

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO**

**ANÁLISE FITO-CITOGENOTÓXICA DE CONCENTRAÇÕES
AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE PESTICIDAS**

Luanna Alves Miranda

Alegre, março de 2022

Luanna Alves Miranda

**ANÁLISE FITO-CITOGENOTÓXICA DE CONCENTRAÇÕES
AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE PESTICIDAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana da Silva Souza

Alegre, março de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e saúde, agradeço pela perseverança, sabedoria, paciência e paz que trouxe ao meu coração, agradeço pelas pessoas incríveis colocadas no meu caminho que me deram força para continuar, agradeço por todas as bênçãos derramadas em minha vida e na minha família.

A Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, campus de Alegre, e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento pela oportunidade de desenvolver esse trabalho e pela disponibilidade dos laboratórios e equipamentos.

A FAPES, pelo apoio financeiro, que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

Agradeço a Prof^a Dr^a Tatiana da Silva Souza, por sua orientação, dedicação, profissionalismo, competência e paciência nesses anos de mestrado, obrigada por acreditar em mim e pelo incentivo não chegaria neste ponto sem o seu apoio.

Ao Prof. Dr. José Marcello Salabert de Campos, responsável pelo laboratório de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, obrigada pela atenção e por destinar seu tempo para a realização das análises de citometria de fluxo.

Aos membros da banca examinadora Prof.^a Dr.^a Cintya Aparecida Christofolletti e Prof.^a Dr.^a Milene Miranda Praça Fontes, que gentilmente se propuseram a participar e colaborar com esta dissertação.

Ao meu amado, Marcelo, obrigada por todo apoio, amor, carinho, compreensão, atenção e amizade incondicional que você me deu, obrigada por ter sonhado junto comigo.

A minha família, minha avó Maria Lúcia, meu pai Marcus Venicius, minha mãe Olyra, e meu irmão Lukas e meus sogros Valdir e Maria Petrucia que foram minha base, tão importante nessa caminhada, obrigada por acreditarem em mim e por todo apoio.

A minha amiga Layra Medeiros, pelos momentos divididos, se tornou uma amiga de verdade e fez dessa jornada mais leve. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias, você foi o presente que o mestrado meu deu, foi ótimo poder contar com você.

Aos meus amigos, Vanessa Dian, Rafael Cabral, Artur Gama, Loren Vasconcelos e Ester Moulin, muito obrigada pela parceria e por toda disponibilidade em me auxiliar sempre que preciso.

A todos professores e alunos que tive o prazer de compartilhar momentos de aprendizado, orientações e amizade, que me auxiliaram durante as disciplinas e viraram referências para mim.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1 Pesticidas testados e faixas de concentrações.....	7
2.1.1 Glifosato.....	7
2.1.2 2,4-D.....	7
2.1.3 Iprodiona.....	8
2.1.4 Imidacloprido.....	8
2.1.5 Mistura dos pesticidas.....	8
2.2 Ensaio com <i>A. cepa</i>	9
2.2.1 Análise do potencial fitotóxico dos pesticidas.....	9
2.2.2 Análise do potencial citogenotóxico dos pesticidas.....	9
2.2.3 Análise do ciclo celular mediante a técnica de citometria de fluxo.....	10
2.3 Análise estatística.....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
3.1 Fitotoxicidade.....	11
3.2 Citogenotoxicidade.....	15
3.3 Citometria de fluxo.....	19
8. CONCLUSÃO	22
9. REFERÊNCIAS	23

ANÁLISE FITO-CITOGENOTÓXICA DE CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE PESTICIDAS

Luanna Alves Miranda¹; José Marcello Salabert de Campos.²; Tatiana da Silva Souza¹

Universidade Federal do Espírito Santo¹; Universidade Federal de Juiz De Fora²

Autor correspondente: tatianas.souza@hotmail.com (SOUZA, T.S.)

RESUMO: O Brasil é um dos maiores importadores e consumidores de pesticidas do mundo. Por conseguinte, o uso intensivo e indiscriminado desses compostos é preocupante devido à contaminação do meio aquático. Um dos problemas associados é a exposição de organismos não-alvo a pesticidas, acarretando danos clastogênicos e também aneugênicos, com alterações no ciclo celular, mutações e morte celular. Desse modo, este trabalho teve como objetivo investigar se concentrações ambientalmente relevantes dos pesticidas glifosato, 2,4-D, imidacloprido e iprodiona, reportadas pela Resolução CONAMA nº 375 (2005) e/ou encontradas em águas superficiais e de abastecimento causam efeitos fito-citogenotóxicos em *Allium cepa*. Os pesticidas foram testados isolados e combinados. As análises realizadas foram: índice de germinação, velocidade de germinação, crescimento radicular, índice mitótico, frequência de células aberrantes e análise do ciclo celular por meio de citometria de fluxo. Foi verificado que os pesticidas e as misturas inibiram o ciclo de divisão celular (inibição do índice mitótico, aumento da frequência de partículas em sub-G1, aumento de células em G0/G1 e redução de núcleos nas fases S e G2/M) induziram a formação de células aberrantes e aumentaram o coeficiente de variação de G1, culminando na redução do índice de germinação, velocidade de germinação e do comprimento radicular. Os resultados deste estudo indicaram que os pesticidas testados e as misturas representam risco para os organismos não-alvo.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium cepa* L., glifosato, imidacloprido, iprodiona, 2,4-D.

ABSTRACT: Brazil is one of the largest importers and consumers of pesticides in the world. Therefore, the intensive and indiscriminate use of these compounds is worrisome due to contamination of the aquatic environment. One of the associated problems is the exposure of non-target organisms to pesticides, causing clastogenic and also aneugenic damage, with alterations in the cell cycle, mutations and cell death. Thus, this study aimed to investigate whether environmentally relevant concentrations of the pesticides glyphosate, 2,4-D, imidacloprid and iprodione, reported by CONAMA Resolution nº 375 (2005) and/or found in surface and supply waters cause phyto-toxic effects. cytogenotoxic agents in *Allium cepa*. Pesticides were tested singly and in combination. The analyzes performed were: germination index, germination speed, root growth, mitotic index, frequency of aberrant cells and cell cycle analysis by flow cytometry. It was found that pesticides and mixtures inhibited the cell division cycle (inhibition of the mitotic index, increased particle frequency in sub-G1, increased cells in G0/G1 and reduced nuclei in S and G2/M phases) induced the formation of aberrant cells and increased the coefficient of variation of G1, culminating in the reduction of germination index, germination speed and root length. The results of this study indicated that the tested pesticides and mixtures pose a risk to non-target organisms.

KEYWORDS: *Allium cepa* L., glyphosate, imidacloprid, iprodione, 2,4-D.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores importadores e consumidores de pesticidas do mundo (CAMARGO *et al.*, 2017; BROVINI *et al.*, 2021). Em 2019, 467 novos pesticidas foram registrados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), um recorde dos últimos dez anos. Devido à extensa área de plantio e ao modelo de cultivo adotado no país, o consumo de pesticidas tem crescido, estimulado pelos créditos agrícolas subsidiados e isenção de tributos fiscais (CARNEIRO *et al.*, 2015). Com a aprovação do Projeto de Lei nº 6299/2002, o controle e a liberação de pesticidas no Brasil serão flexibilizados, visto que o processo será concentrado apenas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), controle que até então, é exercido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (CÂMARA DOS DEPUTADOS, 2022, p. 26).

Uma das maiores preocupações do uso indiscriminado de pesticidas é a presença de ingredientes ativos e seus derivados metabólitos no ambiente aquático, contaminando corpos hídricos através da aplicação direta para o controle de plantas aquáticas e insetos. E transportados a partir da pulverização aérea e via tratores com conseqüente deriva, pelo descarte inadequado de embalagens dos produtos químicos utilizados, lixiviação e escoamento superficial (SANTOS; SILVA, 2007; PIGNATI *et al.*, 2017), que é, dentre as citadas, a maior fonte de poluição difusa de pesticidas do solo agrícola para as águas superficiais (SCHULZ, 2004).

Princípios ativos diferentes e seus derivados metabólitos são encontrados combinados no meio aquático devido à aplicação, nas culturas, de diferentes classes de pesticidas, de forma simultânea ou sequencial, para o combate de pragas agrícolas diversas (FIORESI *et al.*, 2020). Uma estratégia adotada pelos agricultores é a mistura de pesticidas no tanque de pulverização, método legalizado no Brasil (CONFEA Normativa nº 40, de 2018) para reduzir gastos com o manejo das culturas (MITRA; RAGHU, 1998; GAZZIERO, 2015; EMBRAPA, 2018). Como resultado, a mistura desses compostos no meio aquático pode resultar em efeitos aditivos, sinérgicos, antagônicos ou de potenciação, diferentes dos efeitos produzidos por cada químico isolado, devido a interações químicas (HODGSON, 1999; GAZZIERO, 2015; FIORESI *et al.*, 2020).

A presença de pesticidas na água pode causar diversos danos ao meio ambiente e para a saúde humana (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; FRIEDRICH *et al.*, 2021), visto que há uma estimativa de que cada brasileiro estaria exposto a uma média de 7,3 litros de pesticidas por ano (TYGEL, 2015) via consumo de alimentos ou ingestão de água contaminados. Nas Estações de Tratamento de Água (ETA) são empregados processos ineficientes para remoção de pesticidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; LIRA, 2014), culminando na presença desses químicos em água de torneira (SISAGUA, 2018).

Assim, estudos dos efeitos de pesticidas isolados e em misturas são necessários para uma caracterização ampla da toxicidade desses compostos químicos (FIORESI *et al.*, 2020). Para tanto, o uso de *Allium cepa* como organismo modelo é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (WHO, 1985), visto que é sensível para a detecção de agentes com atividade fitotóxica (análise macroscópica) e citogenotóxica e mutagênica (análises microscópicas). Ainda, seu uso é favorecido devido à presença de cromossomos grandes e em número reduzido ($2n = 16$) (FISKESJÖ *et al.*, 1985), dando rapidez e confiabilidade na condução dos testes, cujos resultados apresentam alta correspondência quando comparados aos bioensaios com animais (GRANT, 1999; MA, 1999).

Em adição à análise microscópica, a citometria de fluxo tem sido utilizada como ferramenta para a análise da cinética do ciclo celular e morte celular em resposta a ação de citogenotoxinas e mutágenos ambientais, permitindo a detecção de alterações na frequência de células nas fases G0/G1, S e G2/M, de variações no conteúdo do DNA nuclear e de poliploidias e aneuploidias (BIRADAR *et al.*, 1994; RAYBURN; WETZEL, 2002; CVIKROVA *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2010; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012; FIORESI *et al.*, 2020).

Neste contexto, este trabalho apresenta os efeitos fitotóxicos e citogenotóxicos de formulações comerciais de pesticidas a base de glifosato, imidacloprido, iprodiona e 2,4-D, pois estão dentre os pesticidas mais comercializados no Brasil, além de suas misturas, por meio de testes com sementes de cebola. De acordo com a nova classificação toxicológica dos pesticidas, o glifosato, 2,4-D e o imidacloprido são classificados dentro da categoria 4 - produto pouco tóxico (RESOLUÇÃO Nº 2.080, DE 31 DE JULHO DE 2019). O pesticida iprodiona não está incluso nesta nova classificação. A classificação de

periculosidade ambiental do IBAMA (portaria 6, de 17 de maio de 2012), considera o pesticida iprodiona como classe II - muito perigoso e os pesticidas glifosato, 2,4-D, imidacloprido como classe III – produto perigoso para o meio ambiente.

Foram utilizadas concentrações ambientalmente relevantes efetivamente encontradas em águas superficiais e/ou correspondentes aos valores máximos permitidos em águas superficiais conforme a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005). Foram testadas ainda concentrações encontradas e/ou valores máximos permitidos em águas de consumo humano de acordo com dados do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA, 2018) e da Portaria nº 2.914 de 2011 do Ministério da Saúde.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pesticidas testados e faixas de concentrações

2.1.1 Glifosato

A formulação comercial Original DI Roundup, Monsanto, lote nº 0045 20-63560, contendo 445 g/L (44,5% m/v) de Sal de Di-amônio de *N*-(phosphonomethyl)glycine), 370 g/L (37% m/v) de equivalente ácido de *N*-(phosphonomethyl)glycine e 751 g/L (75% m/v) de outros ingredientes foi utilizada. As concentrações testadas, expressas como equivalente ácido, foram: a) 50 µg/L (GLI 1) - registrada em água de torneira de municípios brasileiros (SISAGUA, 2018); b) 65 µg/L (GLI 2) - corresponde a concentração máxima permitida em águas superficiais de classes I e II (CONAMA res 375, 2005) e c) 280 µg/L (GLI 3) - concentração máxima permitida em águas superficiais de classe III (CONAMA res 375, 2005).

2.1.2 2,4-D

O herbicida Nufarm U46 BR (lote nº 0800491517499 T/B) contendo 806 g/L de sal de dimetilamina do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D Amina), 670 g/L (67% m/v) de equivalente ácido e 380,9 g/L (38,09% m/v) de outros ingredientes foi utilizado. As concentrações testadas, expressas como equivalente ácido, foram: a) 4

µg/L (2,4-D 1) - concentração máxima permitida em águas superficiais de classes I e II (CONAMA res 375, 2005), o mesmo valor estabelecido pela Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde que dispõe sobre o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano (BRASIL, 2011); b) 10 µg/L (2,4-D 2) - encontrada em águas de torneira de municípios brasileiros (SISAGUA, 2018); c) 30 µg/L (2,4-D 3) - concentração máxima permitida em águas superficiais de classe III (CONAMA res 375, 2005).

2.1.3 Iprodiona

O fungicida Rovral SC, FMC Química do Brasil LTDA, lote nº 021-17-5475, contendo 500 g/L de iprodiona (*3-(3,5-dichlorophenyl) -N-isopropyl- 2,4-dioxoimidazolidine-1-carboxamide*) também foi investigado. As concentrações testadas foram: a) 15,96 µg/L (IPR 1) - escolhida por ser menor que as demais concentrações; b) 27,14 µg/L (IPR 2) - correspondente a concentração de iprodiona encontrada em águas superficiais (SEQUINATTO, 2013) e c) 47,26 µg/L (IPR 3) - definida com base na concentração estimada de ingrediente ativo em águas superficiais da sub-bacia do rio Alegre de acordo com o número total de aplicações para a cultura do café (QUEIROZ *et al.*, 2018).

2.1.4 Imidacloprido

As concentrações testadas do inseticida Warrant® 700 WG, lote nº 3269-16-1154, contendo 700 g/kg de imidacloprido (*1-(6-cloro-3-pyridinilmethyl) -N-nitroimidazolidim-2-ylidenoamine*), foram: a) 0,14 µg/L (IMI 1); b) 1,13 µg/L (IMI 2) e c) 4,53 µg/L (IMI 3), encontradas em águas superficiais e poços rurais (BORTOLUZZI *et al.*, 2007; SEQUINATTO, 2013).

2.1.5 Mistura dos pesticidas

As misturas dos pesticidas foram preparadas de acordo com Bianchi *et al.* (2016), Felisbino *et al.* (2018) e Fioresi *et al.* (2020), onde foram combinadas as menores (M1), as intermediárias (M2) e as maiores concentrações testadas (M3):

a) M1 = 50 µg/L glifosato + 15.96 µg/L iprodiona + 0,14 µg/L imidacloprido + 4 µg/L 2,4-D;

- b) M2 = 65 µg/L glifosato + 27,14 µg/L iprodiona + 1,13 µg/L imidacloprido + 10 µg/L 2,4-D;
- c) M3 = 280 µg/L glifosato + 47,26 µg/L iprodiona + 4,53 µg/L imidacloprido + 30 µg/L 2,4-D.

2.2 Ensaio com *A. cepa*

Sementes de *A. cepa* (2n= 16), variedade baia periforme (ISLA®, lote nº 127536, taxa de germinação de 98%) foram utilizadas. Para todos os ensaios, água destilada foi utilizada como controle negativo (CN) e colchicina 0,025% como controle positivo (CP).

2.2.1 Análise do potencial fitotóxico dos pesticidas

O teste foi realizado de acordo com *US Protection Environmental Agency* (USEPA, 1996). Para a análise, 15 sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro umedecido com as concentrações dos pesticidas e misturas. Foram preparadas três placas para cada concentração. A contagem de sementes germinadas foi realizada a cada 24h, até que 65% das sementes do grupo controle tivessem raízes germinadas e desenvolvidas com pelo menos 20 mm de comprimento. A porcentagem de germinação (G) foi calculada por meio da fórmula: $G = (N/A) \times 100$; onde N é o número total de sementes germinadas e A o número de sementes colocadas para a germinação. Para o cálculo da velocidade de germinação foi utilizada a fórmula: $IVG = (\sum Ni)/(\sum Di)$; onde: Ni – número de raízes germinadas no dia i; Di – número de dias para a germinação. O comprimento final das radículas foi mensurado com o auxílio de um paquímetro.

2.2.2 Análise do potencial citogenotóxico dos pesticidas

Após exposição aos pesticidas, quando as radículas obtiveram cerca de 15 mm, foram coletadas, fixadas em metanol+ácido acético (3:1, v/v) e armazenadas em geladeira. Para a retirada do excesso de fixador, as raízes passaram por 3 lavagens, de 5 minutos cada, em água destilada. As radículas foram hidrolisadas em HCl 5N a temperatura ambiente por 10 minutos e também passaram por 3 lavagens,

de 5 minutos cada, em água destilada. Decorrido esse processo, a região meristemática foi seccionada em lâmina, corada com orceína 2% por 10 minutos, coberta com lamínula e macerada. Dez lâminas foram preparadas para cada tratamento e um total de 5000 células por tratamento foram contabilizadas (500 células/lâminas). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com aumento de 400 ×. A frequência de células em divisão foi determinada pelo cálculo do índice mitótico (potencial citotóxico). Todas as anormalidades mitóticas e cromossômicas observadas foram agrupadas dentro de uma mesma categoria: frequência de células aberrantes.

2.2.3 Análise do ciclo celular mediante a técnica de citometria de fluxo

Para as análises de citometria de fluxo foram realizadas 3 repetições para cada tratamento e foram utilizadas 12 raízes de *A. cepa* por réplica. Suspensões nucleares foram obtidas pelo método descrito por Galbraith *et al.* (1983). Os meristemas foram seccionados com auxílio de lâmina de bisturi em placa de Petri contendo 600 µl de tampão de lise LB01, em uma caixa com gelo triturado. Com os núcleos isolados, as suspensões foram filtradas por rede de nylon com cerca de 45 µm, para eliminar a maior parte de resíduos obtidos. Estas então foram coradas com 50 µl de iodeto de propídeo (1 mg/L) para análise em citômetro de fluxo BD FACSCanto II.

Foram analisadas as frequências de núcleos nas fases G0/G1 (conteúdo de DNA 2C), S (conteúdo de DNA 2 - 4C) e G2/M (conteúdo de DNA 4C). Ainda, foi mensurada a proporção de células em sub-G1, que apresentam conteúdo de DNA menor que 2C (fragmentação do material genético devido morte celular) (HOWARD; PELC, 1986; DOLEŽEL *et al.*, 2007; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012). Também foram determinados o índice de fluorescência (IF) que permite estimar a quantidade de DNA, a dispersão da luz frontal (FSC- Forward Scatter) para analisar o diâmetro ou tamanho nuclear e a dispersão lateral da luz (SSC – Side Scatter) para verificar a granulosidade e/ou densidade nuclear. Ainda, foi determinado o coeficiente de variação de G1 (CV = desvio padrão dividido pela média) (ORMEROD *et al.*, 1995).

2.3 Análise estatística

Diferenças estatísticas foram analisadas mediante ANOVA com posterior teste de Dunnett ($p < 0.05$). Quando necessário, os dados foram transformados para alcançar a normalidade e igualdade de variância. Quando não foi possível o uso de testes paramétricos, os resultados foram comparados mediante o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com posterior teste de Dunn ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Fitotoxicidade

Os índices de germinação, velocidade de germinação e crescimento radicular foram utilizados para aferir a toxicidade de concentrações relevantes para o ambiente aquático dos pesticidas glifosato, 2,4-D, iprodiona e imidacloprido, isolados e combinados. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 1.

Nenhuma concentração do pesticida glifosato alterou o índice de germinação, velocidade de germinação e crescimento radicular em relação ao controle negativo (Figura 1 A-C). O glifosato é um herbicida sistêmico e pós emergente, pertencente ao grupo das glicinas, o seu mecanismo de ação interrompe a síntese da enzima 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato (EPSP), como resultado, inviabiliza a síntese do fenilalanina, tirosina e triptofano que são aminoácidos essenciais para as plantas, afetando o desenvolvimento da planta (HELANDER et al., 2019; SAJIDAKHAN et al., 2020).

Esses resultados corroboram com o estudo de Santos *et al.* (2019), que reportaram que a concentração máxima permitida de glifosato em águas superficiais de classes I e II, 65 µg/L (CONAMA, 2005), não foi fitotóxica para *Lactuca sativa*. Entretanto, os autores reportaram que *Eruca sativa*, foi mais sensível às análises pois foi observado aumento no índice de germinação e do crescimento radicular em relação ao controle negativo.

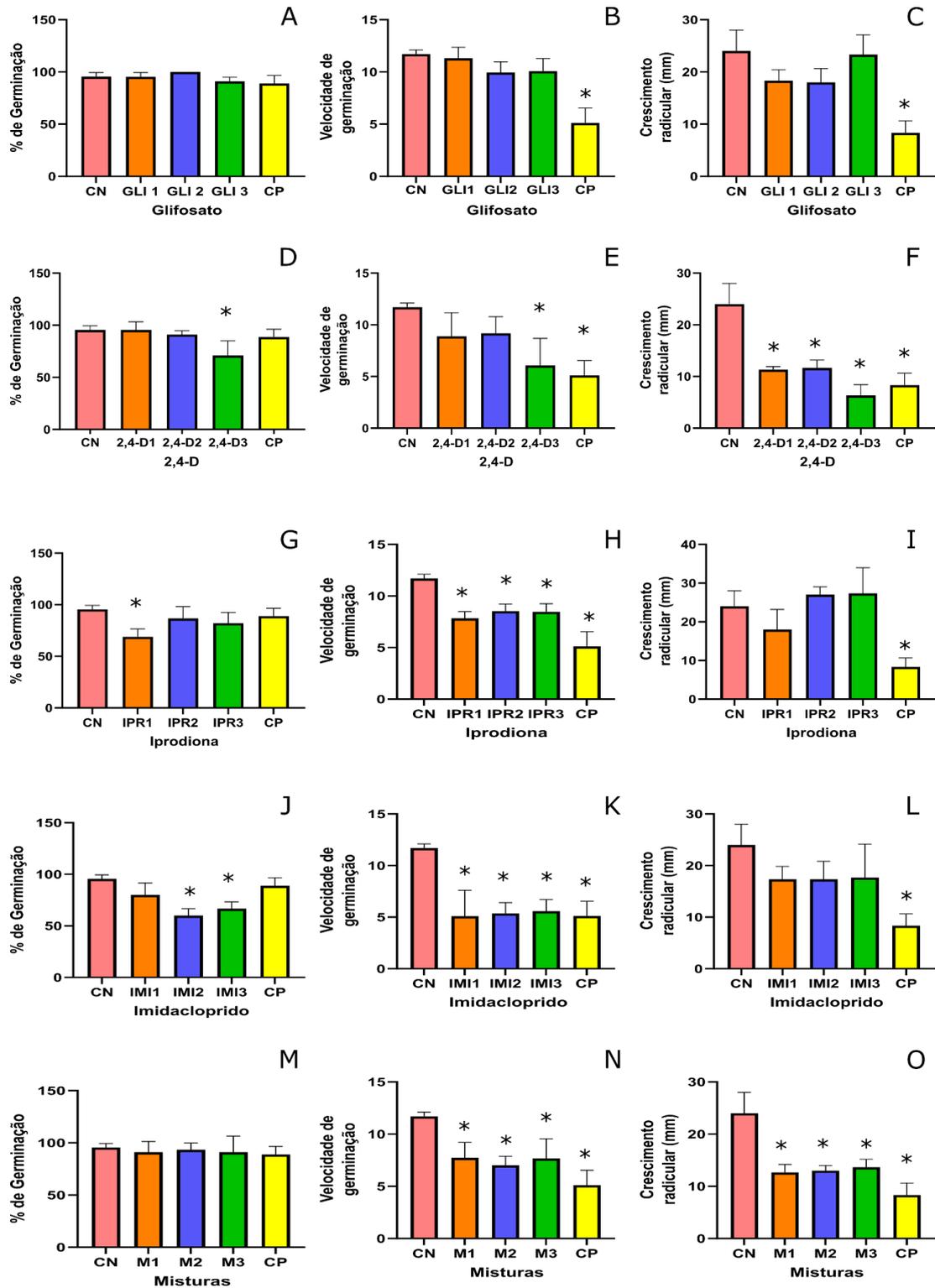


Figura 1. Ensaio de fitotoxicidade após exposição de *A. cepa* aos pesticidas glifosato (A-C), 2,4-D (D-F), iprodiona (G-I), imidacloprido (J-L) e misturas (M-O). Concentrações testadas: glifosato: 50 (GLI 1), 65 (GLI 2) e 280 (GLI 3) $\mu\text{g/L}$; iprodiona: 15,96 (IPR 1), 27,14 (IPR 2) e 47,26 (IPR 3) $\mu\text{g/L}$; imidacloprido: 0,14 (IMI 1), 1,13 (IMI 2) e 4,53 (IMI 3) $\mu\text{g/L}$; 2,4-D: 4 (2,4-D 1), 10 (2,4-D 2) e 30 (2,4-D 3) $\mu\text{g/L}$ e a mistura desses compostos: M1, M2 e M3. CN: água destilada. CP: colchicina 0,025%. * Significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN com teste Dunnet.

O herbicida 2,4-D foi fitotóxico, pois inibiu o índice de germinação (2,4-D 3), promoveu menor velocidade de germinação (2,4-D 3) e reduziu o crescimento radicular (2,4-D 1, 2,4-D 2 e 2,4-D 3) de *A. cepa* (Figura 1D-F). O 2,4-D é um herbicida sistêmico que mimetiza a ação da auxina natural. Em altas concentrações inibe a produção do hormônio etileno, culminando na produção de ácido abscísico que, por sua vez, inibe a divisão e expansão celular, causando a redução do crescimento radicular, dano tecidual e a morte celular da planta (GROSSMANN, 2003; TAIZ; ZEIGER, 2004; MARCATO *et al.*, 2017).

Marcato *et al.* (2017) trabalhando com uma formulação comercial de 2,4-D e concentrações de campo para a cultura de cana-de-açúcar, observaram a inibição do índice de germinação de *A. cepa*, além da redução do crescimento radicular e raízes com inchaço acima da região meristemática. De modo similar, Martins *et al.* (2018) observaram redução no índice de germinação e crescimento radicular em *Lactuca sativa*.

O produto comercial a base de iprodiona inibiu o processo de germinação (IPR 1) e velocidade de germinação (IPR 1, IPR 2 e IPR 3) (Figura 1 G-I). A iprodiona é um fungicida de contato, pertencente ao grupo químico dicarboximida (POMMER *et al.*, 1982), com pouca mobilidade nas plantas (EHR; KEMMITT, 2002). Apesar disso, os resultados obtidos neste trabalho mostram os efeitos adversos da iprodiona e estão de acordo com Fioresi *et al.* (2020) e Bernardes *et al.* (2019) que testaram concentrações de campo para cebola e tomate, respectivamente.

As concentrações de imidacloprido testadas também reduziram o índice de germinação (IMI 2 e IMI 3) e da velocidade de germinação (IMI 1, IMI 2 e IMI 3), mas não alteraram o índice de crescimento radicular (Figura 1 J-L). Pertencente do grupo químico neonicotinóide, o imidacloprido é um inseticida sistêmico, quando absorvido pela planta se transloca através do xilema para todas as partes da planta (GOULSON, 2013).

Corroborando os dados obtidos no presente estudo, Stevens *et al.* (2008), observaram redução no índice de germinação e crescimento radicular do arroz (*Oryza sativa*) expostos a imidacloprido. Entretanto, Zhang *et al.* (2022) em bioensaio com *L. sativa*, relataram que não houve alterações no índice de germinação e crescimento radicular. Ester *et al.* (2003), trabalhando com semente de repolho (*Brassica oleracea* L.convar. *Capitata* L.) e couve-flor (*Brassica oleracea*

L.var. *Botrytis* L.), não observaram diferenças na porcentagem de germinação, mas após 14 dias foi observado redução no índice de plantas sadias.

Nenhuma das misturas induziu alterações no índice de germinação, porém todas reduziram a velocidade de germinação e o crescimento radicular (M1, M2 e M3) (Figura 1 M-O). A mistura em tanque de glifosato e 2,4-D é comumente utilizada para eliminar plantas daninhas resistentes (TAKANO *et al.*, 2013; CONCENÇO *et al.*, 2014). Gomes *et al.* (2017) relataram que a mistura dos dois herbicidas causou toxicidade em plantas de milho. Já Fioresi *et al.* (2020) reportaram que iprodiona e imidacloprido combinados inibiram o processo de germinação e promoveram menor crescimento radicular em *A. cepa*.

A inibição da taxa de germinação é um efeito letal, tendo como resultado a morte do embrião (SOBRERO; RONCO, 2004). Porém, é um parâmetro menos sensível do que o crescimento radicular para a avaliação da fitotoxicidade (VALÉRIO *et al.*, 2007; ARAGÃO *et al.*, 2017). O comprimento radicular é afetado pela velocidade de germinação, que pode, portanto, contribuir para a redução do desenvolvimento das raízes (CARVALHO *et al.*, 2019).

De acordo com Webster *et al.* (1996), o crescimento radicular é dependente do processo de alongamento celular e da progressão do ciclo celular. Portanto, a divisão celular menos frequente avaliada pelo índice mitótico e o alto índice de células aberrantes podem explicar a observação de raízes mais curtas.

3.2 Citogenotoxicidade

Os dados de citogenotoxicidade são mostrados na Tabela 1. Todas as concentrações testadas dos pesticidas glifosato e 2,4-D e as misturas M1 e M3 reduziram o índice mitótico em relação ao controle negativo.

O índice mitótico tem sido utilizado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de diversos agentes, determinada pelo aumento ou diminuição da frequência de células em divisão (LEME; MARIN, 2009; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2016). O efeito mitodepressivo do 2,4-D, de M1 e M3 pode estar associado às lesões no material genético e ativação de mecanismos de reparo, ou ao comprometimento de proteínas específicas envolvidas na progressão do ciclo celular e morte celular, dificultando o início da prófase (SOUSA *et al.*, 2009;

FINKLER *et al.*, 2022). Explicando a redução da velocidade de germinação e do crescimento radicular (ANDRADE *et al.*, 2013; ARAGÃO *et al.*, 2017).

Como o glifosato promoveu redução do índice mitótico esperava-se interferência no índice de velocidade de germinação e crescimento radicular, mas isso não foi observado, isso pode estar relacionada com a característica pós emergente do herbicida.

Todas as concentrações dos pesticidas (exceto a IPR 1 e a mistura M3) promoveram danos genotóxicos com aumento significativo da frequência de células aberrantes (Tabela 1).

Os herbicidas glifosato e o 2,4-D tem o potencial de induzir danos no DNA a partir da metilação da citosina (NARDEMIR *et al.*, 2015; GARCIA *et al.*, 2019), formando uma 5-metilcitosina, que interfere nos processos genéticos, incluindo a replicação e o mecanismo de reparo do DNA (VANYUSHIN, 2006) e, como resultado, a integridade e função do DNA são afetados, causando instabilidade genética (ROMERO *et al.*, 2011; NARDEMIR *et al.*, 2015). Kwiatkowska *et al.* (2017) sugerem que o glifosato pode causar baixa regulação da expressão do gene p53, assim ativando genes regulatórios, promovendo alterações genômicas com inserção e recombinação de homólogos.

Os efeitos citogenotóxicos causados por esses herbicidas têm sido relatados por outros autores em organismos não-alvo terrestres e aquáticos, corroborando os dados obtidos nesse estudo (SOUZA *et al.*, 2010; MERCADO *et al.*, 2020; MOREIRA *et al.*, 2020; BROVINI *et al.*, 2021; FATTAH *et al.*, 2021; FINKLER *et al.*, 2022).

O fungicida iprodiona atua na inibição da atividade da proteína quinase. A inexpressão desta proteína interfere nos sinais intracelulares acarretando problemas em diversas funções celulares (BERG *et al.*, 2018; WEI *et al.*, 2021), Vitoratos *et al.* (2001) relatam que a iprodiona causa desorientação da organização do fuso mitótico resultando na não disjunção cromossômica e desorganização na estrutura do envelope nuclear que promove lacunas no envelope nuclear e facilitam a ocorrência de danos por enzimas celulares ou radicais livres.(AZEVEDO *et al.*, 1977; VITORATOS *et al.*, 2001). A atividade genotóxica da iprodiona em plantas foi reportada por Aragão *et al.* (2019) e Fioresi *et al.* (2020) e o seu dano aos organismos aquáticos foi relatado por Wei *et al.* (2021).

O inseticida imidacloprido possui características alquilantes, levando a indução de danos no DNA das células. Esta propriedade está relacionada a eletronegatividade, sendo favorecida pela presença do farmacóforo eletrofílico (N-nitroimine substituinte =NNO₂), que faz com que ele se torne reativo os elétrons presentes nos sítios do DNA (BENIGNI *et al.*, 1992; JANSEN *et al.*, 1994). Rodriguez *et al.* (2015) e Bianchi *et al.* (2016) relataram os efeitos de concentrações de campo em plantas e Rodriguez *et al.* (2015) demonstraram o efeito genotóxico em organismos aquáticos. Tais dados corroboram aos obtidos no presente estudo.

A atividade genotóxica dos pesticidas testados tem sido relacionada com a indução de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (ROS) (EDLICH; LYR, 1992; KNOPP; SCHILLER, 1992; BOLOGNESI *et al.*, 1997; ORUÇ *et al.*, 2004; EL-GENDY *et al.*, 2010), causando peroxidação lipídica, alterando a fluidez das membranas biológicas (EL-GENDY *et al.*, 2010) e dano direto ao DNA (ZAMA *et al.*, 2007; FENG *et al.*, 2010)..

A interação dos pesticidas M1, M2 e M3 se mostrou como antagonista, pois a indução de células aberrantes foi menor do que a dos compostos isolados (TAMMES, 1964). A não indução significativa de células aberrantes pela mistura M3 pode estar relacionada com o maior efeito citotóxico dentre as amostras testadas. Resultados semelhantes quanto à citogenotoxicidade foram observados por Fioresi *et al.* (2020) para misturas de iprodiona e imidacloprido e por Carvalho *et al.* (2020), para as misturas de glifosato e 2,4-D.

As alterações que mais contribuíram para a genotoxicidade dos pesticidas e misturas estão apresentadas na Figura 2, e essas foram micronúcleos (Figura 3 F), aderência cromossômica (Figura 3 G-H), perda cromossômica (Figura 3 I-J), quebra cromossômica (Figura 3 K), ponte cromossômica (Figura 3 L) e poliploidia (Figura 3 M).

Tabela 1. Citogenotoxicidade dos pesticidas e misturas em *A. cepa*.

Tratamentos	Índice mitótico (%)	Células aberrantes (%)
CN	51,2 ± 7,4	1,6 ± 1,0
CP	54,96 ± 7,6*	20,2 ± 5,4*
GLI 1	37,62 ± 7,4*	5,1 ± 2,3*
GLI 2	42,88 ± 7,8*	7,6 ± 1,4*
GLI 3	31,52 ± 7,2*	5,9 ± 1,9*
2,4-D 1	36,66 ± 9,0*	10,9 ± 5,2*
2,4-D 2	37,66 ± 7,6*	14,9 ± 5,2*
2,4-D 3	39,16 ± 7,5*	11,1 ± 4,4*
IPRO 1	44,3 ± 11,0	12,1 ± 2,4
IPRO 2	48,7 ± 6,4	18,1 ± 4,0*
IPRO 3	53,1 ± 3,6	19,5 ± 7,4*
IMI 1	49,8 ± 4,2	7 ± 3,3*
IMI 2	48,4 ± 8,9	11,22 ± 6,4*
IMI 3	45,8 ± 3,5	10,9 ± 5,3*
M 1	38,5 ± 8,0*	10,4 ± 5,1*
M 2	45,3 ± 7,2	11,3 ± 4,7*
M 3	35,2 ± 7,1*	6,9 ± 6,5

Pesticidas e concentrações testadas: glifosato: 50 (GLI 1), 65 (GLI 2) e 280 (GLI 3) µg/L; iprodiona: 15,96 (IPR 1), 27,14 (IPR 2) e 47,26 (IPR 3) µg/L; imidacloprido: 0,14 (IMI 1), 1,13 (IMI 2) e 4,53 (IMI 3) µg/L; 2,4-D: 4 (2,4-D 1), 10 (2,4-D 2) e 30 (2,4-D 3) µg/L e a mistura desses compostos: M1, M2 e M3. CN: água destilada. CP: colchicina 0,025%. * Significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN com teste Kruskal-Wallis e posterior teste Dunn.

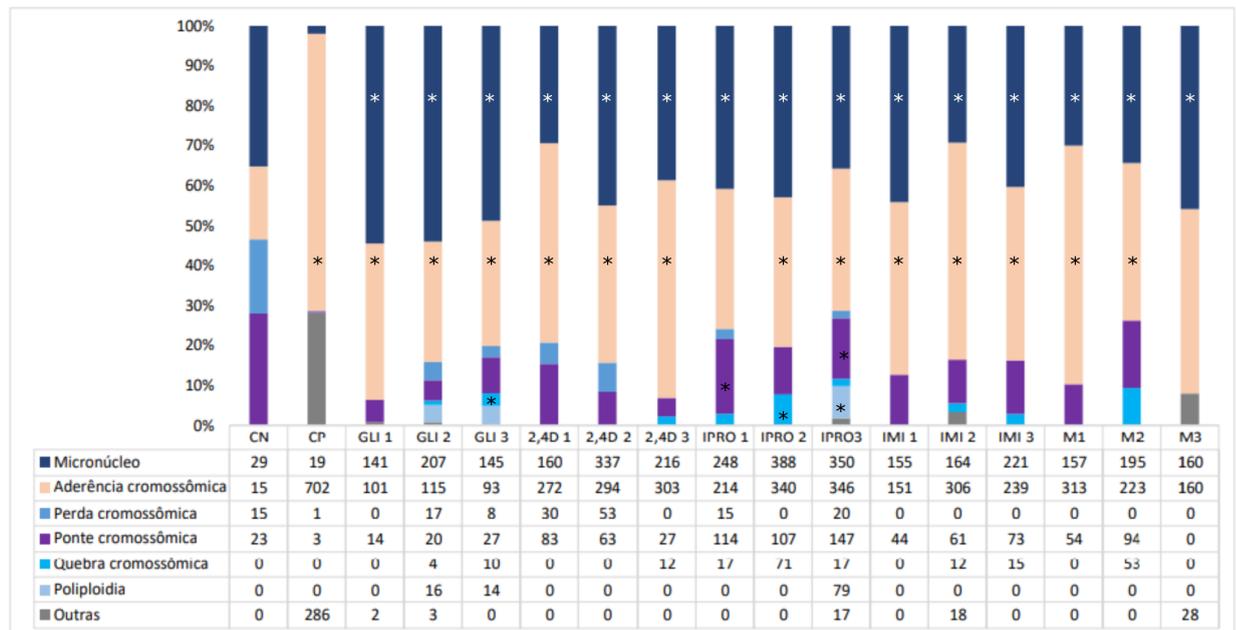


Figura 2. Distribuição das células aberrantes observadas nas raízes de *A. cepa*, expostas a pesticidas. Concentrações testadas: glifosato: 50 (GLI 1), 65 (GLI 2) e 280 (GLI 3) $\mu\text{g/L}$; iprodiona: 15,96 (IPRO 1), 27,14 (IPRO 2) e 47,26 (IPRO 3) $\mu\text{g/L}$; imidacloprido: 0,14 (IMI 1), 1,13 (IMI 2) e 4,53 (IMI 3) $\mu\text{g/L}$; 2,4-D: 4 (2,4-D 1), 10 (2,4-D 2) e 30 (2,4-D) $\mu\text{g/L}$ e a mistura desses compostos: M1, M2 e M3. CN: água destilada. CP: colchicina 0,025%. * Significativo ($p < 0,05$) em relação ao CN com teste Kruskal-Wallis e posterior teste Dunn.

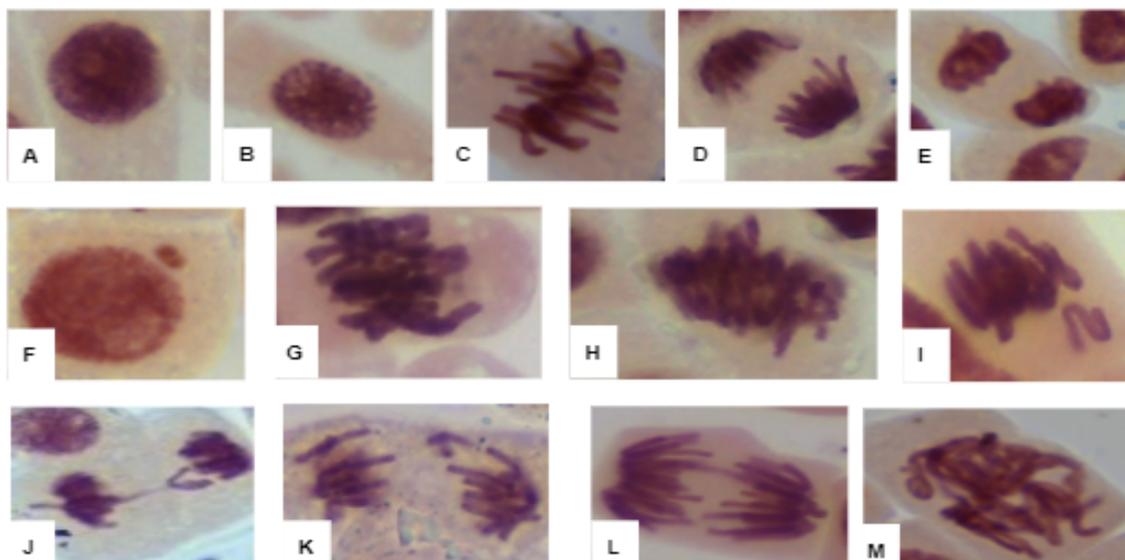


Figura 3. Estágios do ciclo celular de raízes de *A. cepa*. (A-E) fases normais do ciclo: (A) intérfase; (B) prófase; (C) metáfase; (D) anáfase; (E) telófase. (F-M) células aberrantes: (F) célula micronucleada; (G-H) aderência cromossômica; (I) perda cromossômica; (J) perda e ponte cromossômica; (K) quebra cromossômica; (L) ponte cromossômica; (M) poliploidia. visualização 50 μm .

Micronúcleos resultaram dos danos clastogênicos (quebras e pontes cromossômicas) ou aneugênicos (que interferem na maquinaria mitótica) não reparados ou reparados erroneamente em células parentais (RIBEIRO *et al.*, 2018), sendo facilmente observados nas células-filhas (LEME; MARIN, 2009).

Aderência cromossômica é o resultado do efeito altamente tóxico na cromatina, que induz empacotamento incorreto de fibras cromossômicas, tornando os cromossomos conectados por pontes sub-cromáticas (MCGILL *et al.*, 1974; KLÁSTERSKÁ *et al.*, 1976; BADR *et al.*, 1992; BIANCHI *et al.*, 2016), impossibilitando a separação e segregação de cromátides. Se persistirem até a anáfase, algumas dessas aderências formam pontes que podem quebrar e acarretam aberrações cromossômicas como quebras e micronúcleos (MCGILL *et al.*, 1974; PATHAK *et al.*, 1975; FELISBINO *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2017; LIMAN *et al.*, 2019). A aderência cromossômica é também caracterizada como um estágio inicial para a morte celular programada (apoptose) (HENGARTNER, 2000; GALLUZZI *et al.*, 2007).

Poliploidia é resultado da não formação do fuso mitótico, entretanto o ciclo celular não é interrompido e a célula entra na fase G1 sem finalizar a divisão longitudinal dos cromossomos, que ocorreria na anáfase (ZAMARIOLA *et al.*, 2014). Antes de uma nova divisão mitótica, todas as moléculas de DNA são duplicadas e a célula começa a mitose com um número duplicado de cromossomos (CARVALHO *et al.*, 2019). Células poliplóides, na tentativa de restabelecer as condições normais de ploidia, podem eliminar o excesso de DNA do núcleo, originando perdas cromossômicas e micronúcleos (FERNANDES *et al.*, 2007).

3.3 Citometria de fluxo

Os resultados da análise do ciclo celular de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* por meio da citometria de fluxo estão dispostos na Tabela 2.

Todos os pesticidas induziram ocorrência de células na fase de sub-G1, com o conteúdo de DNA menor que 2C, desta forma, todas as concentrações dos pesticidas testados promoveram a fragmentação do DNA (BIRADAR *et al.*, 1994; O'BRIEN *et al.*, 1998; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012). As concentrações 2,4-D 1, 2,4-D 2, 2,4-D 3, IPR 1, IMI 1, IMI 2, IMI 3 e as misturas M1, M2, M3 aumentaram a frequência de núcleos observados na fase de G0/G1, este aumento ocorreu devido a

ativação do ponto de verificação em G1 em resposta a lesões ao DNA, que inibe o processo de divisão celular (TÜRKOĞLU, 2012).

Por consequência, houve redução de núcleos nas fases S para as concentrações 2,4-D 1, 2,4-D 2, 2,4-D 3, IMI 1, IMI 2, IMI 3 e mistura M3, e todos os pesticidas reduziram a frequência de núcleos na fase G2/M. A interrupção da divisão mitótica com acúmulo de células na interfase ocorre para que a maquinaria de reparo atue antes que as alterações sejam irreversíveis (PELAYO *et al.*, 2003). Corroborando com os resultados da análise de citotoxicidade com a redução do índice mitótico (Tabela 1).

Algumas células podem continuar a divisão, mesmo sem o reparo da molécula de DNA, culminando no aumento de células aberrantes (PAULOVICH *et al.*, 1997). Pesquisadores relatam que essas alterações são responsáveis pela redução do índice de velocidade de germinação e crescimento radicular, visto que a taxa de crescimento radicular depende da atividade proliferativa das células meristemáticas (CARBALLO *et al.*, 2006; SOLTYS *et al.*, 2012; FIORESI *et al.*, 2020).

Houve redução nos parâmetros de índice de fluorescência (IF - IPR 1, IMI 3), tamanho nuclear (FSC - IMI 3 M3) e complexidade nuclear (SSC - M3), a redução desses parâmetros indicam que houve condensação da cromatina nuclear, que é um indicativo de morte celular (O'BRIEN *et al.*, 1998; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012).

As variações no conteúdo de DNA foram identificadas para todos os pesticidas testados, pelo aumento do CV em G1; este aumento indica a presença de aderência cromossômica (RAYBURN; WETZEL, 2002) e também de micronúcleos (FIORESI *et al.*, 2020). As aderências causam pontes e quebras cromossômicas, resultando em fragmentos cromossômicos e micronúcleos variando o conteúdo de DNA das células filhas (O'BRIEN *et al.*, 1998; ANDRADE-VIEIRA *et al.*, 2012).

A mistura M3 não alterou o índice de células aberrantes, isto pode ser explicado pela alta indução de fragmentação nuclear observada pelo aumento de núcleos em sub G1, o aumento do índice de coeficiente de variação (CV) e pela redução do tamanho nuclear observado em FSC, características de morte celular. A redução do índice mitótico ocorreu devido ao acúmulo de células fragmentadas em G1 que impediu a progressão das células para as fases de S e G2/M.

Tabela 2: Análise do ciclo celular de *A. cepa* por citometria de fluxo

Tratamentos	% sub-G1	% G1	% S	% G2/M	FSC	SSC	IF	CV
CN	6,85 ± 0,35	68,64 ± 1,45	12,94 ± 0,75	11,57 ± 0,65	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	3,08 ± 0,17
CP	18,22 ± 1,04*	69,22 ± 0,94	7,82 ± 0,4*5	4,74 ± 1,98*	94,77 ± 1,59*	91,52 ± 1,57*	94,40 ± 0,99*	6,70 ± 0,36*
GLI 1	8,37 ± 0,07*	70,41 ± 0,72	13,67 ± 0,83	8,12 ± 0,44	100,7 ± 0,14	100,22 ± 0,81	99,89 ± 0,10	5,54 ± 0,12*
GLI 2	8,59 ± 0,23*	71,15 ± 1,22	13,74 ± 2,20	6,52 ± 2,75*	98,10 ± 1,29	97,15 ± 1,19	96,84 ± 0,45	5,79 ± 0,08*
GLI 3	8,72 ± 0,33*	72,22 ± 1,82	15,18 ± 0,61	3,88 ± 2,17*	98,09 ± 0,79	97,70 ± 0,95	96,67 ± 0,62	6,11 ± 0,10*
2,4 D 1	10,44 ± 0,30*	72,07 ± 1,67*	9,62 ± 0,87*	7,87 ± 1,21*	98,67 ± 0,51	99,77 ± 0,37	99,77 ± 0,28	5,59 ± 0,07*
2,4 D 2	12,22 ± 1,12*	73,63 ± 1,07*	9,94 ± 0,35*	4,09 ± 1,84*	97,70 ± 0,51	97,41 ± 0,67	97,18 ± 1,23	5,77 ± 0,13*
2,4 D 3	13,75 ± 0,28*	72,39 ± 1,89*	9,70 ± 0,54*	4,17 ± 2,30*	97,07 ± 1,44	97,43 ± 0,11	97,66 ± 0,35	5,98 ± 0,07*
IPR 1	8,66 ± 0,41*	71,88 ± 1,67*	12,84 ± 2,00	6,61 ± 1,76*	99,44 ± 1,41	97,77 ± 0,59	97,88 ± 0,38	5,47 ± 0,18
IPR 2	9,11 ± 0,12*	71,78 ± 1,75	11,85 ± 1,34	7,26 ± 2,72*	98,18 ± 0,74	98,44 ± 1,03	97,33 ± 0,12*	5,90 ± 0,02
IPR 3	10,70 ± 0,61*	69,24 ± 0,65	12,54 ± 1,15	7,52 ± 1,93	98,27 ± 0,90	98,62 ± 1,31	97,81 ± 0,54	5,97 ± 0,04*
IMI 1	9,22 ± 0,10*	71,93 ± 1,64*	11,30 ± 0,96*	7,55 ± 1,72*	97,78 ± 0,51	98,04 ± 0,85	98,12 ± 0,22	5,75 ± 0,07*
IMI 2	10,64 ± 0,56*	72,93 ± 1,53*	9,07 ± 0,24*	5,87 ± 1,30*	97,45 ± 0,49	97,15 ± 0,36	96,78 ± 0,35	5,88 ± 0,10*
IMI 3	14,01 ± 0,56*	72,44 ± 0,40*	10,53 ± 0,63*	3,03 ± 0,11*	96,97 ± 0,17*	96,63 ± 0,48*	96,48 ± 0,28*	5,92 ± 0,12*
M1	8,47 ± 1,00*	71,44 ± 0,95*	11,57 ± 1,66	8,52 ± 1,52*	99,52 ± 0,35	100,07 ± 0,14	100,15 ± 1,90	5,82 ± 0,06*
M2	11,00 ± 1,73*	73,03 ± 0,33*	11,96 ± 0,43	4,01 ± 1,51*	98,49 ± 0,46	99,11 ± 0,11	100,01 ± 1,01	5,95 ± 0,04*
M3	15,91 ± 1,39*	73,71 ± 1,01*	7,32 ± 0,52*	2,50 ± 0,90*	96,14 ± 0,75*	96,88 ± 1,29	96,49 ± 2,04	6,10 ± 0,11*

Pesticidas e concentrações testadas: glifosato: 50 (GLI 1), 65 (GLI 2) e 280 (GLI 3) µg/L; iprodiona: 15,96 (IPR 1), 27,14 (IPR 2) e 47,26 (IPR 3) µg/L; imidacloprido: 0,14 (IMI 1), 1,13 (IMI 2) e 4,53 (IMI 3) µg/L; 2,4-D: 4 (2,4-D 1), 10 (2,4-D 2) e 30 (2,4-D 3) µg/L e a mistura desses compostos: M1, M2 e M3. CN: água destilada. CP: colchicina 0,025%. Onde G1, células populações com quantidade 2C de DNA; S, síntese de DNA; G2/M, populações de células com quantidade 4C de DNA; sub-G1, populações de células com menos de 2C de DNA; FSC, tamanho relativo dos núcleos em G1; IFa G1, intensidade de fluorescência dos núcleos em G1; SSC, complexidade dos núcleos em G1 CV, coeficiente de variação de G1. * Significativo (p<0,05) em relação ao CN com teste Kruskal-Wallis e posterior teste Dunn.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou o potencial tóxico de pesticidas contendo os princípios ativos glifosato, imidacloprido, iprodiona e 2,4-D bem como a mistura dessas substâncias, a partir de análises de fito-citogenotoxicidade e citometria de fluxo em *A. cepa*.

O glifosato e o 2,4-D constituem os pesticidas mais utilizados nas lavouras e, devido às propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas, suas concentrações no meio aquático são monitoradas de acordo com a Resolução do CONAMA nº. 357 (2005). Esse estudo mostrou que os valores máximos permitidos pela legislação em águas superficiais induziram danos toxicogénéticos em *A. cepa*, podendo ser, portanto, prejudiciais para organismos expostos.

O processo de tratamento de água (ETA) é ineficiente para remoção de pesticidas. Como a contaminação de ambientes aquáticos ocorre de forma difusa, maior é a dificuldade para a implementação de medidas para prevenção desta contaminação. Como consequência, o Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), vinculado ao Ministério da Saúde, detectou o glifosato e o 2,4-D na água que abastece todos os municípios monitorados (2.300 cidades brasileiras de 2014 a 2017). Os valores registrados pelo para esses herbicidas também promoveram danos aos meristemas radiculares de *A. cepa*.

Por outro lado, o imidacloprido e a iprodiona não estão contemplados na Resolução 375 do CONAMA (2005), portanto, o monitoramento desses pesticidas no meio ambiente não é prioritário. Apesar de não terem sido detectados no trabalho desenvolvido pelo SISAGUA, estes químicos estão presentes no meio ambiente, como reportado em várias publicações científicas.

A maioria dos artigos científicos citados nessa dissertação utilizaram concentrações indicadas ao campo, ou seja, maiores do que as concentrações testadas neste trabalho, sendo os efeitos adversos relatados semelhantes aos nossos, evidenciando que mesmo as menores concentrações desses pesticidas podem promover danos.

Ao nosso conhecimento, esse é o primeiro trabalho que relata os efeitos dos 4 pesticidas combinados. O efeito da mistura desses pesticidas é preocupante, pois existem poucos relatos da interação desses compostos no ecossistema aquático.

Os resultados deste estudo indicam que o glifosato, 2,4-D, iprodiona, imidacloprido e a mistura desses pesticidas representam risco para os organismos não-alvo. Diante disso, sugerimos a reavaliação do limite máximo do glifosato e 2,4-D, e a inserção dos princípios ativos iprodiona e imidacloprido na resolução do CONAMA nº. 357 (2005), bem como a inserção do fungicida iprodiona na RESOLUÇÃO Nº 2.080, DE 31 DE JULHO DE 2019.

9. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. F.; RIBEIRO, J. S.; KUMMROW, F.; NOGUEIRA, A. J. A.; MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ. Sci. J. Integr. Environ. Res.: Processes & Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779- 787, 2016.
- ANDRADE, D. J. D.; FERREIRA, M. D. C.; FENOLIO, L. G. Compatibilidade entre acaricidas e fertilizantes foliares em função de diferentes águas no controle do ácaro da leprose dos citros *Brevipalpus phoenicis*. **Rev. Bras. Frutic**, v. 35, n. 1, p. 39-50, 2013.
- 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*. **Jour. Environ. Manag.**, v. 107, p. 140- 146, 2012.
- ANVISA, agência nacional de vigilância sanitária. Regularização de Produtos – Agrotóxicos, 2019. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos>>. Acesso em: 10 de janeiro de 2021.
- ARAGÃO, F. B.; BERNARDES, P. M.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. S.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Cyto (geno) toxicity of commercial fungicides based on the active compounds tebuconazole, difenoconazole, procymidone, and iprodione in *Lactuca sativa* L. meristematic cells. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 230, n. 1, p. 1-9, 2019.
- ARAGÃO, F. B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; VIEIRA L. F. A. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Rev. Biol. Trop.**, v. 65, n. 2, p. 435- 443, 2017.
- AZEVEDO, J. L.; SANTANA, E. P.; BONATELLI, R. Resistance and mitotic instability to chloroneb and 1, 4-oxathiin in *Aspergillus nidulans*. **Mutante. Res.** 48, 163-172, 1977.
- BADR, A.; GHAREEB, A.; EL-DIN, H. M. Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *Vicia faba* roots. **Egypt. J. Appl. Sci**, v. 7, p. 457- 468, 1992.

BARZOTTO, A. C.; VANINI, J.; BUSINN C. S. Avaliação da genotoxicidade e citotoxicidade do Glifosato em *Allium cepa*. Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 38, n. 1, p. 98, maio/jun. 2017.

BENIGNI, R.; PALOMBO, F.; DOGLIOTTI E. Multivariate statistical analysis of mutation spectra of alkylating agents. **Mutation Research**, v. 267, p. 77-88, 1992.

BERG, C.; HILL, M.; BONETTI, C.; MITCHELL, G. C.; SHARMA, B. The effects of iprodione fungicide on survival, behavior, and brood development of honeybees (*Apis mellifera* L.) after one foliar application during flowering on mustard. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 12, p. 3086- 3094, 2018.

BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. s. Toxicological effects of comercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. **Environ. Sci. Pol. Res**, v. 26, n. 20, p. 21013- 21021, 2019.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**. v. 144, p. 475–483, 2016.

BIRADAR, D. P.; PEDENSE, W.L.; RAYBURN, A.L. Nuclear DNA analysis of maize seedlings treated with the triazole fungicide, Triticonazole. **Pesticide Science**, v. 41, p. 291- 295, 1994.

BOLOGNESI, C.; BONATTI, S.; DEGAN, P.; GALLERANI, E.; PELUSO, M.; RABONI, R. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1957-1962, 1997.

BORTOLUZZI, E. C.; RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R.; MARONEZE, A. M.; KURZ, M. H. S.; BACAR, N. M.; ZANELLA, R. Investigation of the occurrence of pesticides residues in rural Wells and surface water following application to tobacco. **Química Nova**, v. 30, p. 1872- 1876, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 2011.

BROVINI, E. M.; DEUS, B. C. T.; BOAS, J.A. V.; QUADRA, G. R.; CARVALHO, L.; MENDONÇA, R. F.; PEREIRA, R. O.; CARDOSO, S. J. Three-best-seller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**. Laboratório de Ecologia Aquática, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, v. 771, p. 144754, Juiz de Fora-MG, 2021.

CARBALLO, J. A.; PINCHEIRA, J.; TORRE, C. The G2 checkpoint activated by DNA damage does not prevent genome instability in plant cells. **Biological research**, v. 39, n. 2, p. 331-340, 2006.

CAMARGO, F. A. O.; SILVA, L. S.; MERTEN, G. H.; CARLOS, F. S.; BAVEYE, P. C. E.; TRIPLETT, E. W. Agriculture brazilian in perspective: great expectations vs reality. *Advances. Agronomy*. v. 141, p. 53- 114, 2017.

CARNEIRO, F. F.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV, São Paulo: Expressão Popular, 2015.

CARVALHO, M. S. S. ANDRADE-VIEIRA, L. F. ; DOS SANTOS, F. E.; CORREA, F. F.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M.; VILELA, L. R. Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus spp.* in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia horticultrae*, v. 245, p. 90- 98, 2019.

CARVALHO, W. F.; ARCAUTE, C.R.; TORRES, L.; SILVA, D. M.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L. Genotoxicity of mixtures of glyphosate with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid chemical forms towards *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 6, p. 6515-6525, 2020.

CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. “Dispõe sobre a classificação dos corpos d'água e as diretrizes ambientais para sua classificação, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e dá outras providências”, Publicada no Diário Oficial da União nº 053 em 18/03/2005, págs. 58-63; Brasília, DF. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 10 de junho de 2021.

CONCENÇO, G.; GRIGOLLI, J.; JURCA F. Plantas daninhas em sistemas de produção de soja. **Embrapa Agropecuária Oeste-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2014.

CONFEA. Normativa nº 40, de 11 de outubro de 2018. Autorizava o responsável agrônomo a receitar mais de um produto no receituário, a partir de critérios estabelecidos na normativa, tirando assim a responsabilidade da prática de misturas de tanque do produtor e de quem aplica os herbicidas. Acordo de Cooperação Técnica entre a Secretaria de Defesa Agropecuária, vinculada ao Ministério da Agricultura, e o Conselho Federal de Engenharia e Agronomia. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/45173700/do1-2018-10-15-instrucao-normativa-n-40-de-11-de-outubro-de-2018-45173522>. Acesso em: 08 de março de 2022.

CVIKROVA, M.; BINAROVA, P.; CENKLOVA, V.; EDER, J.; DOLEZEL, J.; MACHAČKOWA, I. Effect of 2-aminoindan-2-phosphonic acid on cell cycle progression in synchronous meristematic cells of *Vicia faba* roots. *Plant Science*, v. 164, p. 823- 832, 2003.

DOLEŽEL, J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J.; Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2: 2233–2244. 2007.

EDLICH, W.; LYR H. Target sites of fungicides with primary effects on lipid peroxidation. In: Lyr H (ed) **Target sites of fungicide action**. Fischer, Jena, pp 53–68 1992.

EHR, R. J.; KEMMITT, G. Periodic table of the fungicides. **Indianapolis: Dow Agrosciences**, v. 1, 2002.

EL-GENDY, K. S.; ALY, N. M.; MAHMOUD, F. H.; KENAWY, A.; EL-SEBAE, A. K. H. The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. **Food Chem Toxicol.**, v. 48, p. 215– 221, 2010.

EMBRAPA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Instrução Normativa N° 40 de 11 de outubro de 2018. Diário Oficial da União: Seção 1. p. 3. Disponível em: <<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/212979587/dou-secao-1-15-10-2018-pg-3>> Acesso em: 12 de fevereiro de 2022

ESTER, A.; DE PUTTER, H.; VAN BILSEN, J. G. P. M. Filmcoating the seed of cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *Capitata* L.) and cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *Botrytis* L.) with imidacloprid and spinosad to control insect pests. **Crop Protection**, v. 22, n. 5, p. 761- 768, 2003.

FATTAH, Y. M.; OMER, A. H. Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Glyphosate on *Allium cepa*. **Technium BioChem Med**, v. 2, n. 1, p. 131- 140, 2021.

FELISBINO, K.; SANTOS-FILHO, R.; PIANCINI, L. D. S.; CESTARI, M. M.; LEME, D. M. Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 150, p. 83– 88, 2018.

FENG, B.; GUO, Y. W.; HUANG, C. G.; LI, L.; CHEN, R. H.; JIAO, B. H. 2 -epi-2 -OAcetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 183, p. 142– 153, 2010.

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**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FINKLER, M.; RODRIGUES, G. Z. P.; KAYSER, J. M.; ZIULKOSKI, A. L.; GEHLEN, G. Cytotoxic and genotoxic effects induced by associated commercial glyphosate and 2, 4-D formulations using the *Allium cepa* bioassay. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, p. 1- 9, 2022.

FIORESI, V. S.; VIEIRA B. C. R.; CAMPOS, J. M. S.; SOUZA, T. S. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 28066– 28076, 2020.

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

FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, v. 124, p. 426- 434, 2016.

FRIEDRICH, K.; SILVEIRA, G. R.; AMAZONAS, J. C.; GURGEL, A. M.; ALMEIDA, V. E. S.; SARPA, M. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, mai., 2021.

GALBRAITH, D. W.; HARKINS K. R.; MADDOX, J. M.; AYRES, N. M.; SHARMA, D. P. E.; FIROOZABADY, E. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. **Science**, v. 220, n. 4601, p. 1049– 1051, 1983.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M.C.; VITALE, I.; ZISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G., 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**. 14, 1237e1243.

GARCIA, C.; FURTADO A. A. A.; COSTA, M.; BRITTO, D.; VALLE, R.; ROYAERT, S.; MARELLI, J. P. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 137, n. 2, p. 193-212, 2019.

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, v. 33, n. 1, p. 83- 92, 2015.

GOMES, S. A.; ARANTES, S. A. D.; ANDRADE, E. A. D.; ARANTES, K. R.; VIANA, D. N.; PEREIRA, C. D. C. Residual effect of mixture of glyphosate and 2, 4-D in winter maize in different soil textures. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 317-321, 2017.

GOULSON, D. Review: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **J Appl Ecol**, v. 50, n. 4, p 977– 987, 2013.

GRANT, W. F. Higher Plant Assays for the Detection of Chromosomal Aberations and Gene Mutations – a Brief Historical Background on Their Use for Screening and Monitoring Environmental Chemicals. **Mutation Research**, Orlando, v. 426, n. 6, p. 107 -112, out. 1999.

GROSSMANN, K. Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, 109- 122, 2003.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770 - 776, 2000.

HODGSON, E. Induction and inhibition of pesticide-metabolizing enzymes: roles in synergism of pesticides and pesticide action. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 6– 11, 1999.

HOWARD, A.; PELC, S.R. Synthesis of deoxyribonucleic-acid in normal and irradiated-cells and its relation to chromosome breakage. **International Journal of Radiation Biology**, **49 (2)**: 207-218. 1986.

IBAMA- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Portaria IBAMA nº 84 de 15 de outubro de 1996. Dispõe sobre o efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins, e institui o sistema permanente da avaliação e controle dos agrotóxicos, segundo disposições do decreto nº 98.816 em seu art. 2º. Disponível em: <
<https://www.ibama.gov.br/component/legislacao/?view=legislacao&legislacao=99498>
>. Acesso em: 10 de maio de 2020.

JANSEN, J. G.; GROAT, A. J. L.; TEIJLINGEN, C. M. M.; LOHMAN, P.H.M.; MOHN, G.R.; VRIELING, H.; VAN ZEELAND, A. A. Formation and persistence of DNA adducts in pouch skin fibroblasts and liver tissue of rats exposed in vivo to the monofunctional alkylating agents N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. **Mutation Research**, v.307, p. 95-105, 1994.

KWIATKOWSKA, M.; RESZKA, E.; WOŹNIAK, K.; JABŁOŃSKA, E.; MICHAŁOWICZ, J.; BUKOWSKA, B. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 93-98, 2017.

KLÁŠTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A. T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, v. 83, n. 2, p. 153- 162, 1976.

KNOPP, D.; SCHILLER, F. Oral and dermal application of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. **Archives of Toxicology**, 66, 170–174 1992.

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

LIMAN, R.; ACIKBAS, Y.; CIĞERCI, İ. H. Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. **Ecotoxicol. Environ. Saf**, v. 168, p. 408- 414, 2019.

LIRA, O. O. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS. 2014.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. **Mutation Research**, Orlando, v. 334, n.5, p. 185- 195, out.,1999.

- MARCATO, A. C. C.; DE SOUZA, C. P.; FONTANETTI, C. S. Herbicide 2, 4-D: a review of toxicity on non-target organisms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 3, p. 1- 12, 2017.
- MARTINS, H.; PEREIRA, F. D. C. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DO AGROQUÍMICO TORDON® SOBRE OS ORGANISMOS TESTE *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. **Visão Acadêmica**, v. 19, n. 2, 2018.
- MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T. C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, n. 2, p. 157- 166, 1974.
- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q. Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. **Science of the Total Environment**, v. 700, p. 134452, 2020.
- MITRA, J.; RAGHU, K. Pesticides-non target plants interactions: an overview. **Archives of Agronomy and Soil Science**. v. 43, n. 6, p. 445– 500, 1998.
- MONTEIRO, M. S.; RODRIGUEZ, E.; LOUREIRO, J.; MANN, R. M.; SOARES, A. M. V. M. E.; SANTOS, C. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicol Environ.Saf**, v. 73, n. 6, p. 1231–1237, 2010.
- MOREIRA, R. A.; ROCHA, O.; PINTO, T. J. D. S.; DA SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPINDOLA, E. L. G. Life-history traits response to effects of fish predation (kairomones), fipronil and 2, 4-D on neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, n. 3, p. 298-309, 2020.
- NARDEMIR, G.; AGAR, G.; ARSLAN, E.; AYGUN E. F. Determination of genetic and epigenetic effects of glyphosate on *Triticum aestivum* with RAPD and CRED-RA techniques. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 27, n. 2, p. 131-139, 2015.
- O'BRIEN, I. E. O.; BAGULEY, B. C.; MURRAY, B. G.; MORRIS, B. A. M.; FERGUSON, I. B. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible. **Plant Journal**, 13: 803-814. 1998.
- ORMEROD, M. G.; PAUL, F.; CHEETHAM, M.; SUN, X.M.. Discrimination of apoptotic thymocytes by Forward Light Scatter. **Cytometry**, 21: 300. 1995.
- ORUÇ, E. O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comparative Biochemistry and Physiology—Part C**, 137, 43–51 2004.
- PATHAK, S.; MCGILL, M.; HSU, T. C. Actinomycin effects on mitosis and chromosomes: sticky chromatids and localized lesions. **Chromosoma**, v. 50, n. 1, p. 79-88, 1975.

PAULOVICH A. G.; TOCZYSKI D. P.; HARTWELL L. H. When checkpoints fail. *Cell* 88: 315-321 1997.

PELAYO, H. R.; PINCHEIRA, J.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; CLARKE, D. J.; DE LA TORRE, C. p53-independent checkpoint controls in a plant cell model. **Biol. Res**, v. 36, n. 3-4, p. 381- 388, 2003.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. D. S.; LARA, S. S. D.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. D. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

POMMER, E. H.; LORENZ, G. Resistance of *Botrytis cinerea* Pers. To dicarboximide fungicides — literature review. **Crop Protection**, v. 1, p. 221- 230, 1982.doi: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(82\)90044-8](https://doi.org/10.1016/0261-2194(82)90044-8)

QUEIROZ, V. T.; AZEVEDO, M. M.; QUADROS, I. P. S.; COSTA, A. V.; AMARAL, A. A.; AMARAL, G. M.; SANTOS, D. A.; JUVANHOL, R. S.; TELLES, L. A. A.; SANTOS, A. R.; Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. **Journal of Contaminant Hydrology**, dez., 2018.

RAYBURN, A. L.; WETZEL, J. B. Flow cytometric analyses of intraplant nuclear DNA content variation induced by sticky chromosomes. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 49, n. 1, p. 36–41, 2002.

RIBEIRO, L. R.; BELO, G. A.; MONTEIRO, A. B. Avaliação da atividade citogenotóxica e antimutagênica do extrato aquoso de *bidens pilosa*. **Conexão Ciência**, v. 13, n. 4, p. 15-22, 2018.

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.

RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; MARCATO, A. C.; CORREIA, J. E.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FONTANETTI, C. S. Genotoxic potential of the insecticide imidacloprid in a non-target organism (*Oreochromis niloticus-Pisces*). **Journal of Environmental Protection**, v. 6, n. 12, p. 1360, 2015.

ROMERO D. M; MOLINA M. C. R.; JUAREZ A. B. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of **Chlorella kessleri**. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 74(4): 741– 747.

SANTOS, J. R.; DA SILVA, J. M. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v. 11, n. 4, p. 565-573, 2007.

SANTOS, K. B.; SAMPAIO, T.; ARAUJO, A.; SILVA, D. C. Análise de fitotoxicidade do herbicida glifosato (ROUNDUP). Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Engenharia, Congresso Brasileiro de Engenharia Química e Científica, 2019.

SCHULZ, R. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution: A review. **Journal of enviro. Qual.**, v. 33, n. 2, p. 419- 448, 2004.

SEQUINATTO, L. Occurrence Of Agrochemicals In Surface Waters Of Shallow Soils And Steep Slopes Cropped To Tobacco. **Quimica Nova**, v. 36, n. 6, p. 768- 772, 2013.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; DOS REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359- 367, 2017.

SISAGUA, Ministério da Saúde Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano. Disponível em: <<https://sisagua.saude.gov.br/sisagua/login.jsf>> Acesso em: 15 de fevereiro de 2022.

SISAGUA, Detecção e concentração de agrotóxicos de 2014 a 2017 de acordo com dados de Controle do Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), do Ministério da Saúde. 2018 Disponível em: <<https://portrasdoalimento.info/agrotoxico-na-agua/>> Acesso em: 23 de fevereiro de 2022

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Castillo G, editor. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas**. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Canadá: IDRC/IMTA; p. 71–79, 2004.

SOLTYS, D.; RUDZIŃSKA-LANGWALD, A.; GNIAZDOWSKA, A.; WIŚNIEWSKA, A.; BOGATEK, R. Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) root growth by cyanamide is due to altered cell division, phytohormone balance and expansin gene expression. **Plant signaling & behavior**, v. 236, n. 5, p. 1629- 1638, 2012.

SOUSA, M. S.; SILVA, O. S.; CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

SOUZA, L. F. B.; LAUGHINGHOUE, H. D. IV; PASTORI, P.; TEDESCO, M. T.; KUHN, A. W.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. Genotoxic potential of aqueous extracts of *Artemisia verlotorum* on the cell cycle of *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Studies**, v.67, p. 871- 877, 2010.

STEVENS, M. M.; REINKE, R. F.; COOMBES, N. E.; HELLIWELL, S.; MO, J. Influence of imidacloprid seed treatments on rice germination and earlyseedling growth. **Pest Management Science: Formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 3, p. 215- 222, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKANO, H. K.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; FRANCHINI, L. H. M.; BRAZ, G. B. P.; RIOS, F. A.; GHENO, E. A.; GEMELLI, A. Efeito da Adição do 2,4-D ao Glyphosate para o controle de espécies de plantas daninhas de difícil controle. **R. Bras. herbicidas**. V. 12, n. 1, 2013.

TAMMES P. M. L. Isoboles, a graphic representation of synergism in pesticides. **Neth J Plant Pathol** 70:73–80. 1964.

TYGEL, A. **Aumenta a quantidade de agrotóxicos consumidos por cada brasileiro: 7,3 litros**. 2015. Disponível em: <
<https://mst.org.br/2015/04/28/aumenta-a-quantidade-de-agrotoxicos-consumido-por-cada-brasileiro-73-litros/>> Acesso em: 20 março 2022.

TÜRKOĞLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pestic Biochem Physiol**, v. 103, n. 3, p. 224– 230, 2012.

USEPA- Environmental Protection Agency; **Seed germination/root elongation toxicity test**, OPPTS 850.4200, EPA 712/C-96/154. **Ecological Effects Test Guidelines**. Washington, DC. 1996.

VALERIO, M. E.; GARCÍA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.) **Sci. Total Environ.**, v. 378, n. 1-2, p. 63- 66, 2007.

VANYUSHIN, B.F. DNA methylation in plants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg **DNA methylation: basic mechanism** CTMI 301:67–122, 2006.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of immunological methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167- 190, 2000.

VITORATOS, A. G.; ZIOGAS, B. N. On the mechanism of genetic activity of dicarboximide, aromatic hydrocarbon and phenylpyrrole fungicides on diploid *Aspergillus nidulans*. **Fresenius Environ Bull**, v. 10, p. 495– 500, 2001.

WEBSTER, P. L.; MACLEOD, R. D. The root apical meristem and its magrin. **Plant Roots. The Hidden Half, second ed. Marcel Dekker, New York**, p. 51- 76, 1996.

WEI, Y.; MENG, Y.; HUANG, Y.; LIU, Z.; ZHONG, K.; MA, J.; LU, H. Development toxicity and cardiotoxicity in zebrafish from exposure to iprodione. **Chemosphere**, v. 263, p. 127860, 2021.

WHO. World Health Organization. Guide to short-term tests for detecting mutagenic and carcinogenic chemicals. **Environ. Health Criteria** 51, p. 208, Geneva, 1985.

YI, H., MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutat. Res.** 537, 109 e 114, 2003.

ZAMA, D.; MERAILI, Z.; TEBIBEL, S.; BANAYSSA, W.; BENAYACHE, F.; BENAYACHE, S.; VLITINCK, A. J. Chlorpyrifos-induced oxidative stress and tissue damage in the liver, kidney, brain and fetus in pregnant rats: the protective role of butanolic extract of *Paronychie argentea* L. **Indian Pharmacol.**, v. 39, n. 3, p. 145, 2007.

ZAMARIOLA, L.; TIANG, C. L.; DE STORME, N.; PAWLOWSKI, W.; GEELLEN, D. Chromosome segregation in plant meiosis. **Front. Plant Sci.**, v. 5, p. 279, 2014.

ZHANG, Y.; HUANG, L.; LIU, L.; CAO, X.; SUN, C.; LIN, X. Metabolic disturbance in lettuce (*Lactuca sativa*) plants triggered by imidacloprid and fenvalerate. **Science of The Total Environ.**, v. 802, p. 149764, 2022.