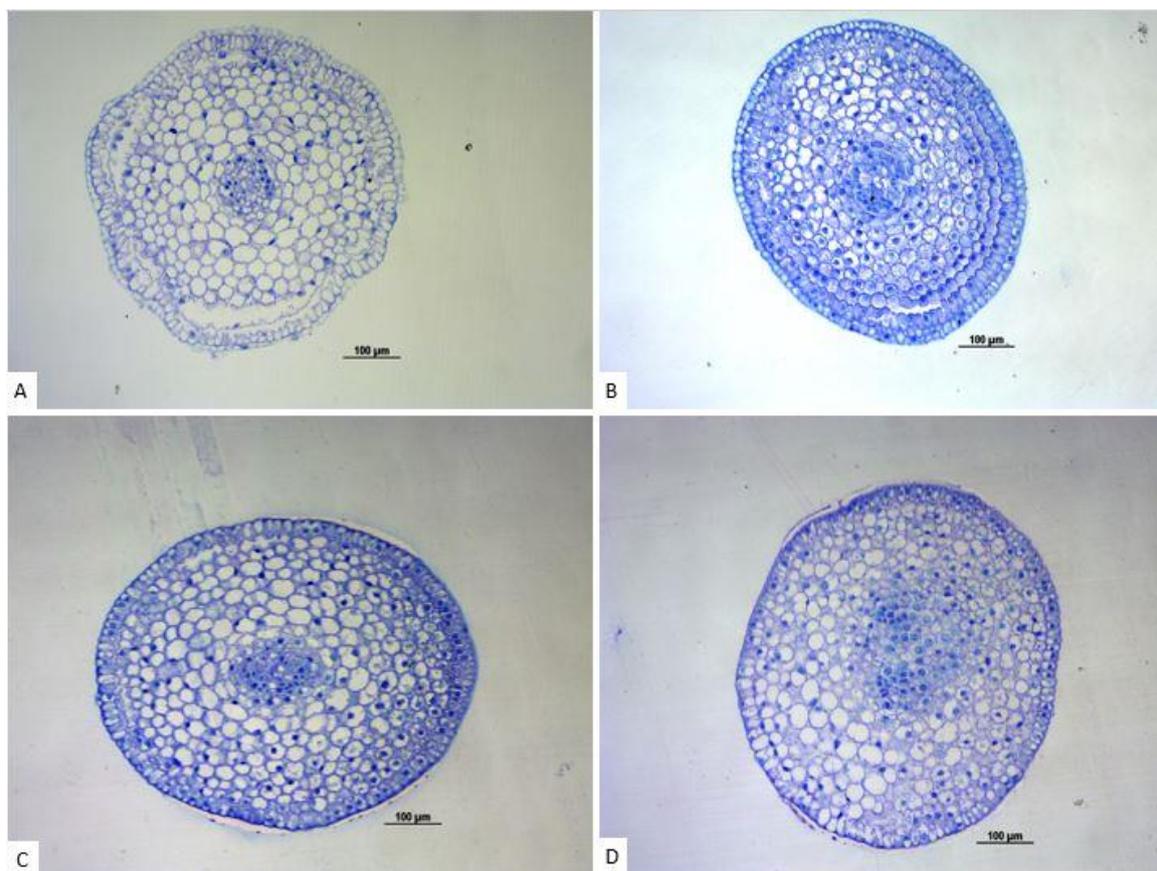


Figura 6 - Corte transversal em raízes de *Allium cepa* L. exposta a diferentes concentrações do herbicida Clethodim. **A.** Controle negativo **B.** Concentração 1 **C.** Concentração 3 **D.** Concentração 6

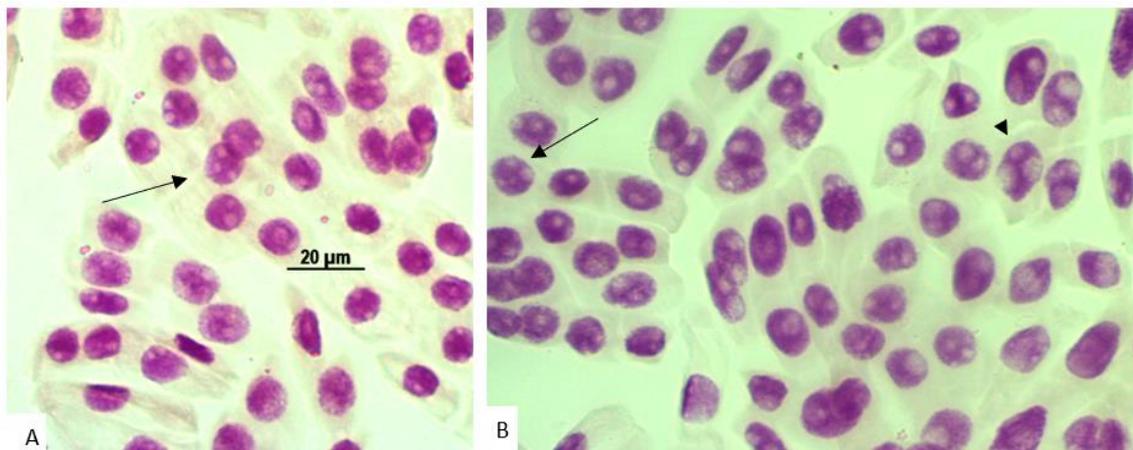


Figura 7 - Células de *Allium cepa* coradas pela metodologia de Feulgen, expostas a diferentes concentrações do herbida Clethodim. **A.** Concentração 1; **B.** Concentração 2. Setas indicam núcleo com variação do número de nucléolos, ponta de seta indica variação no tamanho de nucléolos.

Tabela 1 – Concentração (g/L) do princípio ativo do herbicida.

<b>Concentração</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>
<b>g/L</b>	1,92	0,96	0,48	0,24	0,12	0,06

Tabela 2 – Parâmetros de divisão celular normal e índice mitótico (IM%) de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas durante 96 h aos tratamentos com o herbicida clethodim.

Tratamentos	Índice mitótico (%)	Prófase (%)	Metáfase (%)	Anáfase (%)	Telófase (%)
CN	18,86 ± 9,52 <sup>a</sup>	82,95 ± 3,41 <sup>ab</sup>	7,55 ± 2,57 <sup>ab</sup>	9,47 ± 3,17 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
CP	21,88 ± 6,91 <sup>a</sup>	63,48 ± 6,51 <sup>a</sup>	17,56 ± 3,95 <sup>b</sup>	18,95 ± 3,22 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C1	16,58 ± 4,87 <sup>a</sup>	95,6 ± 5,18 <sup>b</sup>	1,55 ± 1,92 <sup>a</sup>	2,61 ± 3,61 <sup>a</sup>	0,54 ± 1,11 <sup>a</sup>
C2	27,52 ± 8,02 <sup>a</sup>	84,69 ± 10,77 <sup>ab</sup>	6,59 ± 4,22 <sup>ab</sup>	8,71 ± 6,65 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C3	30,88 ± 7,83 <sup>a</sup>	73,67 ± 10,12 <sup>a</sup>	12,45 ± 4,77 <sup>b</sup>	13,86 ± 5,57 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C4	25,48 ± 6,94 <sup>a</sup>	77,01 ± 8,30 <sup>ab</sup>	10,03 ± 4,05 <sup>ab</sup>	12,95 ± 5,88 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C5	22,48 ± 10,80 <sup>a</sup>	77,34 ± 6,87 <sup>ab</sup>	12,17 ± 5,05 <sup>ab</sup>	10,48 ± 2,92 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C6	25,06 ± 4,17 <sup>a</sup>	82,52 ± 4,16 <sup>ab</sup>	7,78 ± 2,79 <sup>ab</sup>	9,6 ± 1,75 <sup>ab</sup>	0,27 ± 0,61 <sup>a</sup>

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

Tabela 3 – Alterações cromossômicas e micronúcleo observadas nas análises citogenéticas realizadas nas células meristemáticas de *Allium cepa* expostas durante 96 h ao herbicida clethodim.

Tratamentos	AC (%)	Células com Micronúcleo (%)	Perda cromossômica (%)	Quebra cromossômica (%)	Aderência cromossômica (%)	C-metáfase (%)	C-metáfase poliploide (%)	Ponte (%)
CN	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
CP	2,19 ± 2,62 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,096 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,088 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,38 ± 0,48 <sup>b</sup>	0,16 ± 0,22 <sup>a</sup>
C1	0,09 ± 0,21 <sup>ab</sup>	2,52 ± 1,68 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,097 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C2	0,17 ± 0,38 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,085 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C3	0,44 ± 0,78 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,082 ± 0,18 <sup>a</sup>
C4	0,88 ± 1,22 <sup>ab</sup>	0,28 ± 0,40 <sup>ab</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C5	0,58 ± 1,31 <sup>ab</sup>	0,16 ± 0,35 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
C6	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>

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

