



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CÂMPUS CENTRAL
ANÁPOLIS CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS HENRIQUE SANTILLO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO
CERRADO

CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM

**Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de pesticidas: aplicação de bioensaios
e estratégia de mitigação**

ANÁPOLIS-GO
AGOSTO DE 2024

CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE PESTICIDAS:
aplicação de bioensaios e estratégia de mitigação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado, da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de Doutor em Recursos Naturais do Cerrado.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Madureira de Almeida

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Virgínia Damin

ANÁPOLIS-GO
AGOSTO DE 2024

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL (BDTD)

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Estadual de Goiás a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UEG), regulamentada pela Resolução, **CsA n.1087/2019 sem** ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

Dados do autor

Nome Completo: **Carlos Filipe Camilo Cotrim**

E-mail: **carlosfcamilo@gmail.com**

Dados do trabalho

Título: **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE PESTICIDAS:
aplicação de bioensaios e estratégia de mitigação**

Tipo

(X) Tese () Dissertação

Curso/Programa: Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado

Concorda com a liberação documento: [X] SIM [] NÃO¹

Anápolis, 25 de setembro de 2024

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM**
Data: 25/09/2024 13:11:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do autor (a)

Documento assinado digitalmente
 **LUCIANE MADUREIRA DE ALMEIDA**
Data: 26/09/2024 14:35:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do orientador (a)

¹ Casos de impedimento:

- Período de embargo é de um ano a partir da data de defesa
- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo autor.

CC845
a

Cotrim, Carlos Filipe Camilo
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS
DE PESTICIDAS: aplicação de bioensaios e estratégia de
mitigação / Carlos Filipe Camilo Cotrim; orientadora Luciane
Madureira de Almeida; co-orientadora Virgínia Damin. -- Anápolis,
2024.
229 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação
Doutorado em Recursos Naturais do Cerrado (RENAC)) --Câmpus
Central - Sede: Anápolis - CET, Universidade Estadual de Goiás,
2024.

1. agrotóxicos. 2. bioensaios. 3. biomonitoramento. 4.
ecotoxicologia. 5. fungos. I. Almeida, Luciane Madureira de, orient. II.
Damin, Virgínia, co-orient. III. Título.

Universidade
Estadual de GoiásESTADO DE GOIÁS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS - UEG
COORDENAÇÃO STRICTO SENSU - RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO CERRADO****ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DOUTORADO Nº 164/2024**

Aos trinta dias de agosto de dois mil e vinte e quatro, a partir das 13 horas por meio de videoconferência entre os componentes da banca, foi realizada a sessão de Banca de Defesa de Doutorado do discente **CARLOS FILIPE CAMILO COTRIM**, que apresentou o trabalho intitulado “**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE PESTICIDAS: APLICAÇÃO DE BIOENSAIOS E ESTRATÉGIA DE MITIGAÇÃO**”. A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes Professores: Dra. Luciane Madureira de Almeida (orientadora), Dra. Samantha Salomão Caramori (Avaliadora interna - Universidade Estadual de Goiás), Dr. Bruno do Amaral Crispim (Avaliador Externo, UNITINS), Dra. Isabel Maria Cunha Antunes Lopes (Avaliadora Externa - Universidade de Aveiro, Portugal), Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira (Avaliadora Externa - Universidade Federal de Goiás). Após a apresentação da discente, os examinadores a arguiram, tendo a discente respondido às perguntas formuladas. Terminada a arguição, a Banca Examinadora reuniu-se emitindo os seguintes pareceres mediante as justificativas e sugestões abaixo:

Membros da Banca	Parecer (Aprovado/Reprovado)
Dra. Luciane Madureira de Almeida	APROVADO
Dra. Samantha Salomão Caramori	APROVADO
Dr. Bruno do Amaral Crispim	APROVADO
Dra. Isabel Maria Cunha Antunes Lopes	APROVADO
Dra. Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira	APROVADO

A Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida, presidente da Banca Examinadora, deu por encerrada a sessão e, para constar, lavrou a presente Ata:



Documento assinado eletronicamente por **Isabel Maria Cunha Antunes Lopes, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 14:29, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno do Amaral Crispim, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 14:39, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Samantha Salomao Caramori, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 14:50, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Luciane Madureira de Almeida, Usuário Externo**, em 19/09/2024, às 15:20, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



Documento assinado eletronicamente por **Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, Usuário Externo**, em 20/09/2024, às 09:27, conforme art. 2º, § 2º, III, "b", da Lei 17.039/2010 e art. 3ºB, I, do Decreto nº 8.808/2016.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site http://sei.go.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=1 informando o código verificador **65091128** e o código CRC **87590A66**.

COORDENAÇÃO STRICTO SENSU - RECURSOS NATURAIS DO CERRADO
RODOVIA BR 153 S/N Qd.ÁREA Lt., KM 99 - Bairro ZONA RURAL - ANAPOLIS - GO - CEP
75132-903 - (62)3328-1151.



Referência: Processo nº 202400020001086



SEI 65091128

*Dedico este trabalho aos meus pais, aos meus
amigos. Também dedico a todas as pessoas
que me ajudaram no decorrer do doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Fleuza Camilo e Manoel Cotrim, por sempre terem me incentivado a estudar e a ser dedicado, para que eu pudesse ser alguém na vida. Agradeço a ajuda, apoio e por nunca terem descreditado dos meus sonhos.

À minha orientadora, Dr.^a Luciane Madureira de Almeida, pela orientação, paciência, parceria, por ter abraçado a ideia de trabalhar com pesticidas, e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora, Dr.^a Virgínia Damin, por ter aceitado o convite para me coorientar, por ter me recebido bem no laboratório para os experimentos avaliando a ação de pesticidas no solo, e pela doação dos pesticidas.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Bruno do Amaral Crispim, Dr.^a Gisele Augusto Rodrigues de Oliveira, Dr.^a Isabel Maria Cunha Antunes Lopes e Dr.^a Samantha Salomão Caramori, pelo tempo dedicado à leitura e avaliação desta tese, bem como pelas valiosas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Agradeço aos professores Dr.^a Luciana de Souza Ondeí e Dr. Fabrício Barreto Teresa pela amizade, oportunidades, ensinamentos e caronas para a universidade.

Agradeço à professora Dr.^a Luciana Damacena Silva pela amizade, parceria e ensinamentos.

Às professoras Dr.^a Samantha Salomão Caramori e Dr.^a Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão pelos ensinamentos e parceria.

À professora Dr.^a Cátia Lira do Amaral e todos os seus alunos de iniciação científica, que ajudaram nos experimentos de citogenotoxicidade com linfócitos humanos. Infelizmente devido ao tempo, esses dados não serão incluídos na versão final da tese, mas, mesmo assim, sou grato.

Ao professor Dr. João Carlos Nabout, por ouvir minhas dúvidas de estatística.

A todos os professores que tive ao longo da vida, em especial à minha professora da época do ensino médio, Fernanda Figueiredo, responsável pela disciplina de biologia.

Ao meu amigo Lucas Leonardo, pelas inúmeras ajudas no laboratório, em casa, e por me apoiar.

Aos meus amigos Wesley Falcão e Yasmim Reis, pelos momentos de amizade e apoio.

Aos alunos de iniciação científica, em especial a Natanael Alves da Silva, pela dedicação em me acompanhar e realizar as atividades.

A Gabriela Gomes Lima, pela ajuda em alguns experimentos e pelas conversas que tivemos no laboratório.

Aos meus colegas do Laboratório de Biotecnologia e do Laboratório de Biogeografia e Ecologia Aquática, pelos momentos de descontração e troca de informações.

Ao técnico de laboratório, Adriano Roberto Vieira de Sousa, pela ajuda em resolver os problemas no laboratório.

Ao agrônomo Leonardo Silva, por ter doado o Verango® Prime.

Aos meus cachorros Billy, Jon e Simba pela companhia e momentos de felicidade.

À Universidade Estadual de Goiás (UEG), pelas oportunidades oferecidas aos estudantes.

À disponibilização do recurso financiado por meio do convênio PROAP, que permitiu o pagamento de diárias e minha permanência em Goiânia, no Laboratório da professora Lee Chen Chen.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pelos financiamentos das chamadas 03/2022 e 09/2022.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado (Processo - 88887.483362/2020-00).

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida acadêmica.

O mundo não é dividido entre especiais e comuns. Todos têm potencial para serem extraordinários. Contando que você tenha uma alma e livre-arbítrio, pode ser qualquer coisa, fazer qualquer coisa, escolher qualquer coisa.

☞ *Cidade do fogo celestial, Cassandra Clare*

RESUMO

Pesticidas são essenciais para proteção das culturas contra pragas, entretanto apresentam efeitos à saúde humana e ao meio ambiente. Conhecer os efeitos associados ao uso dessas moléculas e estabelecer estratégias para degradação delas no meio ambiente é de extrema importância. Dessa maneira, a presente tese tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos, citogenotóxicos, mutagênicos e ambientais de pesticidas. Para isso, foram utilizados bioensaios e análises de parâmetros do solo, com o intuito de identificar os efeitos associados ao uso dos compostos avaliados e explorar o potencial fúngico para processos de micodegradação dos ingredientes ativos. Para isso, inicialmente foi realizada uma revisão da literatura sobre o uso do *Allium cepa* como bioensaio para avaliar o potencial citogenotóxicos e mutagênicos de pesticidas. Foi identificado que o bioensaio com *A. cepa* é eficaz e apropriado para avaliar a toxicidade de pesticidas. Os trabalhos analisados, juntos, investigaram 113 pesticidas que causaram algum nível de toxicidade, principalmente interferência no fuso mitótico. O bioensaio de exposição de raízes de *A. cepa* a quatro concentrações do pesticida fluopiram (Verango® Prime) (5,00 (3×), 1,67 (campo), 0,835 (50%), e 0,17 (10%) mg mL⁻¹) demonstrou que ele não causou peroxidação lipídica, mas induziu efeitos citotóxicos e genotóxicos, variando conforme as concentrações e as fases e exposição ou recuperação. Para avaliar o potencial mutagênico e tóxico do pesticida à base de fluopiram, sete concentrações (0,017, 0,050, 0,210, 0,418, 0,835, 1,67 e 5,00 mg mL⁻¹) foram testadas nas cepas TA100 e TA98 de *Salmonella typhimurium*, em *Artemia salina*, e em testes de germinação de sementes e alongamento de raiz com alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*). Os resultados indicam que o pesticida a base de fluopiram não foi mutagênico para as linhagens testadas de *S. typhimurium*. Entretanto é tóxico em altas concentrações, afetando a sobrevivência de *A. salina*, e o alongamento das raízes. O pesticida à base de fluopiram aplicado em solo do tipo latossolo vermelho distrófico na concentração de campo (1,67 mg mL⁻¹) provocou alterações, de curta duração, em parâmetros como enzimas α -glucosidase, β -glucosidase, fosfatase ácida, no carbono da biomassa microbiana (CBM) e no quociente metabólico do solo (qCO_2). Já o pesticida flumioxazina (Sumisoya®) aplicado em campo reduziu a atividade da β -glucosidase, afetou $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, CBM, qCO_2 e a respiração basal do solo (RBS). Das 68 linhagens fúngicas expostas as concentrações de campo do pesticida a base de fluopiram (1,67 mg mL⁻¹), do pesticida a base de flumioxazina (0,25mg mL⁻¹) e S-metolaclopro (Dual Gold® – 6,4 mg mL⁻¹), apenas três linhagens apresentaram potencial em tolerar a exposição: *Fusarium verticillioides* e *Trametes versicolor*. A terceira linhagem não foi identificada por técnicas moleculares. A capacidade de tolerância dessas espécies demonstra que podem ser utilizadas em futuros experimentos para avaliara a biodegradação dos pesticidas avaliados. Nossos resultados demonstram que os pesticidas estudados causam efeitos adversos em organismos não-alvo além de impactar o solo e apresenta espécies de fungos com potencial biotecnológico para mitigar impactos esses impactos.

Palavras-chave: agrotóxicos, bioensaios, biomonitoramento, ecotoxicologia, flumioxazina, fluopiram, fungos, microbiota do solo

ABSTRACT

Pesticides are essential for protecting crops against pests; however, they have effects on human health and the environment. Understanding the effects associated with the use of these molecules and establishing strategies for their degradation in the environment is of utmost importance. Therefore, the present thesis aims to evaluate the toxic, cytogenotoxic, mutagenic, and environmental effects of pesticides. To this end, bioassays and soil parameter analyses were used to identify the effects associated with the evaluated compounds and explore the fungal potential for mycodegradation processes of the active ingredients. Initially, a literature review was conducted on the use of *Allium cepa* as a bioassay to assess the cytogenotoxic and mutagenic potential of pesticides. It was found that the *A. cepa* bioassay is effective and appropriate for evaluating pesticide toxicity. The analyzed studies collectively investigated 113 pesticides that caused some level of toxicity, mainly interference with the mitotic spindle. The bioassay of *A. cepa* root exposure to four concentrations of the pesticide fluopyram (Verango® Prime) (5.00 (3×), 1.67 (field), 0.835 (50%), and 0.17 (10%) mg mL⁻¹) demonstrated that it did not cause lipid peroxidation but induced cytotoxic and genotoxic effects, varying according to concentrations and phases of exposure or recovery. To evaluate the mutagenic and toxic potential of the fluopyram-based pesticide, seven concentrations (0.017, 0.050, 0.210, 0.418, 0.835, 1.67, and 5.00 mg mL⁻¹) were tested in the TA100 and TA98 strains of *Salmonella typhimurium*, in *Artemia salina*, and in seed germination and root elongation tests with lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*), and cucumber (*Cucumis sativus*). The results indicate that the fluopyram-based pesticide was not mutagenic for the tested *S. typhimurium* strains. However, it was toxic at high concentrations, affecting *A. salina* survival and root elongation. The fluopyram-based pesticide applied to dystrophic red latosol soil at field concentration (1.67 mg mL⁻¹) caused short-term changes in parameters such as α -glucosidase, β -glucosidase, acid phosphatase, microbial biomass carbon (MBC), and soil metabolic quotient ($q\text{CO}_2$). The pesticide flumioxazin (Sumisoya®) applied in the field reduced β -glucosidase activity, affected N-NH₄⁺, N-NO₃⁻, MBC, $q\text{CO}_2$, and basal soil respiration (BSR). Of the 68 fungal strains exposed to field concentrations of fluopyram-based pesticide (1.67 mg mL⁻¹), flumioxazin-based pesticide (0.25 mg mL⁻¹), and S-metolachlor (Dual Gold® – 6.4 mg mL⁻¹), only three strains showed potential tolerance: *Fusarium verticillioides* and *Trametes versicolor*. The third strain was not identified through molecular techniques. The tolerance capacity of these species demonstrates that they can be used in future experiments to evaluate the biodegradation of the assessed pesticides. Our results show that the studied pesticides cause adverse effects on non-target organisms, impact the soil, and present fungal species with biotechnological potential to mitigate these impacts.

Keywords: bioassays, biomonitoring, ecotoxicology, fluopyram, flumioxazin, fungi, pesticides, soil microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Diagrama das etapas metodológicas de busca, identificação, seleção e análise dos artigos que avaliaram efeitos da exposição a pesticidas em biomarcadores de *Allium cepa*. ...52

Figura 1.2 – Uso do bioensaio *Allium cepa* em estudos de pesticidas. **a)** Gráfico de barras mostrando o número de publicações por ano (à esquerda) e gráfico de dispersão mostrando a média de citações por ano (à direita). **b)** Linha do tempo mostrando o incremento de biomarcadores no bioensaio de *A. cepa* para investigar os efeitos de pesticidas. **c)** Nuvem de palavras-chave usadas nos artigos.55

Figura 1.3 – Distribuição mundial de estudos realizados com o bioensaio *Allium cepa* para investigar efeitos de pesticidas. A distribuição geográfica dos artigos está relacionada à cor de cada país, proporcional ao número de publicações. Os pontos representam as instituições onde os estudos foram realizados, e a cor é proporcional ao número de publicações. TR = Turquia, IN = Índia, BR = Brasil, ES = Espanha.56

Figura 1.4 – Propriedades dos ingredientes ativos. **a)** Moléculas de princípios ativos identificadas nos artigos analisados. **b)** Tipo de ingrediente ativo em **(a)** de acordo com suas funções. **c)** Status de disponibilidade de ingredientes ativos em **(a)**. **d)** Status de aprovação do ingrediente ativo na União Europeia. **e)** Classes baseadas na estrutura molecular dos ingredientes ativos. **f)** Origem dos ingredientes ativos; ca. = cada.59

Figura 1.5 – Detalhes relacionados ao delineamento experimental dos artigos. **a)** Condições de estudo. **b)** Determinação das concentrações. **c)** Número de concentrações utilizadas. **d)** Método de exposição. **e)** Número de intervalos de tempo usados para exposição. **f)** Tempo de exposição de artigos que utilizaram apenas um intervalo de tempo. **g)** Tempo de exposição dos estudos que utilizaram mais de um intervalo de tempo. **h)** Partes da planta utilizadas. **i)** Recuperação. **j)** Tempo usado para recuperação.....62

Figura 1.6 – Biomarcadores utilizados nos estudos e efeitos encontrados devido à exposição a agrotóxicos. **a)** Diferentes biomarcadores identificados nos artigos. **b)** Efeitos encontrados; ca. = cada.....65

Figura 1.7 – Mecanismo de ação dos pesticidas na célula. Ao penetrar na célula, os agrotóxicos podem causar diversos danos celulares, como a geração de EROs (**a1**). As EROs podem levar à peroxidação lipídica (**a2**), cujos produtos podem danificar e/ou alterar o DNA por meio da formação de adutos (**d**). As EROs também podem modificar as bases purínicas e pirimídicas e interagir com o esqueleto de açúcar-fosfato das fitas de DNA que compõem o exterior da dupla hélice, causando instabilidade (**d**). As EROs também podem danificar as histonas (**c1**), impedindo a condensação total do material genético e dos microtúbulos (**b1**). Os pesticidas podem danificar diretamente os microtúbulos (**b1**), as histonas (**c1**) e o DNA. Danos nos microtúbulos podem romper a membrana plasmática e a parede celular (**b2**). A interação com microtúbulos também pode causar segregação cromossômica anormal. A interação direta com o DNA pode causar quebra, intercalação, e inativação de enzimas, reduzindo a replicação (**d**). A ação tanto de agrotóxicos quanto de EROs em microtúbulos, DNA e histonas pode prejudicar o ciclo celular (**e**). Tais efeitos podem bloquear o ciclo celular, levando à retenção de estágios mitóticos para possíveis reparos para manter a estabilidade genômica. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os

mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a alterações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular.68

Figura 2.1 – Esquema experimental para avaliação dos efeitos do pesticida à base de fluopiram em parâmetros avaliados nas raízes de *Allium cepa*.....85

Figura 2.2 – Esquema do passo a passo para a análise de malondialdeído (MDA) como marcador de peroxidação lipídica em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.....86

Figura 2.3 – Esquema metodológico para a avaliação da morte celular com corante azul de Evans em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.87

Figura 2.4 – Esquema metodológico para a avaliação de células metabolicamente ativas utilizando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.88

Figura 2.5 – Esquema metodológico para a avaliação do índice mitótico, alterações cromossômicas e anormalidades nucleares em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.89

Figura 2.6 – Parâmetros de citotoxicidade obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação em água destilada. O conjunto de barras próximos ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores de MDA. **b)** Densidade óptica do corante azul de Evans excretado pelas raízes após a etapa de coloração. **c)** Densidade óptica da formazana excretado pelas raízes após a etapa de coloração com TTC.....93

Figura 2.7 – Foto das raízes coradas com azul de Evan e TTC após exposição de 48 h as diferentes concentrações do pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação de 48 h em água destilada. **a)** Raízes coradas com azul de Evans. Se a membrana celular está danificada ou comprometida, o corante azul de Evans consegue atravessar a membrana e entrar na célula, resultando na coloração azul. Isso indica uma perda de integridade da membrana celular. Logo, as raízes mais coradas são as que mais sofreram danos devido a exposição. **b)** Raízes coradas com TTC. O TTC é incolor, mas quando é metabolizado pelas desidrogenases mitocondriais presentes nas células vivas, ele é reduzido a formazana, que é um composto de cor vermelha. Portanto, a presença de cor vermelha indica atividade metabólica e, consequentemente, células viáveis e metabolicamente ativas. Logo, as raízes mais coradas de vermelho são aquelas que possuem células mais metabolicamente ativas.....94

Figura 2.8 – Parâmetros citogenéticos obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação em água destilada. O conjunto de barras próximos ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores de IM. **b)** Porcentagem de inibição e estimulação do índice mitótico (IM). A inibição do IM abaixo de -50% em relação ao controle causa efeitos subletais, enquanto a inibição abaixo de -78% causam efeitos letais. Valores positivos indicam estimulação. **c)** Índice de células em prófase. **d)** Índice de células em metáfase. **e)** Índice de células em anáfase. **f)** Índice de células em telófase.....96

Figura 2.9 – Índice de fases mitóticas em cada fase. **a)** Índice de fases mitóticas obtidas da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles. **b)** Índice de fases mitóticas obtidas da recuperação (48 h) de raízes de *Allium cepa* a água destilada para recuperação. 98

Figura 2.10 – Parâmetros citogenéticos obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação em água destilada. Nos gráficos de barras, o conjunto de barras próximos ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores do índice de AC. **b)** Valores do índice de AN. **c)** Valores do índice de Mn. **d)** Índice de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares por tratamento e fase. Cores mais escuras, indicam índice maior da aberração ou anormalidade no tratamento. 99

Figura 2.11 – Fotomicrografias de aberrações cromossômicas obtidas a partir da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação (48 h) em água destilada. **a)** células normais em interfase. **b)** prófase normal. **c)** metáfase normal. **d)** anáfase normal. **e)** telófase normal. **f-s)** C-mitose. **t-u)** aderência com perda cromossômica. **v-z)** aderência cromossômica. **aa)** aderência com quebra cromossômica. **ab)** metáfase com perda cromossômica. **ac)** anáfase com atraso cromossômico. **ad e ag)** anáfase com ponte e atraso cromossômico. **ae)** anáfase com perda cromossômica. **af e ah)** anáfase com ponte cromossômica. **ai-aj)** anáfase com ponte e cromossomos vagantes. **ak)** anáfase com cromossomos vagantes. **al-am)** telófase com ponte cromossômica. **an)** telófase com cromossomos vagantes. 101

Figura 2.12 – Fotomicrografias de anormalidades nucleares obtidas a partir da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação (48 h) em água destilada. **a)** célula anucleada. **b-j)** células binucleadas. **k)** célula com broto nuclear. **l-r)** células com micronúcleo. **s-t)** células com núcleo lobulado. **u-w)** células interfásicas com ponte nuclear. 102

Figura 2.13 – Gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) evidenciando a similaridade entre os diferentes tratamentos de raízes de *Allium cepa* expostas a várias concentrações do pesticida à base de fluopiram, nas fases de exposição e recuperação. Os pontos e triângulos coloridos representam os tratamentos, sendo que as formas diferentes (círculos = exposição, triângulos = recuperação) representam as fases. As escalas nos eixos X e Y não têm unidades e representam a distância euclidiana entre as amostras. Quanto mais próximos os pontos estiverem uns dos outros, mais semelhante será os tratamentos. 103

Figura 3.1 – Número de colônias revertentes his⁺ e índice de mutagenicidade resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram. 122

Figura 3.2 – Análise da taxa de mortalidade e curva dose-resposta de *Artemia salina* exposta a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram. 123

Figura 3.3 – Taxa de germinação resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram. 124

Figura 3.4 – Taxas de crescimento da raiz resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram. 125

Figura 4.1 – Mapa da área de estudo. **a)** área onde o estudo foi realizado, o quadrado vermelho representa o local exato onde as parcelas foram montadas. **b)** representação e dimensão das parcelas. 136

Figura 4.2 – Variáveis ambientais: gráfico de dispersão que exibe a temperatura máxima e mínima (à esquerda) e gráfico de barras que mostra a precipitação (à direita). As datas em vermelho representam os dias de coleta das amostras de solo, enquanto as datas em cinza, anteriores a 23-nov, indicam a temperatura e precipitação antes do início do experimento. . 137

Figura 4.3 – Atividade enzimática do solo submetido a dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** α -glucosidase. **b)** β -glucosidase. **c)** fosfatase ácida. **d)** glicina aminopeptidase. **e)** arilsulfatase. 142

Figura 4.4 – Parâmetros de atividade do solo dos dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** Amônio (N-NH_4^+). **b)** Nitrato (N-NO_3^-). **c)** Nitrogênio mineral. **d)** Amônio (%). **e)** Nitrato (%). **f)** Carbono da biomassa microbiana (CBM). 143

Figura 4.5 – Parâmetros de atividade do solo dos dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** Respiração Basal do solo (RBS). **b)** quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$). 144

Figura 4.6 – Gráfico de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) da dissimilaridade na composição dos parâmetros do solo para os grupos de controle e tratados com herbicida. Os pontos coloridos representam cada amostra de solo num determinado momento, com as diferentes formas (círculos = controle, triângulos = tratamento com herbicida) a representar os grupos. As escalas nos eixos X e Y não têm unidades e representam a distância euclidiana entre as amostras. Quanto mais próximos os pontos estiverem uns dos outros, mais semelhantes são os parâmetros do solo no intervalo de tempo. 145

Figura 5.1 – Esquema experimental para avaliação dos efeitos do pesticida à base de fluopiram nos parâmetros do solo ao longo do tempo. O arranjo experimental inclui a aplicação do pesticida após o tempo 0, com coletas de amostras de solo realizadas nos tempos 0 (antes da aplicação), 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a aplicação. Cada ponto de coleta possui 5 réplicas por tratamento (controle e tratado), e o experimento foi repetido três vezes, utilizando diferentes vasos para cada período. 158

Figura 5.2 – Atividade de parâmetros do solo de dois tratamentos (controle e tratado com pesticida a base de fluopiram) e variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. As letras de significância indicam diferenças estatisticamente significativas: letras sobre as barras representam diferenças significativas para as interações (tratamento e tempo). 162

Figura 5.3 – Atividade de parâmetros do solo de dois tratamentos (controle e tratado pesticida a base de fluopiram) e variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. As letras de significância indicam diferenças estatisticamente significativas: letras sobre as barras representam diferenças significativas para as interações (tratamento e tempo) e para os efeitos simples do tempo. Para o efeito simples do tratamento, não foram adicionadas letras de significância. 164

Figura 5.4 – A análise CRP mostra a resposta das variáveis do solo aos tratamentos (controle e tratado com pesticida a base de fluopiram) ao longo do tempo. O eixo vertical representa os desvios dos tratamentos em relação ao controle. Os pesos das variáveis no eixo direito indicam a afinidade de cada variável com a resposta mostrada no diagrama, destacando como cada variável responde ao tratamento ao longo do tempo. 166

Figura 6.1 – Crescimento de isolados fúngicos em contato com os pesticidas. CN = Controle negativo, FM = Flumioxazina, FP = Fluopiram, SM = S-metolacoloro. 178

Figura D.1 – Banner apresentado no EEPEX.....	219
Figura D.2 – Certificado Prêmio Goiás Sustentável – SEMAD.	220
Figura D.3 – Fotos da premiação.	221

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Propriedades químicas do fluopiram, princípio ativo do Verango® Prime.	84
Tabela 3.1 – Propriedades químicas do fluopiram, princípio ativo do Verango® Prime.	116
Tabela 3.2 – Concentrações utilizadas do pesticida.....	117
Tabela 4.1 – Características químicas e texturais do solo da área experimental.	135
Tabela 5.1 – Características químicas e texturais do latossolo vermelho distrófico.....	159
Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.....	184
Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo	206
Tabela B.1 – Mutagenicidade de pesticidas em cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	211

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3Rs	<i>Replace-Reduce-Refine</i>	DO	Densidade óptica
4-NQO	4-nitroquinolina-1-óxido	DP	Desvio padrão
AC	Aberrações cromossômicas	drc	<i>Dose-ResponseCurves</i>
AN	Anormalidades nucleares	DT ₅₀	<i>Degradation Time</i>
ANOVA	Análise de Variância	EC	<i>Enzyme Commission</i>
ART	<i>Aligned ranks transformation</i>	EC ₅₀	Concentração Efetiva
ATP	Adenosina Trifosfato	EEPEX	Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão
BDA	Agar Batata Dextrose	EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>	EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
BPDB	<i>Bio-Pesticides DataBase</i>	EROs	Espécies reativas de oxigênio
ca	cada	ES	Espanha
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>	EU	União Europeia
CBM	Carbono da biomassa microbiana	EUA	Estados Unidos da América
CC	Capacidade de campo	FAOSTAT	<i>Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database</i>
CEASA	Centro Estadual de Abastecimento	GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo	GSH	Glutationa reduzida
CHFR	<i>Checkpoint with Forkhead and RING Finger domains</i>	GUS	<i>Groundwater Ubiquity Score</i>
CL ₅₀	Concentração letal	ha	Hectare
CN	Controle negativo	HCl	Ácido clorídrico
CP	Controle positivo	i.a.	Ingrediente ativo
CRC	Comprimento raiz controle negativo	IM	Índice mitótico, Índice de mutagenicidade
CRP	Curvas de Resposta Principal	IN	Índia
CRT	Comprimento raiz no tratamento	IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
CT	Coeficiente de tolerância	IPPB	Programa Internacional de Bioensaios de Plantas
CTC	Capacidade de troca de cátions	ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
CUE	Eficiência do uso do carbono	MDA	Malondialdeído
DAA	Dias após a aplicação	MFO	<i>Mixed-Function Oxidase</i>
DCA	Diâmetro da colônia na amostra	Mn	Micronúcleo
DCC	Diâmetro da colônia na controle	MO	Matéria orgânica
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano		
dNTP	<i>Deoxynucleoside triphosphates</i>		

NAG	Número de sementes germinadas	rpm	Rotações por minuto
NaOH	Hidróxido de sódio	r_s	Coefficiente de correlação de Spearman
NAs	<i>Número de Artemia salina</i>	SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information	SB	Saturação de bases
nm	Nanómetro	SDH	Succinato desidrogenase
nMDS	<i>Non-metric Multidimensional Scaling</i>	SDHIs	Inibidores da Succinato Desidrogenase
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>	SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
OIT	Organização Internacional do Trabalho	seg	Segundos
OPPTS	<i>Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances</i>	SEMAD	Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Goiás
PCR	Reação em cadeia da polimerase	Sob	Número de sobreviventes
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance	TBA	Ácido Tiobarbitúrico
PES	Polyethersulfone	TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
PMCMRplus	Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended	TCR	Taxa de crescimento da raiz
pNP	p-nitrofenol	TEP	1,1,3,3-tetra-hidroxipropano
PNUMA	Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente	TG	Taxa de germinação
PPDB	<i>Pesticide Properties DataBase</i>	TM	Taxa de mortalidade
q.s.p.	Quantidade suficiente para	TS	Número total de sementes
RBS	Respiração basal do solo	TTC	2,3,5-trifeniltetrazolio
RE	Revertentes Espontâneos	U	Unidade
REI	Revertentes Espontâneos e Induzidos	WHO	Organização Mundial da Saúde
		XR	<i>Extended Range</i>
		η_g^2	<i>Generalized Eta Squared</i>

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

BaCl ₂	Cloreto de bário	NaCl	Cloreto de sódio
C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O	Fluopiram	NaOH	Hidróxido de sódio
C ₁₉ H ₁₅ FN ₂ O ₄	Flumioxazina	NH ₄ ⁺	Amônio
CO ₂	Dióxido de carbono	N-NO ₃ ⁻	Nitrato
HCl	Ácido clorídrico	NO ₂	Dióxido de nitrogênio
K ₂ SO ₄	Sulfato de potássio	Ø	Diâmetro
KCl	Cloreto de potássio	P	Fósforo
N	Nitrogênio	qCO ₂	Quociente metabólico do solo

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	24
1.1.	<i>Consequências dos pesticidas para o meio ambiente e saúde humana.....</i>	<i>27</i>
1.2.	<i>Estratégias para avaliar os efeitos que os pesticidas representam para o meio ambiente e a saúde humana</i>	<i>29</i>
1.3.	<i>Persistência de ingredientes ativos no meio ambiente</i>	<i>32</i>
1.4.	<i>O ingrediente ativo é sempre o culpado?</i>	<i>33</i>
1.5.	<i>Propriedades da Flumioxazina e Fluopiram.....</i>	<i>34</i>
2.	OBJETIVOS.....	35
2.1.	<i>Geral.....</i>	<i>35</i>
2.2.	<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>35</i>
	REFERENCIAS.....	35
	ARTIGO 1. O QUE O TESTE <i>Allium cepa</i> PODE DIZER SOBRE A SEGURANÇA DE PESTICIDAS? UMA REVISÃO	49
1.1	INTRODUÇÃO	49
1.2	MATERIAIS E MÉTODOS	51
	<i>Estratégia de pesquisa</i>	<i>51</i>
	<i>Critério de elegibilidade</i>	<i>51</i>
	<i>Extração dos dados</i>	<i>51</i>
	<i>Análise de dados.....</i>	<i>52</i>
1.3	<i>Allium cepa</i> COMO BIOENSAIO.....	53
1.4	TENDÊNCIAS DE PUBLICAÇÃO	54
1.5	PESTICIDAS.....	57
1.6	PROPRIEDADES DOS PESTICIDAS.....	58
1.7	DESIGN EXPERIMENTAL	61
1.8	BIOMARCADORES AVALIADOS E EFEITOS ENCONTRADOS	64
1.9	MECANISMOS DE AÇÃO DE PESTICIDAS	67
1.10	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	70
	REFERÊNCIAS	71
	ARTIGO 2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À PESTICIDA A BASE DE FLUOPIRAM EM <i>Allium cepa</i>	82
2.1	INTRODUÇÃO	83
2.2	METODOLOGIA	84
	<i>Material.....</i>	<i>84</i>
	<i>Procedimento experimental.....</i>	<i>84</i>
	<i>Peroxidação lipídica</i>	<i>86</i>
	<i>Viabilidade celular</i>	<i>87</i>
	<i>Análise citogenética</i>	<i>89</i>
	<i>Análise dos dados.....</i>	<i>91</i>
2.3	RESULTADOS	92
2.4	DISCUSSÃO	103
2.5	CONCLUSÃO	107

REFERÊNCIAS	108
ARTIGO 3. EXPLORANDO A TOXICIDADE DE PESTICIDA À BASE DE FLUOPIRAM EM ESPÉCIES NÃO-ALVO	115
3.1 INTRODUÇÃO	116
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	116
<i>Teste de Ames</i>	117
<i>Teste de toxicidade com Artemia salina</i>	118
<i>Teste de germinação de sementes e alongamento da raiz</i>	119
<i>Análise de dados</i>	120
3.3 RESULTADO	121
<i>Teste de Ames</i>	121
<i>Teste de toxicidade com Artemia salina</i>	122
<i>Teste de germinação de sementes e alongamento da raiz</i>	123
3.4 DISCUSSÃO	125
3.5 CONCLUSÃO	127
REFERÊNCIAS	127
ARTIGO 4. EFEITOS DE CURTO PRAZO DA APLICAÇÃO DO HERBICIDA FLUMIOXAZINA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO.....	133
4.1 INTRODUÇÃO	133
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	135
<i>Area de estudo</i>	135
<i>Preparo da calda e aplicação</i>	137
<i>Amostragem do solo</i>	138
<i>Atividade enzimática do solo</i>	138
<i>Teores de nitrogênio inorgânico</i>	139
<i>Biomassa e taxas de respiração microbiana</i>	139
<i>Análise dos dados</i>	140
4.3 RESULTADO	141
4.4 DISCUSSÃO	145
4.5 CONCLUSÃO	149
REFERENCIAS	150
ARTIGO 5. EFEITOS TEMPORAIS DE PESTICIDA A BASE DE FLUOPIRAM NA SAÚDE DO SOLO.....	156
5.1 INTRODUÇÃO	156
5.2 METODOLOGIA.....	157
<i>Arranjo experimental</i>	157
<i>Preparo do pesticida</i>	159
<i>Atividade enzimática do solo</i>	159
<i>Teor de nitrogênio inorgânico</i>	159
<i>Biomassa e taxas de respiração microbiana</i>	160
<i>Análise de dados</i>	160
5.3 RESULTADOS	161
5.4 DISCUSSÃO	166
5.5 CONCLUSÃO	170

REFERENCIAS	171
ARTIGO 6. BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS: ESTRATÉGIA PARA MITIGAÇÃO DE DANOS AMBIENTAIS (RESULTADOS PRELIMINARES).....	175
6.1 INTRODUÇÃO	175
6.2 METODOLOGIA	176
<i>Capacidade de tolerância das linhagens fúngicas.....</i>	<i>176</i>
<i>Extração de DNA e identificação dos isolados fúngicos</i>	<i>176</i>
6.3 RESULTADOS	177
6.4 DISCUSSÃO	179
6.5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	180
REFERÊNCIAS	180
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
APÊNDICE A. TABELAS ARTIGO 1: O que o teste <i>Allium cepa</i> pode dizer sobre a segurança de pesticidas? Uma revisão.....	184
APÊNDICE B. TABELA ARTIGO 3: Explorando a toxicidade de pesticida à base de fluopiram em espécies não-alvo.....	211
APÊNDICE C. RESULTADOS ESTATÍSTICOS ARTIGO 4: Efeitos de curto prazo da aplicação do herbicida flumioxazina na atividade biológica do solo	212
APÊNDICE D. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 6.....	219

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os avanços tecnológicos no século XX modificaram e modernizaram a agricultura, inserindo inovações que melhoraram a produtividade e eficiência agrícola. A Revolução Verde foi responsável pela difusão de inovações tecnológicas na agricultura, como o uso de fertilizantes químicos, desenvolvimento de cultivares resistentes e com maior rendimento, uso de maquinário e introdução de pesticidas sintéticos (ANTLE, 1999). Essas novidades proporcionaram aumento da produção agrícola, o que foi essencial para lidar paralelamente com o crescimento populacional e maior procura por alimentos (CARVALHO, 2017). Além disso, os pesticidas proporcionaram o controle de pragas e doenças nas lavouras e com o tempo, muitos agricultores começaram a substituir práticas tradicionais de manejo de pragas, como a rotação de culturas e o controle biológico, por pesticidas. Isso levou a adoção da monocultura, que é dependente de pesticidas (TOSTADO *et al.*, 2022).

Como consequência, hoje os pesticidas são fundamentais para manter a produção agrícola (TUDI *et al.*, 2021). Entretanto, embora os pesticidas apresentem benefícios para a produção agrícola, o desenvolvimento que proporcionam pode não ser sustentável no futuro (JOHN; BABU, 2021). Além de serem utilizados na agricultura, pesticidas também podem ser utilizados para o uso doméstico e em práticas de saúde pública para eliminar pragas, incluindo mosquitos transmissores de doenças, carrapatos, ratos e insetos como formigas e baratas (TUDI *et al.*, 2021).

Pesticidas são substâncias, ou mistura de substâncias, destinadas a prevenir, destruir ou controlar qualquer praga, incluindo vetores de doenças em humanos ou em animais, espécies indesejadas de plantas ou animais. As formulações de pesticidas são o produto oferecido para venda, composto por princípio(s) ativo(s), adjuvante(s) e outros formulantes que tornam o ingrediente ativo mais eficaz. O ingrediente ativo é o componente da formulação que contribui para a atividade biológica direta ou indireta (STEPHENSON *et al.*, 2006).

Os pesticidas podem ser classificados de diferentes formas, como classe química, grupos funcionais, modos de ação, função e toxicidade (ABUBAKAR *et al.*, 2020). Em relação a natureza, podem ser sintéticos ou naturais (PATHAK *et al.*, 2022). Em relação aos alvos, os pesticidas são classificados, por exemplo, em herbicidas (eliminam ervas daninhas), fungicidas (eliminam fungos), inseticidas (eliminam insetos), rodenticidas (eliminam roedores) entre outros. Já em classe química, podem ser orgânicos e inorgânicos.

Os pesticidas orgânicos por sua vez podem ser classificados em diferentes grupos baseados em sua estrutura química (TUDI *et al.*, 2021). A classificação pode ser baseada ainda

pelo modo de entrada no alvo, sendo: pesticidas sistêmicos, de contato, estomacais, fumigantes e repelentes (YADAV; DEVI, 2017).

No Brasil, a classificação em função da toxicidade aguda dos pesticidas segue os critérios baseados no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), sendo identificados com os respectivos nomes das categorias e cores nas faixas do rótulo dos produtos, de acordo com o estabelecido abaixo (ANVISA, 2019):

- Categoria 1: Produto Extremamente Tóxico – faixa vermelha;
- Categoria 2: Produto Altamente Tóxico – faixa vermelha;
- Categoria 3: Produto Moderadamente Tóxico – faixa amarela;
- Categoria 4: Produto Pouco Tóxico – faixa azul;
- Categoria 5: Produto Improvável de Causar Dano Agudo – faixa azul;
- Não Classificado – Produto Não Classificado – faixa verde.

Apesar do protagonismo para produção agrícola, os pesticidas são também poluentes onipresentes, causando efeitos adversos na qualidade da água e do solo, afetam o meio ambiente, a saúde humana (TANG *et al.*, 2021) e a segurança alimentar (ZIKANKUBA *et al.*, 2019). Esses efeitos são devido à bioampliação, natureza persistente, bioacumulação e toxicidade dos ingredientes ativos (SHARMA *et al.*, 2019). Um dos primeiros trabalhos que contestava o uso de pesticidas foi o livro *Primavera Silenciosa* de Rachel Carson, publicado em 1962. O livro documenta os efeitos prejudiciais dos pesticidas no meio ambiente e na saúde humana. Entretanto, o alvoroço criado por “*Primavera Silenciosa*” foi silenciado pela revolução tecnológica moderna na agricultura, facilitada pelo apoio político e produção comercial de insumos que se espalharam por todo o globo (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022). Com isso percebe-se que mesmo com a conscientização que o livro trouxe para a sociedade, por iniciar os debates sobre a utilização de pesticidas, com o tempo, a imagem dos pesticidas ficou atrelada com a necessidade de se produzir alimento, logo é um mal necessário.

Diferentes regiões do mundo apresentam padrões distintos de uso de pesticidas, cada uma enfrentando desafios únicos em termos de regulamentação, resistência de pragas e impactos ambientais (SHARMA *et al.*, 2019). Os pesticidas são mais problemáticos em economias em desenvolvimento, onde há regulamentações mais fracas (TOSTADO *et al.*, 2022). Nesses locais, a aplicação de pesticidas é frequentemente caracterizada por uma abordagem não científica em todos os estágios, desde a escolha dos pesticidas até os métodos de aplicação (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022). O uso não científico pode ser atribuído pela comparação com países desenvolvidos, como países da União Europeia, que possuem leis

rigorosas quanto ao uso e liberação de pesticidas. Nesses países desenvolvidos, pesticidas que possuem comprovação de risco para a saúde humana e meio ambiente são banidos, já países em desenvolvimento continuam utilizando-os (BOMBARDI, 2019) de forma extensiva, ignorando seus efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (RAJAK *et al.*, 2023). Apesar do rigor da União Europeia para a liberação, os efeitos nocivos dos pesticidas em ecossistemas inteiros não são levados em consideração (TOSTADO *et al.*, 2022). Há também pesticidas que são proibidos em países mais desenvolvidos, mas que são exportados para os menos desenvolvidos (BOMBARDI, 2019; DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022).

No Brasil, maior mercado mundial de pesticidas, há conflito de interesses entre estudos toxicológicos realizados por laboratórios privados, financiados pela indústria de pesticidas, e as evidências científicas independentes que apontam para os efeitos mutagênicos, carcinogênicos e reprodutivos desses produtos (ROCHA; GRISOLIA, 2019). Isso faz com que liberação de pesticidas seja uma prática controversa. Para se ter uma ideia nas falhas de liberação, de 247 formulações de pesticidas que foram analisadas por laboratórios privados de empresas, nenhum apresentou resultados positivos para mutagenicidade, carcinogenicidade ou teratogenicidade (ROCHA; GRISOLIA, 2019). Ainda segundo os autores:

Comparando artigos entre instituições públicas e privadas da base de dados da literatura para mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade/malformações, observa-se que a maioria dos resultados positivos veio de artigos publicados por instituições públicas (84%), enquanto apenas 21% dos resultados positivos foram de laboratórios privados. Em contraste, a maioria dos artigos com resultados negativos veio de instituições privadas (79%), em comparação com os resultados negativos provenientes de instituições públicas. Essa discrepância levanta sérias preocupações sobre a integridade e independência dos processos regulatórios e destaca a necessidade de uma revisão crítica das práticas de liberação de pesticidas no país (ROCHA; GRISOLIA, 2019).

Dessa maneira, estudos focados em avaliar a segurança de pesticidas, realizados em instituições públicas, são fundamentais para compreender as reais consequências de seu uso indiscriminado, garantir a segurança pública e ambiental e promover uma regulamentação mais transparente e independente. Nesse sentido, entender as consequências que os pesticidas têm para o meio ambiente e a saúde humana é um passo fundamental para a adoção de práticas agrícolas mais sustentáveis. Apesar de haver uma extensa literatura científica alertando para os efeitos deletérios que os pesticidas possuem, ainda é necessário estudar seus efeitos em organismos não-alvo. Pois a demanda de pesticidas, principalmente os perigosos, está em ascensão, especialmente nas regiões com regulamentação menos rigorosa, o que levanta preocupações sobre os impactos na saúde humana e no meio ambiente (TOSTADO *et al.*, 2022).

Ainda há o aparecimento de novos desafios, como criação de novos ingredientes ativos e o uso de misturas. O uso de misturas ocorre devido a estagnação de pesquisas e redução no número de patentes de novos ingredientes ativos, devido a processos de aprovação mais rigorosos que fazem com que os custos de lançamento de uma nova molécula aumentem. Para superar essa limitação, as empresas agroquímicas utilizam ingredientes ativos mais antigos, combinados em novas misturas (TOSTADO *et al.*, 2022). Outro desafio é o uso de terras agrícolas para produzir *commodities* de base biológica, como biocombustíveis ou fibras, em vez de alimentos, o que também aumenta a demanda e o uso de pesticidas (POPP; PETŐ; NAGY, 2013). Apesar de que nas últimas décadas o número de trabalhos focados em avaliar o impacto dos pesticidas aumentou, espera-se que o número cresça ainda mais (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022).

1.1. Consequências dos pesticidas para o meio ambiente e saúde humana

Muitos efeitos prejudiciais foram observados em diversos organismos, decorrentes do uso generalizado de pesticidas (PATHAK *et al.*, 2022). Até o ano de 2023, foi utilizado em todo o mundo, aproximadamente, 4,1 milhões de toneladas de pesticidas. A China, Estados Unidos e Brasil são os países que mais utilizam pesticidas (WORLDOMETERS, 2023). A classe de pesticidas mais usada na lavoura é a dos herbicidas (53,0%), seguido de fungicidas (23,1%) e inseticidas (16,8%) (FAOSTAT, 2021). Em relação ao potencial tóxico, inseticidas são considerados mais tóxicos, enquanto os fungicidas estão em segundo lugar e herbicidas ocupam o terceiro lugar na lista de toxicidade, isso considerando o impacto que causam sobre organismos não-alvo (MAHMOOD *et al.*, 2016).

Os pesticidas podem ser aplicados através de diversas técnicas, como manual, terrestre ou aérea. A técnica de aplicação pode influenciar a deriva do pesticida; a pulverização aérea, por exemplo, faz com que o pesticida seja transportado pelo vento (CARVALHO, 2017). Na pulverização aérea, somente 50% dos pesticidas aplicados atingem as culturas alvo (PIMENTEL; BURGESS, 2012). Em relação ao total de pesticidas aplicados nas lavouras, somente 0,1% atingem os organismos alvo (SINGH *et al.*, 2021). O excedente de pesticidas que não atingem o alvo acaba dispersando-se no ambiente, contaminando o ar, o solo e a água oferecendo riscos e danos para organismos não-alvo (SHARMA *et al.*, 2019).

Em relação a contaminação do solo, há uma falha em reconhecer a importância do solo dentro de sistemas agrícolas, e a degradação do solo trará consequências para a humanidade, pois o solo é um recurso finito (KOPITTKKE *et al.*, 2019). A contaminação do solo é um enorme problema, uma vez que os pesticidas podem reduzir ou eliminar a biodiversidade, representada

por uma grande variedade de organismos, responsáveis por inúmeros serviços como filtragem de água, reciclagem de nutrientes, combate a doenças, sequestro de gases do efeito estufa e regulação do clima. A morte desses organismos afeta os serviços ecossistêmicos prestados pelo solo (TOSTADO *et al.*, 2022).

Além disso, o acúmulo de ingredientes ativos no solo faz com que seja reservatório dessas moléculas por décadas (CARVALHO, 2017). No solo as moléculas podem sofrer processos de degradação e transferência para outros locais. O processo de transferência acarreta consequências, pois além de impactar a biodiversidade local, os princípios ativos irão contaminar a água por infiltração, escoamento superficial e deriva (TUDI *et al.*, 2021). Alguns princípios ativos já foram encontrados a mais de 1.000 quilômetros de distância do local de aplicação (TOSTADO *et al.*, 2022). Durante a transferência, os princípios ativos acabam atingindo diversos organismos não-alvo (TUDI *et al.*, 2021).

O uso de pesticidas é contraproducente (ABUBAKAR *et al.*, 2020) causando diversos problemas tanto na saúde humana quanto no meio ambiente. A disposição de pesticidas no meio ambiente tem levado à morte em massa de abelhas, pássaros, anfíbios, peixes e pequenos mamíferos e bioacumulação (CARVALHO, 2017). Além disso, resíduos de pesticidas são detectados constantemente em alimentos e amostras de água, representando uma fonte significativa de exposição humana (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022). Em humanos podem causar intoxicação de agricultores rurais e suas famílias, resultando em morte ou efeitos negativos na saúde (CARVALHO, 2017). Os trabalhadores agrícolas, são diretamente expostos a pesticidas, muitas vezes sem o devido conhecimento dos efeitos prejudiciais e os devidos cuidados a manuseá-los (DEVI; MANJULA; BHAVANI, 2022).

O que determina a toxicidade dos pesticidas nos sistemas vivos é a estrutura química específica e da quantidade de pesticida presentes em determinado momento ou situação (PATHAK *et al.*, 2022). Isso quer dizer que a estrutura química dos pesticidas é o que vai influenciar na sua capacidade de interagir com os organismos vivos. E durante a interação, a quantidade à qual o organismo é exposto e o tempo (agudo – curto prazo, crônico – longo prazo) vão influenciar na toxicidade, com efeitos variando conforme a duração e frequência de exposição. A via de exposição também determina a toxicidade, as principais vias são: oral, dérmica, cutânea e inalatória (DEDEK, 1982).

Os principais mecanismos da toxicidade dos pesticidas incluem: *i)* a inibição de enzimas críticas no metabolismo dos organismos (RANJBAR *et al.*, 2005, KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2013); *ii)* interferências neurológicas (COMAN *et al.*, 2013; PITZER; WILLIAMS; VORHEES, 2021); *iii)* desregulação endócrina, interferindo em hormônios

responsáveis por regular o desenvolvimento, reprodução e outros processos fisiológicos (KUMAR *et al.*, 2023; PAN *et al.*, 2024); *iv*) danos oxidativos, provocam a indução de estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) que danificam lipídios, proteínas e DNA, podendo levar a morte celular (RANJBAR *et al.*, 2005; SULE; CONDON; GOMES, 2022); e *v*) efeitos genotóxicos, podem causar danos no DNA, resultando em mutações, câncer e outras doenças genéticas (KAPELEKA; SAULI; NDAKIDEMI, 2021; SASIKALA *et al.*, 2023).

Em virtude das várias consequências que os pesticidas apresentam é fundamental que se conheça os efeitos que as moléculas possam oferecer. Com isso é fundamental o processo de avaliação pós-mercado para monitorar sistematicamente os impactos do uso de pesticidas na saúde humana e animal e para o meio ambiente como um todo (NAGY *et al.*, 2020).

1.2. Estratégias para avaliar os efeitos que os pesticidas representam para o meio ambiente e a saúde humana

Há diversas estratégias para avaliar e conhecer os efeitos que os pesticidas oferecem para o meio ambiente e saúde humana. Conhecer esses efeitos é fundamental para garantir a segurança e minimizar os impactos do uso de pesticidas. Uma boa estratégia para avaliar os riscos de pesticidas é realizando revisões científicas. As revisões científicas fornecem informações através da combinação de estudos já publicados. Isso possibilita uma maior compreensão de tendências, lacunas e padrões. As revisões possibilitam obter informações detalhadas sobre determinado pesticida, composição química, modo de ação e toxicidade e efeitos já relatados. Com isso é possível combinar descobertas para melhorar a compreensão dos efeitos associados ao uso de pesticidas, ajudando na tomada decisões sobre seu uso e o manejo e desenvolvimento de estratégias para minimizar seus efeitos (PELOSI *et al.*, 2014; ALBUQUERQUE *et al.*, 2016; KARALEXI *et al.*, 2021; RANI *et al.*, 2021; SABZEVARI; HOFMAN, 2022; TOSI *et al.*, 2022).

Estudos de toxicidade aguda e crônica são fundamentais para fornecer informações de potenciais efeitos de pesticidas. Testes de toxicidade aguda e crônica avaliam efeitos em organismos expostos a curto e longo prazo, respectivamente. Na exposição aguda o contato entre um pesticida e um alvo ocorre em um curto período, após uma única exposição ao pesticida. Como resultado é possível obter uma concentração letal (CL₅₀). Já na exposição crônica os efeitos dos pesticidas são avaliados a longo prazo, como em estudos de exposição a doses repetidas ao longo do desenvolvimento do organismo exposto (STEPHENSON *et al.*, 2006). Em estudos de toxicidade aguda e crônica são utilizados organismos não-alvo,

organismos modelos, ou culturas de células humanas. Isso torna possível estudar os impactos dos pesticidas em diferentes sistemas biológicos.

Estudos ecotoxicológicos realizados de acordo com diretrizes padronizadas internacionalmente e boas práticas laboratoriais podem ser utilizados para avaliação de efeitos e perigos ambientais ou ecológicos de produtos químicos. Os estudos têm como resultado pontos finais, efeitos individuais ou no nível da população. Geralmente são baseados na sobrevivência, crescimento, desenvolvimento e reprodução (RUDÉN *et al.*, 2017).

Entre os vários organismos modelos existentes, temos o modelo *Allium cepa*. O bioensaio com *A. cepa* é uma ferramenta viável para triagem rápida de citotoxicidade e genotoxicidade (ALIAS *et al.*, 2023) por ser sensível, simples, econômico, rápido e fácil de manusear, obtenção e manutenção (LEME; MARIN-MORALES, 2009; KHANNA; SHARMA, 2013). Segundo Fiskesjö (1985) outra característica é que *A. cepa* possui boas condições cromossômicas (cromossomos grandes, visíveis e em número reduzido, $2n=16$) o que facilita estudos de danos cromossômicos ou distúrbios da divisão celular. Além disso, as células têm a capacidade de ativar promutágenos, por meio de enzimas (sistema MFO – *Mixed-Function Oxidase*) (KHANNA; SHARMA, 2013). O teste apresenta uma boa correlação com outros sistemas de teste, como linfócitos humanos, crustáceos e algas. Portanto, resultados positivos no teste com *A. cepa*, devem ser considerados como um aviso e uma indicação de que o produto químico testado pode representar um risco à saúde humana e ao ambiente (FISKESJÖ, 1985). As aberrações cromossômicas em células radiculares de *A. cepa* são os pontos finais mais utilizados para detectar genotoxicidade de produtos químicos. O índice mitótico e as aberrações cromossômicas também são usadas para avaliar a genotoxicidade (KHANNA; SHARMA, 2013).

Um dos efeitos causados por pesticidas é a indução de mutações. Mutações podem ser deletérias para organismos não-alvo, incluindo o ser humano. Uma forma rápida e confiável de verificar o potencial mutagênico de um produto químico é utilizando o teste de Ames (ZEIGER, 2019). O princípio do teste de Ames é bem simples. O teste usa linhagens de cepas bacterianas mutantes de *Salmonella typhimurium*, incapazes de sintetizar aminoácidos. Caso o composto químico seja mutagênico, irá ocorrer uma nova mutação que irá reverter a mutação anterior. A detecção de colônias revertentes indica a presença de mutagenicidade do composto testado (OECD, 2020). Basicamente no teste de Ames, cepas específicas de *S. typhimurium* são expostas ao composto químico a ser testado em placas de ágar. Após a incubação, as colônias formadas são contadas. Um aumento significativo no número de colônias revertidas em

comparação com um controle indica que o composto é mutagênico (HAMEL; ROY; PROUDLOCK, 2016).

A toxicidade de pesticidas em ambientes aquáticos também é uma preocupação crescente devido à lixiviação e deriva dessas substâncias para corpos d'água (NOWELL *et al.*, 2018). Para prever o potencial que pesticidas possam ter em meio aquático, pode-se usar o teste com *Artemia salina*, devido a sua simplicidade, facilidade de obtenção e eclosão dos cistos, baixo custo de manutenção, facilidade do cultivo, reprodutibilidade e rapidez em fornecer resultados (SALAY *et al.*, 2024; SOUZA *et al.*, 2024). Essas características tornaram o teste uma ferramenta eficaz e um bom indicador preliminar (SALAY *et al.*, 2024). O gênero *Artemia* sp. é aceito como um organismo modelo confiável para experimentos de toxicidade aquática (ASADI DOKHT LISH *et al.*, 2019) e apropriado para avaliar a ecotoxicidade de diferentes substâncias químicas e bastante usado com biomarcador de qualidade ambiental (SOUZA *et al.*, 2024). A eclosão e a mortalidade são os pontos finais mais comuns, onde a mortalidade é um indicativo de toxicidade da substância testada (LIBRALATO *et al.*, 2016).

Testes de germinação e alongamento de raízes também são métodos aceitos e que podem ser empregados para avaliar a toxicidade de pesticidas e substâncias tóxicas (EPA, 1996). Os testes de fitotoxicidade possuem como vantagem a durabilidade e disponibilidade de sementes, custo e manutenção baixo, as sementes podem ser ativadas em qualquer momento e simplicidade (WANG; KETURI, 1990). Dessa maneira, estes testes são eficientes em avaliar a toxicidade de diferentes compostos químicos (CARAFA; CARRATÙ, 2008; DOTANIYA; MEENA; DAS, 2014; VISIOLI *et al.*, 2014; BETTIOL *et al.*, 2016; DI SALVATORE; REDE *et al.*, 2019;). Sementes de diferentes espécies podem ser empregadas, porém a *Environmental Protection Agency* (EPA) recomenda as espécies: *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Cucumis sativus* (pepino), *Lactuca sativa* (alface), *Glycine max* (soja), *Brassica oleracea* (repolho), *Avena sativa* (aveia), *Lolium perenne* (azevém perene), *Allium cepa* (cebola), *Daucus carota* (cenoura) e *Zea mays* (milho) (EPA, 1996). Em estudos de fitotoxicidade é comum utilizar sementes de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) devido serem de fácil disponibilidade, sensibilidade e resposta uniforme. Estudos demonstram que essas sementes são particularmente úteis para identificar e analisar a seletividade e intensidade dos efeitos fitotóxicos de diversas substâncias (LI *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2022).

Devido a avaliação dos efeitos dos pesticidas sobre os microrganismos do solo ter sido negligenciada há muito tempo, em nível regulatório, devemos avançar na avaliação de risco de pesticidas sobre os microrganismos do solo (KARPOUZAS; VRYZAS; MARTIN-LAURENT, 2022). Uma forma de se fazer essa avaliação é através da medição de parâmetros bioquímicos

e microbiológicos. Parâmetros como a atividade enzimática (MICUTI *et al.*, 2020; RIAH *et al.*, 2014) carbono da biomassa microbiana (CBM) (DALAL, 1998; SINGH, P; PRASAD, 2019), respiração basal do solo (RBS) (LUO; ZHOU, 2006; PHILLIPS; NICKERSON, 2015), concentrações de amônio (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-) (ACZEL, 2019; STEIN; KLOTZ, 2016), e o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) (ASHRAF; WAQAS; RAHMAN, 2022) são indicadores da saúde do solo e da atividade microbiana. A medição desses parâmetros proporciona uma visão da saúde dos solos e dos efeitos associados à aplicação de pesticidas. Em relação as enzimas: a saúde do solo está interligada com a saúde bioquímica do solo e as atividades das enzimas do solo, e elas podem ser os indicadores de qualidade mais importantes em solos contaminados com pesticidas (MANDAL *et al.*, 2020).

1.3. Persistência de ingredientes ativos no meio ambiente

Um dos problemas dos pesticidas é que, após a aplicação, eles não se degradam facilmente e podem sofrer deriva. Moléculas de pesticidas orgânicos já foram encontrados em sedimentos recolhidos em profundidades abaixo de 2.000 m no Oceano Pacífico (GE *et al.*, 2021). Moléculas de pesticidas, como DDT (banido há anos), são encontrados em ambientes extremos como a Antártida e regiões oceânicas remotas. Os pesticidas contaminam essas regiões devido o transporte atmosférico de longa distância e transporte via circulação oceânica (BIDLEMAN *et al.*, 1993; BARGAGLI, 2008; TANIGUCHI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2015; POTAPOWICZ *et al.*, 2020).

Além disso, a persistência de moléculas de pesticidas no solo e seu acúmulo, faz com que penetrem profundamente no solo até atingir o lençol freático, contaminando os recursos hídricos (KUMAR *et al.*, 2021). A contaminação dos recursos hídricos pode ocorrer ainda por lixiviação, uma vez que o solo se torna reservatório de moléculas de pesticidas. Essas moléculas disponíveis no meio ambiente, além de bioacumular ao longo da cadeia alimentar (GOMES *et al.*, 2020), podem afetar a dinâmica microbiana do solo, o que acaba influenciando na capacidade de suporte a vida do solo e, com o tempo, prejudicando a produtividade de culturas e serviços ecossistêmicos (SHARMA *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2021). Outro problema, é que a persistência faz com que moléculas já banidas ainda estejam disponíveis na natureza, caracterizando assim uma contaminação herdada de aplicações passadas. Essas moléculas herdadas também possuem o potencial de impactar o meio ambiente (RASMUSSEN *et al.*, 2015; CARVALHO, 2017).

Para mitigar esse problema, processos biológicos podem ser empregados para quebrar, transformar e remover as moléculas do meio ambiente (VAKSMAA *et al.*, 2023). A

biodegradação de pesticidas é uma nova maneira de controle de poluição para benefícios ambientais (PATHAK *et al.*, 2022). Fungos estão entre os candidatos promissores para serem explorados para o processo de biodegradação de pesticidas. Fungos são quimioheterotróficos, onipresentes em ambientes terrestres e aquáticos, degradadores definitivos de moléculas complexas recalcitrantes na natureza, utilizando-as como fonte de energia (VAKSMAA *et al.*, 2023).

A capacidade de biodegradação dos fungos é associada a reações de oxidação, mediadas por enzimas oxidativas, como lacases e peroxidases, que desempenham papel crucial na modificação e degradação da lignina, que é uma molécula de estrutura complexa (HOFRICHTER, 2002). Alguns dos fungos com potencial para degradar pesticidas pertencem aos gêneros *Trametes*, *Ganoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Pleurotus*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Phlebia* e *Mortiella*. Esses gêneros pertencem a grupos de fungos, como fungos de podridão branca, fungos de podridão parda, fungos filamentosos e leveduras (VAKSMAA *et al.*, 2023).

Apesar do conhecimento do potencial que esses gêneros possuem, a riqueza de táxons fúngicos e enzimas úteis parece não ser totalmente explorados. Portanto, pesquisas com essa temática devem ter como objetivo desvendar a extensão de espécies fúngicas para atuarem com agentes de micorremediação eficazes e decifrar suas vias metabólicas (VAKSMAA *et al.*, 2023).

1.4. O ingrediente ativo é sempre o culpado?

Uma prática bastante comum em estudos que trabalham com formulações é atribuir os efeitos observados ao princípio ativo. Entretanto por ser formulações, co-formulantes, podem também contribuir para os efeitos adversos. Dessa maneira é importante tomar cuidado na hora de inferir a toxicidade ao princípio ativo em trabalhos com formulações. Nesses casos, há a necessidade de descrever o tratamento como uma formulação em todo o trabalho e nunca como um ingrediente ativo (STRAW, 2024). Por conta disso, este trabalho usa termos como “pesticida à base de fluopiram ou flumioxazina” para se referir ao composto testado e não ao nome da molécula. Apesar disso, abordagens que avaliam formulações tem a vantagem de conhecer o efeito real do produto final que é destinado para o uso. Várias formulações de pesticidas apresentam toxicidade diferente ou superior dos ingredientes ativos isolados. Além disso, são as formulações às quais humanos e o meio ambiente estarão expostos, e sua avaliação oferece um cenário mais realista dos efeitos (NAGY *et al.*, 2020).

1.5. *Propriedades da Flumioxazina e Fluopiram*

A flumioxazina ($C_{19}H_{15}FN_2O_4$) é um herbicida com um anel benzoxazínico e um grupo acetilênico (prop-2-ynil), além de ser um composto organofluorado. (HASTINGS *et al.*, 2016). É considerada uma molécula inibidora da protoporfirinogênio oxidase e um agente teratogênico, embriofetal e causadora de retardo de crescimento em ratos (NCBI, 2024). É um herbicida de contato e funciona interferindo na produção de clorofila das plantas, onde o bloqueio da protoporfirinogênio faz com que acumule porfírina, causando a fotossensibilização, desencadeando peroxidação lipídica da membrana plasmática, ocasionando danos irreversíveis de função e estrutura (LEWIS *et al.*, 2016). A protoporfirinogênio oxidase é uma enzima comum a biossíntese de clorofila e do grupo heme da hemoglobina (KAWAMURA; KATO; FANTEL, 2014; ABE *et al.*, 2018). A flumioxazina é considerada lipofílica com coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) de 2,55 (pH = 7) (LEWIS *et al.*, 2016).

Em relação ao comportamento do solo, apresentou ter baixa mobilidade (porém apresenta metabolito com alta mobilidade), persistência moderada (DT_{50}) = 11,8 a 34,7 dias, com risco baixo para os organismos do solo (EFSA *et al.*, 2020). Entretanto, a persistência foi considerada em apenas quatro tipos de solo, onde não foi revelado a procedência. Em solos da China a persistência variou de 8,2 a 50,6 dias, apresentando baixa mobilidade (CHEN *et al.*, 2021). Apesar da EFSA relatar risco baixo para organismos do solo, alguns trabalhos relataram impactos em microrganismos (DAUGROIS; HOY; GRIFFIN, 2005; ARAUJO *et al.*, 2023) e parâmetros do solo (PERTILE *et al.*, 2020). Na literatura há poucos trabalhos que avaliam os impactos da flumioxazina no solo. Mais estudos devem ser realizados considerando outras classes de solo, cujas propriedades biológicas, químicas e físicas se diferem, o que pode fazer com que o comportamento e os efeitos da flumioxazina sejam diferentes. Além disso, não há dados sobre a flumioxazina para solos do Cerrado.

O fluopiram ($C_{16}H_{11}ClF_6N_2O$) é uma molécula com atividade fungicida e nematocida, membro da classe benzamidas, um composto organoclorado, um membro das piridinas (NCBI, 2024). Atua inibindo a succinato desidrogenase (SDH), ou seja, inibição da respiração mitocondrial (LEWIS *et al.*, 2016). Pode apresentar efeitos prejudiciais na biomassa e a diversidade microbiana do solo por causar alterações na estrutura da comunidade microbiana e apresentar efeitos ambientais devido à sua persistência e mobilidade no solo (ZHANG *et al.*, 2014; RATHOD *et al.*, 2022). O fluopiram apresenta meia vida de 64,2 a 93,6 dias, fazendo com que ele tenha uma degradação lenta no solo (ZHANG *et al.*, 2014; SANTÍSIMA-TRINIDAD *et al.*, 2018). O fluopiram é um pesticida consideravelmente lipofílico com um coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) de 3,3 (pH = 7,0) (LEWIS *et al.*, 2016). Ainda é

uma molécula pouco estudada e que merece atenção devido atuar na inibição da SDH. A SDH é uma enzima essencial no ciclo de Krebs e cadeia transportadora de elétrons em procariotos e eucariotos, altamente conservada ao longo da evolução devido sua importância funcional. A literatura aponta que pode desencadear estresse oxidativo em organismos não-alvo (LIU *et al.*, 2022), modificar a comunidade microbiana do solo (SUN *et al.*, 2020) e provocar toxicidade em vertebrados (TINWELL *et al.*, 2014). Devido aos indícios de toxicidade ambiental e comportamento persistente no solo é fundamental avaliar os efeitos decorrentes do uso indiscriminado do fluopiram (RATHOD *et al.*, 2022).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos tóxicos, citogenotóxicos e ambientais de pesticidas por meio de bioensaios e análises de parâmetros do solo, visando identificar os impactos associados ao uso desses compostos e investigar o potencial de fungos na degradação dos ingredientes ativos.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar uma revisão da literatura sobre o uso do bioensaio com *Allium cepa* para avaliação da toxicidade de pesticidas;
- Verificar os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos de um fungicida à base de fluopiram em *Allium cepa*;
- Avaliar o potencial mutagênico do fungicida à base de fluopiram em *Salmonella typhimurium* e seus efeitos tóxicos em *Artemia salina*, *Lactuca sativa*, *Allium cepa* e *Cucumis sativus*;
- Realizar um estudo em campo para avaliar o impacto de um herbicida comercial a base de flumioxazina no solo, usando respostas da comunidade microbiana;
- Realizar um estudo em laboratório para verificar o efeito de um fungicida comercial a base de fluopiram, usando respostas da comunidade microbiana do solo;
- Investigar o potencial de espécies fúngicas em tolerar pesticidas para futuros testes de micorremediação de pesticidas.

REFERENCIAS

ABE, J.; ISOBE, N.; MIKATA, K.; NAGAHORI, H.; NAITO, Y.; SAJI, H.; ONO, M.; KAWAMURA, S. Flumioxazin metabolism in pregnant animals and cell-based protoporphyrinogen IX oxidase (PPO) inhibition assay of fetal metabolites in various animal

species to elucidate the mechanism of the rat-specific developmental toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 339, p. 34–41, Jan. 2018. DOI 10.1016/j.taap.2017.11.028.

ABUBAKAR, Y.; TIJJANI, H.; EGBUNA, C.; ADETUNJI, C. O.; KALA, S.; KRYEZIU, T. L.; IFEMEJE, J. C.; PATRICK-IWUANYANWU, K. C. Pesticides, History, and Classification. *Em*: EGBUNA, C.; SAWICKA, B. (eds.). **Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control**. Elsevier, 2020. p. 29–42. DOI 10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8.

ACZEL, M. R. What Is the Nitrogen Cycle and Why Is It Key to Life? **Frontiers for Young Minds**, vol. 7, 12 Mar. 2019. DOI 10.3389/frym.2019.00041.

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. **Environmental Science: Processes & Impacts**, vol. 18, no. 7, p. 779–787, 2016. DOI 10.1039/C6EM00268D.

ALIAS, C.; FERETTI, D.; VIOLA, G. V. C.; ZERBINI, I.; BISCEGLIE, F.; PELOSI, G.; ZANI, C.; BUSCHINI, A.; CARCELLI, M.; ROGOLINO, D.; RESTIVO, F. M.; DEGOLA, F. *Allium cepa* tests: A plant-based tool for the early evaluation of toxicity and genotoxicity of newly synthesized antifungal molecules. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, vol. 889, p. 503654, Jul. 2023. DOI 10.1016/j.mrgentox.2023.503654.

ANTLE, J. M. The New Economics of Agriculture. **American Journal of Agricultural Economics**, vol. 81, no. 5, p. 993–1010, Dec. 1999. DOI 10.2307/1244078.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC no 294, de 29 de julho de 2019**. Dispõe sobre os critérios para avaliação e classificação toxicológica, priorização da análise e comparação da ação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de ma. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2019.

ARAUJO, A. S. F.; PERTILE, M.; COSTA, R. M.; COSTA, M. K. L.; DE AVIZ, R. O.; MENDES, L. W.; DE MEDEIROS, E. V.; DA COSTA, D. P.; MELO, V. M. M.; PEREIRA, A. P. de A. Short-term responses of plant growth-promoting bacterial community to the herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Chemosphere**, vol. 328, p. 138581, Jul. 2023. DOI 10.1016/j.chemosphere.2023.138581.

ASADI DOKHT LISH, R.; JOHARI, S. A.; SARKHEIL, M.; YU, I. J. On how environmental and experimental conditions affect the results of aquatic nanotoxicology on brine shrimp (*Artemia salina*): A case of silver nanoparticles toxicity. **Environmental Pollution**, vol. 255, p. 113358, Dec. 2019. DOI 10.1016/j.envpol.2019.113358.

ASHRAF, M. N.; WAQAS, M. A.; RAHMAN, S. Microbial Metabolic Quotient is a Dynamic Indicator of Soil Health: Trends, Implications and Perspectives (Review). **Eurasian Soil Science**, vol. 55, no. 12, p. 1794–1803, 8 Dec. 2022.

BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of The Total Environment**, vol. 400, no. 1–3, p. 212–226, Aug. 2008. DOI 10.1016/j.scitotenv.2008.06.062.

BETTIOL, C.; DE VETTORI, S.; MINERVINI, G.; ZUCCON, E.; MARCHETTO, D.; GHIRARDINI, A. V.; ARGESE, E. Assessment of phenolic herbicide toxicity and mode of action by different assays. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 23, no. 8, p. 7398–7408, 23 Apr. 2016. DOI 10.1007/s11356-015-5958-5.

BIDLEMAN, T. F.; WALLA, M. D.; ROURA, R.; CARR, E.; SCHMIDT, S. Organochlorine pesticides in the atmosphere of the Southern Ocean and Antarctica, January–March, 1990. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 26, no. 5, p. 258–262, May 1993. DOI 10.1016/0025-326X(93)90064-Q.

BOMBARDI, L. M. L. M. **A Geography of Agrottoxins use in Brazil and its Relations to the European Union**. São Paulo: FFLCH - USP, 2019. DOI 10.11606/9788575063590.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, vol. 6, no. 2, p. 48–60, May 2017. DOI 10.1002/fes3.108.

CHEN, Y.; HAN, J.; CHEN, D.; LIU, Z.; ZHANG, K.; HU, D. Persistence, mobility, and leaching risk of flumioxazin in four Chinese soils. **Journal of Soils and Sediments**, vol. 21, no. 4, p. 1743–1754, 18 Apr. 2021. DOI 10.1007/s11368-021-02904-3.

COMAN, G.; FARCAS, A.; MATEI, A. V.; FLORIAN, C. Pesticides Mechanisms of Action in Living Organisms. *Em*: SIMEONOV, L.; MACAEV, F.; SIMEONOVA, B. (eds.). **Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe**. NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. Springer, 2013. p. 173–184. DOI 10.1007/978-94-007-6461-3_16.

DALAL, R. C. Soil microbial biomass—what do the numbers really mean? **Australian Journal of Experimental Agriculture**, vol. 38, no. 7, p. 649, 1998. DOI 10.1071/EA97142.

DAUGROIS, J. H.; HOY, J. W.; GRIFFIN, J. L. Protoporphyrinogen Oxidase Inhibitor Herbicide Effects on Pythium Root Rot of Sugarcane, *Pythium* Species, and the Soil Microbial Community. **Phytopathology®**, vol. 95, no. 3, p. 220–226, Mar. 2005. DOI 10.1094/PHYTO-95-0220.

DEDEK, W. Routes of Entry and Wards During Exposure to Pesticides. *Em*: HEEMSTRA-LEQUIN, E. A. H. van (ed.). **Education and Safe Handling in Pesticide Application**. 18th ed. Elsevier, 1982. p. 187–197. DOI 10.1016/S0166-1116(09)70046-9.

DEVI, P. I.; MANJULA, M.; BHAVANI, R. V. Agrochemicals, Environment, and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources**, vol. 47, no. 1, p. 399–421, 17 Oct. 2022. DOI 10.1146/annurev-environ-120920-111015.

DI SALVATORE, M.; CARAFA, A. M.; CARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. **Chemosphere**, vol. 73, no. 9, p. 1461–1464, Nov. 2008. DOI 10.1016/j.chemosphere.2008.07.061.

DOTANIYA, M. L.; MEENA, V. D.; DAS, H. Chromium toxicity on seed germination, root elongation and coleoptile growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Legume Research - An International Journal**, vol. 37, no. 2, p. 227, 2014. DOI 10.5958/j.0976-0571.37.2.034.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) **Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test**. United States Environmental Protection Agency, no. April, p. 1–8, 1996.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); ANASTASSIADOU, M.; ARENA, M.; AUTERI, D.; BRANCATO, A.; BURA, L.; CARRASCO CABRERA, L.; CHAIDEFTOU, E.; CHIUSOLO, A.; CRIVELLENTI, F.; DE LENTDECKER, C.; EGSMOSE, M.; FAIT, G.; GRECO, L.; IPPOLITO, A.; ISTACE, F.; JARRAH, S.; KARDASSI, D.; LEUSCHNER, R.; ... VILLAMAR-BOUZA, L. Updated peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumioxazin. **EFSA Journal**, vol. 18, no. 9, Sep. 2020. DOI 10.2903/j.efsa.2020.6246.

FAOSTAT. **Pesticides Use. Food and Agriculture Organization of the United Nations**, 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Acesso em 07 de agosto de 2021.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, vol. 102, no. 1, p. 99–112, 14 Feb. 1985. DOI 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x.

GE, M.; WANG, X.; YANG, G.; WANG, Z.; LI, Z.; ZHANG, X.; XU, Q. Persistent organic pollutants (POPs) in deep-sea sediments of the tropical western Pacific Ocean. **Chemosphere**, vol. 277, p. 130267, Aug. 2021. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.130267.

GOMES, H. O.; MENEZES, J. M. C.; DA COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; TEIXEIRA, R. N. P.; DO NASCIMENTO, R. F.; NASCIMENTO, R. F. A socio-environmental perspective on pesticide use and food production. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 197, p. 110627, Jul. 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2020.110627.

HAMEL, A.; ROY, M.; PROUDLOCK, R. The Bacterial Reverse Mutation Test. *Em: PROUDLOCK, R. (ed.). Genetic Toxicology Testing. Elsevier*, 2016. p. 79–138. DOI 10.1016/B978-0-12-800764-8.00004-5.

HASTINGS, J.; OWEN, G.; DEKKER, A.; ENNIS, M.; KALE, N.; MUTHUKRISHNAN, V.; TURNER, S.; SWAINSTON, N.; MENDES, P.; STEINBECK, C. **ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites**. 2016. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:8939>. Acesso em 07 de agosto de 2024.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 30, no. 4, p. 454–466, Apr. 2002. DOI 10.1016/S0141-0229(01)00528-2.

JOHN, D. A.; BABU, G. R. Lessons From the Aftermaths of Green Revolution on Food System and Health. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, vol. 5, 22 Feb. 2021. DOI 10.3389/fsufs.2021.644559.

KAPELEKA, J. A.; SAULI, E.; NDAKIDEMI, P. A. Pesticide exposure and genotoxic effects as measured by DNA damage and human monitoring biomarkers. **International Journal of Environmental Health Research**, vol. 31, no. 7, p. 805–822, 3 Oct. 2021. DOI 10.1080/09603123.2019.1690132.

KARALEXI, M. A.; TAGKAS, C. F.; MARKOZANNES, G.; TSERETOPOULOU, X.; HERNÁNDEZ, A. F.; SCHÜZ, J.; HALLDORSSON, T. I.; PSALTOPOULOU, T.; PETRIDOU, E. T.; TZOULAKI, I.; NTZANI, E. E. Exposure to pesticides and childhood leukemia risk: A systematic review and meta-analysis. **Environmental Pollution**, vol. 285, p. 117376, Sep. 2021. DOI 10.1016/j.envpol.2021.117376.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Mitochondrial dysfunction and organophosphorus compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 270, no. 1, p. 39–44, Jul. 2013. DOI 10.1016/j.taap.2013.04.001.

KARPOUZAS, D. G.; VRYZAS, Z.; MARTIN-LAURENT, F. Pesticide soil microbial toxicity: setting the scene for a new pesticide risk assessment for soil microorganisms (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, vol. 94, no. 10, p. 1161–1194, 26 Oct. 2022. DOI 10.1515/pac-2022-0201.

KAWAMURA, S.; KATO, T.; FANTEL, A. G. Close Link between Protoporphyrin IX Accumulation and Developmental Toxicity Induced by N -Phenylimide Herbicides in Rats. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, vol. 101, no. 6, p. 429–437, 4 Dec. 2014. DOI 10.1002/bdrb.21133.

KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, vol. 1, no. 03, p. 105–119, 30 Sep. 2013. DOI 10.30750/ijpbr.1.3.15.

KOPITTKKE, P. M.; MENZIES, N. W.; WANG, P.; MCKENNA, B. A.; LOMBI, E. Soil and the intensification of agriculture for global food security. **Environment International**, vol. 132, p. 105078, Nov. 2019. DOI 10.1016/j.envint.2019.105078.

KUMAR, M.; YADAV, A. N.; SAXENA, R.; PAUL, D.; TOMAR, R. S. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 31, p. 101883, Jan. 2021. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101883.

KUMAR, V.; SHARMA, N.; SHARMA, P.; PASRIJA, R.; KAUR, K.; UMESH, M.; THAZEEM, B. Toxicity analysis of endocrine disrupting pesticides on non-target organisms: A critical analysis on toxicity mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, vol. 474, p. 116623, Sep. 2023. DOI 10.1016/j.taap.2023.116623.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, vol. 682, no. 1, p. 71–81, Jul. 2009. DOI 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, vol. 22, no. 4, p. 1050–1064, 18 May 2016. DOI 10.1080/10807039.2015.1133242.

LI, X.-X.; YU, M.-F.; RUAN, X.; ZHANG, Y.-Z.; WANG, Q. Phytotoxicity of 4,8-Dihydroxy-1-tetralone Isolated from *Carya cathayensis* Sarg. to Various Plant Species. **Molecules**, vol. 19, no. 10, p. 15452–15467, 26 Sep. 2014. DOI 10.3390/molecules191015452.

LIBRALATO, G.; PRATO, E.; MIGLIORE, L.; CICERO, A. M.; MANFRA, L. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, vol. 69, p. 35–49, Oct. 2016. DOI 10.1016/j.ecolind.2016.04.017.

LIU, Y.; ZHANG, W.; WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, S.; JI, X.; QIAO, K. Oxidative stress, intestinal damage, and cell apoptosis: Toxicity induced by fluopyram in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, vol. 286, no. P3, p. 131830, Jan. 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.131830.

LUO, Y.; ZHOU, X. Importance and Roles of Soil Respiration. *Em*: LUO, Y.; ZHOU, X. (eds.). **Soil Respiration and the Environment**. Elsevier, 2006. p. 17–32. DOI 10.1016/B978-012088782-8/50002-4.

MAHMOOD, I.; IMADI, S. R.; SHAZADI, K.; GUL, A.; HAKEEM, K. R. Effects of Pesticides on Environment. *Em*: HAKEEM, K. R.; AKHTAR, M. S.; ABDULLAH, S. N. A. (eds.). **Plant, Soil and Microbes**. Cham: Springer, Cham, 2016. p. 253–269. DOI 10.1007/978-3-319-27455-3_13.

MANDAL, A.; SARKAR, B.; MANDAL, S.; VITHANAGE, M.; PATRA, A. K.; MANNA, M. C. Impact of agrochemicals on soil health. *Em*: PRASAD, M. N. V. (ed.). **Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation**. Elsevier, 2020. p. 161–187. DOI 10.1016/B978-0-08-103017-2.00007-6.

MICUTI, M.-M.; POPA (BURLACU), A.; BADULESCU, L.; ISRAEL-ROMING, F. Soil Enzymes - Bioindicators of Soil Health. **Scientific Papers-Series B-Horticulture**, vol. 64, no. 1, p. 679–684, 2020.

NAGY, K.; DUCA, R. C.; LOVAS, S.; CRETA, M.; SCHEEPERS, P. T. J.; GODDERIS, L.; ÁDÁM, B. Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research**, vol. 181, p. 108926, Feb. 2020. DOI 10.1016/j.envres.2019.108926.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compound Summary para CID 92425, Flumioxazin**. 2024a. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Flumioxazin>. Acessado em 7 de agosto de 2024.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **PubChem Compound Summary para CID 11158353, Fluopyram**. 2024b. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluopyram>. Acessado em 7 de agosto de 2024.

NOWELL, L. H.; MORAN, P. W.; SCHMIDT, T. S.; NORMAN, J. E.; NAKAGAKI, N.; SHODA, M. E.; MAHLER, B. J.; VAN METRE, P. C.; STONE, W. W.; SANDSTROM, M. W.; HLADIK, M. L. Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern U.S. streams. **Science of The Total Environment**, vol. 613–614, p. 1469–1488, Feb. 2018. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.06.156.

OECD. Test No. 471: **Bacterial Reverse Mutation Test. Section 4**. Paris: OECD Publishing, 2020 (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). DOI 10.1787/9789264071247-em.

PAN, J.; LIU, P.; YU, X.; ZHANG, Z.; LIU, J. The adverse role of endocrine disrupting chemicals in the reproductive system. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 14, 17 Jan. 2024. DOI 10.3389/fendo.2023.1324993.

PATHAK, V. M.; VERMA, V. K.; RAWAT, B. S.; KAUR, B.; BABU, N.; SHARMA, A.; DEWALI, S.; YADAV, M.; KUMARI, R.; SINGH, S.; MOHAPATRA, A.; PANDEY, V.; RANA, N.; CUNILL, J. M. Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 17 Aug. 2022. DOI 10.3389/fmicb.2022.962619.

PELOSI, C.; BAROT, S.; CAPOWIEZ, Y.; HEDDE, M.; VANDENBULCKE, F. Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, vol. 34, no. 1, p. 199–228, 16 Jan. 2014. DOI 10.1007/s13593-013-0151-z.

PERTILE, M.; ANTUNES, J. E. L.; ARAUJO, F. F.; MENDES, L. W.; VAN DEN BRINK, P. J.; ARAUJO, A. S. F. Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 7694, 6 Dec. 2020. DOI 10.1038/s41598-020-64648-3.

PHILLIPS, C. L.; NICKERSON, N. Soil Respiration. **Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences**. Elsevier, 2015. DOI 10.1016/B978-0-12-409548-9.09442-2.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. Small amounts of pesticides reaching target insects. **Environment, Development and Sustainability**, vol. 14, no. 1, p. 1–2, 24 Feb. 2012. DOI 10.1007/s10668-011-9325-5.

PITZER, E. M.; WILLIAMS, M. T.; VORHEES, C. V. Effects of pyrethroids on brain development and behavior: Deltamethrin. **Neurotoxicology and Teratology**, vol. 87, p. 106983, Sep. 2021. DOI 10.1016/j.ntt.2021.106983.

POPP, J.; PETŐ, K.; NAGY, J. Pesticide productivity and food security. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, vol. 33, no. 1, p. 243–255, 17 Jan. 2013. DOI 10.1007/s13593-012-0105-x.

POTAPOWICZ, J.; LAMBROPOULOU, D.; NANNOU, C.; KOZIOŁ, K.; POLKOWSKA, Ż. Occurrences, sources, and transport of organochlorine pesticides in the aquatic environment of Antarctica. **Science of The Total Environment**, vol. 735, p. 139475, Sep. 2020. DOI 10.1016/j.scitotenv.2020.139475.

RAJAK, P.; ROY, S.; GANGULY, A.; MANDI, M.; DUTTA, A.; DAS, K.; NANDA, S.; GHANTY, S.; BISWAS, G. Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? **Journal of Hazardous Materials Advances**, vol. 10, no. February, p. 100264, May 2023. DOI 10.1016/j.hazadv.2023.100264.

RANI, L.; THAPA, K.; KANOJIA, N.; SHARMA, N.; SINGH, S.; GREWAL, A. S.; SRIVASTAV, A. L.; KAUSHAL, J. An extensive review on the consequences of chemical

pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, vol. 283, p. 124657, Feb. 2021. DOI 10.1016/j.jclepro.2020.124657.

RANJBAR, A.; SOLHI, H.; MASHAYEKHI, F. J.; SUSANABDI, A.; REZAIE, A.; ABDOLLAHI, M. Oxidative stress in acute human poisoning with organophosphorus insecticides; a case control study. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 20, no. 1, p. 88–91, Jul. 2005. DOI 10.1016/j.etap.2004.10.007.

RASMUSSEN, J. J.; WIBERG-LARSEN, P.; BAATTRUP-PEDERSEN, A.; CEDERGREEN, N.; MCKNIGHT, U. S.; KREUGER, J.; JACOBSEN, D.; KRISTENSEN, E. A.; FRIBERG, N. The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. **Water Research**, vol. 84, p. 25–32, Nov. 2015. DOI 10.1016/j.watres.2015.07.021.

RATHOD, P. H.; SHAH, P. G.; PARMAR, K. D.; KALASARIYA, R. L. The Fate of Fluopyram in the Soil–Water–Plant Ecosystem: A Review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 260, no. 1, p. 1, 5 Dec. 2022. DOI 10.1007/s44169-021-00001-7.

REDE, D.; SANTOS, L. H. M. L. M.; RAMOS, S.; OLIVA-TELES, F.; ANTÃO, C.; SOUSA, S. R.; DELERUE-MATOS, C. Individual and mixture toxicity evaluation of three pharmaceuticals to the germination and growth of *Lactuca sativa* seeds. **Science of The Total Environment**, vol. 673, p. 102–109, Jul. 2019.

RIAH, W.; LAVAL, K.; LAROCHE-AJZENBERG, E.; MOUGIN, C.; LATOUR, X.; TRINSOUTROT-GATTIN, I. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 12, no. 2, p. 257–273, 27 Jun. 2014.

ROCHA, G. M.; GRISOLIA, C. K. Why pesticides with mutagenic, carcinogenic and reproductive risks are registered in Brazil. **Developing World Bioethics**, vol. 19, no. 3, p. 148–154, 6 Sep. 2019. DOI 10.1111/dewb.12211.

RUDÉN, C.; ADAMS, J.; ÅGERSTRAND, M.; BROCK, T. C.; POULSEN, V.; SCHLEKAT, C. E.; WHEELER, J. R.; HENRY, T. R. Assessing the relevance of ecotoxicological studies for regulatory decision making. **Integrated Environmental Assessment and Management**, vol. 13, no. 4, p. 652–663, Jul. 2017. DOI 10.1002/ieam.1846.

SABZEVARI, S.; HOFMAN, J. A worldwide review of currently used pesticides' monitoring in agricultural soils. **Science of The Total Environment**, vol. 812, p. 152344, Mar. 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.152344.

SALAY, G.; LUCARELLI, N.; GASCÓN, T. M.; CARVALHO, S. S. de; VEIGA, G. R. L. da; REIS, B. da C. A. A.; FONSECA, F. L. A. Acute Toxicity Assays with the *Artemia salina* Model: Assessment of Variables. **Alternatives to Laboratory Animals**, vol. 52, no. 3, p. 142–148, 5 May 2024. DOI 10.1177/02611929241242443.

SANTÍSIMA-TRINIDAD, A. B. L.; DEL MAR MONTIEL-ROZAS, M.; DIÉZ-ROJO, M. Á.; PASCUAL, J. A.; ROS, M. Impact of foliar fungicides on target and non-target soil microbial communities in cucumber crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 166, no. March, p. 78–85, Dec. 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.09.074.

SASIKALA, S.; MINU JENIFER, M.; VELAVAN, K.; SAKTHIVEL, M.; SIVASAMY, R.; FENWICK ANTONY, E. R. Predicting the relationship between pesticide genotoxicity and breast cancer risk in South Indian women in in vitro and in vivo experiments. **Scientific Reports**, vol. 13, no. 1, p. 9712, 15 Jun. 2023. DOI 10.1038/s41598-023-35552-3.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A. S.; PARIHAR, R. D.; DAR, O. I.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A. K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, vol. 1, no. 11, p. 1446, 21 Nov. 2019. DOI 10.1007/s42452-019-1485-1.

SINGH, P.; PRASAD, S. M. Sustenance of soil microbial biomass, the basis of soil fertility in the agro-ecosystems: Influence of pesticide and soil amendments. **Plant Archives**, vol. 19, p. 496–507, 2019.

SINGH, S.; SHARMA, S.; SARMA, S. J.; MISRA, K.; BRAR, S. K. Pesticides in water. *Em*: AHUJA, S. (ed.). **Handbook of Water Purity and Quality**. Elsevier, 2021. p. 231–253. DOI 10.1016/B978-0-12-821057-4.00004-5.

SOUZA, C. R. de; SOUZA-SILVA, G.; SILVA, F. V. M.; CARDOSO, P. von R.; LIMA, W. dos S.; PEREIRA, C. A. de J.; MOL, M. P. G.; SILVEIRA, M. R. Ecotoxicological studies of direct and indirect genotoxicity with *Artemia*: a integrative review. **Journal of Environmental**

Science and Health, Part A, vol. 59, no. 6, p. 305–320, 11 May 2024. DOI 10.1080/10934529.2024.2384216.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, vol. 26, no. 3, p. R94–R98, Feb. 2016. DOI 10.1016/j.cub.2015.12.021.

STEPHENSON, G. R.; FERRIS, I. G.; HOLLAND, P. T.; NORDBERG, M. Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006). **Pure and Applied Chemistry**, vol. 78, no. 11, p. 2075–2154, 1 Jan. 2006. DOI 10.1351/pac200678112075.

STRAW, E. A. The active ingredient is not always to blame: in response to Serra *et al.* (2023). **Ecotoxicology**, vol. 33, no. 2, p. 235–237, 3 Mar. 2024. DOI 10.1007/s10646-024-02733-3.

SULE, R. O.; CONDON, L.; GOMES, A. V. A Common Feature of Pesticides: Oxidative Stress—The Role of Oxidative Stress in Pesticide-Induced Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, vol. 2022, p. 1–31, 19 Jan. 2022. DOI 10.1155/2022/5563759.

SUN, T.; LI, M.; SALEEM, M.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. The fungicide “fluopyram” promotes pepper growth by increasing the abundance of P-solubilizing and N-fixing bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 188, no. November 2019, p. 109947, Jan. 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109947.

TANG, F. H. M.; LENZEN, M.; MCBRATNEY, A.; MAGGI, F. Risk of pesticide pollution at the global scale. **Nature Geoscience**, vol. 14, no. 4, p. 206–210, 29 Apr. 2021. DOI 10.1038/s41561-021-00712-5.

TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C.; BÍCEGO, M. C.; COLABUONO, F. I.; WEBER, R. R.; SERICANO, J. L. Chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in the fat tissue of seabirds from King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 58, no. 1, p. 129–133, Jan. 2009. DOI 10.1016/j.marpolbul.2008.09.026.

TINWELL, H.; ROUQUIÉ, D.; SCHORSCH, F.; GETER, D.; WASON, S.; BARS, R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 70, no. 3, p. 648–658, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.yrtph.2014.09.011.

TOSI, S.; SFEIR, C.; CARNESECCHI, E.; VANENGELSDORP, D.; CHAUZAT, M.-P. Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. **Science of The Total Environment**, vol. 844, p. 156857, Oct. 2022. DOI 10.1016/j.scitotenv.2022.156857.

TOSTADO, L.; BOLLMOHR, S.; BÄR, J.; BICKEL, U.; BOMBARDI, L. M.; BOURGIN, C.; BÖDEKER, W.; BRÜHL, C.; BUTSCHER-SCHADEN, H.; DECKEN, H. von der; GOULSON, D.; HAFFMANS, S.; HEIMRATH, J.; HOINKES, C.; HOLDINGHAUSEN, H.; LEMKEN, D.; LIEBETRAU, L.; MERTENS, M.; NABEL, M.; ... ZÜHLSDORF, A. **Pesticide Atlas: Facts and figures about toxic chemicals in agriculture**. 2nd ed. Berlin, Germany: Heinrich-Böll-Stiftung, 2022.

TUDI, M.; DANIEL RUAN, H.; WANG, L.; LYU, J.; SADLER, R.; CONNELL, D.; CHU, C.; PHUNG, D. T. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 18, no. 3, p. 1112, 27 Jan. 2021. DOI 10.3390/ijerph18031112.

VAKSMAA, A.; GUERRERO-CRUZ, S.; GHOSH, P.; ZEGHAL, E.; HERNANDO-MORALES, V.; NIEMANN, H. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. **Frontiers in Marine Science**, vol. 10, 6 Mar. 2023. DOI 10.3389/fmars.2023.1070905.

VISIOLI, G.; CONTI, F. D.; GARDI, C.; MENTA, C. Germination and Root Elongation Bioassays in Six Different Plant Species for Testing Ni Contamination in Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 92, no. 4, p. 490–496, 28 Apr. 2014. DOI 10.1007/s00128-013-1166-5.

WANG, W.; KETURI, P. H. Comparative seed germination tests using ten plant species for toxicity assessment of a metal engraving effluent sample. **Water, Air, and Soil Pollution**, vol. 52, no. 3–4, p. 369–376, Aug. 1990. DOI 10.1007/BF00229444.

WORLDOMETERS. **Pesticide Use by Country. 2023**. Dover, Delaware, EUA. Disponível em: <https://www.worldometers.info/food-agriculture/pesticides-by-country/>. Acessado em 24 de maio de 2021.

YADAV, I. C.; DEVI, N. L. Pesticides Classification and Its Impact on Human and Environment. *Em*: KUMAR, A.; SINGHAL, J. C.; TECHATO, K.; MOLINA, L. T.; SINGH, N.; KUMAR, P.; KUMAR, P.; CHANDRA, R.; CAPRIO, S.; UPADHYE, S.; YONEMURA,

S.; RAO, S. Y.; ZHANG, T. C.; SHARMA, U. C.; ABROL, Y. P. (eds.). **Environmental Science and Engineering**. 6: Toxicol. Studium Press LLC, USA, 2017. p. 140–158.

YAN, Z.; LI, P.; XIAO, Y.; CAO, L.; YAO, L. Phytotoxic Effects of Allelochemical Acacetin on Seed Germination and Seedling Growth of Selected Vegetables and Its Potential Physiological Mechanism. **Agronomy**, vol. 12, no. 5, p. 1038, 26 Apr. 2022. DOI 10.3390/agronomy12051038.

ZEIGER, E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, vol. 841, p. 43–48, May 2019. DOI 10.1016/j.mrgentox.2019.05.007.

ZHANG, Q.; CHEN, Z.; LI, Y.; WANG, P.; ZHU, C.; GAO, G.; XIAO, K.; SUN, H.; ZHENG, S.; LIANG, Y.; JIANG, G. Occurrence of organochlorine pesticides in the environmental matrices from King George Island, west Antarctica. **Environmental Pollution**, vol. 206, p. 142–149, Nov. 2015. DOI 10.1016/j.envpol.2015.06.025.

ZHANG, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; WU, X.; ZHENG, Y. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 108, p. 273–280, Oct. 2014. DOI 10.1016/j.ecoenv.2014.07.018.

ZIKANKUBA, V. L.; MWANYIKA, G.; NTWENYA, J. E.; JAMES, A. Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. **Cogent Food & Agriculture**, vol. 5, no. 1, p. 1601544, 1 Jan. 2019. DOI 10.1080/23311932.2019.1601544.

ARTIGO 1. O QUE O TESTE *Allium cepa* PODE DIZER SOBRE A SEGURANÇA DE PESTICIDAS? UMA REVISÃO¹

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão¹, Luciana Souza Ondeí¹,
Fernanda Melo Carneiro² & Luciane Madureira Almeida¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central - Sede Anápolis - Ciências Exatas e tecnológicas, 459, Br 153, nº 3.105, CEP: 75132-903, Anápolis-GO, Brasil

²Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Goiânia - Laranjeiras, Rua Prof. Alfredo de Castro, 9175 - Parque das Laranjeiras, 74855-130, Goiânia - GO, Brasil

Resumo – O uso crescente de pesticidas tem causado preocupações globais sobre os efeitos tóxicos e as consequências adversas dos pesticidas nos seres humanos e no meio ambiente. Entre as formas de entender o impacto dos agrotóxicos, destaca-se o bioensaio com *Allium cepa*. Este teste é adequado para avaliar diferentes resultados tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Nesse contexto, a presente revisão teve como objetivo resumir a história do uso do teste de *A. cepa* para investigar danos causados por pesticidas. Dados sobre as condições experimentais também foram discutidos. Os estudos revisados mostraram o perfil de toxicidade de 113 princípios ativos testados principalmente em laboratório, usando água para exposição. Os biomarcadores mais utilizados foram o índice mitótico, aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares. Todos os princípios ativos causaram algum tipo de toxicidade em *A. cepa*, mostrando a eficiência e sensibilidade deste bioindicador. Além disso, ficou evidente que os pesticidas têm potencial para interferir no fuso mitótico e danificar o DNA, porque quase todos os princípios ativos testados induzem aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares. A revisão atual mostrou que o bioensaio com *A. cepa* é eficaz e apropriado para avaliar a toxicidade de agrotóxicos. Além disso, a presente revisão indica lacunas de pesquisa e recomendações para estudos futuros.

Palavras-chave: biomarcador, biomonitoramento, ecotoxicologia, poluentes ambientais, genotoxicidade, mutagenicidade, toxicologia.

1.1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são um grande problema por acarretarem impactos para o ambiente e para a humanidade. Consequentemente, é necessário compreender os efeitos potenciais que os pesticidas podem provocar. Mudanças nas práticas agrícolas e uma agricultura cada vez mais intensiva desencadearam um aumento dramático no uso de pesticidas nas últimas décadas

¹Artigo publicado em 14 de maio de 2022 no periódico *Environmental Science and Pollution Research*
<https://doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z>

(KONSTANTINOOU *et al.*, 2019). Isso fez com que o uso de pesticidas se consolidasse como algo inevitável para atender à crescente demanda por produtos agrícolas (DHANANJAYAN *et al.*, 2020), visto que os pesticidas beneficiam as colheitas por combaterem pragas que atacam plantações e as prejudicam (MAHMOOD *et al.*, 2016). Em 2019, estima-se que cerca de 4,1 milhões de toneladas de pesticidas foram utilizados em todo o mundo (FAOSTAT, 2021). Além de serem empregados na agricultura, os pesticidas também são utilizados para o controle de doenças, eliminando vetores (KONSTANTINOOU *et al.*, 2019) e em residências para controle de pragas domésticas (MAHMOOD *et al.*, 2016).

Quando os primeiros pesticidas modernos surgiram em 1939 com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT por Paul Müller, os pesticidas foram vistos como algo vantajoso, com benefícios, por isso, gozavam de boa reputação. Entretanto, essa opinião mudou após a descoberta dos efeitos tóxicos do DDT (TADEO; ALBERO; PÉREZ, 2019). Desde então, o impacto dos pesticidas no meio ambiente e para a humanidade foram descobertos e com isso surgiram esforços para avaliar sua toxicidade aos componentes ambientais, incluindo o homem (DHANANJAYAN *et al.*, 2020).

Uma ferramenta que pode ajudar a entender os efeitos dos pesticidas no meio ambiente é o biomonitoramento, por ser uma ferramenta que ajuda na compreensão do destino dos pesticidas nos compartimentos ambientais. Dados obtidos no biomonitoramento podem ser usados para elaboração de políticas públicas (DHANANJAYAN *et al.*, 2020).

Uma forma de se realizar o biomonitoramento é empregando espécies bioindicadoras (MARKERT; BREURE; ZECHMEISTER, 2003). Dentre as espécies que podem ser utilizadas como bioindicadoras, as plantas superiores são ótimas candidatas para localizar e avaliar fontes de poluição ou para testes de exposição aguda ou crônica (ERNST, 2003). Além disso, produtos químicos capazes de provocar danos cromossômicos em ensaios vegetais, provavelmente também podem danificar cromossomos de outros organismos no ambiente (RANK; NIELSEN, 1997). Nesse sentido, a espécie *Allium cepa* é reconhecida como uma espécie bioindicadora eficiente para avaliar o efeito de produtos químicos. Em virtude da atual preocupação com a poluição e degradação ambiental, bioensaios com *A. cepa* têm ocupado lugar importante para prevenção e previsão dos impactos ambientais causados pelo uso e descarte de substâncias, incluindo drogas e pesticidas (BOSIO; LAUGHINGHOUSE IV, 2012). Isso posto, a presente revisão teve como objetivo resumir o histórico de utilização do bioensaio com *A. cepa* para investigar os impactos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos pesticidas. Esta revisão destaca o uso e eficiência do bioensaio com *A. cepa*, bem como resume informações disponíveis na literatura sobre os efeitos causados pela exposição a pesticidas. Também são

fornecidos detalhes sobre a metodologia que os autores utilizaram para conduzir os bioensaios e lacunas de pesquisa e recomendações para pesquisas futuras.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Estratégia de pesquisa

A literatura para o estudo foi pesquisada até outubro de 2021 nas coleções de bancos de dados *Scopus* e *Web of Science*, usando a pesquisa avançada. Os seguintes conjuntos de palavras-chave, operadores booleanos e códigos de campo foram usados no processo de busca: *Scopus* = *TITLE-ABS-KEY*((*agrochemical OR phytosanitary OR pesticide OR "agricultural defensive" OR insecticide OR fungicide OR herbicide OR biocide*) *AND* ("*Allium cepa*" *OR "Allium test"*)) *AND* *PUBYEAR* > 1990 *AND* *PUBYEAR* < 2021 *AND* *LANGUAGE*(*english*) *AND* *DOCTYPE*(*ar*); *Web of Science* = *TS*=((*agrochemical OR phytosanitary OR pesticide OR "agricultural defensive" OR insecticide OR fungicide OR herbicide OR biocide*) *AND* ("*Allium cepa*" *OR "Allium test"*)) *AND* *PY*=1991–2020 *AND* *LA*=*English* *AND* *DT*=*Article*. Códigos de campo serviram para realizar uma filtragem inicial, onde as palavras-chave foram buscadas apenas no tópico (título, resumo e palavras-chave), entre 1991 e 2020, de documentos do tipo artigo, publicados na língua inglesa. Foram recuperados 1130 artigos: 860 do *Scopus* e 450 do *Web of Science*.

Critério de elegibilidade

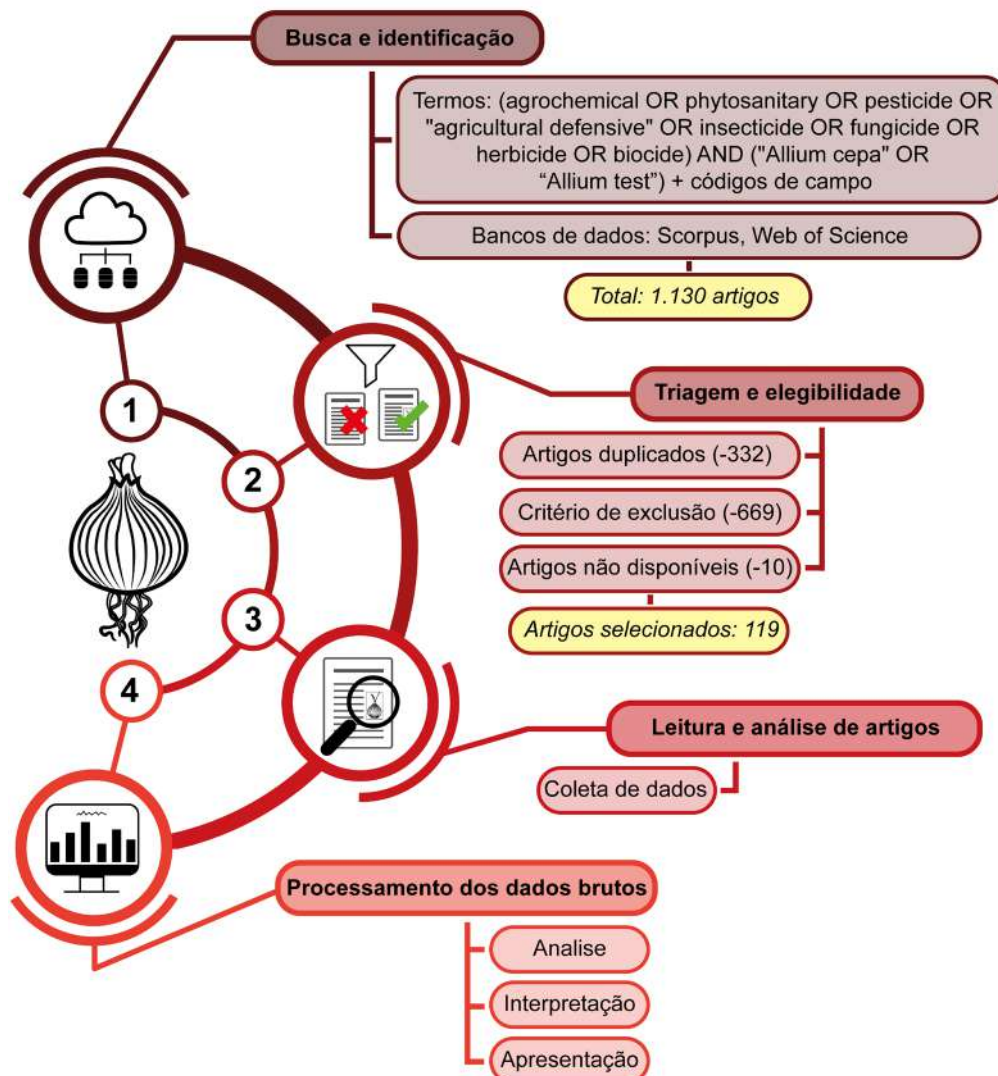
Todos os artigos duplicados foram excluídos (*n* = 332). Em seguida, procedeu-se à leitura do título e resumo dos estudos para selecionar apenas aqueles publicados como pesquisas originais relatando o efeito da exposição a agrotóxicos (princípio ativo e formulação). Foram excluídos artigos com metodologia e resultados escritos sem clareza e, para artigos indisponíveis, foi solicitado aos autores que os enviassem por e-mail. No final, a lista de estudos elegíveis incluiu 119 artigos (Figura 1.1; Tabela A.1).

Extração dos dados

Os 119 artigos foram baixados e iniciou-se a leitura das seções de material/métodos, resultados e discussão para extrair as seguintes informações: *i*) ano de publicação; *ii*) localização do estudo com base no endereço do primeiro autor; *iii*) se foi um experimento de campo ou experimento de laboratório; *iv*) avaliação do princípio ativo ou formulação comercial e se o material era nanoencapsulado; *v*) determinação da concentração ou dose; *vi*) condições de exposição (concentração, tempo, forma de exposição, parte exposta); *vii*) biomarcadores avaliados; *viii*) efeitos dos pesticidas; *ix*) mecanismo de ação detectado; e *xi*) se houve

recuperação dos danos causados pela exposição a agrotóxicos. Dados sobre o princípio ativo, como *i)* tipo de pesticida; *ii)* origem da substância; *iii)* grupo de substâncias; e *iv)* status de disponibilidade, foram obtidos no banco de dados PPDB (*Pesticide Properties DataBase*) e BPDB (*Bio-Pesticides DataBase*) (LEWIS *et al.*, 2016). A autorização de uso do princípio ativo na União Europeia, foi consultada no *EU Pesticides Database* (https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_en).

Figura 1.1 – Diagrama das etapas metodológicas de busca, identificação, seleção e análise dos artigos que avaliaram efeitos da exposição a pesticidas em biomarcadores de *Allium cepa*.



Fonte: elaborado pelo autor.

Análise de dados

A correlação de *Spearman* foi realizada (r_s , 5% de significância) para avaliar a relevância da relação entre os anos e o percentual de artigos publicados sobre o tema. Nas séries temporais, o teste de *Pettit* foi usado para determinar o ponto de mudança no conjunto de dados. O método da nuvem de palavras foi utilizado para verificar as palavras-chave mais utilizadas

nos artigos, pois as palavras-chave podem refletir o foco dos estudos. As análises foram realizadas com os *softwares* R, versão 3.6.1 (R CORE TEAM, 2017) e *RStudio*, versão 1.2.1335 (RSTUDIO TEAM, 2019). A análise da distribuição dos artigos por país foi representada num mapa feito no QGIS, versão 3.4 (QGIS.ORG, 2019). Os gráficos foram feitos no *GraphPad Prism*, versão 9.0.0 para *Windows* (*GraphPad Software, San Diego, CA, USA*, www.graphpad.com). As figuras foram elaboradas no *Adobe Illustrator*, versão 24.0.1 (www.adobe.com/products/illustrator).

1.3 *Allium cepa* COMO BIOENSAIO

O bioensaio com *A. cepa* tem sido amplamente utilizado para detectar poluentes ambientais, desde os primeiros estudos na década de 1930 (BANK, 1932; HAMMETT, 1928a, 1928b, 1928c, 1928d, 1928e; HAMMETT; JUSTICE, 1928; LALLEMAND, 1930a, 1930b; LEVAN, 1938, 1949) até os dias de hoje. Os resultados obtidos com este bioensaio são eficazes e confiáveis para avaliar diferentes estressores (CHAKRABORTY; MUKHERJEE; MUKHERJEE, 2009). O processo de validação do bioensaio com *A. cepa* teve início na década de 1970 com o programa *Gene-Tox* (*Genetic Toxicology*) da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), que propôs a inclusão do *A. cepa* entre os bioensaios usados para avaliar danos cromossômicos induzidos por produtos químicos (GRANT, 1982). Posteriormente, em 1980, o bioensaio com *A. cepa* foi incluído no Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), criado por um esforço conjunto entre o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA), a Organização Internacional do Trabalho (OIT) e a Organização Mundial da Saúde (WHO). Em 1992, o Programa Internacional de Bioensaios de Plantas (IPPB) foi iniciado sob os auspícios do PNUMA. As diretrizes do IPPB propuseram que os membros participantes do programa aplicassem bioensaios de plantas, incluindo *A. cepa*, para monitorar ou testar ar, água ou solo (MA, 1999).

Desde então, o bioensaio com *A. cepa* tem sido amplamente utilizado por ser simples, confiável, barato (GRANT, 1982), facilmente disponível (GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004), de curta duração e fácil de manusear. Também possui cromossomos grandes e poucos ($2n = 16$ cromossomos) o que facilita e possibilita a observação de divisões mitóticas (EREN *et al.*, 2016; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, o bioensaio com *A. cepa* tem uma boa correlação com outros sistemas, como testes de mamíferos e vertebrados (CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999; FIRBAS; AMON, 2014), e seus resultados ainda podem ser extrapolados para humanos (FIRBAS; AMON, 2014). Outra vantagem é a flexibilidade, visto que o bioensaio com *A. cepa* permite avaliar diferentes desfechos genéticos e mecanismos de

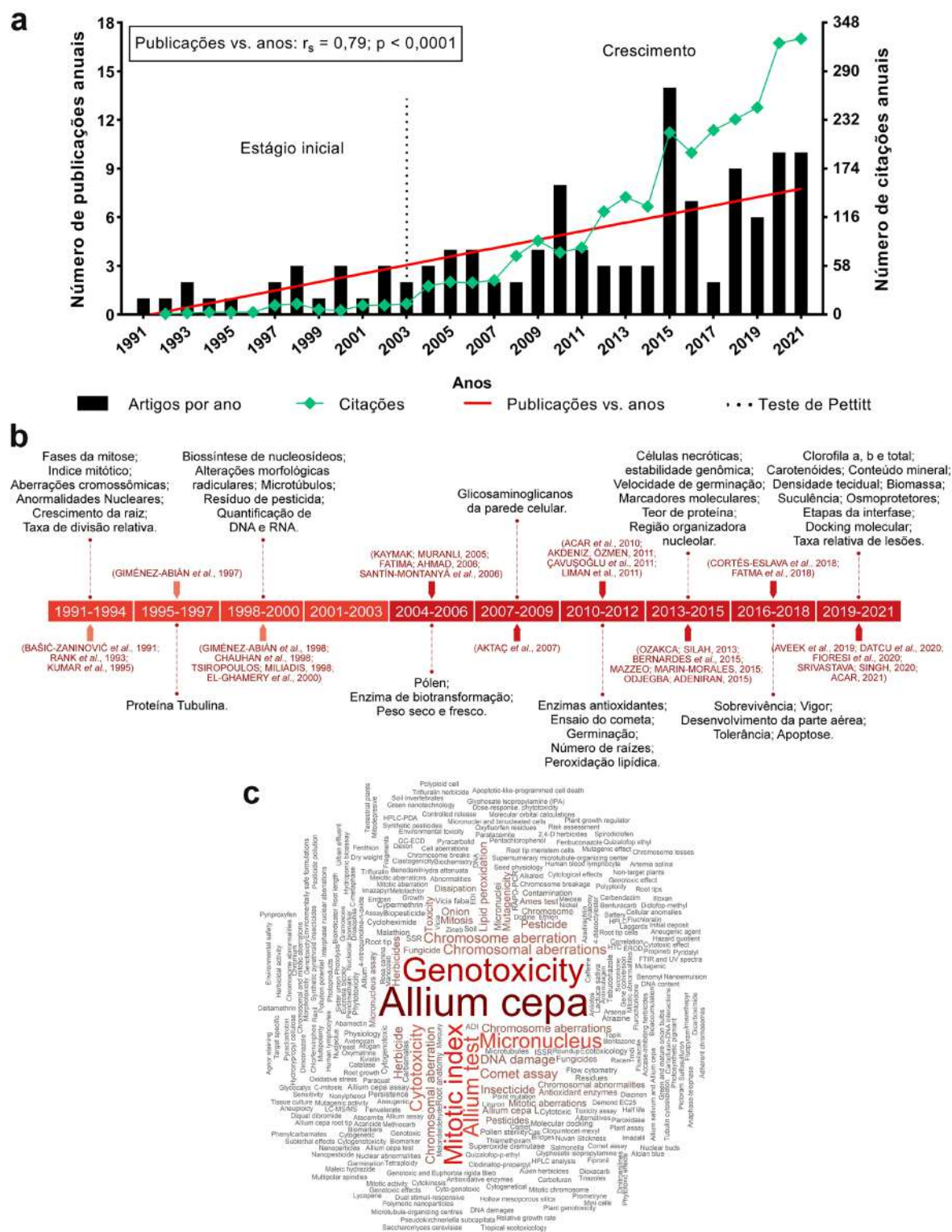
ação (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Assim, o bioensaio com *A. cepa* fornece uma abordagem complexa para triagem do potencial tóxico de pesticidas, e os resultados obtidos podem servir de alerta para os efeitos nocivos que os pesticidas podem causar à saúde humana e ambiental.

1.4 TENDÊNCIAS DE PUBLICAÇÃO

A tendência temporal de publicações sobre o potencial tóxico de pesticidas usando *A. cepa*, de 1991 a 2021, está aumentando constante e significativamente (*Spearman*, $r_s = 0,79$; $p < 0,0001$) ao longo dos anos (Figura 1.2a), com uma taxa anual de 7,98%. O número de citações também aumentou ao longo dos anos (Figura 1.2a). É possível observar uma mudança no total de publicações anuais (Figura 1.2a) a partir 2003 (ponto de mudança; teste *Pettit*, $p < 0,01$). A mudança na tendência de publicações dividiu a série temporal em dois períodos. No período de 1991 a 2003, houve poucas publicações, com média de 17,65% dos artigos publicados, representando uma fase inicial de abordagens utilizando o bioensaio com *A. cepa* para avaliar os efeitos dos pesticidas. De 2004 a 2021, houve uma média de 82,35% dos artigos publicados, representando o período de crescimento das publicações.

O número crescente de publicações pode ser resultado da evolução do bioensaio com *A. cepa*. No início, o teste fornecia um limite mínimo de biomarcadores usados para avaliar a ação de estressores sobre o material genético e era comumente utilizado por grupos de citogenética. No entanto, ao longo do tempo, outros biomarcadores e técnicas foram adicionados ao bioensaio com *A. cepa* para ajudar a detectar os efeitos de diferentes substâncias nocivas, incluindo pesticidas (Figura 1.2b). Outra razão que poderia justificar o aumento de publicações com *A. cepa* é o uso de métodos alternativos à pesquisa animal, o que levou ao desenvolvimento do princípio dos 3Rs (*Replace-Reduce-Refine*) (RUSSELL; BURCH, 1959). O princípio dos 3Rs incentiva os cientistas a reduzir modelos animais, e o bioensaio com *A. cepa* é uma alternativa eficiente a esses modelos. Rank e Nielsen (1994) mostraram uma correlação de 82% do bioensaio com *A. cepa* com o teste de carcinogenicidade em roedores.

Figura 1.2 – Uso do bioensaio *Allium cepa* em estudos de pesticidas. **a)** Gráfico de barras mostrando o número de publicações por ano (à esquerda) e gráfico de dispersão mostrando a média de citações por ano (à direita). **b)** Linha do tempo mostrando o incremento de biomarcadores no bioensaio de *A. cepa* para investigar os efeitos de pesticidas. **c)** Nuvem de palavras-chave usadas nos artigos.

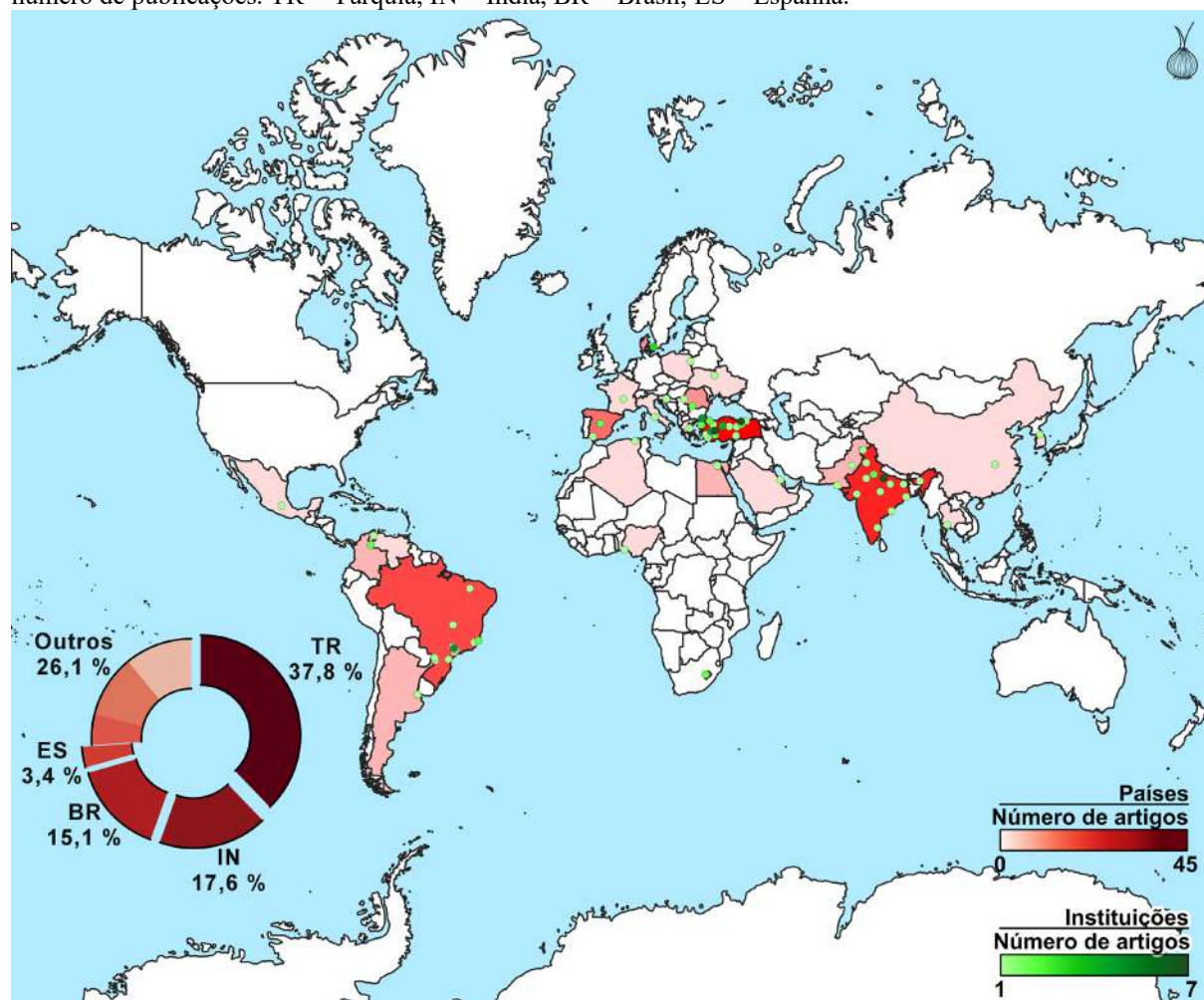


Fonte: elaborado pelo autor

A análise de palavras-chave é uma ferramenta essencial para investigar tópicos e tendências e o foco de estudos. Este estudo identificou 322 palavras-chave diferentes nas 119

publicações analisadas (Figura 1.2c). A nuvem de palavras destaca a frequência de uso de cada palavra, fornecendo uma imagem visível dos termos mais proeminentes (ou seja, quanto maior a palavra, maior a frequência nos artigos). As palavras mais citadas foram “*Allium cepa*”, “*Genotoxicity*”, “*Mitotic index*”, “*Allium test*”, “*Micronucleus*” e “*Cytotoxicity*”. No entanto, os termos “*Allium cepa*” e “*Allium test*” foram usadas para destacar o modelo usado e não refletiam a significância do tópico, então nossa análise desconsiderou essas palavras. Portanto, a palavra-chave mais citada foi “*Genotoxicity*”. A frequência desse termo aumenta quando se considera seus sinônimos (ex., “*Chromosome aberration*”, “*Chromosome abnormalities*”, “*Chromosome breakage*”, “*Chromosomal aberrations*”, “*DNA damage*” e outros). Assim, nossos resultados sugerem que a genotoxicidade é o foco das pesquisas que utilizam o bioensaio com *A. cepa* para avaliar agrotóxicos.

Figura 1.3 – Distribuição mundial de estudos realizados com o bioensaio *Allium cepa* para investigar efeitos de pesticidas. A distribuição geográfica dos artigos está relacionada à cor de cada país, proporcional ao número de publicações. Os pontos representam as instituições onde os estudos foram realizados, e a cor é proporcional ao número de publicações. TR = Turquia, IN = Índia, BR = Brasil, ES = Espanha.



Em relação à distribuição mundial de publicações, 25 países usaram o bioensaio *A. cepa* para avaliar o efeito da exposição a pesticidas (Figura 1.3). A Turquia é o país com maior número de publicações (37,8%), seguida da Índia (17,6%), Brasil (15,1%) e Espanha (3,4%). Os demais países juntos responderam por 26,1% das publicações. Entre 2000 e 2017, a Turquia apresentou um aumento de 31,4% no uso de agrotóxicos (YENI; TEOMAN, 2020), o que pode justificar mais publicações. Porém, ao analisar o consumo mundial de agrotóxicos por países, a Turquia ocupa a 12ª posição, a Índia a 13ª e o Brasil a 3ª posição. Atualmente, os principais consumidores de agrotóxicos são a China (1ª posição) e os EUA (2ª posição) (WORLDOMETERS.INFO, 2021). No entanto, a China apresenta apenas um estudo, enquanto os EUA não possuem nenhum. Uma possível explicação para a falta de artigos sobre o tema nesses países pode ser o uso de outros bioindicadores para avaliar potenciais efeitos nocivos de agrotóxicos, como mamíferos, peixes, gastrópodes e anuros.

1.5 PESTICIDAS

As formulações comerciais de pesticidas não são ingredientes únicos. Eles geralmente consistem em uma mistura de produtos químicos comumente divididos em princípio ativo e outros ingredientes (por exemplo, surfactantes) (GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004). Aqui, a classificação dos artigos como avaliando a formulação comercial e/ou princípio ativo foi baseada nas informações fornecidas pelos autores. No entanto, alguns estudos não forneceram informações claras sobre a origem do composto estudado. Nesse caso, a classificação ocorreu da seguinte forma: (i) quando o autor não fornecia se era formulação ou princípio ativo o que ele estava avaliando, mas se referia ao nome do princípio ativo, consideremos como avaliando princípio ativo; (ii) entretanto, caso houvesse alguma formulação comercial com o mesmo nome do princípio ativo, considerou-se como avaliando a formulação comercial. Como resultado, 71 artigos utilizaram a formulação comercial, 45 utilizaram o princípio ativo e três utilizaram ambos. Dos estudos que avaliaram a formulação comercial, apenas um avaliou apenas o surfactante (Tabela A.1).

Avaliar a formulação comercial é importante, visto que é a formulação comercial que é aplicada no campo (GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004; YÜZBAŞIOĞLU; ÜNAL; SANCAK, 2009) e, conseqüentemente, é a que os trabalhadores estão expostos (ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, 2004). Além disso, os componentes da formulação (adjuvantes, como solventes, diluentes, dispersantes, emulsificantes e intensificadores) devem ser testados para verificar se podem aumentar a toxicidade ou serem mais tóxicos que o princípio ativo. Grisolia; Bilich e Formigli (2004) avaliaram o imazapir, a formulação comercial Arsenal® 250 NA, e o

surfactante nonilfenol etoxilado, e verificaram que o surfactante era mais tóxico que o princípio ativo. No entanto, às vezes a avaliação dos adjuvantes pode não ser possível, pois eles podem ser mantidos em sigilo pelos fabricantes (ZELJEZIC; GARAJ-VRHOVAC, 2004). Além disso, podem ocorrer conflitos com as marcas responsáveis pela produção das formulações. No entanto, avaliar princípios ativos pode ser uma abordagem inicial para entender os efeitos potenciais de formulações comerciais que os contenham.

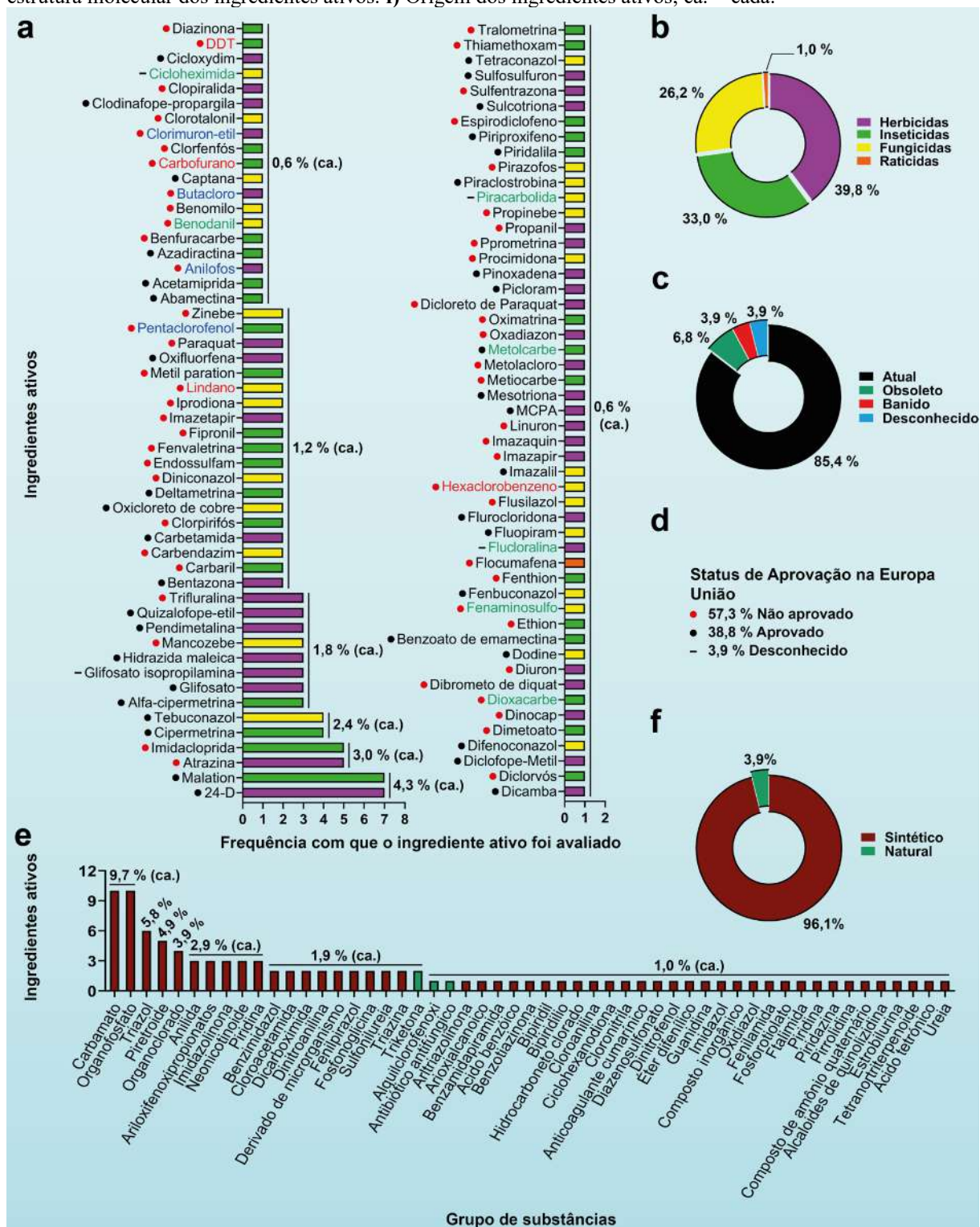
O uso da nanotecnologia na agricultura tem se mostrado promissor. Soluções nano-aprimoradas foram desenvolvidas para proteger a água e os solos, melhorar a germinação e o crescimento das sementes, proteger o desenvolvimento das plantas com a liberação controlada de agroquímicos com alta especificidade e reduzir os danos colaterais (NAIR *et al.*, 2010; TRIPATHI *et al.*, 2017). Dos 119 artigos revisados, apenas quatro avaliaram o princípio ativo nanoencapsulado no bioensaio com *A. cepa*. Os estudos observaram que os sistemas de nanopartículas poderiam reduzir a genotoxicidade e toxicidade de pesticidas em comparação com o princípio ativo não nanoparticulado. No entanto, isso não impediu que os princípios ativos causassem danos (NAIR *et al.*, 2010; GRILLO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; BALAJI *et al.*, 2017; GAO *et al.*, 2021). Embora os potenciais benefícios das formulações de nanopesticidas tenham sido sugeridos, informações mais factuais são necessárias para entender os efeitos de possíveis exposições inesperadas e efeitos adversos. Também é crucial criar regulamentos rigorosos e eficientes para evitar o uso indevido, protegendo outras espécies de plantas cujas interações com nanomateriais específicos geram efeitos altamente adversos em seu desenvolvimento.

1.6 PROPRIEDADES DOS PESTICIDAS

A presente revisão encontrou 164 testes com o bioensaio *A. cepa* para investigar os efeitos tóxicos de 113 substâncias. Os pesticidas mais estudados foram 2,4-D, malation (4,3% cada), atrazina (3,0%), cipermetrina, imidaclopride e tebuconazol (2,4% cada) (Figura 1.4a). Considerando a classe do pesticida de acordo com sua função, dos 151 testes realizados, 39,8% usaram herbicidas, 33,0% inseticidas, 26,2% fungicidas e 1,0% raticidas (Figura 1.4b). Vale a pena notar que a classificação foi baseada no uso mais frequente (por exemplo, carbofuran pode ser usado como inseticida, nematicida e acaricida, mas é usado com mais frequência como inseticida). Nossos resultados mostraram que o pesticida mais usado no mundo também foi o mais estudado pela comunidade científica, ou seja, herbicidas (53,0%), seguido de fungicidas (23,1%) e inseticidas (16,8%) (FAOSTAT, 2021). Em relação ao potencial tóxico, os inseticidas

são considerados os mais tóxicos, enquanto os fungicidas e herbicidas ocupam o segundo e o terceiro lugar na lista de toxicidade, respectivamente (MAHMOOD *et al.*, 2016).

Figura 1.4 – Propriedades dos ingredientes ativos. **a)** Moléculas de princípios ativos identificadas nos artigos analisados. **b)** Tipo de ingrediente ativo em **(a)** de acordo com suas funções. **c)** Status de disponibilidade de ingredientes ativos em **(a)**. **d)** Status de aprovação do ingrediente ativo na União Europeia. **e)** Classes baseadas na estrutura molecular dos ingredientes ativos. **f)** Origem dos ingredientes ativos; ca. = cada.



Fonte: elaborado pelo autor.

Em relação à disponibilidade comercial, das 113 substâncias identificadas nesta pesquisa, 85,4% estão disponíveis comercialmente, 6,8% estão obsoletas, 3,9% foram proibidas e 3,9% têm disponibilidade desconhecida (Figura 1.4c). Comparando esses resultados com os dados de agrotóxicos divulgados pela União Europeia, 57,3% dos princípios ativos identificados nesta pesquisa são proibidos e apenas 38,8% são permitidos (Figura 1.4d). A União Europeia é tida aqui como exemplo de marco regulatório mais restritivo para pesticidas, uma vez que proibiu o uso dessas substâncias perigosas, entretanto não proibiu sua produção. Em 2016, cerca de 50% do mercado de pesticidas no mundo era controlado por empresas sediadas na União alguns desses princípios ativos proibidos retornam à União Europeia em alimentos importados de países onde os princípios ativos são permitidos (BOMBARDI, 2019).

Quanto aos pesticidas proibidos, DDT, carbofurano, lindano e hexaclorobenzeno foram banidos do mercado. Estudos comprovaram seus efeitos mutagênicos, carcinogênicos, neurotóxicos, endócrinos e de interrupção reprodutiva (LEWIS *et al.*, 2016). No entanto, outros pesticidas com potencial toxicológico demonstrado em estudos científicos ainda são comercializados e não foram banidos. Por exemplo, atrazina e paraquat, que são tóxicos para o sistema nervoso, fígado, rins, estômago, intestino, sistema respiratório e afetam o sistema endócrino e a reprodução (LEWIS *et al.*, 2016).

Outra classificação de pesticidas é por grupos funcionais de acordo com sua estrutura química. Nesta pesquisa, 53 grupos de substâncias foram identificados (Figura 1.4e; Tabela A.2). Os grupos com maior número de moléculas diferentes de princípios ativos foram carbamato, organofosforado (9,7% cada), triazol (5,8%), piretróide (4,9%) e organoclorados (3,9%). Os grupos de pesticidas atuais e mais usados pertencem às classes de organoclorados, carbamatos, organofosforados, piretróides e neonicotinóides (MAHMOOD *et al.*, 2016). Organoclorados, organofosforados e carbamatos são pesticidas organossintéticos comumente usados na agricultura e são extremamente prejudiciais ao meio ambiente (KARAMI-MOHAJERI; ABDOLLAHI, 2011). Os pesticidas piretróides, têm baixa toxicidade para mamíferos, mas são tóxicos para organismos aquáticos, são considerados menos poluentes do que outros inseticidas. Assim, eles estão se tornando o grupo predominante de inseticidas usados contra pragas e candidatos a substituir pesticidas organoclorados e organofosforados (KATSUDA, 1999). No entanto, triazol é um grupo de fungicidas amplamente utilizado na agricultura para controlar e tratar várias doenças fúngicas (SCHERMERHORN *et al.*, 2005).

Em relação à origem sintética ou natural, dos 53 grupos, apenas o tetranortriterpenoide (azadiractina), abamectina e benzoato de emamectina (derivados de microrganismos) e alcaloides quinolizidínicos (oximatrina) são de origem natural (Figura 1.4f). Este resultado

revela que os pesticidas de origem natural (ou biopesticidas) ainda requerem mais investigação porque não estão isentos de causar danos (AKDENIZ; ÖZMEN, 2011; AL-AHMADI, 2013; KWANKUA *et al.*, 2010). A ciência dos biopesticidas ainda é considerada jovem e em evolução. Os biopesticidas cobrem apenas 2% dos protetores de plantas usados globalmente, mas seu uso aumenta 10% a cada ano (KUMAR; SINGH, 2015). Os biopesticidas têm vantagens sobre os pesticidas sintéticos, como segurança ambiental, especificidade do alvo, eficácia, biodegradabilidade e adequação em programas integrados de manejo de pragas (KUMAR; SINGH, 2015).

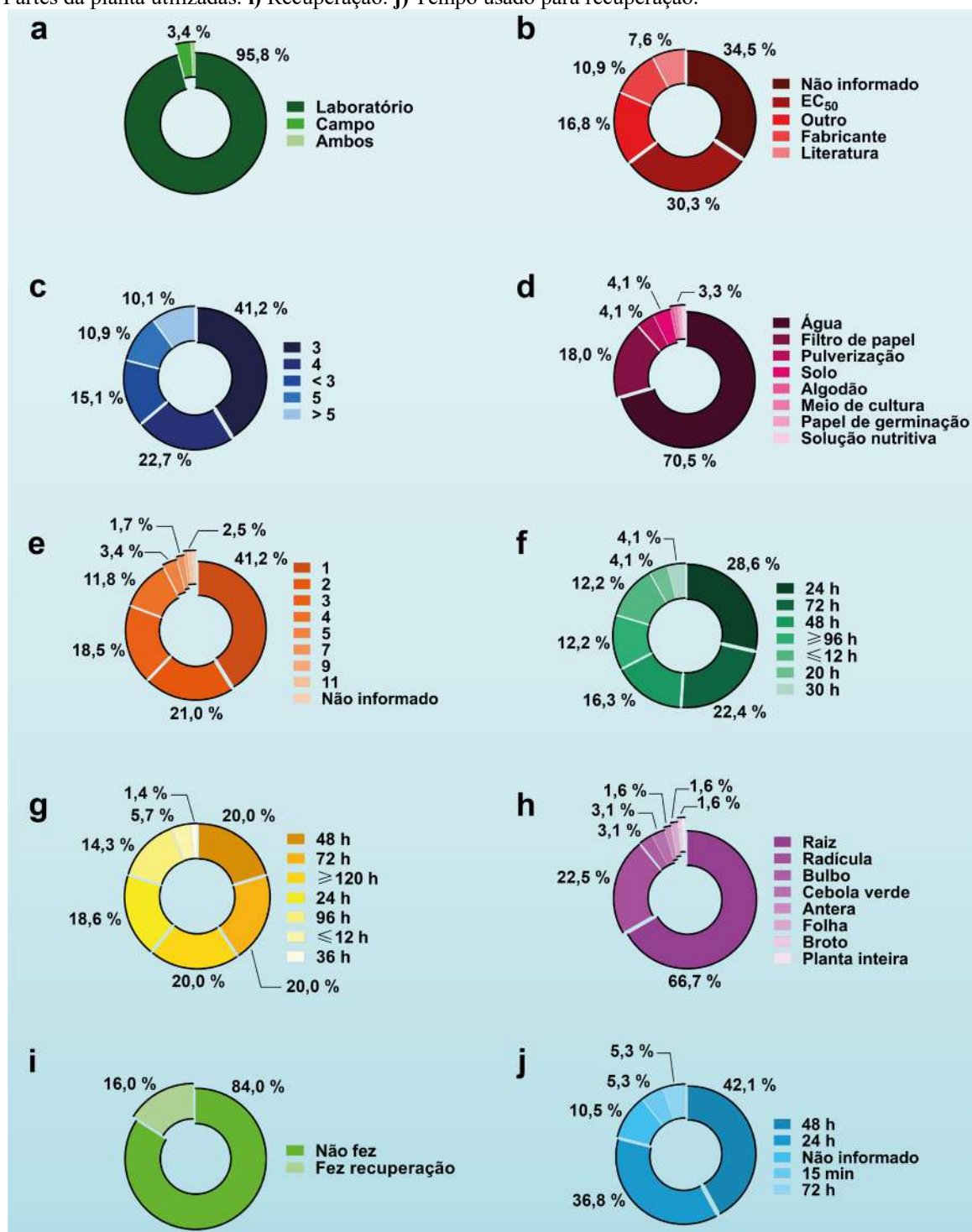
1.7 DESIGN EXPERIMENTAL

Dos 119 artigos analisados, a maioria foi realizada em laboratório (95,8%), enquanto 3,4% foram realizados em campo e 0,8% em ambos (Figura 1.5a; Tabela A.1). Esse resultado indica que o uso do bioensaio com *A. cepa* está restrito a testes laboratoriais, com poucos estudos abordando microcosmos, mesocosmos e ambiente natural. Os estudos de campo identificados nesta pesquisa visaram avaliar o acúmulo ou a presença de resíduos de pesticidas em cebolas (TSIROPOULOS; MILIADIS, 1998; SONDHIA, 2010; SAHOO *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2016). É importante abordar a abordagem sob condições ambientalmente relevantes para obter resultados mais confiáveis.

Em relação a forma de determinação da concentração utilizada nos bioensaios com *A. cepa*, 34,5% dos estudos não forneceram o método para determinação da concentração, 30,3% definiram pela concentração efetiva (EC_{50}), 10,9% utilizaram a dose recomendada pela do fabricante, 7,6% seguiram a literatura e 16,8% definiram a concentração de acordo com outros parâmetros (Figura 1.5b; Tabela A.1). A CE_{50} refere-se à concentração do composto que induz metade do efeito máximo. Em *A. cepa*, a escolha mais comum do parâmetro para determinar a CE_{50} é a redução do crescimento radicular (comprimento). Desta forma, o valor de EC_{50} é um parâmetro útil para a escolha das concentrações de teste para bioensaios com *A. cepa*.

Quanto ao número de grupos experimentais, 41,2% dos estudos usaram três concentrações do princípio ativo, 22,7% usaram quatro, 15,1% usaram menos de três, 10,9% usaram cinco e 10,1% usaram mais de cinco concentrações (Figura 1.5c; Tabela A.1). Quanto maior o número de concentrações testadas, mais próximo o número real. Porém, dependendo do tempo de obtenção dos dados e da complexidade do ensaio, muitos grupos experimentais inviabilizam a pesquisa. No geral, devido ao grande número de células a serem avaliadas (5.000 por condição experimental) e ao longo tempo de análise para o bioensaio com *A. cepa*, três concentrações geralmente são suficientes para avaliar a toxicidade dos poluentes.

Figura 1.5 – Detalhes relacionados ao delineamento experimental dos artigos. **a)** Condições de estudo. **b)** Determinação das concentrações. **c)** Número de concentrações utilizadas. **d)** Método de exposição. **e)** Número de intervalos de tempo usados para exposição. **f)** Tempo de exposição de artigos que utilizaram apenas um intervalo de tempo. **g)** Tempo de exposição dos estudos que utilizaram mais de um intervalo de tempo. **h)** Partes da planta utilizadas. **i)** Recuperação. **j)** Tempo usado para recuperação.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados revisados mostraram que existem diferentes formas de exposição aos princípios ativos, sendo que a forma de exposição pode depender do estágio de vida da espécie *A. cepa* (sementes ou bulbos). A presente análise identificou que a exposição dos

bulbos na água foi a forma mais utilizada (70,5%), seguida da exposição das sementes em papel filtro (18,0%), pulverização, exposição ao solo (4,1% cada) e outros (3,3%). (Figura 1.5d; Tabela A.1). A escolha do método de exposição pode ser influenciada pelas características da solução de teste, como disponibilidade, preço, hidrofobicidade e afinidade com as partículas do solo. A água é uma forma viável de exposição porque permite um bioensaio mais uniforme. Já o solo apresenta algumas limitações devido suas propriedades que podem afetar a disponibilidade de pesticidas (adsorção) e degradação (EDWARDS, 1975). É importante entender a influência das características do solo na toxicidade de pesticidas porque o solo é um dos receptores de pesticidas.

Ainda em relação à forma de exposição, apenas 16,8% dos artigos informaram se a solução com princípio ativo foi renovada, enquanto 83,2% não forneceram essa informação. O ingrediente ativo pode precipitar no fundo do recipiente ou degradar com o tempo. Assim, é fundamental saber se a solução teste foi trocada ou completada, principalmente quando o veículo de exposição foi a água.

O intervalo de exposição de *A. cepa* aos princípios ativos variou muito entre os artigos. Os dados revisados mostraram que 41,2% dos estudos foram realizados com apenas um intervalo de tempo, seguidos dos estudos que utilizaram dois (21,0%), três (18,5%), quatro (11,8%), cinco (3,4%), sete (1,7%), nove, onze (0,8% cada) intervalos (Figura 1.5e; Tabela A.1). Quanto à duração da exposição, o tempo de exposição mais utilizado em estudos de intervalo único foi de 24 h (n = 49) (28,6%), seguido de 72 h (22,4%), 48 h (16,3%), ≥ 96 h, ≤ 12 h (12,2% cada), 20 h e 30 h (4,1% cada) (Figura 1.5f; Tabela A.1). Em estudos com mais de um intervalo de tempo de exposição (n = 69), a exposição máxima foi de 48 h, 72 h (20,3%) e ≥ 120 h (20,3%), seguida de 24 h (18,8%), 96 h (14,5%), ≤ 12 h (4,3%), e 36 h (1,4%) (Figura 1.5g; Tabela A.1). O tempo de exposição deve considerar o ciclo de vida da espécie bioindicadora e o tempo necessário para a resposta do biomarcador selecionado. Considerando que o ciclo celular de *A. cepa* é de cerca de 20 – 23 h (GRANT; ZINOV'EVA-STACHEVITCH; ZURA, 1981; MATAGNE, 1968), sugere-se considerar esse intervalo de tempo para a realização do bioensaio. Em relação à exposição crônica ou aguda, a maioria dos artigos (94,1%) foi classificada como aguda e realizada com intervalo de curta duração (< 14 dias). Além disso, apenas 5,9% dos artigos foram classificados como exposição crônica e realizados com intervalos de longa duração (> 14 dias).

Quanto à parte exposta aos agrotóxicos, a maioria dos estudos utilizou raízes de bulbos (66,7%) ou radícula de sementes (22,5%). Poucos estudos usaram outras partes da planta, como folhas (1,6%) (Figura 1.5h; Tabela A.1). A raiz e/ou radícula têm sido os órgãos preferidos

porque as células meristemáticas estão em intensa atividade mitótica e permitem analisar os cromossomos e consequentemente os efeitos genotóxicos. Além disso, esses tecidos são responsáveis pela absorção e transporte de nutrientes, facilitando a entrada de agrotóxicos nas células.

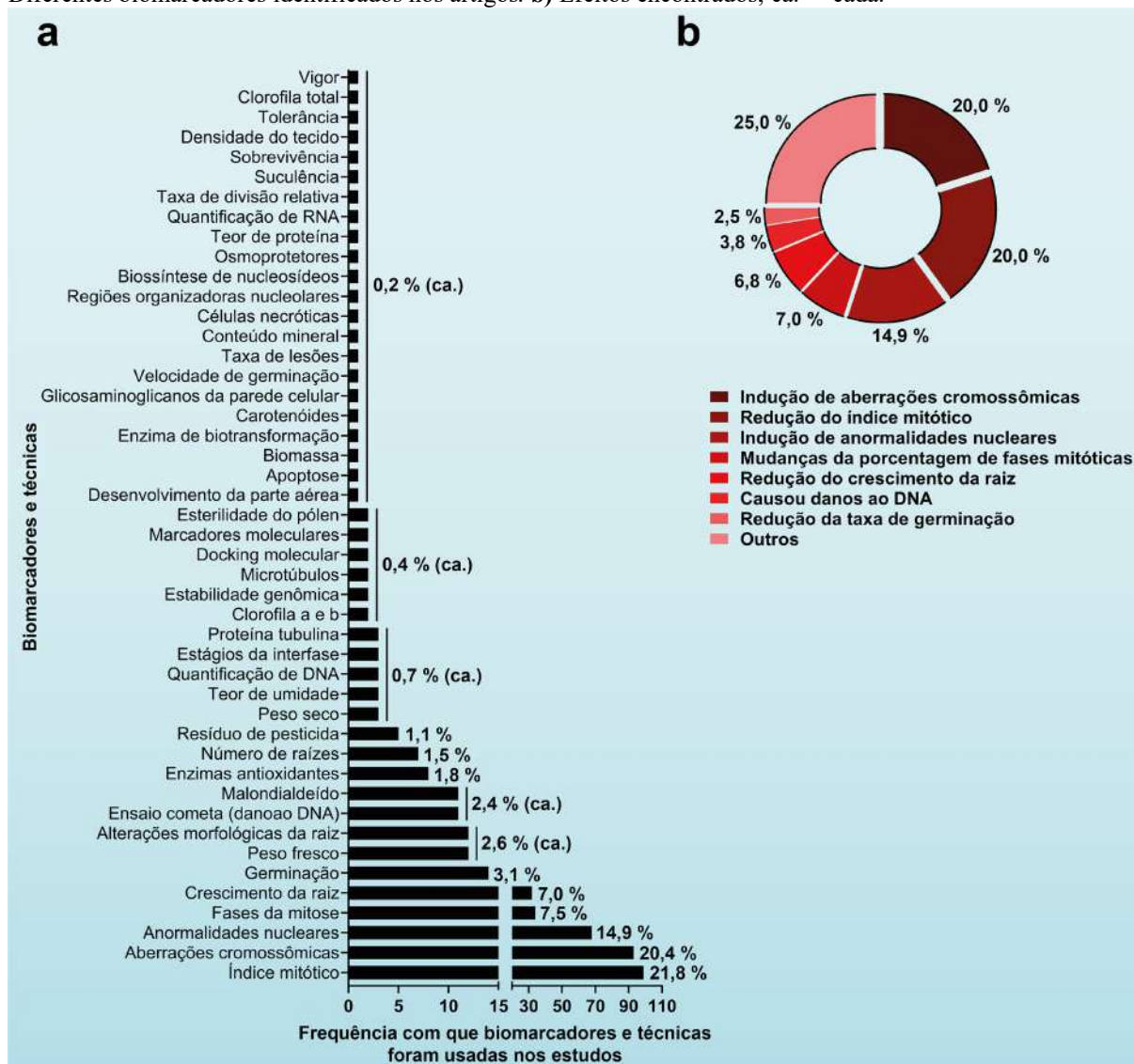
Adicionalmente, o ensaio de *A. cepa* permite avaliar se os efeitos desencadeados pela exposição a agrotóxicos podem ser reversíveis. Em nossa análise, apenas 16,0% dos estudos verificaram a reversibilidade dos efeitos dos pesticidas e 84% não (Figura 1.5i; Tabela A.1). Os intervalos temporais (máximo) utilizados nos artigos (n = 19) que realizaram recuperação foram 48 h (42,1%), 24 h (36,8%), 15 min (5,3%), 72 h (5,3%) e não relatados (10,5%) (Figura 1.5j; Tabela A.1).

1.8 BIOMARCADORES AVALIADOS E EFEITOS ENCONTRADOS

Investigar os efeitos de um determinado estressor usando bioensaios requer uma bateria adequada de biomarcadores capazes de fornecer diferentes dados sobre a ação do estressor no organismo. Avaliações completas devem ter análises de toxicidade, genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, porque as substâncias testadas podem ter diferentes resultados e efeitos (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2002). Portanto, é comum usar mais de um biomarcador em um único estudo. Considerando a bateria de biomarcadores utilizados nos estudos analisados, o número total de biomarcadores identificados foi de 455. Os biomarcadores mais observados nos artigos foram o índice mitótico (21,8%), as aberrações cromossômicas (20,4%) e as anormalidades nucleares (14,9%) (Figura 1.6a). A Tabela A.1, e a Figura 1.6a mostram a lista completa de biomarcadores.

No geral, os efeitos mais comuns dos ingredientes ativos testados no ensaio de *A. cepa* foram a indução de aberração cromossômica, a redução do índice mitótico (20,0% cada), a indução de anormalidades nucleares (14,9%), mudanças na porcentagem de fases mitóticas (7,0%), redução de crescimento (6,8%), danos ao DNA (3,8%) e redução de germinação (2,5%). Assim, fica evidenciado o potencial dos ingredientes ativos para inibir e causar efeitos durante a divisão celular, induzir aberração cromossômica e anormalidades nucleares (Figura 1.6b). Além disso, os dados sugerem que os ingredientes ativos parecem ser compostos com grande potencial para despolimerizar microtúbulos, considerando a grande indução de aberração cromossômica a partir dos efeitos no fuso mitótico. Os efeitos causados por cada pesticida estudado pelos autores são fornecidos na Tabela A.1.

Figura 1.6 – Biomarcadores utilizados nos estudos e efeitos encontrados devido à exposição a agrotóxicos. **a)** Diferentes biomarcadores identificados nos artigos. **b)** Efeitos encontrados; ca. = cada.



Fonte: elaborado pelo autor.

O índice mitótico é considerado uma medida aceitável de citotoxicidade para todos os organismos vivos (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996) e é caracterizado pelo número de células em divisão em relação ao número total de células analisadas (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Um aumento no índice mitótico indica aumento da divisão celular, danificando as células e levando à proliferação celular desordenada e até mesmo formação de tecido tumoral. No entanto, a redução do índice mitótico pode indicar inibição/atraso na divisão celular (GRAÑA, 2018), o que pode danificar o desenvolvimento e crescimento normais da planta.

As aberrações cromossômicas são um conjunto de alterações na estrutura e/ou número dos cromossomos visualizados durante a divisão celular e são classificadas como biomarcadores de genotoxicidade. As aberrações cromossômicas podem ser divididas em numéricas e estruturais. As aberrações numéricas resultam dos efeitos aneugênicos que causam

aneuploidia e poliploidia, interferindo com o fuso mitótico e causando segregação anormal dos cromossomos. Por sua vez, as aberrações cromossômicas estruturais podem ocorrer devido à ação clastogênica nos cromossomos ou à inibição e/ou erros durante a replicação do DNA (JAIN *et al.*, 2018). Ambas as classes de aberração cromossômica podem ocorrer devido à exposição a pesticidas. As aberrações cromossômicas ainda proporcionam a possibilidade de identificar se a ação do pesticida foi clastogênica (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009) ou de efeito misto (BERNARDES *et al.*, 2015), devido à maior frequência de determinadas aberrações em relação a outras. Após sua formação, as aberrações cromossômicas podem originar outras aberrações cromossômicas em ciclos celulares subsequentes, bem como levar a anomalias nucleares. Muitas aberrações cromossômicas podem levar à morte celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

A ocorrência de anomalias nucleares é um biomarcador que pode fornecer evidências de efeitos genotóxicos ou mutagênicos. Se a anormalidade estiver relacionada à forma do núcleo, o efeito é genotóxico devido à interação com o material genético, que acaba deformando o núcleo. Essa alteração pode ser revertida. No entanto, se a anomalia estiver relacionada à presença de micronúcleos e células binucleadas ou polinucleadas, o efeito pode ser considerado mutagênico porque essa alteração não é reversível, originando células com conjuntos cromossômicos alterados. As anomalias nucleares surgem devido a aberrações cromossômicas (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009). Ao contrário das aberrações cromossômicas, as anomalias nucleares são observadas no núcleo em interfase devido ao agente testado (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A figura 1.6a também mostra que o bioensaio de *A. cepa* tem diferentes biomarcadores que avaliam os resultados tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos com base em macro e microanálises. Por exemplo, os marcadores de toxicidade avaliados com base na morfologia da raiz e nas mudanças de cor, forma, textura, espessura e crescimento são considerados macroanálises. A raiz pode servir como um sinal externo sensível de eventos internos em nível celular em andamento (FATMA *et al.*, 2018). Em resposta a contaminantes, mudanças morfológicas da raiz podem afetar toda a estrutura da planta, já que as raízes são a principal via de absorção de água e nutrientes. Outros exemplos de biomarcadores tóxicos são a taxa de germinação de sementes e o desenvolvimento da radícula. A análise de germinação e crescimento da raiz é rápida, barata, confiável e baseada na quantificação de sementes germinadas e na medição do alongamento das raízes durante a exposição a poluentes tóxicos. Além disso, é robusto e simples para avaliar o potencial toxicológico de substâncias (ÇAVUŞOĞLU *et al.*, 2011).

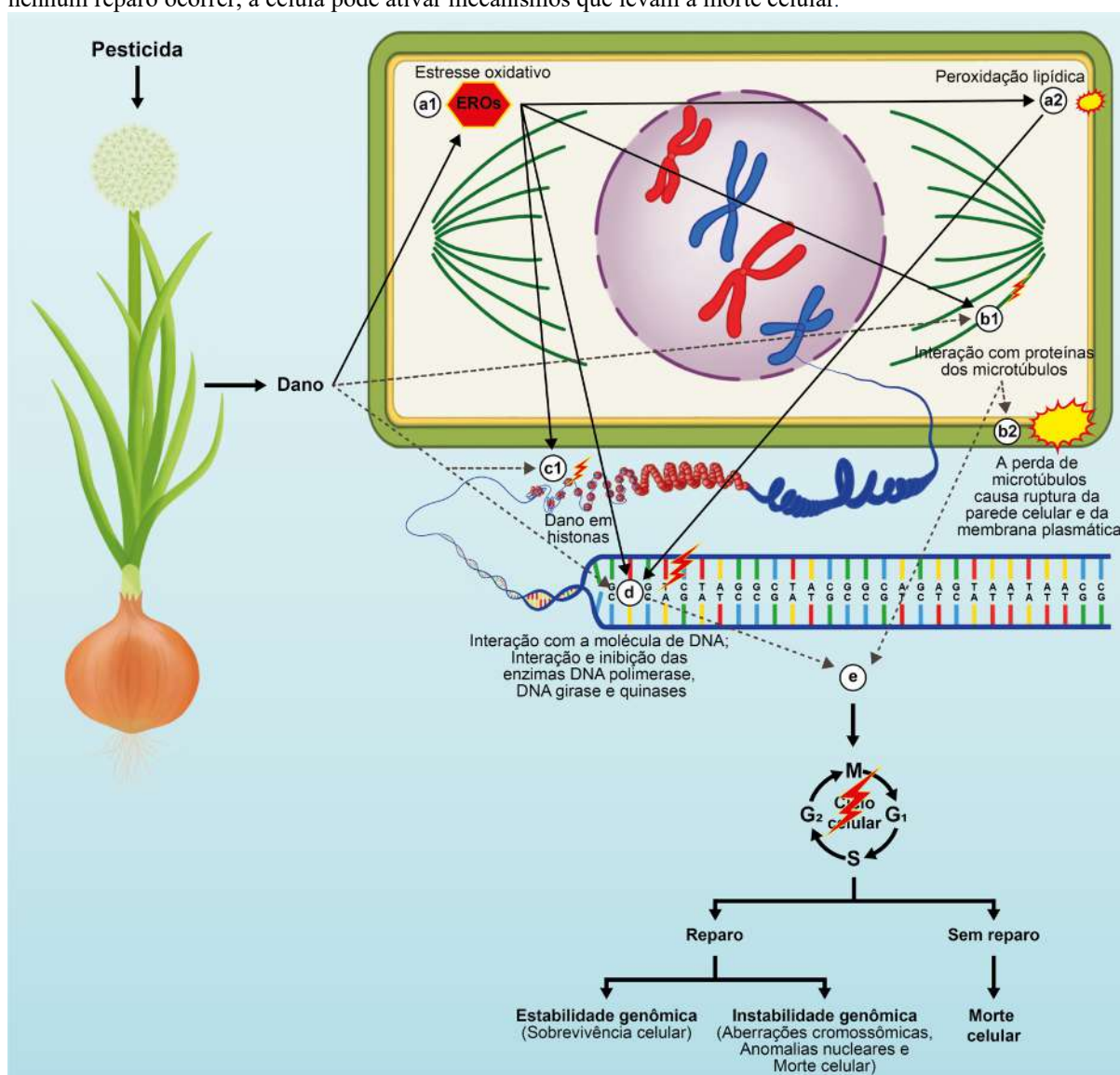
Os estudos que avaliaram se houve recuperação do dano causado pela exposição aos ingredientes ativos mostraram, em geral, que os efeitos são irreversíveis (Tabela A.1). O efeito irreversível tem sido associado ao pesticida atingindo um nível crítico na célula ou nos espaços intercelulares, afetando vários ciclos celulares após a exposição (MARCANO *et al.*, 2004; ÖZKARA, 2019).

1.9 MECANISMOS DE AÇÃO DE PESTICIDAS

A exposição a pesticidas tem consequências adversas em várias matrizes ambientais e humanas (PARRA-ARROYO *et al.*, 2022). Portanto, os potenciais efeitos adversos dos pesticidas devem ser investigados para melhorar a compreensão do mecanismo pelo qual eles causam danos. Os bioensaios de *A. cepa* mostraram que a exposição a pesticidas afetou vários processos e compartimentos celulares (Figura 1.7), o que se refletiu em parâmetros acima do nível celular. Assim, o teste de *A. cepa* tem sido utilizado em numerosos estudos para investigar a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de vários pesticidas, como malation (SRIVASTAVA; SINGH, 2020), linuron (ERGIN; INCEER; ERGIN, 2020), abamectina (MACAR, 2021b) e imidacloprida (MERT; BETÜL, 2020) (Tabela A.1).

Os pesticidas podem danificar a célula de várias maneiras. Uma delas é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam ao estresse oxidativo. As EROs podem causar peroxidação de lipídios, o que interfere diretamente na eficiência da membrana plasmática (MACAR, 2021a). O aumento da peroxidação lipídica pode reduzir a germinação, comprimento das raízes, ganho de peso e conteúdo de água (MERCADO; CALEÑO; SUÁREZ, 2020; SRIVASTAVA; SINGH, 2020; MACAR, 2021a). Além disso, as EROs podem romper fitas de DNA, contribuindo para o aumento do dano ao DNA (ÖZTÜRK, 2015; CORTÉS-ESLAVA *et al.*, 2018; FIORESI *et al.*, 2020; LIMAN; CIĞERCI; SRIVASTAVA; SINGH, 2020), modificações entre as bases de purina e pirimidina (ODJEGBA; ADENIRAN, 2015) e morte celular programada (CORTÉS-ESLAVA *et al.*, 2018). As EROs também estão envolvidas na montagem/desmontagem dos microtúbulos e funções do fuso mitótico (LIVANOS *et al.*, 2012).

Figura 1.7 – Mecanismo de ação dos pesticidas na célula. Ao penetrar na célula, os agrotóxicos podem causar diversos danos celulares, como a geração de EROs (a1). As EROs podem levar à peroxidação lipídica (a2), cujos produtos podem danificar e/ou alterar o DNA por meio da formação de adutos (d). As EROs também podem modificar as bases purínicas e pirimídicas e interagir com o esqueleto de açúcar-fosfato das fitas de DNA que compõem o exterior da dupla hélice, causando instabilidade (d). As EROs também podem danificar as histonas (c1), impedindo a condensação total do material genético e dos microtúbulos (b1). Os pesticidas podem danificar diretamente os microtúbulos (b1), as histonas (c1) e o DNA. Danos nos microtúbulos podem romper a membrana plasmática e a parede celular (b2). A interação com microtúbulos também pode causar segregação cromossômica anormal. A interação direta com o DNA pode causar quebra, intercalação, e inativação de enzimas, reduzindo a replicação (d). A ação tanto de agrotóxicos quanto de EROs em microtúbulos, DNA e histonas pode prejudicar o ciclo celular (e). Tais efeitos podem bloquear o ciclo celular, levando à retenção de estágios mitóticos para possíveis reparos para manter a estabilidade genômica. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular. No entanto, se o reparo for ineficiente, o modelo genômico pode ficar comprometido e instável, levando a aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e morte celular. Se os mecanismos de reparo forem ineficientes e nenhum reparo ocorrer, a célula pode ativar mecanismos que levam à morte celular.



Fonte: elaborado pelo autor.

Além disso, os pesticidas podem interagir e inibir proteínas do ciclo celular, como a DNA polimerase, a DNA girase, a RNA polimerase, a quinase e enzimas envolvidas na produção, montagem ou orientação do fuso mitótico (TARTAR; KAYMAK; MURANLI, 2006; YÜZBAŞIOĞLU, 2003). A intercalação dos pesticidas com a molécula de DNA também pode ocorrer. Como resultado, a síntese de DNA pode ser inibida, o que leva a uma redução na replicação de DNA. Os níveis de DNA caíram em raízes expostas a pesticidas clorfenvinfós, fenbuconazol (TÜRKOĞLU, 2012) e permetrina (KARAIŞMAILOĞLU, 2015), provavelmente devido à intercalação com o DNA que impediu a replicação. Danos ao DNA pela ação de pesticidas podem gerar instabilidade do modelo genômico devido a falhas nos mecanismos de reparo do DNA (OZAKCA; SILAH, 2013), nos quais os danos ao DNA podem não ser reparados, dificultando a amplificação (BERNARDES *et al.*, 2019). O dano à molécula de DNA pode aumentar as células necróticas (OZAKCA; SILAH, 2013).

Os pesticidas também podem inibir diretamente a polimerização da tubulina (CHAUHAN *et al.*, 1998; GIMÉNEZ-ABIÁN *et al.*, 1998), o que perturba a formação do fuso mitótico (VERMA; SRIVASTAVA, 2018) e consequentemente inibe o fuso mitótico (MERCADO; CALEÑO, 2020). Um exemplo é a ligação do grupo NO₂ do trifluralin às moléculas de tubulina, impedindo a polimerização e consequentemente a formação de microtúbulos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). A ação dos pesticidas nos microtúbulos pode causar aberrações cromossômicas. O efeito aneugênico dos pesticidas pode causar aneuploidia e poliploidia interferindo com o fuso mitótico e causando segregação cromossômica anormal. As aberrações cromossômicas estruturais podem ser devido à ação clastogênica de pesticidas nos cromossomos ou à inibição e/ou erros durante a replicação do DNA. Além disso, a perda de microtúbulos expande a célula, culminando na ruptura da parede celular e membrana plasmática (CHAUHAN *et al.*, 1998).

A divisão celular tem vários pontos de controle do ciclo celular que podem bloquear ou retardar a progressão da mitose devido à presença de estressores celulares e ambientais (BURGESS; RASOULI; ROGERS, 2014). Assim, os agrotóxicos poderiam interferir na duração da fase mitótica, tornando algumas fases mais frequentes do que outras. Por exemplo, o aumento de células prófase pode resultar do bloqueio do ponto de checagem CHFR que impede e/ou retarda a entrada da célula na metáfase (LIMAN *et al.*, 2010, 2011; LIMAN; CİĞERCİ; ÖZTÜRK, 2015). Assim, os índices de metáfase, anáfase e telófase serão reduzidos, enquanto haverá um acúmulo de células na prófase (MAGDALENO *et al.*, 2015). O checkpoint CHFR é considerado um checkpoint precoce da mitose que retarda a resposta do ciclo celular a drogas que atuam nos microtúbulos, contribuindo para manter a estabilidade genômica

(PRIVETTE; PETTY, 2008). No entanto, o aumento das células metafásicas seria consequência do bloqueio da formação do fuso mitótico (YÜZBAŞIOĞLU, 2003; TÜRKOĞLU, 2012). Durante a mitose, cada par de cromátides é fielmente segregado para polos opostos do fuso mitótico, alinhados na placa metafásica para formar células-filhas. As cromátides incorretamente alocadas ao fuso são detectadas pelo ponto de verificação de montagem do fuso constitutivamente ativo (SAC), que induz uma parada mitótica prolongada, dando à célula tempo para corrigir a fixação e segregação completa (BURGESS; RASOULI; ROGERS, 2014). A ação mitodepressiva dos pesticidas pode causar a inibição do crescimento das raízes (BERNARDES *et al.*, 2019; FIORESI *et al.*, 2020; MERCADO; CALEÑO, 2020), germinação, ganho de peso (MACAR, 2021b), número de raízes (VERMA; SRIVASTAVA, 2018) e finalmente, a morte do tecido.

O índice mitótico mais elevado pode ser consequência de uma redução no tempo necessário para o reparo do DNA (LIMAN *et al.*, 2010, 2011) ou resultado do acúmulo de configurações de c-metáfase (RAO; NARASIMHAM; SUBBARAO, 2005). O índice mitótico mais elevado também pode ser prejudicial devido à proliferação celular descontrolada, levando à formação de tumores (LIMAN *et al.*, 2010, 2011; MAGDALENO *et al.*, 2015).

1.10 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O uso excessivo de pesticidas em práticas agrícolas requer avaliações ambientais que demonstrem seus potenciais efeitos prejudiciais. Assim, *A. cepa* tem sido um modelo adequado para detectar os efeitos tóxicos de pesticidas, pois possui numerosas vantagens que o tornam um bioensaio eficiente e sensível. Além disso, *A. cepa* possui vários biomarcadores que permitem extrair informações valiosas sobre toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, avaliando diferentes desfechos. Os dados revisados mostraram que os pesticidas podem causar efeitos prejudiciais em *A. cepa* e podem ser extrapolados para outros organismos, incluindo humanos. Os dados obtidos com esse bioensaio também podem servir como um aviso para a formulação de políticas públicas.

No entanto, os seguintes aspectos devem ser considerados em pesquisas futuras para aprimorar o bioensaio de *A. cepa*:

- i) Estudo da ação de pesticidas ou grupos químicos ainda não explorados;
- ii) Investigação de biopesticidas, considerando que eles também podem oferecer riscos;
- iii) Estudos em microcosmos e mesocosmos e no campo;
- iv) Investigação sobre a interferência do solo e sua influência na ação de pesticidas;
- v) Recuperação após exposição a pesticidas;

- vi) Detalhes sobre a metodologia, como origem do pesticida, determinação da concentração e se a solução do pesticida foi alterada durante a exposição. Isso é essencial porque alguns estudos não explicaram a metodologia, o que dificultou a extração de dados, e isso pode afetar a reprodutibilidade do estudo;
- vii) Testes para melhorar a compreensão do mecanismo de ação dos pesticidas e não apenas de seus efeitos;
- viii) Protocolos padrão, considerando que o teste possui muita plasticidade entre os grupos de pesquisa;
- ix) Um atlas com fotomicrografias mostrando vários estágios e formas de aberração cromossômica e anormalidades nucleares para padronização.

REFERÊNCIAS

- AKDENIZ, D.; ÖZMEN, A. Antimitotic effects of the biopesticide oxymatrine. **Caryologia**, v. 64, n. 1, p. 117–120, 2011.
- AL-AHMADI, M. S. Cytogenetic effects of two synthetic pesticides on mitotic chromosome on root tip cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 78, n. 1, p. 3–8, 2013.
- ARKHIPCHUK, V. V; GARANKO, N. N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 187–194, 2002.
- BALAJI, A. P. B.; SASTRY, T. P.; MANIGANDAN, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Environmental benignity of a pesticide in soft colloidal hydrodispersive nanometric form with improved toxic precision towards the target organisms than non-target organisms. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 190–201, 2017.
- BANK, O. Der Einfluß des Koffeins auf Plasmolyseform und -zeit bei *Allium cepa*. **Protoplasma**, v. 16, n. 1, p. 452–453, 1 dez. 1932.
- BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; DA SILVA FERREIRA, M. F. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 7, p. 207, 2015.
- BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. da S. Toxicological effects of comercial formulations of fungicides based on

procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 21013–21021, 2019.

BOMBARDI, L. M. **A Geography of Agrottoxins use in Brazil and its Relations to the European Union**. São Paulo: FFLCH - USP, 2019. 267 p.

BOSIO, S.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Em: SRIVASTAVA, J. Environmental Contamination*. InTech, 2012. p. 137–158.

BURGESS, A.; RASOULI, M.; ROGERS, S. Stressing Mitosis to Death. **Frontiers in Oncology**, v. 4, p. 140, 2014.

ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; ÇAVUŞOĞLU, K.; ÇİÇEK, F. Investigation of toxic effects of the glyphosate on *Allium cepa*. **Tarım Bilimleri Dergisi**, v. 17, n. 2, p. 131–142, 2011.

CHAKRABORTY, R.; MUKHERJEE, A. K.; MUKHERJEE, A. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 153, n. 1–4, p. 351–357, 2009.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181–189, 1999.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; SUNDARARAMAN, V.; GUPTA, S. K. Diuron-Induced Cytological and Ultrastructural Alterations in the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 62, n. 3, p. 152–163, 1998.

CORTÉS-ESLAVA, J.; GÓMEZ-ARROYO, S.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 77–86, 2018.

DHANANJAYAN, V.; JAYANTHI, P.; JAYAKUMAR, S.; RAVICHANDRAN, B. Agrochemicals Impact on Ecosystem and Bio-monitoring. *Em: KUMAR, S.; MEENA, R. S.; JHARIYA, M. K. Resources Use Efficiency in Agriculture*. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 349–388.

EDWARDS, C. A. Factors that affect the persistence of pesticides in plants and soils. *Em: VARO, P. Pesticide Chemistry–3*. Elsevier, 1975. p. 39–56.

EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; AKYIL, D.; ÖZKARA, A. Mutagenic and cytotoxic activities of benfuracarb insecticide. *Cytotechnology*, v. 68, n. 4, p. 637–643, 2016.

ERGIN, T.; INCEER, H.; ERGIN, B. Investigation of Antimutagenic Effect of *Rosa canina* L. Against Linuron Induced DNA Damage on Root Meristematic Cells of *Allium cepa* L. *CYTOLOGIA*, v. 85, n. 3, p. 233–237, 2020.

ERNST, W. H. O. The use of higher plants as bioindicators. *Em: Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, 2003. p. 423–463.

FAOSTAT. **Pesticides Use**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>>. Acesso em: 24 maio. 2021.

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

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.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FIORESI, V. S.; VIEIRA, B. de C. R.; CAMPOS, J. M. S. de; SOUZA, T. da S. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 22, p. 28066–28076, 2020.

FIRBAS, P.; AMON, T. Chromosome damage studies in the onion plant *Allium cepa* L. *Caryologia*, v. 67, n. 1, p. 25–35, 2014.

GAO, Y.; LIU, Y.; QIN, X.; GUO, Z.; LI, D.; LI, C.; WAN, H.; ZHU, F.; LI, J.; ZHANG, Z.; HE, S. Dual stimuli-responsive fungicide carrier based on hollow mesoporous

silica/hydroxypropyl cellulose hybrid nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 414, n. October 2020, p. 125513, 2021.

GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; PANZERA, F.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; DE LA TORRE, C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Immediate disruption of spindle poles and induction of additional microtubule-organizing centres by a phenylcarbamate, during plant mitosis. **Protoplasma**, v. 204, n. 3–4, p. 119–127, 1998.

GRAÑA, E. Mitotic Index. *Em: Advances in Plant Ecophysiology Techniques*. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 231–240.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. F.; ZINOV'EVA-STAHEVITCH, A. E.; ZURA, K. D. Plant Genetic Test Systems for the Detection of Chemical Mutagens. *Em: STICH, H. F.; SAN, R. H. C. Short-Term Tests for Chemical Carcinogens. Topics in Environmental Physiology and Medicine*. New York, NY: Springer, 1981. p. 200–216.

GRILLO, R.; PEREIRA, A. E. S.; NISHISAKA, C. S.; DE LIMA, R.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L. F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 163–171, 2014.

GRISOLIA, C. K.; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 1, p. 123–126, 2004.

HAMMETT, F. S. Studies in the Biology of Metals. I. The localization of lead by growing roots. **Protoplasma**, v. 4, n. 1, p. 183–186, 1928a.

HAMMETT, F. S. Studies in the biology of metals. II. The retardative influence of lead on root growth. **Protoplasma**, v. 4, n. 1, p. 187–191, 1928b.

HAMMETT, F. S. Studies in the biology of metals. III. The localization of lead within the cell of the growing root. **Protoplasma**, v. 5, n. 1, p. 135–141, 1928c.

HAMMETT, F. S. Studies in the biology of metals. IV. The influence of lead on mitosis and cell size in the growing root. **Protoplasma**, v. 5, n. 1, p. 535–542, 1928d.

HAMMETT, F. S. Studies in the biology of metals. VI. The nature of the lead compound deposited the growing root. **Protoplasma**, v. 5, n. 1, p. 547–562, 1928e.

HAMMETT, F. S.; JUSTICE, E. S. Studies in the biology of metals. V. The selective fixation of lead by root nuclei in mitosis. **Protoplasma**, v. 5, n. 1, p. 543–546, 1928.

JAIN, A. K.; SINGH, D.; DUBEY, K.; MAURYA, R.; PANDEY, A. K. Chromosomal Aberrations. *Em*: KUMAR, A.; DOBROVOLSKY, V. N.; DHAWAN, A.; SHANKER, R. **Mutagenicity: Assays and Applications**. Academic Press Elsevier, 2018. p. 69–92.

KARAISSMAILIOGLU, M. C. Investigation of the potential toxic effects of prometryne herbicide on *Allium cepa* root tip cells with mitotic activity, chromosome aberration, micronucleus frequency, nuclear DNA amount and comet assay. **Caryologia**, v. 68, n. 4, p. 323–329, 2015.

KARAMI-MOHAJERI, S.; ABDOLLAHI, M. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates. **Human & Experimental Toxicology**, v. 30, n. 9, p. 1119–1140, 2011.

KATSUDA, Y. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. **Pesticide Science**, v. 55, n. 8, p. 775–782, 1999.

KONSTANTINOOU, I.; HELA, D.; LAMBROPOULOU, D.; ALBANIS, T. Monitoring and Assessment of Pesticides and Transformation Products in the Environment. *Em*: TADEO, J. L. **Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples**. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 365–413.

KUMAR, S.; SINGH, A. Biopesticides: Present Status and the Future Prospects. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, p. 1000e129, 2015.

KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 949–954, 2010.

LALLEMAND, M. S. Relations existant entre les examens cytologiques et les mesures de croissance pratiquées sur des racines irradiées d' *Allium cepa*. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 77, n. 3, p. 274–275, 1930a.

LALLEMAND, M. S. Étude cytologique de l'action des rayons X sur les racines d' *Allium cepa*. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 77, n. 2, p. 192–196, 1930b.

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

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471–486, 1938.

LEVAN, A. The influence on chromosomes and mitosis of chemicals, as studied by the *Allium* test. **Hereditas**, v. 35, n. S1, p. 325–337, 1949.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050–1064, 2016.

LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1056–1061, 2010.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 1, p. 61–64, 2011.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 38–42, 2015.

LIVANOS, P.; GALATIS, B.; QUADER, H.; APOSTOLAKOS, P. Disturbance of reactive oxygen species homeostasis induces atypical tubulin polymer formation and affects mitosis in root-tip cells of *Triticum turgidum* and *Arabidopsis thaliana*. **Cytoskeleton**, v. 69, n. 1, p. 1–21, 2012.

MA, T.-H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 103–106, 1999.

MACAR, O. Multiple toxic effects of tetraconazole in *Allium cepa* L. meristematic cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 10092–10099, 2021a.

MACAR, T. K. Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in *Allium cepa* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 2, p. 2391–2399, 2021b.

MAGDALENO, A.; PERALTA GAVENSKY, M.; FASSIANO, A. V.; RÍOS DE MOLINA, M. C.; SANTOS, M.; MARCH, H.; MORETTON, J.; JUÁREZ, Á. B. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 23, p. 19194–19202, 2015.

MAHMOOD, I.; IMADI, S. R.; SHAZADI, K.; GUL, A.; HAKEEM, K. R. Effects of Pesticides on Environment. *Em*: HAKEEM, K. R.; AKHTAR, M. S.; ABDULLAH, S. N. A. **Plant, Soil and Microbes**. Cham: Springer, Cham, 2016. p. 253–269.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221–226, 2004.

MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications**. Elsevier, 2003. 997 p.

MATAGNE, R. Duration of Mitotic Cycle and Patterns of DNA Replication in Chromosomes of *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 21, n. 3, p. 209–224, 1968.

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.

- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q.; SUÁREZ, J. P. R. Cytogenotoxic effect of propanil using the *Lens culinaris* Med and *Allium cepa* L test. **Chemosphere**, v. 249, p. 126193, 2020.
- MERT, M.; BETÜL, B. Investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of the *Euphorbia rigida* bieb. Extract. **Caryologia**, v. 73, n. 4, p. 65–75, 2020.
- NAIR, R.; VARGHESE, S. H.; NAIR, B. G.; MAEKAWA, T.; YOSHIDA, Y.; KUMAR, D. S. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Science**, v. 179, n. 3, p. 154–163, 2010.
- ODJEGBA, V. J.; ADENIRAN, R. A. Bentazone herbicide induces genotoxic effect and physiological disorders in non-targeted *Allium cepa* L. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 375–379, 2015.
- OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 38–43, 2013.
- ÖZKARA, A. Assessment of cytotoxicity and mutagenicity of insecticide demond EC 25 in *Allium cepa* and ames test. **Caryologia**, v. 72, n. 2, p. 21–27, 2019.
- PARRA-ARROYO, L.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, R. B.; CASTILLO-ZACARÍAS, C.; MELCHOR MARTÍNEZ, E. M.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N.; BARCELÓ, D.; PARRA-SALDÍVAR, R. Highly hazardous pesticides and related pollutants: Toxicological, regulatory, and analytical aspects. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 151879, 2022.
- PATEL, B. V.; CHAWLA, S.; GOR, H.; UPADHYAY, P.; PARMAR, K. D.; PATEL, A. R.; SHAH, P. G. Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 20871–20881, 2016.
- PEREIRA, A. E. S.; GRILLO, R.; MELLO, N. F. S.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, 2014.
- PRIVETTE, L. M.; PETTY, E. M. CHFR: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. **Translational Oncology**, v. 1, n. 2, p. 57–64, 2008.

QGIS.ORG. **QGIS Geographic Information System, Version 3.4. QGIS Association.** 2019.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing, Version 3.6.1. R Foundation for Statistical Computing.** Vienna, Austria. 2017.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 1, p. 17–24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1–2, p. 121–127, 1997.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R, Version 1.2.1335. RStudio, PBC.** Boston, MA. 2019.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The Principles of Humane Experimental Technique.** London: Methuen & Co. Limited, 1959. 252 p.

SAHOO, S. K.; MANDAL, K.; SINGH, G.; KUMAR, R.; CHAHIL, G. S.; BATTU, R. S.; SINGH, B. Residual behavior of quizalofop ethyl on onion (*Allium cepa* L.). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1711–1718, 2013.

SCHERMERHORN, P. G.; GOLDEN, P. E.; KRYNITSKY, A. J.; LEIMKUEHLER, W. M. Determination of 22 Triazole Compounds Including Parent Fungicides and Metabolites in Apples, Peaches, Flour, and Water by Liquid Chromatography/TandemMass Spectrometry. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 88, n. 5, p. 1491–1502, 2005.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, n. 3–4, p. 171–179, 1996.

SONDHIA, S. Persistence and bioaccumulation of oxyfluorfen residues in onion. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 162, n. 1–4, p. 163–168, 2010.

SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. Assessment of malathion toxicity on cytophysiological activity, DNA damage and antioxidant enzymes in root of *Allium cepa* model. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 886, 2020.

TADEO, J. L.; ALBERO, B.; PÉREZ, R. A. Pesticides: Classification and Properties. Em: TADEO, J. L. **Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples**. Boca Raton: CRC Press, 2019. p. 1–40.

TARTAR, G.; KAYMAK, F.; MURANLI, F. D. G. Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 241–247, 2006.

TRIPATHI, D. K.; SHWETA; SINGH, S.; SINGH, S.; PANDEY, R.; SINGH, V. P.; SHARMA, N. C.; PRASAD, S. M.; DUBEY, N. K.; CHAUHAN, D. K. An overview on manufactured nanoparticles in plants: Uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 110, p. 2–12, 2017.

TSIROPOULOS, N. G.; MILIADIS, G. E. Field Persistence Studies on Pendimethalin Residues in Onions and Soil after Herbicide Postemergence Application in Onion Cultivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 291–295, 1998.

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

VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L. - A biomarker based study. **Chemosphere**, v. 206, p. 248–254, 2018.

WORLDOMETERS.INFO. **Pesticide Use by Country**. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/food-agriculture/pesticides-by-country/>>. Acesso em: 24 maio. 2021.

YENİ, O.; TEOMAN, Ö. The Agriculture–Environment Relationship and Environment-based Agricultural Support Instruments in Turkey. **European Review**, p. 1–25, 2020.

YÜZBAŞIOĞLU, D. Cytogenetic Effects of Fungicide Afugan on the Meristematic Cells of *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 68, n. 3, p. 237–243, 2003.

YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; SANCAK, C. Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. **Turkish Journal of Biology**, v. 33, n. 4, p. 283–290, 2009.

ZELJEZIC, D.; GARAJ-VRHOVAC, V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. **Toxicology**, v. 200, n. 1, p. 39–47, 2004.

ARTIGO 2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À PESTICIDA A BASE DE FLUOPIRAM EM *Allium cepa*

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹, Natanael Alves da Silva¹, Gabriela Gomes Lima¹, Luciana Souza Onde¹, Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão¹, Virgínia Damin² & Luciane Madureira de Almeida¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central – Sede Anápolis - Ciências Exatas e tecnológicas, 459, Br 153, nº 3.105, CEP: 75132-903, Anápolis-Go, Brasil

²Herbil, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia - Campus Samambaia, Av. Esperança s/n, CEP: 74.690-900, Goiânia-Go, Brasil

Resumo – O fluopiram é uma molécula que possui propriedades fungicida e nematocida. Embora pesticidas a base de fluopiram sejam utilizados, seu potencial genotóxico ainda não foi completamente avaliado. Este estudo teve como objetivo avaliar a citogenotoxicidade de uma formulação comercial de pesticida à base de fluopiram em células de raiz de *Allium cepa*. Para isso, foram testadas quatro concentrações do pesticida (5,00 mg mL⁻¹ (3×), 1,67 mg mL⁻¹ (campo), 0,835 mg mL⁻¹ (50%), e 0,17 mg mL⁻¹ (10%)) em raízes de *A. cepa*. Após a exposição de 48 horas, as raízes foram submetidas a uma fase de recuperação em água destilada por mais 48 horas. Os parâmetros avaliados foram peroxidação lipídica, viabilidade celular e danos citogenéticos. Os resultados demonstraram que o pesticida à base de fluopiram não causou peroxidação lipídica, mas desencadeou efeitos citotóxicos e genotóxicos nas células de *A. cepa*. Na maior concentração testada, houve um aumento na viabilidade celular, evidenciado pelos corantes vitais, tanto na exposição quanto na recuperação. O índice mitótico foi estimulado na concentração 0,835 mg mL⁻¹ durante a exposição. Porém, ao final da recuperação, houve redução do índice mitótico nas concentrações 1,67 mg mL⁻¹, 0,835 mg mL⁻¹, e 0,17 mg mL⁻¹ abaixo de -50%, indicando efeitos subletais da exposição ao pesticida. O pesticida também interferiu nas fases mitóticas, aumentando a frequência de células em prófase. Além disso induziu anormalidade nucleares e aberrações cromossômicas. Os resultados demonstram que o pesticida possui potencial genotóxico por causar anormalidades nucleares e aberrações cromossômicas em raízes de *A. cepa*. Os efeitos variaram conforme a concentração do pesticida e a fase (exposição ou recuperação). Entretanto a recuperação mitiga os danos, mas não reverte os efeitos. Este estudo contribui para a compreensão dos efeitos associados ao uso de pesticida que possuem o fluopiram como ingrediente ativo e ressalta a importância de monitorar seu impacto ambiental e em organismos não-alvo.

Palavras-chave: aberrações, anormalidades, biomonitoramento, ecotoxicologia, toxicologia.

2.1 INTRODUÇÃO

Pesticidas são utilizados para combater pragas, garantindo a segurança de plantações. Entretanto o uso crescente de pesticidas tem causado preocupações devido aos efeitos danosos para o meio ambiente e o homem (ABUBAKAR *et al.*, 2020). O fluopiram é uma molécula sintética que possui propriedades antifúngicas e antinematicidas, atuando como inibidor da enzima succinato desidrogenase (SDH) (LEWIS *et al.*, 2016). Por ser uma molécula presente em formulações comerciais de pesticida, tende a se acumular no solo e na água, com tempo de residência de 35,5 dias (QANUNGO; KUMARI; THAKUR, 2023). Outros estudos identificaram persistência considerável no ambiente, com variações de meia-vida que depende de condições ambientais e tipo de solo (> 30 dias) (CHAWLA *et al.*, 2018; YOGENDRAIAH MATADHA *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2021). Além disso, de acordo com o índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (Groundwater Ubiquity Score, GUS) e o método de Goss, o fluopiram possui alto potencial de contaminação em águas superficiais e subterrâneas (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020; RATHOD *et al.*, 2022). Outro problema é que a degradação do fluopiram pode apresentar riscos ao ambiente devido a produtos de transformação potencialmente tóxicos (HU; PANG; DONG, 2019).

Apesar de ser eficiente no controle de pragas, o fluopiram pode provocar estresse oxidativo em organismos não-alvo (LIU *et al.*, 2022), alterar a comunidade microbiana do solo (SUN *et al.*, 2020) e apresentar efeitos de toxicidade e carcinogenicidade em vertebrados (TINWELL *et al.*, 2014; APVMA, 2015). Além disso, inibidores da succinato desidrogenase (SDHIs), grupo o qual o fluopiram faz parte, embora sejam eficazes no controle de fungos, apresentam efeitos significativos devido à sua falta de especificidade e capacidade de inibir múltiplos complexos da cadeia respiratória, afetando organismos não-alvo, incluindo humanos (BÉNIT *et al.*, 2019). Portanto, o uso e a segurança do fluopiram devem ser monitorados, principalmente em relação ao seu potencial de provocar danos genotóxicos, uma vez que existem poucos estudos avaliando esse aspecto.

Uma forma de monitorar os efeitos do fluopiram é através do uso do bioensaio *Allium cepa*. O bioensaio com *A. cepa* é amplamente reconhecido como um teste eficaz para investigar a citogenotoxicidade de pesticidas devido à sua simplicidade, confiabilidade, baixo custo, alta sensibilidade para detectar danos cromossômicos, boa correlação com outros sistemas de teste e flexibilidade para avaliar diferentes desfechos. Esses fatores combinados fazem do *A. cepa* um modelo valioso para estudos de toxicidade ambiental (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022).

Nesta investigação, a citogenotoxicidade do fluopiram foi avaliada, utilizando uma formulação comercial, em células de raiz de *A. cepa*. Investigamos a influência de diferentes

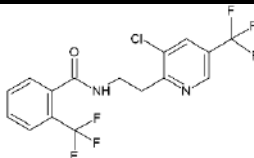
concentrações do pesticida, baseadas na concentração de campo do produto, o que permite concluir se a concentração utilizada é segura. Também foi investigado se os efeitos causados pela exposição podem ser recuperados após a retirada do pesticida. A importância deste estudo reside em contribuir para o entendimento dos efeitos associados ao uso do fluopiram.

2.2 METODOLOGIA

Material

O pesticida utilizado no experimento foi o Verango® Prime (Fluopiram – 500 g L⁻¹, Bayer), doado por um agrônomo. As concentrações finais testadas foram baseadas na concentração de campo recomendada para pré-emergência da cultura de soja (0,5 L ha⁻¹ do produto em 150 L ha⁻¹ de água). Foram testadas quatro concentrações do pesticida: 5,00 mg mL⁻¹ (3×), 1,67 mg mL⁻¹ (campo), 0,835 mg mL⁻¹ (50%), e 0,17 mg mL⁻¹ (10%). As concentrações foram preparadas utilizando água destilada e considerando a quantidade de princípio ativo presente na formulação. A Tabela 2.1 contém as propriedades químicas do princípio ativo fluopiram.

Tabela 2.1 – Propriedades químicas do fluopiram, princípio ativo do Verango® Prime.

Nome comum ^a	Nome CAS ^a	Fórmula ^a	Estrutura química ^b	Áreas de uso ^a
Fluopiram	N-(2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl)ethyl)-2-(trifluoromethyl)benzamide	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O		Fungicida nematicida

^aLEWIS *et al.*, 2016

^bChemSpider ID: 9333461

Procedimento experimental

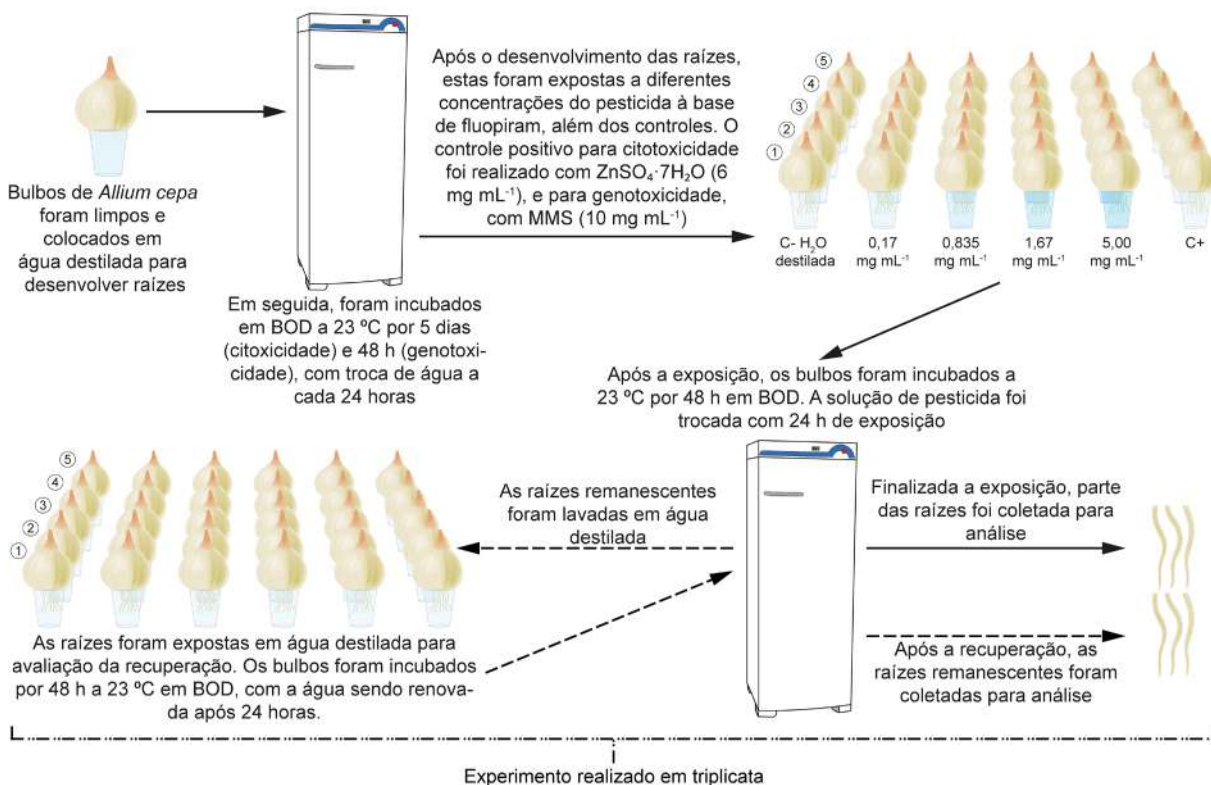
O experimento foi realizado quatro vezes, com diferentes objetivos em cada montagem. O primeiro experimento teve como objetivo a obtenção de raízes para avaliação da peroxidação lipídica, pela quantificação de malondialdeído (MDA), marcador de estresse oxidativo e dano celular. A segunda e terceira montagem foram realizadas para obter raízes para os corantes de viabilidade celular, azul de Evans e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). A quarta montagem foi destinada à obtenção de raízes para confecção de lâminas citológicas para análises do índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN). As repetições foram necessárias pois somente um experimento não iria fornecer a quantidade de raízes para a avaliação da exposição e recuperação, feitas nos mesmos bulbos.

Para cada concentração de pesticida e controle negativo e positivo, foram utilizados cinco bulbos. O experimento foi realizado em triplicata para cada montagem, totalizando 360

bulbos ($\varnothing = 31,03 \pm 0,63$ mm, $19,79 \pm 1,36$ g) da variedade amarela de *Allium cepa* ($2n = 2x = 16$ cromossomos) obtidos no Centro Estadual de Abastecimento (CEASA) de Anápolis, Goiás.

Inicialmente as cebolas foram limpas, removendo os catafilos externos e removendo o excesso de raízes secas na região do prato, garantindo que os primórdios das raízes não fossem danificados. Após os bulbos foram colocados para desenvolverem raízes em contato (apenas a região do prato) com água destilada por cinco dias (citotoxicidade) e 48 h (genotoxicidade) em BOD a 23 °C, com a água destilada sendo trocada a cada 24 h. Posteriormente os bulbos, com as raízes crescidas, foram expostos às concentrações de pesticidas, mais os controles, por 48 h a 23 °C em BOD. As soluções de pesticida foram trocadas com 24 h de exposição. Após o período de exposição, as raízes foram coletadas, e as raízes remanescentes foram lavadas e colocadas em contato com água destilada para a fase de recuperação por 48 h. Durante a fase de recuperação, os bulbos também foram mantidos em BOD a 23 °C com renovação da água destilada após 24 h (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Esquema experimental para avaliação dos efeitos do pesticida à base de fluopiram em parâmetros avaliados nas raízes de *Allium cepa*.



Fonte: elaborado pelo autor.

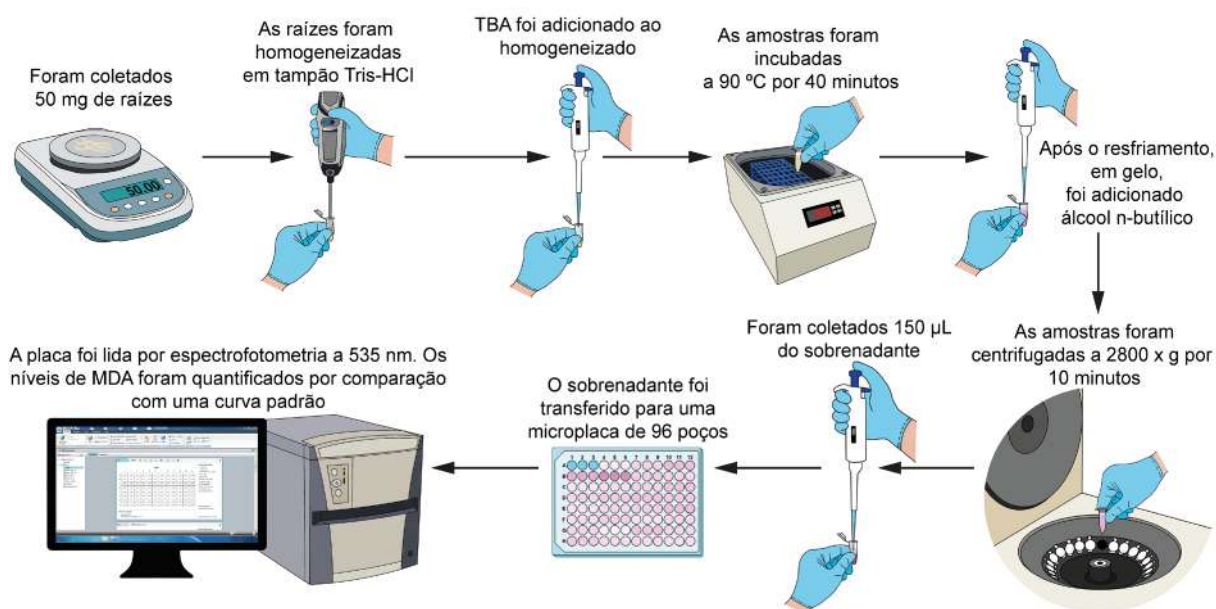
Para o controle positivo na avaliação da citotoxicidade, foi utilizado sulfato de zinco heptahidratado (6 mg mL^{-1}) (MATTOS *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2020). Para a avaliação da

genotoxicidade, utilizou-se metanossulfonato de metila (10 mg mL^{-1}) (LIMAN; CİĞERCI; ÖZTÜRK, 2015). Para o controle negativo, foi utilizado água destilada.

Peroxidação lipídica

Após as etapas de exposição e recuperação, de cada bulbo, foram coletados 50 mg de raízes, que foram armazenadas em freezer -80°C . Para determinar os níveis de malondialdeído (MDA), foi utilizado o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme Camilo-Cotrim *et al.* (2022) com modificação somente na proporção do volume do tampão utilizado na homogeneização, volume de álcool n-butílico e volume usado na leitura (Figura 2.2). As amostras foram homogeneizadas em $200 \mu\text{L}$ (1:4, m:v) de tampão Tris-HCl 0,1 M; pH 8 com auxílio de micro homogeneizador (Marconi, MA1102). Em seguida, $150 \mu\text{L}$ de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,03 M foram adicionados em cada amostra. Após as amostras foram encubadas a 90°C por 40 min, sendo refrigeradas em gelo após a finalização. Quando estavam geladas, foram adicionados $550 \mu\text{L}$ de álcool n-butílico e as amostras foram agitadas e centrifugadas a $2.800 \times g$ (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 16R) por 10 min para extração do produto formado entre MDA e TBA no álcool n-butílico.

Figura 2.2 – Esquema do passo a passo para a análise de malondialdeído (MDA) como marcador de peroxidação lipídica em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.



Fonte: elaborado pelo autor.

Medimos os níveis de MDA a partir da leitura por espectrofotometria (SpectraMax® Paradigm® Multi-mode Detection Platform) de $150 \mu\text{L}$ do sobrenadante a 535 nm , utilizando uma microplaca de 96 poços. Quantificamos os níveis de MDA por comparação com uma curva padrão, com diferentes concentrações de MDA obtidas pela hidrólise de 1,1,3,3-tetra-

hidroxipropano (TEP) 0,1 mM reagido com TBA submetido às mesmas condições das amostras. Os dados foram expressos em nmol mg^{-1} de tecido.

O seguinte cálculo foi empregado para calcular o valor final de MDA de cada amostra:

$$\left\{ \frac{\left(\frac{m - \beta}{\alpha} \right)}{\left[\left(\frac{mg}{Vb} \right) \times Va \right]} \right\}$$

Onde:

m: média da absorbância;

α : valor do coeficiente angular da curva padrão;

β : valor do coeficiente linear da curva padrão;

mg: miligrama de tecido utilizado;

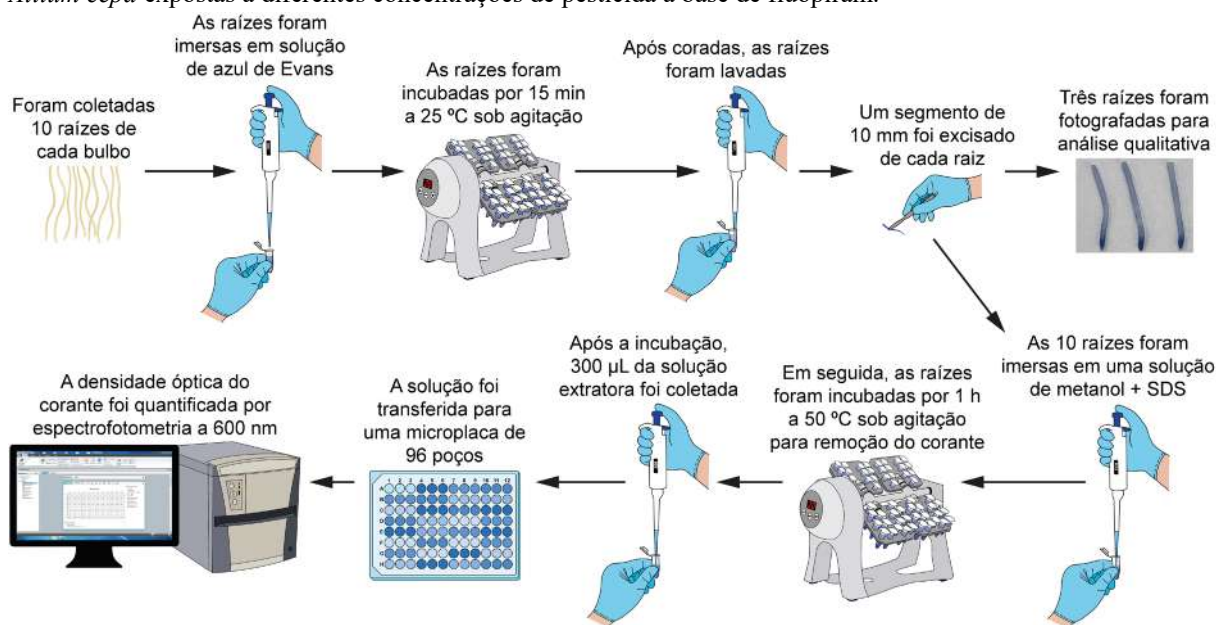
Vb: volume de butanol;

Va: volume usado de amostra.

Viabilidade celular

Para avaliar a morte celular, foi utilizado o corante azul de Evans, com modificações na metodologia de Tsai e Huang (2006). Após o período de exposição e recuperação, dez raízes, de cada bulbo, foram removidas e lavadas, três vezes, em água destilada para remover qualquer resíduo de pesticida (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Esquema metodológico para a avaliação da morte celular com corante azul de Evans em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.

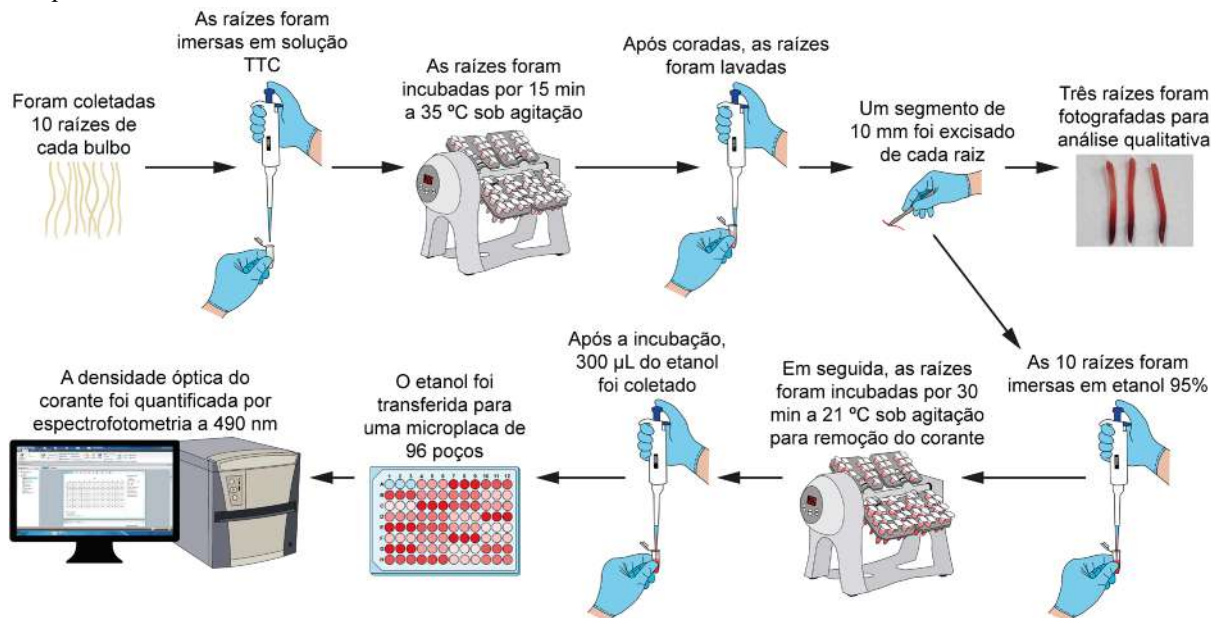


Fonte: elaborado pelo autor.

Em seguida, as raízes foram imersas em 1,5 mL de solução de azul de Evans 2,6 mM por 15 min a 25 °C sob agitação. Após a coloração, as raízes foram lavadas em água destilada até que a água deixasse de apresentar cor. Para análise 10 mm extremos das pontas das raízes coradas foram excisados. Para análise qualitativa, três raízes de cada tratamento foram fotografadas. Já para a análise quantitativa, as dez raízes foram colocadas em microtubo e adicionou-se 1 mL de solução extratora, metanol mais dodecil sulfato de sódio (metanol 50% + SDS 35 mM). As raízes foram então encubadas por 1 h a 50 °C sob agitação para remoção do corante. A densidade óptica (DO) do corante excretado pelas raízes foi quantificado a partir da leitura por espectrofotometria (SpectraMax® Paradigm® Multi-mode Detection Platform) de 300 µL da solução extratora a 600 nm, utilizando uma microplaca de 96 poços. O valor foi dado em DO, quanto mais elevada for a DO, mais morte celular houve.

Para avaliar células metabolicamente ativas, foi utilizado o TTC (SHAYMURAT *et al.*, 2012; PRAJITHA; THOPPIL, 2017). Novamente dez raízes foram removidas de cada bulbo, em cada etapa, e lavadas em água destilada (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Esquema metodológico para a avaliação de células metabolicamente ativas utilizando cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.



Fonte: elaborado pelo autor.

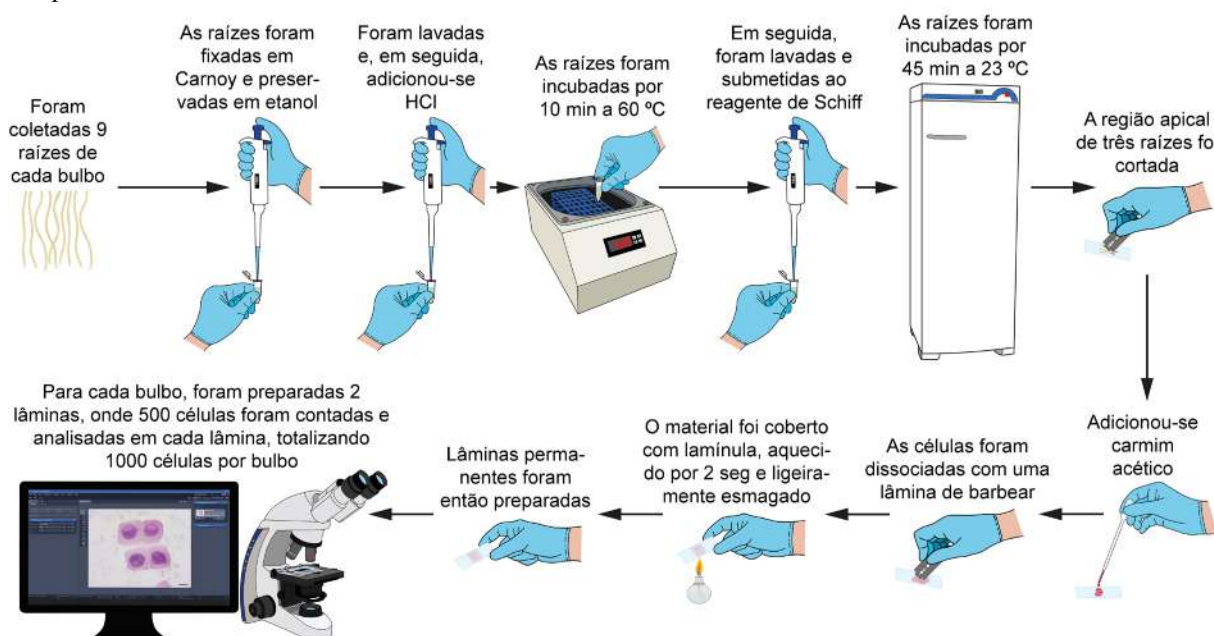
Após as raízes foram colocadas em microtubo e adicionou-se 1 mL de solução TTC 15 mM. Após o microtubos foram incubados a 35 °C por 15 min, sob agitação no escuro. Finalizado o tempo, as raízes foram lavadas em água destilada e 10 mm extremos das pontas das raízes coradas foram excisados. Para análise qualitativa, três raízes de cada tratamento foram fotografadas. Já para a análise quantitativa, as dez raízes foram colocadas em microtubo

e adicionou-se 1 mL de etanol 95%. Os tubos foram incubados novamente a 21 °C no escuro sob agitação para remoção do corante no etanol. A densidade óptica (DO) do corante excretado pelas raízes foi quantificado a partir da leitura por espectrofotometria (SpectraMax® Paradigm® Multi-mode Detection Platform) de 300 µL da solução extratora a 490 nm, utilizando uma microplaca de 96 poços. O valor foi dado em DO, quanto mais elevada for a DO, mais metabolicamente ativa estavam as células, indicando que estavam vivas.

Análise citogenética

A análise citogenética foi realizada conforme o protocolo descrito por (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009), com modificações. Após as fases de exposição e recuperação finalizarem, aproximadamente nove raízes em cada fase foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) por 24 h. Após foram transferidas para etanol 70% e marinadas na geladeira até a confecção das lâminas (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Esquema metodológico para a avaliação do índice mitótico, aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares em raízes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.



Fonte: elaborado pelo autor.

No dia do preparo das lâminas, as raízes foram removidas do álcool e lavadas em água destilada, duas vezes. Após foram transferidas para microtubo seco, posteriormente foi adicionado HCl 1 M a 60 °C até as raízes ficarem submersas. Após os tubos foram levados a banho maria por 10 min a 60 °C. As raízes foram lavadas novamente e submetidas ao reagente de Schiff's por 45 min a 23 °C no escuro. Em seguida apenas as regiões apicais meristemáticas de três raízes foram cortadas sobre uma lâmina de microscopia. Foi adicionado carmim acético

2% e as células foram dissociadas com o auxílio de lâmina de barbear e espalhadas na lâmina com um alfinete. O material foi coberto por lamínula, aquecido por dois segundos sobre uma lamparina e ligeiramente esmagado para obter uma melhor distribuição do matérias sobre a lâmina. Após as lâminas foram submersas em nitrogênio líquido para remoção das lamínulas. Depois de secas, foi preparado lâminas permanentes com Entellan. Para cada bulbo foi preparado duas lâminas, onde 500 células foram contadas e analisadas em cada lâmina, totalizando 1.000 células por bulbo (5.000 para cada tratamento $\times$ 3 réplicas experimentais = 15.000). O material foi analisado em microscópio ótico (Primo Star, Carl Zeiss). As fotomicrografias foram realizadas com o módulo de câmera para microscópio – Axiocan 105 color (Carl Zeiss). Os efeitos genotóxicos foram avaliados em células em interfase e em divisão. As aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares foram classificadas com base em Leme e Marin-Morales (2009). Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- i) Índice mitótico (IM), calculado pela seguinte fórmula:

$$IM \text{ por réplica (\%)} = \left(\frac{n^{\circ} \text{ células em divisão por tratamento}}{n^{\circ} \text{ células contadas por tratamento}} \right) * 100$$

- ii) Inibição/estimulação do IM, calculado pela diferença relativa no IM entre controle e o tratamento normalizada pelo IM do controle, multiplicada por -100, onde valores positivos indicam porcentagem de estimulação e negativos a porcentagem de inibição. A seguinte formula foi empregada:

$$Inibição/estimulação \text{ do IM por réplica (\%)} = \frac{IM \text{ controle} - IM \text{ tratamento}}{IM \text{ controle}} * -100$$

- iii) % de fases mitóticas por réplica, calculadas pela seguinte fórmula:

$$Fase \text{ por réplica (\%)} = \left(\frac{fase \text{ particular por tratamento}}{n^{\circ} \text{ células em divisão por tratamento}} \right) * 100$$

- iv) Índice de aberrações cromossômicas (AC), calculado pela fórmula:

$$AC \text{ por réplica (\%)} = \left(\frac{total \text{ de AC}}{n^{\circ} \text{ células contadas por tratamento}} \right) * 100$$

- v) Índice de anormalidades nucleares (AN), calculado pela fórmula:

$$AN \text{ por réplica (\%)} = \left(\frac{total \text{ de AN}}{n^{\circ} \text{ células contadas por tratamento}} \right) * 100$$

- vi) Índice de micronúcleo (Mn), calculado pela fórmula:

$$Mn \text{ por réplica (\%)} = \left(\frac{total \text{ de Mn}}{n^{\circ} \text{ células contadas por tratamento}} \right) * 100$$

- vii) Índice de alteração por réplica, calculado pela fórmula:

$$\text{Alteração por réplica (\%)} = \left(\frac{AC \text{ ou } AN}{n^{\circ} \text{ células contadas por tratamento}} \right) * 100$$

Análise dos dados

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se uma ANOVA mista de duas vias para comparar os efeitos das diferentes concentrações de pesticida e controles e a fase. Essa abordagem permitiu a análise dos efeitos principais das duas variáveis independentes: i) tratamento – variável entre sujeitos, concentrações de pesticida e controles; ii) fase – variável dentro do sujeito, exposição e recuperação, mesmo grupo de bulbos medidos antes e depois. A confiabilidade dos resultados foi assegurada pela verificação dos pressupostos de ausência de outliers significativos, normalidade, homogeneidade das variâncias e covariâncias, e esfericidade. Quando algum dos pressupostos foram violados, a variável resposta foi transformada utilizando transformação Box-Cox. Devido à interação bidirecional significativa entre todas as variáveis de resposta na ANOVA mista, a interação foi decomposta em efeitos principais simples e comparações simples entre pares. Os efeitos principais foram interpretados utilizando uma ANOVA unidirecional para cada nível da variável fase (exposição e recuperação) considerando tratamento como o fator entre os grupos. A análise foi realizada com correção de Bonferroni para ajustar os valores de p. Isso significa que para cada nível da variável fase (exposição e recuperação), foi executada uma ANOVA unidirecional para verificar se há diferenças significativas entre os diferentes tratamentos. Para determinar quais grupos eram diferentes dentro de cada fase, utilizou-se o teste t, com correção de Bonferroni (independência dos grupos), para realizar comparações pareadas entre os diferentes níveis de tratamento. Para identificar as diferenças entre as fases dentro de cada tratamento, foi realizado comparações utilizando o teste t pareado, também com correção de Bonferroni (dependência do mesmo grupo antes e depois).

Além disso, foi realizada uma análise de variância multivariada (PERMANOVA) e uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) para avaliar a semelhança entre os tratamentos de acordo com as variáveis de respostas. A PERMANOVA foi utilizada para determinar diferenças potencialmente significativas na composição global das variáveis de resposta entre tratamentos e fase. A nMDS foi utilizada para mostrar padrões e possíveis agrupamentos de tratamentos e fase com base nas semelhanças entre os grupos. As variáveis respostas foram padronizadas utilizando o método *standardize* do comando *decostand*. A PERMANOVA foi realizada considerando os fatores tratamento e fase, e utilizando 999 permutações com distância Euclidiana.

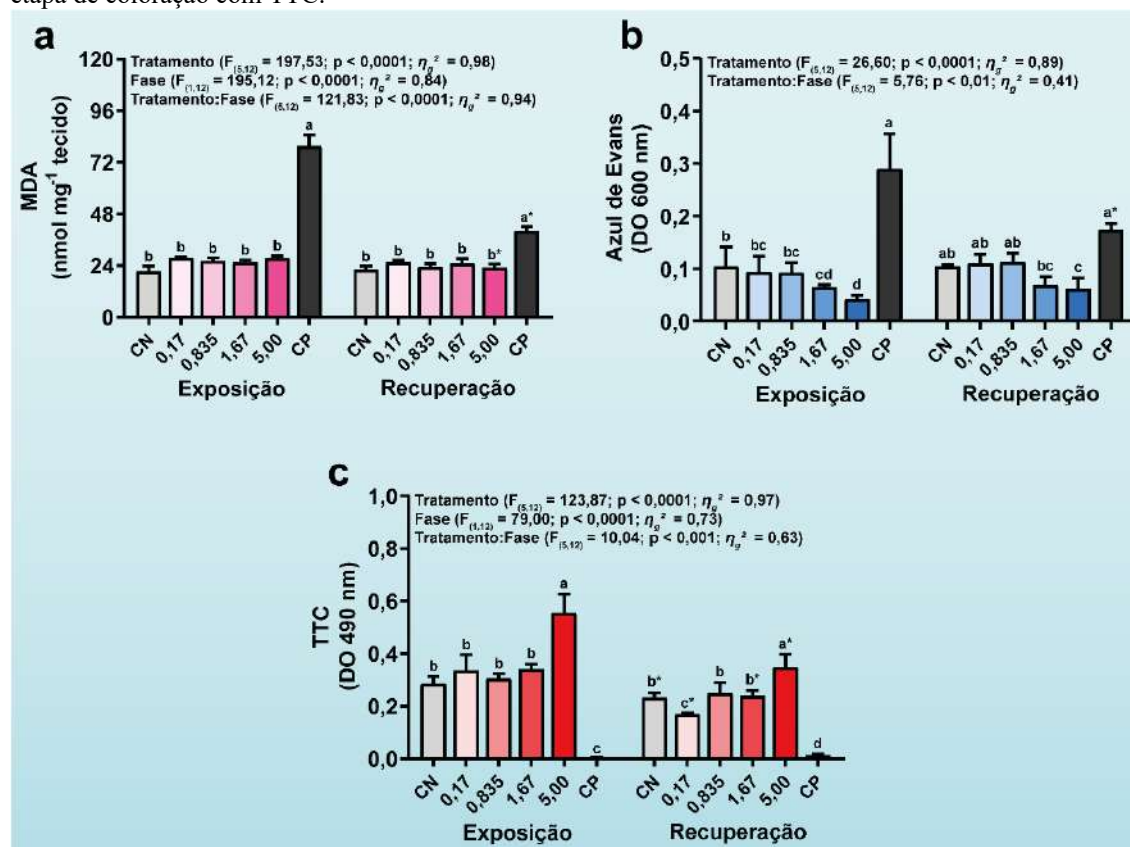
Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *software R* (R CORE TEAM, 2022), versão 4.2.2 e RStudio, versão 2023.03.0 (RSTUDIO TEAM, 2019). Para a análise estatística foi utilizado os pacotes dplyr, MASS, rstatix, tidyverse, vegan. Para a plotagem da nMDS foi necessário o pacote ggplot2. Os demais gráficos foram confeccionados no GraphPad Prism, versão 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com). A composição de figuras foi feita no Adobe Illustrator, versão 24.0.1.

2.3 RESULTADOS

Os resultados da ANOVA mista bidirecional para o estresse oxidativo, medido pelos níveis de MDA, revelaram efeito significativo do tratamento e da fase (exposição ou recuperação), bem como interação entre tratamento e fase ($F_{(5,12)} = 121,83$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,94$). As análises *post-hoc* indicaram diferenças significativas entre os tratamentos durante a fase de exposição ($F_{(5,12)} = 230,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,99$) e recuperação ($F_{(5,12)} = 48,60$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,95$). Comparações mostraram que, durante a exposição e recuperação, todas as concentrações de pesticida e controle negativo diferiram do controle positivo ($p < 0,05$), logo o pesticida não causou peroxidação lipídica. Comparações pareadas mostraram que na fase de recuperação, a concentração de 5,00 mg mL⁻¹ e controle positivo apresentaram diferença ($p < 0,05$) entre a exposição e recuperação, indicando diminuição dos valores de MDA (Figura 2.6a). A diminuição no controle positivo indica diminuição da peroxidação lipídica após o processo de recuperação.

A viabilidade celular avaliada pelo corante azul de Evans apresentou interação significativa entre tratamento e fase ($F_{(5,12)} = 5,76$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,41$) e também efeito simples do tratamento (Figura 2.6b). Houve diferença entre os tratamentos durante a exposição ($F_{(5,12)} = 29,1$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,92$) e recuperação ($F_{(5,12)} = 11,2$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,82$). As comparações mostram que houve redução da densidade óptica durante a fase de exposição nas concentrações de 1,67 e 5,00 mg mL⁻¹ em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Na recuperação somente a concentração 5,00 mg mL⁻¹ estava com níveis reduzidos na densidade óptica. As comparações pareadas mostram que somente o controle positivo apresentou diminuição na fase de recuperação ($p < 0,05$). Os danos demonstram que nas maiores concentrações de pesticida as células estavam mais viáveis.

Figura 2.6 – Parâmetros de citotoxicidade obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação em água destilada. O conjunto de barras próximas ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores de MDA. **b)** Densidade óptica do corante azul de Evans excretado pelas raízes após a etapa de coloração. **c)** Densidade óptica da formazana excretado pelas raízes após a etapa de coloração com TTC.



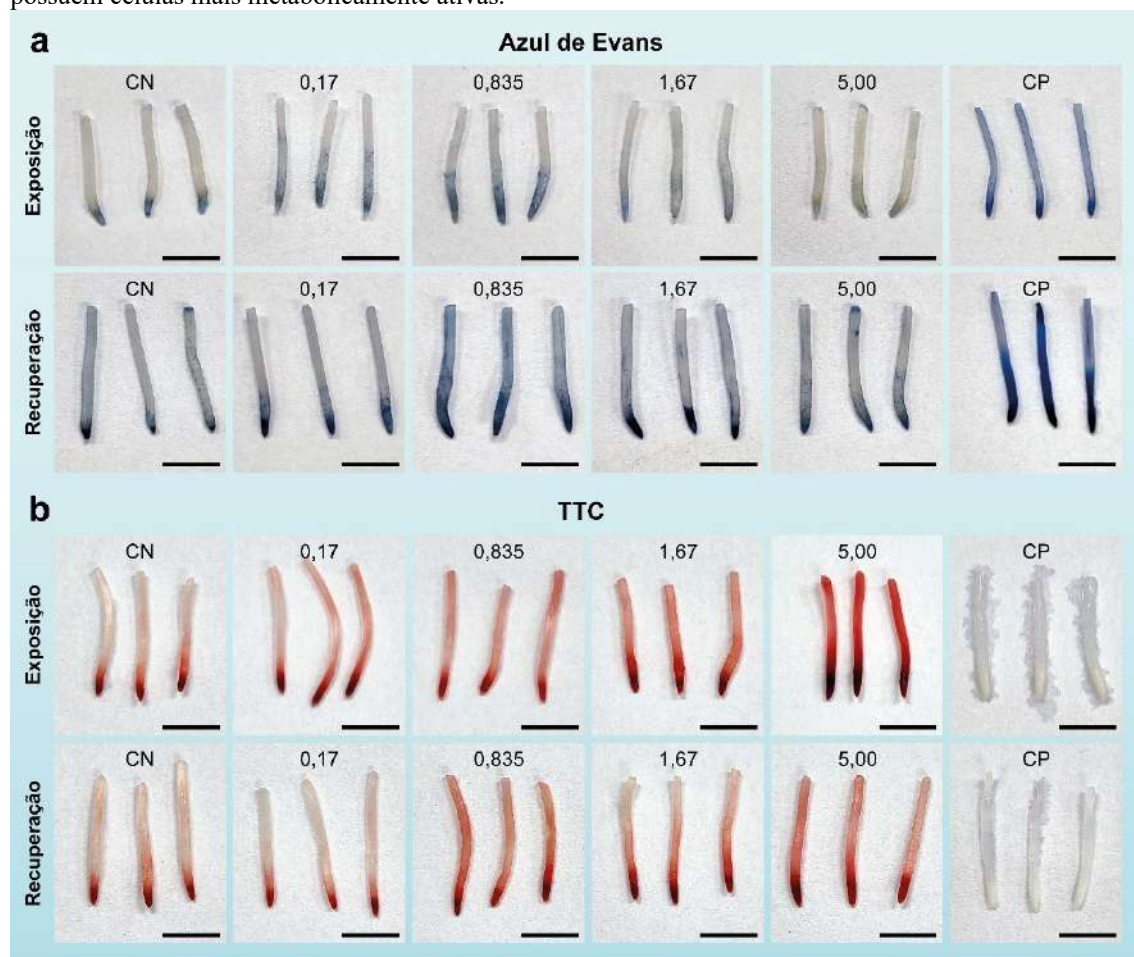
MDA = Malondialdeído, TTC = cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio, CN = controle negativo e CP = controle positivo. Na parte superior do gráfico é apresentado os valores significativos da ANOVA mista de duas vias para cada variável resposta. As letras em cada conjunto de exposição e recuperação são decorrentes da análise da ANOVA unidirecional para cada nível da variável fase, considerando os tratamentos como fator entre os grupos. Letras em comum na mesma barra, na mesma fase, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra, na mesma fase, indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Os asteriscos na fase de recuperação mostram a diferença estatística ($p < 0,05$) devido a comparação pareada, medida repetida, entre os mesmos tratamentos na etapa de exposição. **Fonte:** elaborado pelo autor.

Já para viabilidade celular avaliada pelo TTC, foi observada interação entre tratamento e fase ($F_{(5,12)} = 10,04$; $p < 0,001$; $\eta_p^2 = 0,63$) e efeitos simples de fase e tratamento (Figura 2.6c). As análises *post-hoc* mostraram diferenças significativas entre os tratamentos tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 84,80$; $p < 0,0001$; $\eta_p^2 = 0,97$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 65,70$; $p < 0,0001$; $\eta_p^2 = 0,96$). As comparações em cada fase revelaram que na concentração de 5,00 mg mL⁻¹ houve aumento da densidade óptica em relação as demais concentrações e controles ($p < 0,05$) na fase de exposição e recuperação. Na fase de recuperação a concentração de 0,17 mg mL⁻¹ apresentou redução na densidade óptica em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Comparações pareadas entre as concentrações da fase em cada nível do tratamento mostram

que redução de densidade óptica na fase de recuperação para as concentrações de 0,17 mg mL⁻¹, 1,67 mg mL⁻¹, 5,00 mg mL⁻¹, controle negativo e controle positivo ($p < 0,05$). de forma geral, os dados complementam a análise da viabilidade do azul de Evans, onde nas maiores concentrações do pesticida, as células estavam mais metabolicamente ativas.

A figura 2.7 mostra a análise qualitativa. É possível notar que para o corante azul de Evans, na exposição, a concentração 5,00 mg mL⁻¹ apresenta menos coloração que os outros tratamentos. Já na recuperação apenas 0,835 mg mL⁻¹ e o controle positivo apresentam coloração de azul mais intenso. Já para o TTC, é possível observar que a concentração 5,00 mg mL⁻¹, tanto na exposição quanto na recuperação está mais corada que os outros tratamentos.

Figura 2.7 – Foto das raízes coradas com azul de Evan e TTC após exposição de 48 h as diferentes concentrações do pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação de 48 h em água destilada. **a)** Raízes coradas com azul de Evans. Se a membrana celular está danificada ou comprometida, o corante azul de Evans consegue atravessar a membrana e entrar na célula, resultando na coloração azul. Isso indica uma perda de integridade da membrana celular. Logo, as raízes mais coradas são as que mais sofreram danos devido a exposição. **b)** Raízes coradas com TTC. O TTC é incolor, mas quando é metabolizado pelas desidrogenases mitocondriais presentes nas células vivas, ele é reduzido a formazana, que é um composto de cor vermelha. Portanto, a presença de cor vermelha indica atividade metabólica e, consequentemente, células viáveis e metabolicamente ativas. Logo, as raízes mais coradas de vermelho são aquelas que possuem células mais metabolicamente ativas.



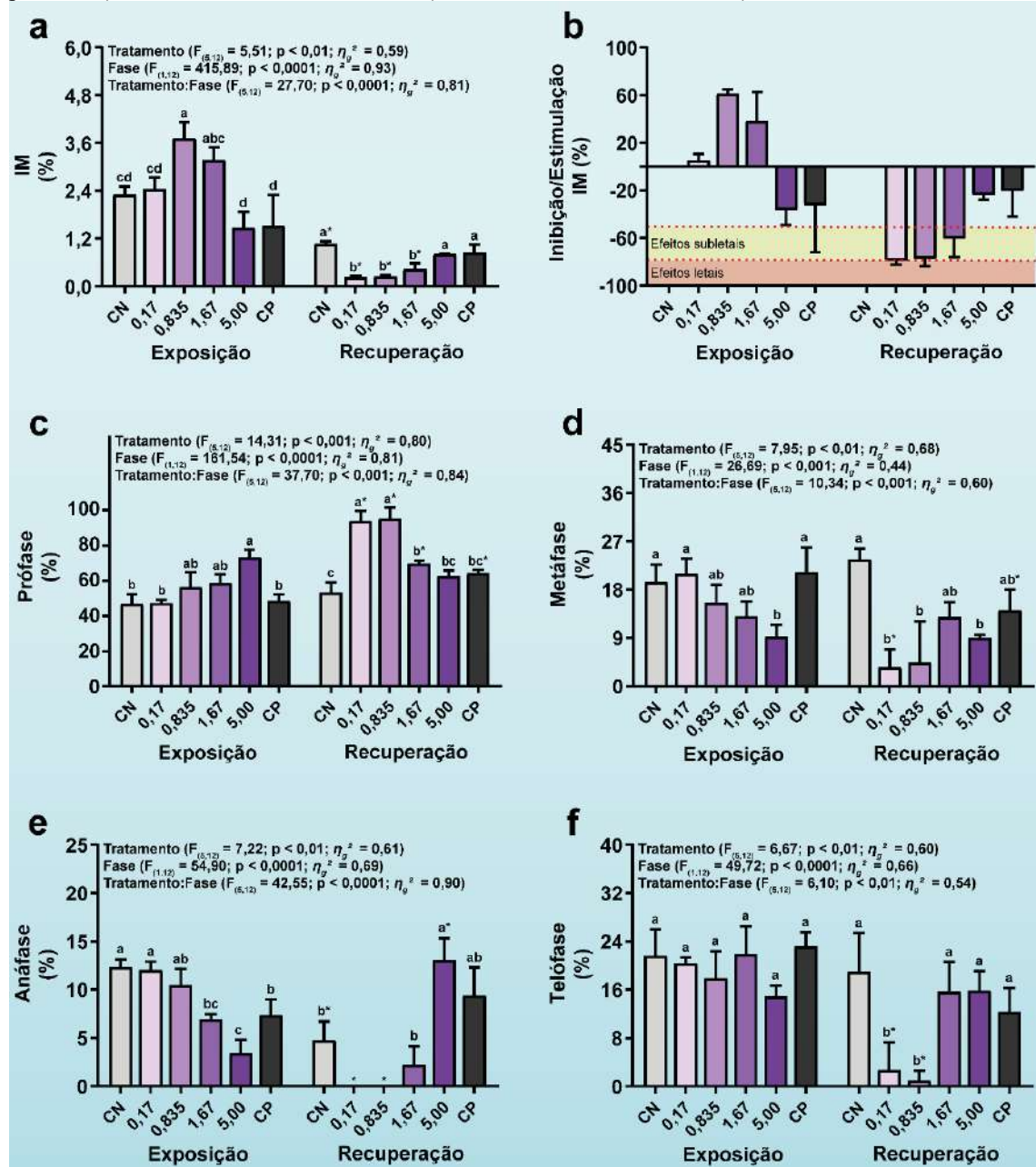
TTC = cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazolio, CN = controle negativo e CP = controle positivo. Barras pretas na horizontas = 5 mm. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A análise do índice mitótico revela que entre tratamento e fase houve interação ($F_{(5,12)} = 27,70$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,81$). Houve também efeito simples de tratamento e fase (Figura 2.8a). Análises *post-hoc* indicaram diferenças significativas entre os tratamentos tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 12,40$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,84$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 30,90$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,93$). Na exposição, houve aumento do índice mitótico na concentração de $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Já na recuperação, houve redução do índice mitótico nas concentrações de $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). As comparações pareadas mostram redução do índice mitótico na fase de recuperação para o controle negativo e as concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação aos mesmos grupos na fase e exposição ($p < 0,05$). Em relação a inibição e estimulação do índice mitótico, as concentrações $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ estimularam o a divisão celular acima de 20% em relação ao índice mitótico do controle negativo, indicando que essas concentrações são mitogênicas, entretanto somente na fase de exposição. Pois, na recuperação, todas as concentrações causaram redução abaixo de 20% em comparação a índice mitótico do controle negativo sendo antimitogênicas (Figura 2.8b).

Em relação as fases mitóticas houve efeito simples de tratamento e fase para todas (Figura 2.8c-f). Porém, todas apresentaram efeito de interação entre tratamento e fase. Para a prófase (interação – $F_{(5,12)} = 37,70$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,84$), nas análises *post-hoc*, a *one-way* ANOVA mostrou efeitos significativos dos níveis de tratamento tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 9,93$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,81$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 36,30$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,94$). Na exposição houve aumento de células em prófase na concentração de $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação ao controle ($p < 0,05$). Já na recuperação havia mais células em prófase nas concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$. Na recuperação houve aumento de células em prófase nas concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação aos mesmos tratamento na fase de exposição (Figura 2.8c).

A metáfase (interação – $F_{(5,12)} = 10,34$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,60$) apresentou valores alterado na fase exposição ($F_{(5,12)} = 6,67$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,74$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 20,2$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,81$). Durante a exposição a concentração $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentou menos células em metáfase ($p < 0,05$). Já na recuperação as concentrações 17 mg mL^{-1} , $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentaram menos células em metáfase em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). As comparações pareadas mostram que entre a concentração 17 mg mL^{-1} e controle positivo, houve redução no número de metáfase entre as fases (Figura 2.8d).

Figura 2.8 – Parâmetros citogenéticos obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopirame e controles, e recuperação em água destilada. O conjunto de barras próximas ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores de IM. **b)** Porcentagem de inibição e estimulação do índice mitótico (IM). A inibição do IM abaixo de -50% em relação ao controle causa efeitos subletais, enquanto a inibição abaixo de -78% causam efeitos letais. Valores positivos indicam estimulação. **c)** Índice de células em prófase. **d)** Índice de células em metáfase. **e)** Índice de células em anáfase. **f)** Índice de células em telófase.



IM = índice mitótico, CN = controle negativo e CP = controle positivo. Na parte superior do gráfico é apresentado os valores significativos da ANOVA mista de duas vias para cada variável resposta. As letras em cada conjunto de exposição e recuperação são decorrentes da análise da ANOVA unidirecional para cada nível da variável fase, considerando os tratamentos como fator entre os grupos. Letras em comum na mesma barra, na mesma fase, não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra, na mesma fase, indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Os asteriscos na fase de recuperação mostram a diferença estatística ($p < 0,05$) devido a comparação pareada, medida repetida, entre os mesmos tratamentos na etapa de exposição. **Fonte:** elaborado pelo autor.

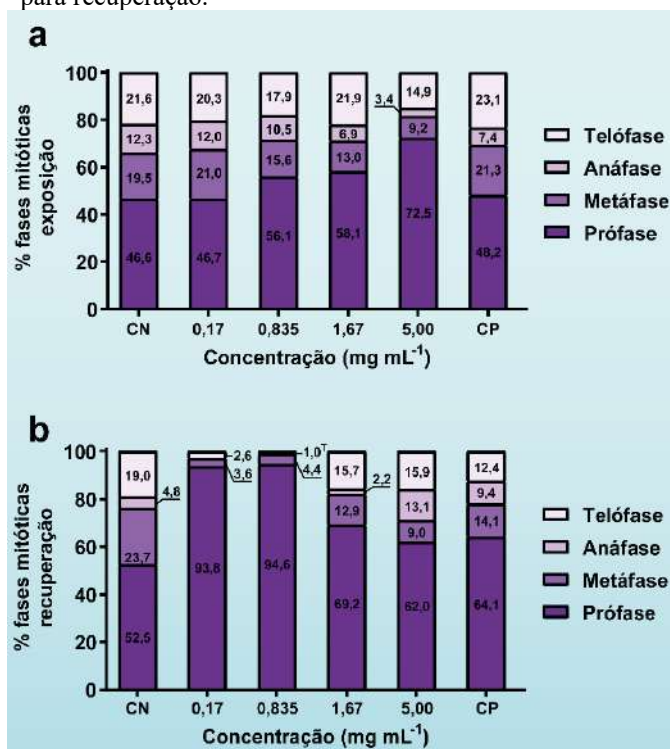
Em relação a anáfase ($F_{(5,12)} = 42,55$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,90$), houve efeitos nos níveis de tratamento nos valores de anáfase tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 23,7$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,91$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 24,3$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,91$). Durante a exposição houve redução da anáfase em células nas concentrações $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Já na recuperação as concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ não apresentaram células em anáfase e a concentração $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentou mais células em anáfase do que o controle negativo ($p < 0,05$). As comparações pareadas mostram redução no número de células em anáfase no controle negativo e nas concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ na fase de recuperação em comparação com os mesmos grupos na exposição ($p < 0,05$). Já a concentração $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ teve mais células em anáfase na recuperação em relação a mesma concentração na exposição ($p < 0,05$) (Figura 2.8e).

Já para a telófase ($F_{(5,12)} = 6,10$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,54$), a *one-way* ANOVA no *post-hoc* indicou efeitos significativos dos níveis de tratamento nos valores de telófase apenas na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 8,82$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,79$). As comparações entre os tratamentos mostram que as concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentarem redução no número de células em telófase em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). As mesmas concentrações, na análise pareada, mostram diferenças com a fase de exposição ($p < 0,05$), apresentando redução (Figura 2.8f).

A figura 2.9 mostra o índice de fases mitóticas para cada fase e em cada tratamento. Tanto na exposição quanto na recuperação o índice de células em prófase foi maior em relação as outras fases da divisão celular, sendo mais da metade de células em divisão em todas as observações.

Para as aberrações cromossômicas, o índice de aberrações cromossômicas indicaram interação entre tratamento e fase ($F_{(5,12)} = 5,95$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,58$) e efeito simples de tratamento e fase (Figura 2.10a). Análises *post-hoc* revelaram diferenças significativas entre os tratamentos tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 9,56$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,80$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 8,99$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,79$). As comparações entre os tratamentos na fase de exposição mostram que o índice de aberrações cromossômicas foi semelhante ao índice do controle positivo ($p > 0,05$) e diferente índice de aberrações do controle negativo ($p < 0,05$). Na fase de recuperação somente a concentração $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ e apresentou índice de aberrações elevado em relação ao controle ($p < 0,05$). Comparações pareadas entre as fases mostraram diferenças significativas para as concentrações de $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ ($p < 0,05$), indicando que o pesticida causa aberrações cromossômicas que podem ser parcialmente revertidas durante a fase de recuperação.

Figura 2.9 – Índice de fases mitóticas em cada fase. **a)** Índice de fases mitóticas obtidas da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles. **b)** Índice de fases mitóticas obtidas da recuperação (48 h) de raízes de *Allium cepa* a água destilada para recuperação.

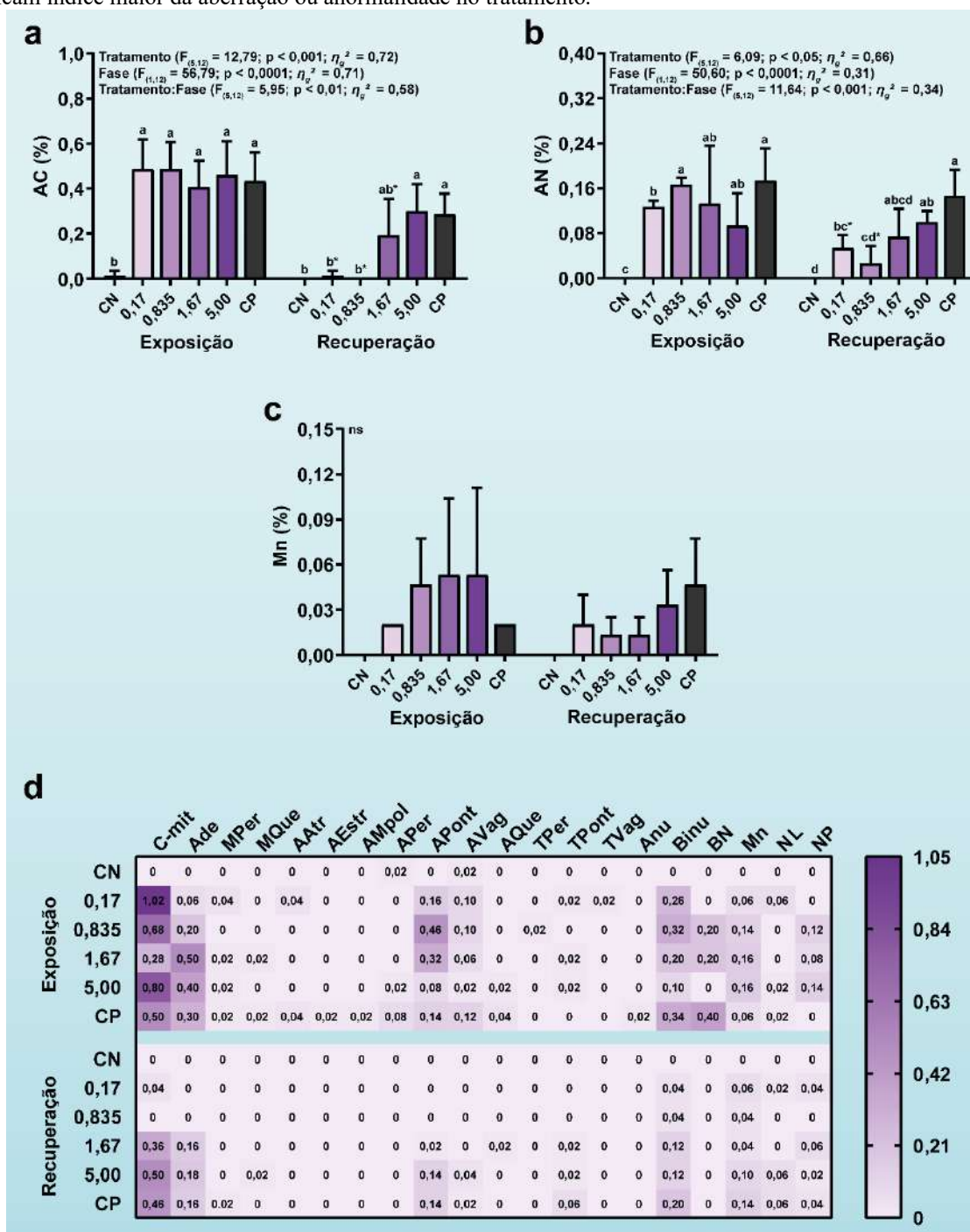


CN = controle negativo e CP = controle positivo. Barras pretas na horizontas = 5 mm. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A análise do índice de anormalidades nucleares também relevou interação significativa entre tratamento e fase ($F_{(5,12)} = 11,64$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,34$). Análises *post-hoc* mostraram diferenças significativas entre os tratamentos tanto na fase de exposição ($F_{(5,12)} = 4,83$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,67$) quanto na fase de recuperação ($F_{(5,12)} = 8,04$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,77$). Na fase de exposição todas as concentrações induziram aberrações cromossômicas em relação ao controle negativo ($p < 0,05$), se assemelhando com o índice de anormalidades do controle positivo ($p > 0,05$). Já na fase de recuperação somente as concentrações $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$ e $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ apresentam valores índice de anormalidades nucleares maiores que o controle negativo ($p < 0,05$). A comparação pareada mostra que apenas $0,17 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,835 \text{ mg mL}^{-1}$ se diferenciam da fase de exposição, indicando que o pesticida induz anormalidades nucleares que são parcialmente recuperadas durante a fase de recuperação (Figura 2.10b).

Em relação ao índice de micronúcleos, a ANOVA mista bidirecional não foi significativa para os efeitos simples de tratamento e fase, e de interação ($p > 0,05$), indicando que não houve uma variação significativa no índice de micronúcleo entre as fases de exposição e recuperação em resposta às diferentes concentrações de pesticida.

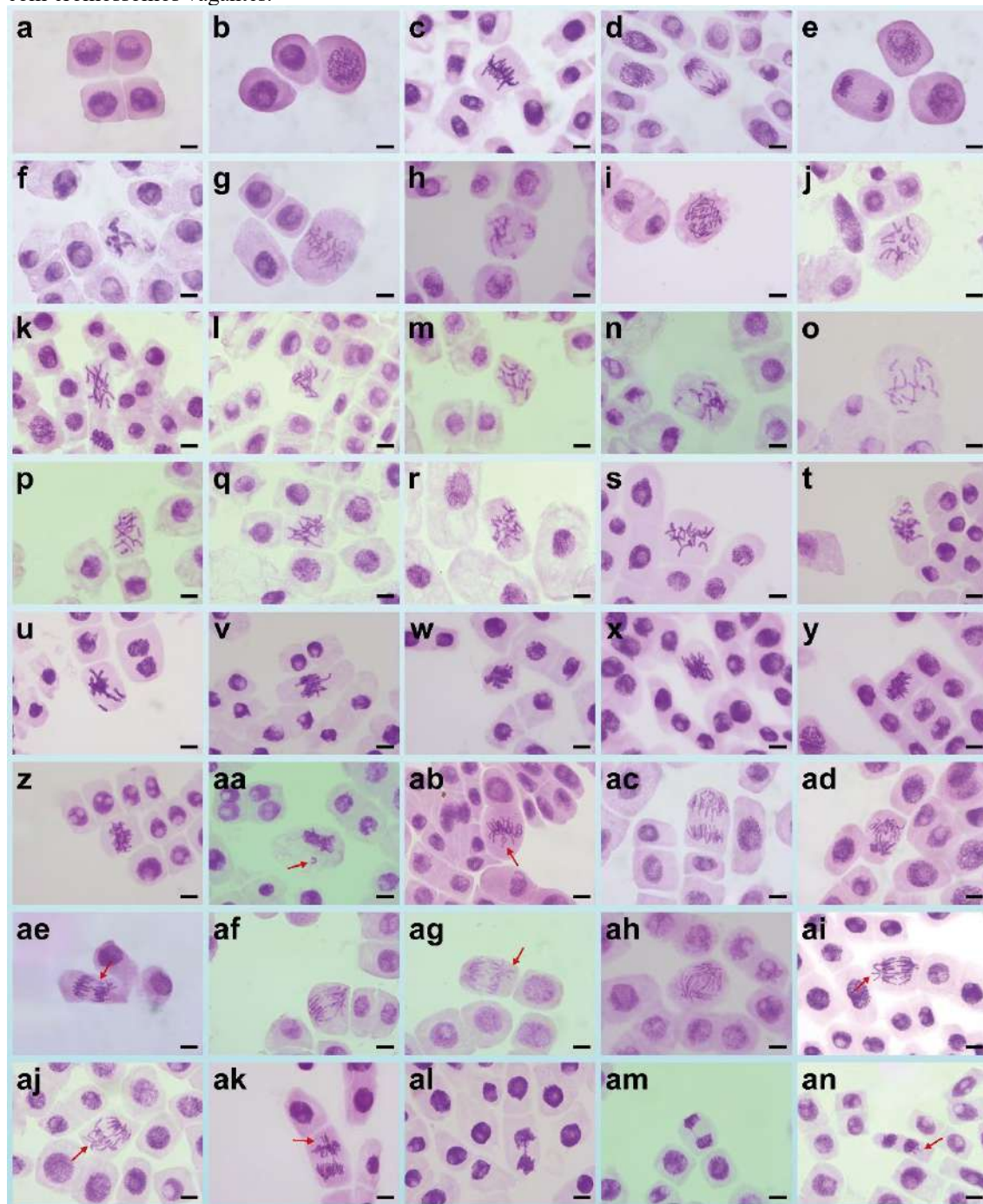
Figura 2.10 – Parâmetros citogenéticos obtidos a partir da exposição de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação em água destilada. Nos gráficos de barras, o conjunto de barras próximas ao eixo y representam a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de exposição (48 h). Já o conjunto mais afastado representa a média e desvio padrão dos tratamentos durante a fase de recuperação (48 h). **a)** Valores do índice de AC. **b)** Valores do índice de AN. **c)** Valores do índice de Mn. **d)** Índice de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares por tratamento e fase. Cores mais escuras, indicam índice maior da aberração ou anormalidade no tratamento.



CN = controle negativo, CP = controle positivo, C-mit = C-mitose, Ade = Aderência cromossômica, MPer = metáfase com perda cromossômica, MQue = metáfase com quebra cromossômica, AAtr = anáfase com atraso cromossômico, AEstr = anáfase estrela, AMpol = anáfase multipolar, APER = anáfase com perda cromossômica, APont = anáfase com ponte cromossômica, AVag = anáfase com cromossomos vagantes, AQue = anáfase com quebra cromossômica, TPer = telófase com perda cromossômica, TPont = telófase com ponte cromossômica, TVag = telófase com cromossomos vagantes, Anu = célula anucleada, Binu = célula binucleada, BN = célula com broto nuclear, Mn = célula com micronúcleo, NL = célula com núcleo lobulado, NP = célula com ponte nuclear. **Fonte:** elaborado pelo autor.

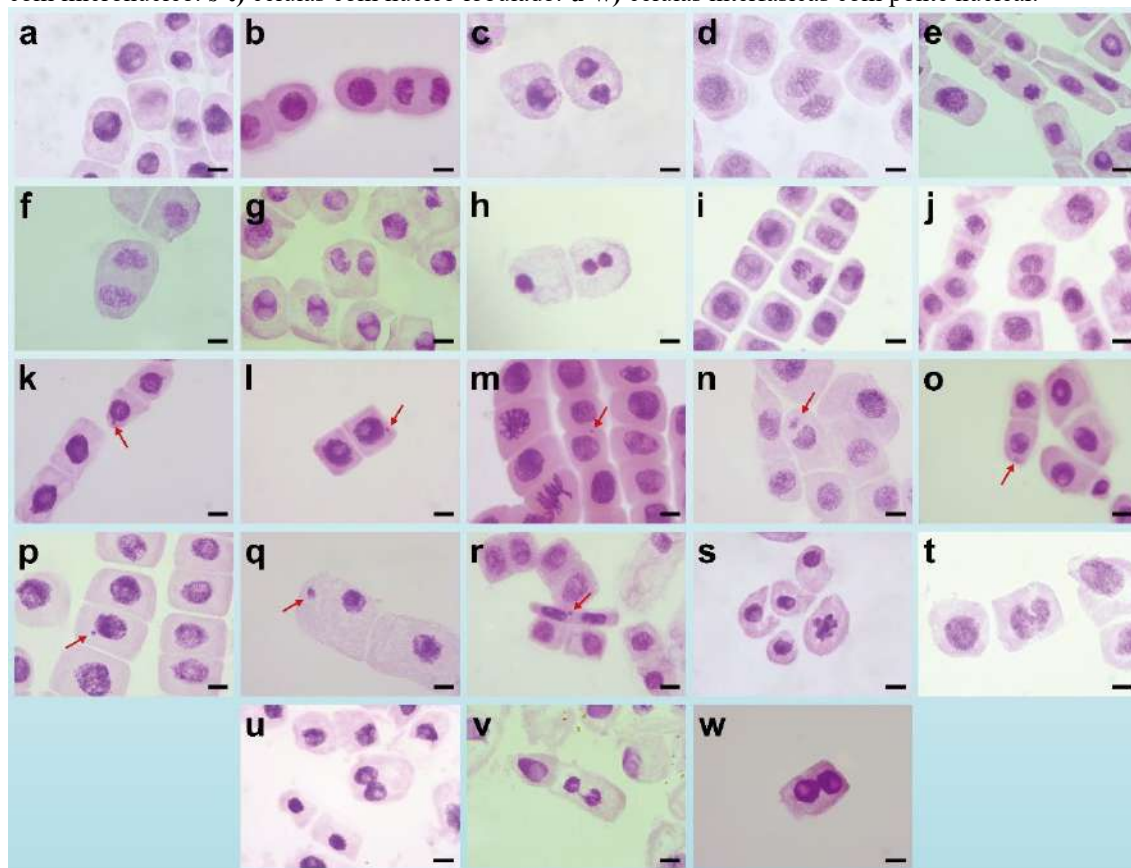
Em relação ao índice de cada alteração encontrada, a figura 2.10c evidencia as que foram mais encontradas por tratamento e fase. Ao observar é possível ver que na fase de exposição, c-mitose (C-mit) foi a aberração cromossômica mais observada, seguida de aderência (Ade) e Anáfase com pontes nucleares (Apont). Já células binucleadas (Binu) foram as normalidades nucleares mais observadas, seguidas de broto nuclear (BN) e micronúcleo (Mn). Na fase de recuperação é possível ver que nas maiores concentrações, c-mitose ainda é a aberração cromossômica mais frequente e células binucleadas e com micronúcleo as anormalidades mais frequentes. Além disso, muitas das aberrações cromossômicas visualizadas durante a fase de exposição, não foram mais vistas durante a fase de recuperação. Isso não significa reversão das aberrações, uma vez que na recuperação houve redução do índice mitótico para todos os tratamentos e inibição abaixo de 20% para todas as concentrações. Logo, se não tem células em divisão, também não tem como observar as aberrações cromossômicas. Já em relação as anormalidades nucleares, observadas em células em interfase, somente células anucleadas e com brotos nucleares não foram observadas. A figura 2.11 são exemplos das aberrações cromossômicas encontradas. Já a figura 2.12 são os exemplos de anormalidades nucleares encontradas devido a exposição ao pesticida.

Figura 2.11 – Fotomicrografias de aberrações cromossômicas obtidas a partir da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação (48 h) em água destilada. **a)** células normais em interfase. **b)** prófase normal. **c)** metáfase normal. **d)** anáfase normal. **e)** telófase normal. **f-s)** C-mitose. **t-u)** aderência com perda cromossômica. **v-z)** aderência cromossômica. **aa)** aderência com quebra cromossômica. **ab)** metáfase com perda cromossômica. **ac)** anáfase com atraso cromossômico. **ad e ag)** anáfase com ponte e atraso cromossômico. **ae)** anáfase com perda cromossômica. **af e ah)** anáfase com ponte cromossômica. **ai-aj)** anáfase com ponte e cromossomos vagantes. **ak)** anáfase com cromossomos vagantes. **al-am)** telófase com ponte cromossômica. **an)** telófase com cromossomos vagantes.



Barras pretas na horizontas = 10 μ m. Setas em vermelho evidenciam algumas aberrações para facilitar a observação. **Fonte:** elaborado pelo autor.

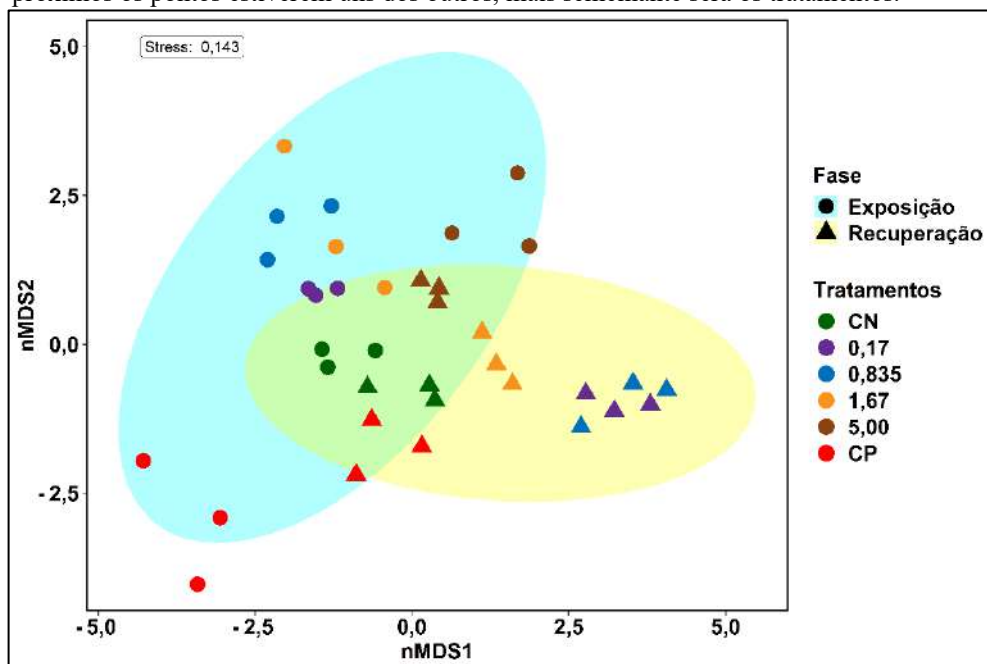
Figura 2.12 – Fotomicrografias de anormalidades nucleares obtidas a partir da exposição (48 h) de raízes de *Allium cepa* a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram e controles, e recuperação (48 h) em água destilada. **a)** célula anucleada. **b-j)** células binucleadas. **k)** célula com broto nuclear. **l-r)** células com micronúcleo. **s-t)** células com núcleo lobulado. **u-w)** células interfásicas com ponte nuclear.



Barras pretas na horizontas = 10 μ m. Setas em vermelho evidenciam micronúcleos. **Fonte:** elaborado pelo autor.

A análise PERMANOVA foi realizada para avaliar o efeito das diferentes concentrações de pesticida e dos controles, bem como a fase (exposição vs. recuperação), sobre as variáveis medidas. Os resultados mostraram que tanto o tratamento quanto a fase tiveram efeitos significativos nas respostas das cebolas. O tratamento teve um efeito significativo ($F = 12,23$; $p < 0,001$), explicando aproximadamente 38% da variabilidade total das variáveis medidas. A fase também teve um efeito significativo ($F = 35,40$; $p < 0,001$), explicando cerca de 22% da variabilidade total. Além disso, a interação entre tratamento e fase foi significativa ($F = 8,30$; $p < 0,001$), indicando que o efeito do tratamento varia dependendo da fase (exposição ou recuperação), explicando aproximadamente 26% da variabilidade total. Para visualizar as relações entre as diferentes condições experimentais, foi realizada uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) baseada na distância Euclidiana. A análise resultou em um valor de stress de 0,143, o que indica uma boa representação bidimensional das distâncias originais dos dados. O gráfico nMDS mostrou uma clara separação das amostras de acordo com os diferentes tratamentos e fases (Figura 2.13).

Figura 2.13 – Gráfico de escalonamento multidimensional não-métrico (nMDS) evidenciando a similaridade entre os diferentes tratamentos de raízes de *Allium cepa* expostas a várias concentrações do pesticida à base de fluopiram, nas fases de exposição e recuperação. Os pontos e triângulos coloridos representam os tratamentos, sendo que as formas diferentes (círculos = exposição, triângulos = recuperação) representam as fases. As escalas nos eixos X e Y não têm unidades e representam a distância euclidiana entre as amostras. Quanto mais próximos os pontos estiverem uns dos outros, mais semelhante será os tratamentos.



Fonte: elaborado pelo autor.

2.4 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados fornecem uma visão detalhada dos efeitos do pesticida à base de fluopiram em raízes de *A. cepa* em diferentes concentrações e fases de tratamento (exposição e recuperação). Os dados gerados evidenciam interações significativas entre as variáveis de tratamento e fase, destacando os impactos diferenciados do pesticida nas diferentes condições experimentais.

A análise de peroxidação lipídica e viabilidade fornece dados complementares. A ausência de peroxidação lipídica ao final da exposição pode ter ocorrido devido adaptações contra o estresse causado pelo pesticida. Entre as estratégias está a modificação da composição lipídica e da regulação de proteínas de transporte na membrana plasmática que ajuda as plantas a manter a integridade e a funcionalidade da membrana em condições adversas (RAWAT; SINGLA-PAREEK; PAREEK, 2021). Com isso a entrada do pesticida na célula teria sido dificultada. Além disso, as plantas possuem enzimas, com as do citocromo P450s (CYPs), para oxidar e hidrolisar pesticidas, transformando-os em compostos menos lipofílicos e mais hidrofílicos, facilitando sua excreção (ZHANG; YANG, 2021). O fluopiram é um pesticida consideravelmente lipofílico com um coeficiente de partição octanol-água ($\log P$) de 3,3 (pH

= 7,0) (LEWIS *et al.*, 2016). O fluopiram, sendo um composto lipofílico, poderia ser oxidado pelas CYPs, tornando-se menos lipofílico e mais fácil de ser metabolizado e excretado pela célula. As mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP, necessário para várias reações de detoxificação, incluindo aquelas mediadas por CYPs e GSH (WELCHEN *et al.*, 2021; ZHANG; YANG, 2021). Dessa maneira, a maior atividade metabólica evidenciada pelos altos níveis de formazana observados na maior concentração do pesticida, tanto na exposição quanto na recuperação, sugere que as células estão ativamente produzindo energia e possivelmente se defendendo contra os danos induzidos pela exposição ao pesticida à base de fluopiram. Além disso, em resposta a alterações nas demandas metabólicas e energéticas celulares, as mitocôndrias sofrem mudanças em sua morfologia e capacidade respiratória regulando a composição e abundância da maquinaria proteica. Dessa forma, as mitocôndrias são dinamicamente ajustadas para atender à necessidade específica de energia em diferentes tipos de tecido ou em resposta ao ambiente (JACOBY *et al.*, 2012). Isso significa que um aumento nas desidrogenases mitocondriais pode refletir um aumento na capacidade oxidativa da célula, permitindo uma maior produção de energia para suportar funções celulares intensificadas durante o estresse causada pela exposição. Isso poderia ser o motivo também pelo qual as raízes coradas com azul de Evans na maior concentração do pesticida apresentaram menor intensidade da coloração, havia mais células viáveis “trabalhando” na prevenção e/ou reparo de danos.

O índice mitótico é utilizado para avaliar a citotoxicidade e o potencial genotóxico de diversas substâncias, além de monitorar a atividade mitótica em estudos ambientais (GRAÑA, 2018). Observou-se um aumento do índice mitótico na concentração de 0,835 mg mL⁻¹ durante a fase de exposição, evidenciando proliferação celular. No entanto, durante a fase de recuperação, as concentrações inferiores a 5,00 mg mL⁻¹ apresentaram uma redução do índice mitótico, indicando que o aumento ocorreu apenas durante a exposição. Essa redução provavelmente decorreu dos efeitos subletais das concentrações mais baixas. O aumento do índice mitótico pode indicar proliferação celular descontrolada ou formação de tumores, enquanto a diminuição sugere o potencial genotóxico de substâncias devido à inibição e/ou atraso na divisão celular (GRAÑA, 2018). O aumento na concentração de 0,835 mg mL⁻¹ pode ser resultado da redução no tempo necessário para o reparo do DNA na fase de exposição (LIMAN *et al.*, 2010, 2011). Por outro lado, a redução do índice mitótico, na recuperação, pode estar relacionada ao fato de que muitos pesticidas têm o potencial de impedir que as células entrem em divisão, bloqueando o ciclo celular ou inibindo a síntese de DNA (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022).

Na literatura, é indicado que uma redução no índice mitótico para menos de 50% em relação ao controle geralmente sugere efeitos subletais, enquanto uma queda abaixo de 22% do controle, considerando o índice mitótico do controle como 100%, pode causar efeitos letais no organismo (GRANJA, 2018; ALAGUPRATHANA *et al.*, 2022; MOHAMMED *et al.*, 2023). O cálculo da inibição/estimulação do IM usado neste trabalho mede a diferença relativa no IM entre controle e o tratamento normalizado pelo IM do controle. A multiplicação por -100 inverte os sinais. Logo valores positivos são indicativos de estimulação e negativos inibição. Dessa forma, valores de inibição na figura 2.8b entre -50% e -78% representam efeitos subletais e abaixo de -78% indicam efeitos letais. A inibição do índice mitótico na concentração de 5,00 mg mL⁻¹ durante a fase de exposição foi acima de -50%, em relação ao índice mitótico do controle negativo na mesma fase. Já na fase de recuperação, as raízes que haviam sido expostas as concentrações 0,17 mg mL⁻¹, 0,835 mg mL⁻¹ e 1,67 mg mL⁻¹ apresentaram redução do índice mitótico abaixo de -50%, indicando impactos subletais nas células da raiz.

Em relação as fases mitóticas, de forma geral e como pode ser observado da figura 2.9, a exposição as concentrações do pesticida à base de fluopiram favoreceu a porcentagem de células em prófase em detrimento as demais fases. Enquanto a porcentagem de células em prófase aumentou na exposição e recuperação, as demais fases foram reduzidas, com exceção da telófase na fase de exposição que continuou com porcentagem semelhantes ao controle negativo. O progresso de cada etapa do ciclo celular depende da finalização da etapa anterior. Se o índice de uma determinada fase da divisão celular for elevado, isso significa que as células nessa fase estão demorando mais do que o usual para se dividir e passar para a próxima fase (WANG, 2021). O acúmulo de células em prófase pode ser uma indicação do bloqueio final da prófase. O bloqueio seria decorrente do ponto CHFR (*checkpoint with forkhead and RING finger domains*) que atrasa a entrada na metáfase em resposta ao estresse mitótico (SCOLNICK; HALAZONETIS, 2000; PRIVETTE; PETTY, 2008). Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos avaliando a genotoxicidade de pesticidas através do teste de *Allium cepa*. Os autores também associam o aumento de células em prófase ao CHFR (LIMAN *et al.*, 2011, 2010; TÜRKÖĞLU, 2012; EREN *et al.*, 2015; LIMAN; CİĞERCI; ÖZTÜRK, 2015).

O resultado da análise citogenética evidenciou que as concentrações do pesticida induziram aberrações cromossômicas, que foram estatisticamente significativas em comparação ao controle negativo, em todas as concentrações avaliadas na fase de exposição e nas concentrações 1,67 mg mL⁻¹ e 5,00 mg mL⁻¹ na recuperação. A ausência de aberrações cromossômicas nas concentrações de 0,17 mg mL⁻¹ e 0,835 mg mL⁻¹ pode estar relacionada à

inibição do índice mitótico nessas concentrações. A inibição do índice mitótico e a permanência das células na fase de prófase pode ter levado a uma diminuição na proliferação celular, resultando em menos células em divisão, dificultando a observação de aberrações cromossômicas, uma vez que sua formação depende dos estágios mitóticos para se formarem (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022). Isso vale para as anormalidades nucleares, já que em todas as concentrações, na fase de exposição, houve aumento do índice de anormalidades nucleares em relação ao controle. Já na recuperação houve diminuição na frequência de aberrações cromossômicas nas concentrações 0,17 mg mL⁻¹ e 0,835 mg mL⁻¹ em relação a fase de exposição, porém a frequência ainda foi maior que o controle negativo. Apesar do pesticida ter induzido a formação de micronúcleos, o índice de micronúcleos das concentrações avaliadas não foi significativamente diferente do controle negativo.

Os pesticidas podem provocar aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares através de diversos mecanismos. Um desses mecanismos é o estresse oxidativo, onde as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas causam danos à célula e à molécula de DNA. Além disso, os pesticidas podem causar danos diretos ao DNA, interferindo na sua estrutura e função. Outro mecanismo inclui danos aos microtúbulos e histonas, afetando a formação do fuso mitótico e a integridade do material genético (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022).

No presente trabalho não foi observado efeito da peroxidação lipídica, que seria um indício de estresse oxidativo. Com isso, o mecanismo que levou as aberrações cromossômicas observadas e anormalidades pode estar associado a ação do pesticida nas fibras do fuso mitótico. Pesticidas podem inibir a polimerização da tubulina, afetando a formação do fuso mitótico e causando aberrações cromossômicas. Isso pode resultar em aneuploidia e poliploidia devido à interferência com o fuso mitótico e segregação anormal dos cromossomos (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022). O que reforça esse pensamento e a alta frequência de C-mitose (ou C-metáfase), aderência, perdas cromossômicas e atraso cromossômico (Figura 2.10c) que são resultado de efeitos aneugênicos, decorrentes da interferência na formação do fuso mitótico, impedido a separação adequada dos cromossomos durante a divisão celular (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; LEME; MARIN-MORALES, 2009). O efeito C-mitose indica o potencial do pesticida em inibir a formação das fibras do fuso por interferir na polimerização (ATEEQ *et al.*, 2002; DANE; DALGIÇ, 2005; VERMA; SRIVASTAVA, 2018b) o que ocasiona ausência completa do fuso ou efeito parcial. O efeito parcial pode levar a cromossomos atrasados (YÜZBAŞIOĞLU; ÜNAL; SANCAK, 2009).

Os cromossomos atrasados além de serem provocados por evento de C-mitose parcial, podem ser originados a partir do comprometimento do aparelho mitótico (BUTT; VAHIDY,

1994), como distúrbios na formação do fuso. Um evento no fuso responsável pelo atraso pode ser à interferência na despolimerização dos microtúbulos, onde há bloqueio do encurtamento dos microtúbulos, atrasando a migração do cromossomo para os polos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; LIMAN *et al.*, 2010; KARASMAILOGLU, 2015). Cromossomos vagantes são outra aberração decorrentes de irregularidades do fuso (BOLLE *et al.*, 2004; MUSTAFA; SUNA ARIKAN, 2008; GOUJON *et al.*, 2014). Como observamos também aberrações cromossômicas decorrentes de efeitos clastogênicos, o pesticida pode estar também atuando diretamente no DNA. Os pesticidas podem interagir diretamente com o DNA, causando quebra, intercalação e inativação de enzimas, o que reduz a replicação do DNA. Isso pode levar à instabilidade genômica e falhas nos mecanismos de reparo do DNA, resultando em aberrações cromossômicas e morte celular (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022).

A fim de obter uma resposta integrada dos biomarcadores avaliados no teste de *Allium cepa*, realizamos uma análise multivariada que considerou a dissimilaridade entre as fases (exposição e recuperação) e entre os diferentes tratamentos. Esta técnica foi útil, pois nos permite mostrar como as diferentes variáveis de resposta podem estar interconectadas e influenciar os resultados como um todo. Além disso, é possível identificar padrões significativos, mesmo quando as respostas individuais podem ser ambíguas ou não conclusivas. A interação significativa, evidenciado pela da PERMANOVA, entre tratamento e fase sugere que a recuperação dos efeitos do pesticida, quando as cebolas são transferidas para água destilada, depende da concentração inicial do pesticida. A análise nMDS fornece uma visualização clara das relações entre os tratamentos e as fases, reforçando os achados da PERMANOVA. A proximidade dos pontos no gráfico indica maior similaridade entre as amostras, refletindo como os diferentes tratamentos e fases impactam as raízes de *Allium cepa*. É possível observar que na fase de recuperação, nenhum dos tratamentos expostos as diferentes concentrações do pesticida formaram agrupamento próximo aos agrupamentos dos controles negativos, indicativo de não recuperação ou recuperação parcial. Na literatura os estudos que avaliam a recuperação dos danos causados pela exposição a pesticidas mostram em sua maioria que os efeitos são irreversíveis (CAMILO-COTRIM *et al.*, 2022).

2.5 CONCLUSÃO

De acordo com nosso estudo, o pesticida à base de fluopiram causa impacto na viabilidade celular e nos índices de citogenotóxicos, com exceção na indução de micronúcleos, com efeitos que variam conforme a concentração de pesticida e a fase de recuperação em água destilada. A recuperação parcial observada em algumas análises sugere que a remoção do

pesticida e a imersão em água destilada podem mitigar, mas não reverter completamente, os efeitos tóxicos do pesticida. Este estudo demonstrou que o pesticida à base de fluopiram não provocou estresse oxidativo nas raízes de *Allium cepa*, mas possui um potencial genotóxico considerável, como evidenciado pelo índice mitótico, índice de aberrações cromossômicas e índice de anormalidades nucleares e elevado número de C-mitoses e outras aberrações cromossômicas. A interferência do pesticida nos microtúbulos do fuso mitótico aparente ser o mecanismo de ação pela ocorrência das aberrações cromossômicas, resultando em falhas na segregação cromossômica e instabilidade genética. Além disso, o aumento da viabilidade celular sugere uma resposta adaptativa das células ao pesticida.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, Y.; TIJJANI, H.; EGBUNA, C.; ADETUNJI, C. O.; KALA, S.; KRYEZIU, T. L.; IFEMEJE, J. C.; PATRICK-IWUANYANWU, K. C. Pesticides, History, and Classification. *Em: EGBUNA, C.; SAWICKA, B. (eds.). Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. Elsevier, 2020. p. 29–42. DOI 10.1016/B978-0-12-819304-4.00003-8.
- ALAGUPRATHANA, M.; POONKOTHAI, M.; AL-ANSARI, M. M.; AL-HUMAIL, L.; KIM, W. Cytogenotoxicity assessment in *Allium cepa* roots exposed to methyl orange treated with *Oedogonium subplagiostomum* AP1. **Environmental Research**, vol. 213, p. 113612, Oct. 2022. DOI 10.1016/j.envres.2022.113612.
- ASSUNÇÃO, T.; GOMES, F.; BRANDT, E.; PEREIRA, R. Novos agrotóxicos e o padrão de potabilidade da água: dinâmica ambiental e riscos à saúde. **Revista de Gestão de Água da América Latina**, vol. 17, no. 1, p. 16–0, 2 Sep. 2020. DOI 10.21168/reg.v17e16.
- AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY. **Public release summary on the evaluation of the new active constituent fluopyram in the product transform insecticide**. Kingston - Australia: APVMA product number 63642, 2015.
- BÉNIT, P.; KAHN, A.; CHRETIEN, D.; BORTOLI, S.; HUC, L.; SCHIFF, M.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.-P.; FAVIER, J.; GRESSSENS, P.; RAK, M.; RUSTIN, P. Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. **PLOS ONE**, vol. 14, no. 11, p. e0224132, 7 Nov. 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0224132.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M. G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, vol. 43, no. 2, p. 137–141, 2004. DOI 10.1002/em.20007.

BUTT, S. k; VAHIDY, A. A. Cytotoxic effects of herbicide ronstar on meristematic cells of *Allium cepa* L. **Pakistan Journal of Botany**, vol. 26, no. 1, p. 69–74, 1994.

CAMILO-COTRIM, C. F.; BAILÃO, E. F. L. C.; ONDEI, L. S.; CARNEIRO, F. M.; ALMEIDA, L. M. What can the *Allium cepa* test say about pesticide safety? A review. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, no. 32, p. 48088–48104, 14 Jul. 2022. DOI 10.1007/s11356-022-20695-z.

CAMILO-COTRIM, C. F.; DE SOUZA ONDEI, L.; DE ALMEIDA, E. A.; TERESA, F. B. Fish biomarker responses reflect landscape anthropic disturbance in savanna streams. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 29, no. 58, p. 87828–87843, 12 Dec. 2022. DOI 10.1007/s11356-022-21865-9.

CHAWLA, S.; PATEL, D. J.; PATEL, S. H.; KALASARIYA, R. L.; SHAH, P. G. Behaviour and risk assessment of fluopyram and its metabolite in cucumber (*Cucumis sativus*) fruit and in soil. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 25, no. 12, p. 11626–11634, 10 Apr. 2018. DOI 10.1007/s11356-018-1439-y.

EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; AKYIL, D.; ÖZKARA, A.; KONUK, M.; SAĞLAM, E. Cytotoxic and genotoxic effects of dioxacarb by human peripheral blood lymphocytes CAs and *Allium* test. **Cytotechnology**, vol. 67, no. 6, p. 1023–1030, 22 Dec. 2015. DOI 10.1007/s10616-014-9741-0.

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**, vol. 88, no. 3, p. 252–259, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 72, no. 6, p. 1680–1686, Sep. 2009. DOI 10.1016/j.ecoenv.2009.03.014.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 113, no. 1, p. 47–54, Jul. 2014. DOI 10.1016/j.pestbp.2014.06.002.

GRANA, E. Mitotic Index. *Em*: SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M.; REIGOSA, M. J. (eds.). **Advances in Plant Ecophysiology Techniques**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 231–240. DOI 10.1007/978-3-319-93233-0_13.

HU, J.; PANG, K.; DONG, B. Mechanism and identify photolysis products of fluopyram under TiO₂: Experiments, DFT and ab initio Molecular dynamics study. **SDRP Journal of Earth Sciences & Environmental Studies**, vol. 4, no. 4, p. 681–690, 2019. DOI 10.25177/JESES.4.3.RA.504.

JACOBY, R. P.; LI, L.; HUANG, S.; PONG LEE, C.; MILLAR, A. H.; TAYLOR, N. L. Mitochondrial Composition, Function and Stress Response in Plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, vol. 54, no. 11, p. 887–906, 14 Nov. 2012. DOI 10.1111/j.1744-7909.2012.01177.x.

KARASMAILOGLU, M. C. Investigation of the potential toxic effects of prometryne herbicide on *Allium cepa* root tip cells with mitotic activity, chromosome aberration, micronucleus frequency, nuclear DNA amount and comet assay. **Caryologia**, vol. 68, no. 4, p. 323–329, 2 Oct. 2015. DOI 10.1080/00087114.2015.1109927.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, vol. 682, no. 1, p. 71–81, Jul. 2009. DOI 10.1016/j.mrrev.2009.06.002.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, vol. 22, no. 4, p. 1050–1064, 18 May 2016. DOI 10.1080/10807039.2015.1133242.

LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium test*. **Chemosphere**, vol. 80, no. 9, p. 1056–1061, Aug. 2010. DOI 10.1016/j.chemosphere.2010.05.011.

- LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 99, no. 1, p. 61–64, Jan. 2011. DOI 10.1016/j.pestbp.2010.10.006.
- LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 118, p. 38–42, Feb. 2015. DOI 10.1016/j.pestbp.2014.11.007.
- LIU, Y.; ZHANG, W.; WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, S.; JI, X.; QIAO, K. Oxidative stress, intestinal damage, and cell apoptosis: Toxicity induced by fluopyram in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, vol. 286, no. P3, p. 131830, Jan. 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.131830.
- MATTOS, B. D.; DA SILVA, L. R.; DE SOUZA, I. R.; MAGALHÃES, W. L. E.; LEME, D. M. Slow delivery of biocide from nanostructured, microscaled, particles reduces its phytotoxicity: A model investigation. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 367, p. 513–519, Apr. 2019. DOI 10.1016/j.jhazmat.2018.12.117.
- MOHAMMED, J. S.; MUSTAPHA, Y.; HIM, M. A.; DANLADI, Z. N. Assessment of Cytogenotoxicity of Plastic Industrial Effluent Using *Allium cepa* Root Tip Cells. **International Journal of Cell Biology**, vol. 2023, p. 1–7, 17 Oct. 2023. DOI 10.1155/2023/5161017.
- MUSTAFA, Y.; SUNA ARIKAN, E. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Caryologia**, vol. 61, no. 1, p. 45–52, 4 Jan. 2008. DOI 10.1080/00087114.2008.10589608.
- PRAJITHA, V.; THOPPIL, J. E. Cytotoxic and apoptotic activities of extract of *Amaranthus spinosus* L. in *Allium cepa* and human erythrocytes. **Cytotechnology**, vol. 69, no. 1, p. 123–133, 28 Feb. 2017. DOI 10.1007/s10616-016-0044-5.
- PRIVETTE, L. M.; PETTY, E. M. CHFR: A Novel Mitotic Checkpoint Protein and Regulator of Tumorigenesis. **Translational Oncology**, vol. 1, no. 2, p. 57–64, Jul. 2008. DOI 10.1593/tlo.08109.

QANUNGO, K.; KUMARI, A.; THAKUR, A. Fugacity Based EQC Level II Method: Prediction of Environmental Partitioning of a Fungicide Fluopyram. **Journal of Physics: Conference Series**, vol. 2603, no. 1, p. 012054, 1 Oct. 2023. DOI 10.1088/1742-6596/2603/1/012054.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, Version 4.2.2. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

RATHOD, P. H.; SHAH, P. G.; PARMAR, K. D.; KALASARIYA, R. L. The Fate of Fluopyram in the Soil–Water–Plant Ecosystem: A Review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 260, no. 1, p. 1, 5 Dec. 2022. DOI 10.1007/s44169-021-00001-7.

RAWAT, N.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Membrane dynamics during individual and combined abiotic stresses in plants and tools to study the same. **Physiologia Plantarum**, vol. 171, no. 4, p. 653–676, 2 Apr. 2021. DOI 10.1111/ppl.13217.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R, Version 2023.03.0. Boston, MA, 2019. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>.

SCOLNICK, D. M.; HALAZONETIS, T. D. CHFR defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. **Nature**, vol. 406, no. 6794, p. 430–435, Jul. 2000. DOI 10.1038/35019108.

SHAYMURAT, T.; GU, J.; XU, C.; YANG, Z.; ZHAO, Q.; LIU, Y.; LIU, Y. Phytotoxic and genotoxic effects of ZnO nanoparticles on garlic (*Allium sativum* L.): A morphological study. **Nanotoxicology**, vol. 6, no. 3, p. 241–248, 17 May 2012. DOI 10.3109/17435390.2011.570462.

SOUZA, I. R.; SILVA, L. R.; FERNANDES, L. S. P.; SALGADO, L. D.; SILVA DE ASSIS, H. C.; FIRAK, D. S.; BACH, L.; SANTOS-FILHO, R.; VOIGT, C. L.; BARROS, A. C.; PERALTA-ZAMORA, P.; MATTOSO, N.; FRANCO, C. R. C.; SOARES MEDEIROS, L. C.; MARCON, B. H.; CESTARI, M. M.; SANT’ANNA-SANTOS, B. F.; LEME, D. M. Visible-light reduced silver nanoparticles’ toxicity in *Allium cepa* test system. **Environmental Pollution**, vol. 257, p. 113551, Feb. 2020. DOI 10.1016/j.envpol.2019.113551.

SUN, T.; LI, M.; SALEEM, M.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. The fungicide “fluopyram” promotes pepper growth by increasing the abundance of P-solubilizing and N-fixing bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 188, no. November 2019, p. 109947, Jan. 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109947.

TINWELL, H.; ROUQUIÉ, D.; SCHORSCH, F.; GETER, D.; WASON, S.; BARS, R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 70, no. 3, p. 648–658, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.yrtph.2014.09.011.

TSAI, T.; HUANG, H. Effects of iron excess on cell viability and mitogen-activated protein kinase activation in rice roots. **Physiologia Plantarum**, vol. 127, no. 4, p. 583–592, 19 Aug. 2006. DOI 10.1111/j.1399-3054.2006.00696.x.

TÜRKOĞLU, Ş. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 103, no. 3, p. 224–230, Jul. 2012. DOI 10.1016/j.pestbp.2012.06.001.

WANG, Z. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. **Cells**, vol. 10, no. 12, p. 3327, 26 Nov. 2021. DOI 10.3390/cells10123327.

WELCHEN, E.; CANAL, M. V.; GRAS, D. E.; GONZALEZ, D. H. Cross-talk between mitochondrial function, growth, and stress signalling pathways in plants. **Journal of Experimental Botany**, vol. 72, no. 11, p. 4102–4118, 18 May 2021. DOI 10.1093/jxb/eraa608.

YOGENDRAIAH MATADHA, N.; MOHAPATRA, S.; SIDDAMALLAIAH, L.; UDUPI, V. R.; GADIGEPPA, S.; RAJA, D. P.; DONAGAR, S. P.; HEBBAR, S. S. Persistence and dissipation of fluopyram and tebuconazole on bell pepper and soil under different environmental conditions. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, vol. 101, no. 14, p. 2408–2427, 14 Nov. 2021. DOI 10.1080/03067319.2019.1704745.

ZHANG, J. J.; YANG, H. Metabolism and detoxification of pesticides in plants. **Science of The Total Environment**, vol. 790, p. 148034, Oct. 2021. DOI 10.1016/j.scitotenv.2021.148034.

ZHOU, J.; LIANG, S.; CUI, Y.; RONG, Y.; SONG, J.; LV, D. Study on environmental behaviour of fluopyram in different banana planting soil. **Scientific Reports**, vol. 11, no. 1, p. 15346, 28 Jul. 2021. DOI 10.1038/s41598-021-91460-4.

ARTIGO 3. EXPLORANDO A TOXICIDADE DE PESTICIDA À BASE DE FLUOPIRAM EM ESPÉCIES NÃO-ALVO

Carlos Filipe Camilo Cotrim¹, Lucas Leonardo-Silva¹, Natanael Alves da Silva¹, Gabriela Gomes Lima¹, Abel Vieira de Melo Bisneto², Lee Chen Chen², Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão, Virgínia Damin³ & Luciane Madureira de Almeida¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central – Sede Anápolis - Ciências Exatas e tecnológicas, 459, Br 153, nº 3.105, CEP: 75132-903, Anápolis-Go, Brasil

²Laboratório de Radiobiologia de Microrganismos e Mutagênese, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, Av. Esperança, s/n. 74690-900, Goiânia-Go, Brasil

³Herbil, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia - Campus Samambaia, Av. Esperança s/n, CEP: 74.690-900, Goiânia-Go, Brasil

Resumo – O fluopiram é um fungicida com propriedades nematicidas presente na formulação de pesticidas utilizados na agricultura. Por possuir uma dinâmica ambiental favorável à contaminação das águas, ter uma elevada toxicidade, e alta persistência no solo é importante realizar o monitoramento do composto no ambiente. Além disso, é uma molécula recentemente introduzida no mercado, ainda há poucos trabalhos que façam uma triagem dos possíveis efeitos da exposição a essa molécula. Diante disso, este estudo investigou a citogenotoxicidade e toxicidade ambiental de um pesticida à base de fluopiram. Para isso foi utilizado cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, bioensaio com *Artemia salina* e avaliação de germinação e alongamento radicular em sementes de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*). Foram utilizadas concentrações de 0,017, 0,050, 0,210, 0,418, 0,835, 1,67 e 5,00 mg mL⁻¹ do pesticida. Os testes com o pesticida à base de fluopiram revelaram que ele não é mutagênico nas cepas TA100 e TA98, com índice de mutagenicidade inferior a 2. Na cepa TA98, o pesticida demonstrou efeito citotóxico em altas concentrações. No teste de toxicidade com *A. salina*, o pesticida causou mortalidade significativa a partir de 0,210 mg mL⁻¹, com CL₅₀ de 1,021 mg mL⁻¹. Nos testes de germinação, sementes de alface e pepino não foram afetadas, enquanto sementes de cebola tiveram redução na germinação apenas na maior concentração (5,00 mg mL⁻¹). O crescimento das raízes de alface foi estimulado a partir de 0,210 mg mL⁻¹ e inibido em 5,00 mg mL⁻¹; raízes de cebola e pepino também foram afetadas. Concluímos que o fluopiram não é mutagênico, mas é tóxico em altas concentrações, afetando organismos aquáticos e o crescimento de plantas.

Palavras-chave: bioensaio, biomonitoramento, ecotoxicologia, toxicologia.

3.1 INTRODUÇÃO

O fluopiram é um fungicida de amplo espectro e nematicida não fumigante promissor em muitas culturas de alto valor (LEWIS *et al.*, 2016). É um membro da classe benzamidas, um composto organoclorado, um membro das piridinas (NCBI, 2024). Seu modo de ação depende da inibição da succinato desidrogenase na cadeia respiratória mitocondrial (BÉNIT *et al.*, 2019). No ambiente, o fluopiram degrada lentamente, tendo a meia vida (DT₅₀) variando de 21 a mais de 300 dias, dependendo das condições do solo, apresentando mobilidade moderada no solo e potencial de lixiviação para camadas mais profundas do solo e águas subterrâneas (RATHOD *et al.*, 2022).

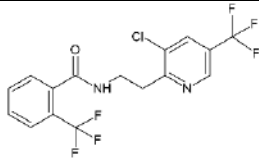
Até o presente momento existe poucos trabalhos que avaliam os impactos do fluopiram no meio ambiente, mas já se sabe que pode desencadear estresse oxidativo em organismos não-alvo (LIU *et al.*, 2022), modificar a comunidade microbiana do solo (SUN *et al.*, 2020) e apresentar efeitos de toxicidade em vertebrados (TINWELL *et al.*, 2014). Devido aos indícios de risco ambiental e comportamento persistente no solo é fundamental avaliar os efeitos decorrentes do uso indiscriminado do fluopiram (RATHOD *et al.*, 2022).

A fim de contribuir para a avaliação dos efeitos associados ao uso de pesticidas a base de fluopiram, este estudo utiliza uma abordagem de triagem rápida para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos de uma formulação comercial de pesticida a base de fluopiram. Para isso, foi realizado o teste de Ames com linhagem TA100 e TA98 de *Salmonella typhimurium* para detectar mutagenicidade, o bioensaio de mortalidade com *Artemia salina* para avaliar a toxicidade aguda e o bioensaio de germinação e alongamento em *Lactuca sativa*, *Allium cepa* *Cucumis sativus* para medir a fitotoxicidade. Esta triagem visa fornecer uma visão sobre os efeitos associados à exposição a pesticida à base de fluopiram.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O pesticida Verango® Prime (Fluopiram – 500 g L⁻¹, Bayer) foi doado por um agrônomo. A Tabela 3.1 contém as propriedades químicas do princípio ativo fluopiram.

Tabela 3.1 – Propriedades químicas do fluopiram, princípio ativo do Verango® Prime.

Nome comum ^a	Nome CAS ^a	Fórmula ^a	Estrutura química ^b	Áreas de uso ^a
Fluopiram	N-(2-(3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridinyl)ethyl)-2-(trifluoromethyl)benzamide	C ₁₆ H ₁₁ ClF ₆ N ₂ O		Fungicida nematicida

^aLEWIS *et al.*, 2016

^bChemSpider ID: 9333461

As concentrações finais testadas foram baseadas na concentração de campo recomendada para pré-emergência da cultura de soja ($0,5 \text{ L ha}^{-1}$ do produto em 150 L ha^{-1} de água). Para o teste de Ames, a OECD 471 recomenda pelo mesmo cinco concentrações da substância testada, não ultrapassado a concentração máxima de 5 mg placa^{-1} (OECD, 2020). Com base nisso, determinamos a concentração máxima sendo $3\times$ maior do que a de campo, e a partir dela foram feitas diluições em água destilada. A Tabela 3.2 apresenta as concentrações de fluopiram utilizadas em todos os bioensaios, considerou-se a quantidade de princípio ativo presente na formulação.

Tabela 3.2 – Concentrações utilizadas do pesticida.

Concentração	Fluopiram
1%	$0,017 \text{ mg mL}^{-1}$
3%	$0,050 \text{ mg mL}^{-1}$
12,5%	$0,210 \text{ mg mL}^{-1}$
25%	$0,418 \text{ mg mL}^{-1}$
50%	$0,835 \text{ mg mL}^{-1}$
Campo	$1,67 \text{ mg mL}^{-1}$
$3 \times$	$5,00 \text{ mg mL}^{-1}$

Teste de Ames

O teste de Ames foi realizado utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* TA100 (hisG46, rfa, Δ bio, Δ uvrB, pKM101 – que detecta mutações de substituição de pares de bases) e TA98 (hisD3052, rfa, Δ bio, Δ uvrB, pKM101 – que detecta mutações frameshift). As cepas foram fornecidas pela Divisão de Toxicologia, Genotoxicidade e Microbiologia Ambiental da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), São Paulo, Brasil. A aplicação das duas cepas permite a identificação de mutágenos com diferentes mecanismos de ação.

Para avaliar o potencial mutagênico do pesticida, utilizou-se o protocolo proposto por Maron e Ames (1983). Inicialmente, cepas de *S. typhimurium* TA100 e TA98 foram inoculadas em caldo nutriente estéril, após incubadas sob agitação por 12 h a 37°C quando atingiram fase estacionária de crescimento ($1\text{--}2 \times 10^9$ células mL^{-1}). Em seguida, alíquotas de $100 \mu\text{L}$ de suspensões bacterianas de cada cepa foram pré-incubadas em tubos de ensaio contendo $20 \mu\text{L}$ das concentrações do pesticida mencionadas na Tabela 3.2, a uma temperatura de 37°C por 25 min, sob agitação.

Após a pré-incubação, uma alíquota de 2 mL de top ágar (0,6% ágar bacteriológico Kasvi, 0,5% NaCl, $50 \mu\text{M}$ de L-histidina e $50 \mu\text{M}$ de biotina, a 45°C) foi adicionada aos tubos de ensaio com as bactérias. O conteúdo foi então vertido em placas de Petri contendo meio ágar mínimo glicosado (1,5% de ágar, 2% de dextrose e 2% de solução de sais de Vogel-Bonner).

As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 °C por 48 horas. O ensaio incluiu um controle negativo (água destilada) e um controle positivo (1,5 µg de azida sódica placa⁻¹ para TA100 e 0,5 µg 4-nitroquinolina-1-óxido placa⁻¹ para TA98). A replicação experimental foi realizada com três repetições completas do experimento, em que todas as concentrações dos pesticidas foram testadas usando três réplicas. Finalizada a incubação, as colônias revertentes foram contadas com auxílio de um contador eletrônico.

A indução de mutagenicidade foi medida usando a regra de duas vezes (CARIELLO; PIEGORSCH, 1996; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). A regra duas vezes estabelece que uma substância é considerada mutagênica se ela causar um aumento de pelo menos duas vezes no número de colônias bacterianas revertidas em relação ao controle negativo. Para calcular o índice de mutagenicidade foi usado a fórmula:

$$IM = \frac{REI}{RE(\text{controle negativo})}$$

Onde:

IM – Índice de Mutagenicidade;

REI – Revertentes Espontâneos e Induzidos;

RE – Revertentes Espontâneos.

A citotoxicidade foi identificada por uma redução acentuada no número de revertentes em comparação com o controle negativo

Teste de toxicidade com *Artemia salina*

Os cistos de *A. salina* (Yepist) foram adquiridos em loja de aquarismo localizada na cidade de Anápolis, Goiás. Para o teste de toxicidade aguda com *A. salina*, utilizou-se a metodologia descrita por Meyer *et al.* (1982) e Filipe *et al.* (2022). A solução salina foi preparada utilizando sal marinho sem iodo na concentração de 30 g L⁻¹ e autoclavada a 120 °C por 20 min. Após a autoclavagem, a solução salina foi filtrada (Stericup® Millipore Express® 0,10 µm PES). O pH da solução salina foi ajustado para 8. O artemilheiro foi montado utilizando 300 mL de solução salina em um funil de separação, ao qual foram adicionados 40 mg de cistos. O artemilheiro foi mantido em BOD com iluminação e aeração constante a 25 °C por 48 h até a eclosão dos cistos.

Para o teste, as concentrações do pesticida foram preparadas em solução salina. Como a diluição do pesticida é de 1:9, as concentrações iniciais foram 10 vezes as da Tabela 3.2. Após a eclosão, cerca de 10 náuplios de *A. salina* foram pescados, com auxílio de uma micropipeta, em 900 µL de solução salina e transferidos para tubos de ensaio. Após a captura dos náuplios

foi adicionado 100 µL de cada concentração de pesticida nos respectivos tubos de cada pesticida. Cada concentração foi feita em triplicada e o experimento foi realizado 3 vezes.

Os controles foram água destilada (controle negativo) e dicromato de potássio 50 µg mL⁻¹ (controle positivo). Após a montagem do experimento, os tubos de ensaio foram levados para BOD a 25 °C com iluminação constante. A contagem dos animais mortos e vivos foi realizada após 24 h.

A taxa de mortalidade foi calculada com a seguinte formula, que mede a diferença relativa na mortalidade entre o número *A. salina* colocadas em cada tudo e o número de sobreviventes, normalizando pelo número *A. salina* colocadas em cada tudo.

$$TM (\%) = \frac{NAs - Sob}{NAs} * 100$$

Onde:

TM – Taxa de mortalidade;

NAs – Número de *A. salina* colocadas no tubo;

Sob – Número de sobreviventes.

Teste de germinação de sementes e alongamento da raiz

Sementes de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) foram adquiridas em casa agropecuária na cidade de Goiânia e todas são da marca Topseed® Agristar do Brasil Ltda com taxa de germinação ≥ 90%.

O ensaio de toxicidade, com as sementes de alface, cebola e pepino, foi realizado conforme pequenas modificações da metodologia proposta pela *Ecological Effects Test Guideline – Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test (OPPTS 850.4200)* (EPA, 1996). Os testes foram realizados em caixas *gerbox* e placas de Petri, utilizando papel Germitest®. Os papéis utilizados para o teste foram cortados em tamanhos de 10,5 cm × 10,5 cm para *gerbox* e 9 cm de diâmetro para placas de Petri, e autoclavados a 120 °C por 20 min. As sementes não foram esterilizadas antes do teste, pois eram de boa qualidade.

Para cada concentração foi utilizado três placas de Petri contendo duas folhas de papel de germinação e 10 sementes de pepino em cada, as sementes foram colocadas entre as folhas e distribuídas uniformemente. Após foi adicionado 2 mL de cada concentração da Tabela 3.2. Para as sementes de alface e cebola, foram utilizadas *gerbox*, três para cada concentração. Duas folhas de papel foram colocadas dentro da *gerbox*. Em seguida, 25 sementes foram adicionadas uniformemente e cobertas por uma folha de papel de germinação. Em seguida, adicionou-se 6 mL das concentrações, equivalente a 3 × o peso do papel, conforme recomendado nas Regras

para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Como controle negativo foi utilizado água destilada e como positivo foi usado sulfato de zinco heptahidratado (6 mg mL^{-1}), inibidor germinação e crescimento de raiz.

Após a identificação das *gerbox* e placas, estas foram levadas para BOD a 25°C sem iluminação. As sementes do pepino foram realizadas com 5 dias de exposição, e as de alface e cebola após 7 dias. Decorrido o tempo de exposição, o número de sementes germinadas foi contado e o comprimento das raízes foi medido com auxílio de uma régua.

A taxa de germinação será calculada pela fórmula:

$$TG (\%) = \frac{NSG}{TS} * 100$$

Onde:

TG – Taxa de germinação;

NAG – Número de sementes germinadas;

TS – Número total de sementes.

Para avaliar o efeito dos tratamentos no crescimento radicular, utilizamos a taxa de crescimento da raiz (TCR), calculada pela seguinte fórmula:

$$TCR (\%) = \frac{CRC - CRT}{CRC} * 100$$

Onde:

TCR – Taxa de crescimento da raiz;

CRC – Comprimento raiz controle negativo;

CRT – Comprimento raiz no tratamento.

Essa fórmula mede a diferença relativa no crescimento entre o controle e o tratamento, normalizando pelo crescimento no controle. A multiplicação por -100 inverte os sinais, tornando valores positivos indicativos de estimulação do crescimento e valores negativos indicativos de inibição. Vale destacar que os valores do controle negativo são usados como referência para a normalização na equação e não significam ausência de crescimento.

Análise de dados

Utilizamos análise de variância unidirecional (One-Way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, para comparar as médias entre os grupos quando os pressupostos de independência das observações, ausência de outliers significativos, normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias foram atendidos. Quando a normalidade e homogeneidade não foram atendidas, aplicamos uma transformação logarítmica aos dados antes da realização da ANOVA. Se as

suposições foram violadas, mesmo após a transformação, recorremos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados da mutagenicidade dos pesticidas foram expressos com valores de média $\pm$ desvio padrão (DP).

Para a estimativa da concentração letal média (CL_{50}), foi utilizada a regressão log-logística, uma técnica robusta para análise de dose-resposta. Os dados foram filtrados para excluir os controles positivo e negativo, e a concentração foi convertida para valores numéricos. O modelo log-logístico foi ajustado aos dados, e a CL_{50} foi determinada utilizando o pacote *drc* no *software R* (RITZ *et al.*, 2015). Este modelo é amplamente utilizado devido à sua capacidade de descrever de forma precisa a relação dose-resposta em dados biológicos e toxicológicos.

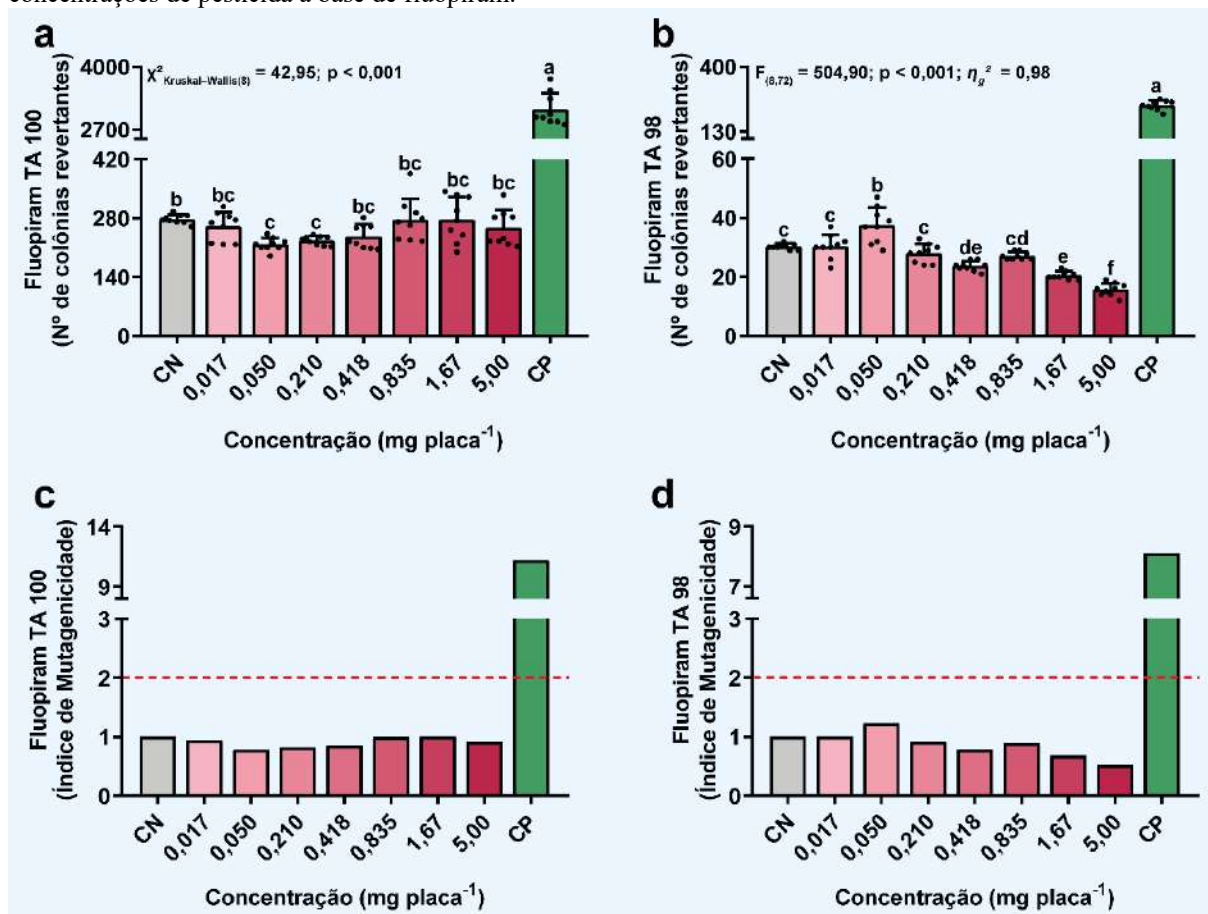
Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *software R* (R CORE TEAM, 2022), versão 4.2.2 e RStudio, versão 2023.03.0 (RSTUDIO TEAM, 2019). Os pacotes *rstatix*, *stats* e *PMCMRplus* foram utilizados para a análise estatística. O índice de mutagenicidade foi calculado no Microsoft Excel, versão 2305. Os gráficos foram feitos no GraphPad Prism, versão 9.0.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, www.graphpad.com). As figuras foram elaboradas no Adobe Illustrator, versão 28.6 (www.adobe.com/products/illustrator).

3.3 RESULTADO

Teste de Ames

O potencial mutagênico das concentrações avaliadas pode ser observado na figura 3.1, e na Tabela B.1. Os valores de colônias revertentes nos controles positivo e negativo estão em conformidade com os valores estabelecidos por Maron e Ames (1983) e Mortelmans e Zeiger (2000). O pesticida demonstrou efeito nas concentrações testadas para as duas cepas ($\chi^2_{\text{Kruskal-Wallis}(8)} = 42,952$; $p < 0,001$ para TA100 e $F_{(8,72)} = 504,9$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,98$ para TA98) (Figura 3.1ab). Na cepa TA100, as concentrações 0,050 e 0,210 mg placa⁻¹ provocaram redução no número de revertentes his⁺ ($p < 0,05$). Já na cepa TA98 a concentração 0,050 mg placa⁻¹ aumentou o número de revertentes ($p < 0,05$). Entretanto, as concentrações 0,210, 0,418, 1,67 e 5,00 mg placa⁻¹ reduziram a quantidade de revertentes ($p < 0,05$). Podemos perceber que as concentrações mais elevadas do pesticida foram citotóxicas devido a diminuição de revertentes TA98 e, aparentemente, observando o gráfico (Figura 3.1b) a redução foi concentração dependente. Contudo em nenhuma das cepas o pesticida teve efeito mutagênico ($IM < 2$) (Figura 3.1cd).

Figura 3.1 – Número de colônias revertentes his⁺ e índice de mutagenicidade resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.

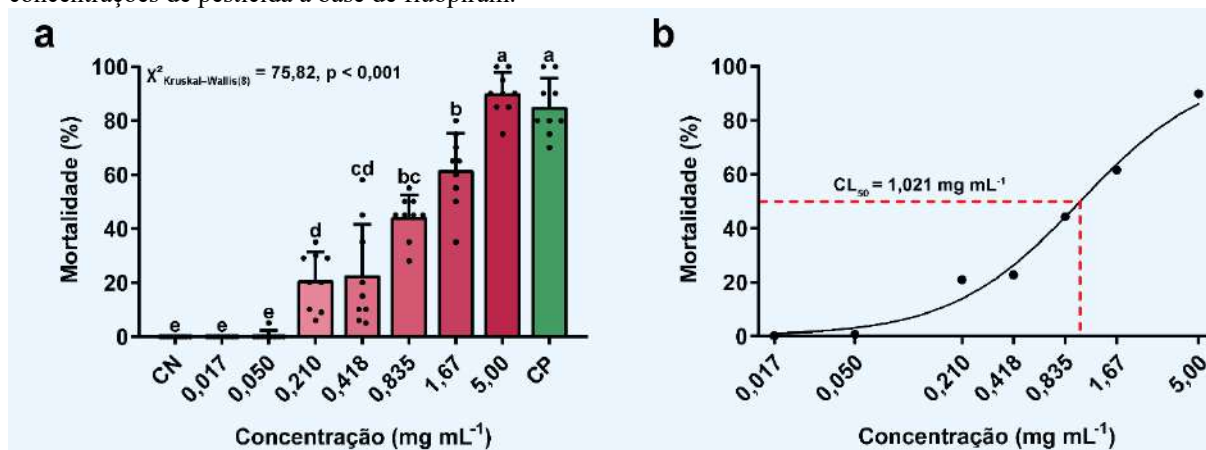


CN = controle negativo e CP = controle positivo. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas obtidas em três experimentos independentes. Letras em comum na mesma barra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Teste de toxicidade com *Artemia salina*

A exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram causaram mortalidade nas *A. salina* ($\chi^2_{\text{Kruskal-Wallis}(8)} = 75,82; p < 0,001$) (Figura 3.2a). Esses resultados sugerem que a concentração do pesticida tem um efeito significativo na mortalidade. Os resultados do teste de comparações múltiplas mostraram que a mortalidade de *A. salina* aumenta a partir da concentração de 0,210 mg mL⁻¹, em comparação ao controle negativo e as concentrações de 0,017 e 0,050 mg mL⁻¹ ($p < 0,05$). Concentrações mais altas ($\geq 0,210$ mg mL⁻¹) mostraram diferenças quando comparadas às concentrações mais baixas e ao controle negativo ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre as concentrações de 0,05 mg mL⁻¹ e o controle negativo ($p > 0,05$). A CL₅₀ foi determinada em 1,021 mg mL⁻¹, com um erro padrão de 0,075 (Figura 3.2b). Isso significa que a variabilidade associada à estimativa da CL₅₀ é relativamente pequena, indicando que a estimativa é precisa.

Figura 3.2 – Análise da taxa de mortalidade e curva dose-resposta de *Artemia salina* exposta a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.



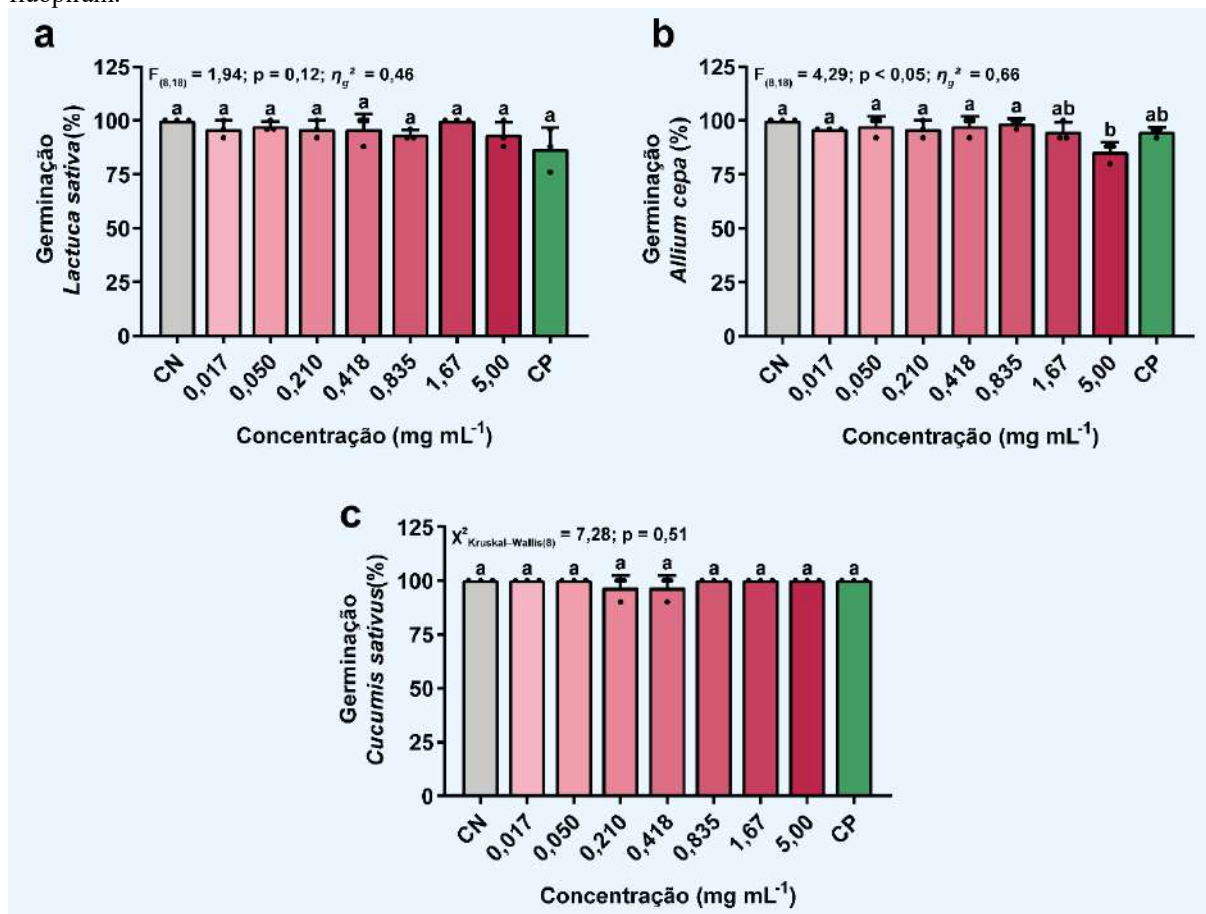
NC = controle negativo e PC = controle positivo. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas obtidas em três experimentos independentes. Letras em comum na mesma barra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Teste de germinação de sementes e alongamento da raiz

Germinação

A germinação das sementes de alface não foi afetada pela exposição a diferentes concentrações de pesticida ($F_{(8,18)} = 1,94$; $p = 0,12$; $\eta_g^2 = 0,46$) (Figura 3.3a). Para as sementes de cebola, a exposição ao pesticida afetou a germinação ($F_{(8,18)} = 4,29$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,66$) somente na maior concentração – 5,00 mg mL⁻¹, $p < 0,05$ (Figura 3.3b). Já a germinação das sementes de pepino não foram afetadas entre as diferentes concentrações do pesticida ($\chi^2_{\text{Kruskal-Wallis}(8)} = 7,28$; $p = 0,51$) (Figura 3.3c). De forma geral, os resultados sugerem que para as sementes testadas, as concentrações testadas do pesticida não causam redução da germinação, somente a concentração de 5,00 mg mL⁻¹ para cebola. Devido às altas taxas de germinação, não foi possível estimar a CE₅₀ para as sementes das três espécies.

Figura 3.3 – Taxa de germinação resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.

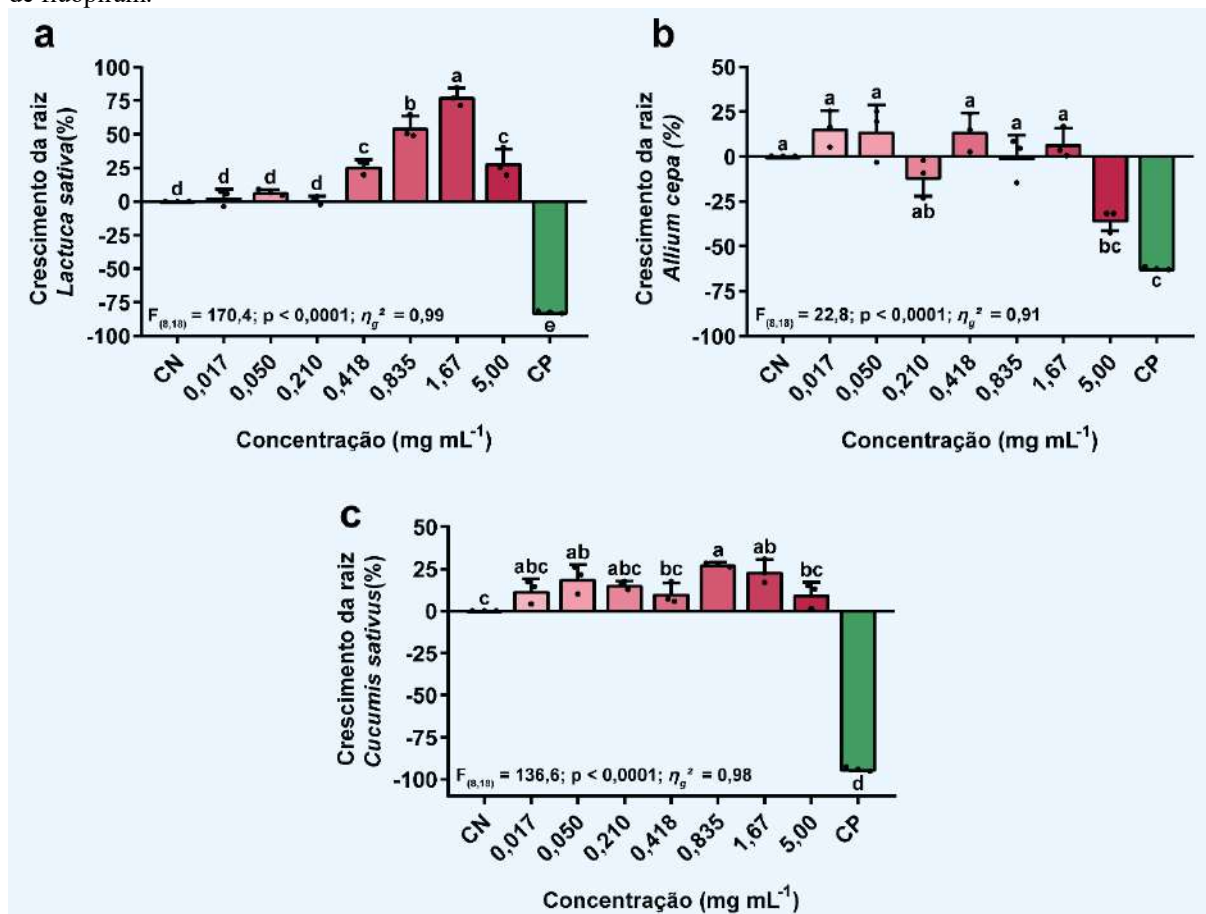


NC = controle negativo e PC = controle positivo. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas obtidas em três experimentos independentes. Letras em comum na mesma barra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

Alongamento

A taxa de crescimento da raiz de alface foi afetada pela exposição ($F_{(8,18)} = 170,4; p < 0,0001; \eta_g^2 = 0,99$), onde houve alongamento a partir $0,418 \text{ mg mL}^{-1}$, porém redução em $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ em relação a concentração anterior ($p < 0,05$) (Figura 3.4a). A exposição das sementes de cebola as concentrações do pesticida também afetou no alongamento ($F_{(8,18)} = 22,8; p < 0,0001; \eta_g^2 = 0,91$), sendo que na concentração de $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ houve inibição do crescimento ($p < 0,05$) (Figura 3.4b). O alongamento das raízes das sementes de pepino também foi afetado pela exposição ($F_{(8,18)} = 136,6; p < 0,0001; \eta_g^2 = 0,98$). As concentrações de $0,05$, $0,835$ e $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$ causaram impacto no alongamento da raiz, estimulando o crescimento quando comparadas ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 3.4c). Devido a estimulação do alongamento das raízes das três espécies estudadas não foi possível estimar a CE_{50} .

Figura 3.4 – Taxas de crescimento da raiz resultantes da exposição a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram.



CN = controle negativo e CP = controle positivo. Os valores apresentados são a média $\pm$ desvio padrão (DP) das réplicas obtidas em três experimentos independentes. Letras em comum na mesma barra não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$). Letras diferentes na mesma barra indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Fonte: elaborado pelo autor.

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes de mutagenicidade, toxicidade com *A. salina* e germinação e alongamento de raízes expostas a diferentes concentrações de pesticida à base de fluopiram fornece uma série de resultados que se complementam.

Pesticidas podem apresentar efeitos mutagênicos em espécies não-alvo, fazendo com que a avaliação do potencial mutagênico seja de extrema importância. Neste estudo, os resultados do teste de Ames evidenciam que o pesticida à base de fluopiram não apresentou efeito mutagênico nas cepas TA100 e TA98 de *S. typhimurium*, uma vez que o índice de mutagenicidade (IM) permaneceu abaixo de 2 em todas as concentrações testadas (CARIELLO; PIEGORSCH, 1996; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Contudo, observou-se efeito citotóxico nas concentrações 1,67 e 5,00 mg mL⁻¹ para a cepa TA98, devido à redução no número de colônias revertentes em comparação com o controle negativo (MORTELMANS; ZEIGER, 2000). O efeito citotóxico das concentrações pode interferir na detecção de

mutagenicidade pelo teste de Ames, uma vez que causaram a morte de células bacterianas (EREN *et al.*, 2016; AKYIL *et al.*, 2017). Alguns pesticidas apresentam citotoxicidade contra células bacterianas, o que pode limitar a interpretação dos resultados do teste de Ames, sugerindo a necessidade de métodos complementares para uma avaliação mais precisa (ILYUSHINA; EGOROVA; RAKITSKII, 2019). Além disso, certos pesticidas só se tornam mutagênicos na presença de um sistema de ativação metabólica, que degrada o composto em um metabólito ativo (BUGDA; GUVEN EZER; RENCUZOGULLARI, 2023). A incapacidade de um composto penetrar na parede celular da *S. typhimurium* também pode impedir que ele cause mutações detectáveis, já que a estrutura e as propriedades físico-químicas dos compostos são determinantes para a penetração (JILLELLA; KHAN; ROY, 2020). É importante considerar ainda que alguns pesticidas apresentam genotoxicidade apenas em condições *in vivo*, como observado em avaliações que utilizam tanto métodos *in vitro* (teste de Ames), quanto *in vivo* (teste do micronúcleo em eritrócitos de mamíferos) (ILYUSHINA; EGOROVA; RAKITSKII, 2019).

A toxicidade de pesticidas em organismos aquáticos é uma preocupação significativa, pois os cursos de água são receptores dessas moléculas devido à lixiviação e deriva (NOWELL *et al.*, 2018). Neste estudo, a *A. salina* foi utilizada como organismo aquático não-alvo para avaliar a toxicidade de pesticida à base de fluopiram. Os resultados demonstram que a mortalidade depende da concentração, com CL_{50} determinada em $1,021 \text{ mg mL}^{-1}$, sugerindo uma alta precisão na estimativa e revela sensibilidade da *A. salina* ao pesticida. A dose-dependência observada no presente estudo indica que pequenas variações na concentração do pesticida podem ter impactos significativos na fauna aquática não-alvo, o que é consistente com resultados de outros estudos avaliando outras classes de pesticidas (VENKATESWARA *et al.*, 2007; CRUZEIRO *et al.*, 2017).

Em relação a resposta entre as diferentes espécies de vegetais testados, há uma variabilidade significativa em resposta a exposição ao pesticida, conforme observado na germinação das sementes e alongamento das raízes. De forma geral a germinação não foi afetada para as três espécies testadas, com exceção na maior concentração para cebola ($5,00 \text{ mg mL}^{-1}$). Apesar das três espécies não apresentarem diferença na germinação, na literatura há dados que sugere que a sensibilidade a pesticidas pode variar entre a espécies devido características bioquímicas e fisiológicas (STAVELEY *et al.*, 2018). Já o alongamento das raízes foi afetado em todas as espécies testadas, com uma inibição observada na concentração de $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$ para alface e cebola. Por outro lado, o pepino apresentou uma resposta de estimulação do crescimento radicular em concentrações mais baixas em relação a concentração $5,00 \text{ mg mL}^{-1}$,

resultado semelhante para o crescimento da radícula da alface. Esse fenômeno é conhecido como resposta hormética, onde concentrações baixas de um estressor, como o pesticida, podem estimular o crescimento enquanto concentrações altas causam inibição. Esse fenômeno é bem documentado na literatura de toxicologia vegetal para herbicidas (APPLEBY, 1998; PYON *et al.*, 2012; BUSI; GIROTTI; POWLES, 2016; XU *et al.*, 2023). Além disso, foi demonstrado que o fluopiram promoveu o crescimento de pimenta, devido aumentar a abundância de bactérias solubilizadoras de P e fixadoras de N (SUN *et al.*, 2020). No entanto, como este estudo foi realizado em solo, sua relevância para condição de germinação em papel é limitada. A estimulação do crescimento radicular pode ser um indicativo de proliferação celular aumentada, mas essa resposta pode ser prejudicial caso seja descontrolada, levando a crescimento anormais e desordens de desenvolvimento, para responder isto testes complementares precisam ser realizados.

3.5 CONCLUSÃO

O pesticida a base de fluopiram não foi mutagênico para as cepas TA100 e TA98 de *S. typhimurium*. Entretanto a citotoxicidade observada na cepa TA98 e a toxicidade observada em *A. salina* indicam potencial tóxico do fluopiram em espécies não-alvo. A toxicidade para *A. salina* sugere que o pesticida pode ser tóxico também para espécies aquáticas. Além disso, a exposição ao pesticida afetou significativamente o crescimento radicular dos vegetais estudados, com efeitos variando de inibição a estimulação dependendo da concentração, o que pode levar a desordens de desenvolvimento a longo prazo em espécies vegetais na natureza que podem entrar em contato com o pesticida. A combinação de métodos complementares de avaliação utilizados nesse trabalho foi essencial para uma análise dos riscos associados aos pesticidas, garantindo a segurança ambiental e humana.

REFERÊNCIAS

- AKYIL, D.; KONUK, M.; EREN, Y.; LIMAN, R.; SAĞLAM, E. Mutagenic and genotoxic effects of Anilofos with micronucleus, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and Ames test. **Cytotechnology**, vol. 69, no. 6, p. 865–874, 12 Dec. 2017. DOI 10.1007/s10616-017-0099-y.
- APPLEBY, A. P. The practical implications of hormetic effects of herbicides on plants. **Human & Experimental Toxicology**, vol. 17, no. 5, p. 270–271, 2 May 1998. DOI 10.1177/096032719801700511.

BÉNIT, P.; KAHN, A.; CHRETIEN, D.; BORTOLI, S.; HUC, L.; SCHIFF, M.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.-P.; FAVIER, J.; GRESSENS, P.; RAK, M.; RUSTIN, P. Evolutionarily conserved susceptibility of the mitochondrial respiratory chain to SDHI pesticides and its consequence on the impact of SDHIs on human cultured cells. **PLOS ONE**, vol. 14, no. 11, p. e0224132, 7 Nov. 2019. DOI 10.1371/journal.pone.0224132.

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.** Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BUGDA, H.; GUVEN EZER, B.; RENCUZOGULLARI, E. In vitro screening of genotoxicity and mutagenicity of pyriproxyfen in human lymphocytes and *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 strains. **Drug and Chemical Toxicology**, vol. 46, no. 5, p. 955–961, 3 Sep. 2023. DOI 10.1080/01480545.2022.2113096.

BUSI, R.; GIROTTO, M.; POWLES, S. B. Response to low-dose herbicide selection in self-pollinated *Avena fatua*. **Pest Management Science**, vol. 72, no. 3, p. 603–608, Mar. 2016. DOI 10.1002/ps.4032.

CARIELLO, N. F.; PIEGORSCH, W. W. The Ames test: The two-fold rule revisited. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, vol. 369, no. 1–2, p. 23–31, Jul. 1996. DOI 10.1016/S0165-1218(96)90044-0.

CRUZEIRO, C.; AMARAL, S.; ROCHA, E.; ROCHA, M. J. Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and *Artemia salina* and *Daphnia magna* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 145, p. 126–134, Nov. 2017. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.07.010.

EPA. Ecological Effects Test Guidelines: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. **United States Environmental Protection Agency**, no. April, p. 1–8, 1996. Disponível em: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockkey=P100RF5I.TXT>.

EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; AKYIL, D.; ÖZKARA, A. Mutagenic and cytotoxic activities of benfuracarb insecticide. **Cytotechnology**, vol. 68, no. 4, p. 637–643, 8 Aug. 2016. DOI 10.1007/s10616-014-9811-3.

FILIPE, M. S.; ISCA, V. M. S.; NTUNGWE N., E.; PRINCIOTTO, S.; DÍAZ-LANZA, A. M.; RIJO, P. Lethality Bioassay using *Artemia salina* L. **Journal of Visualized Experiments**, vol. 2022, no. 188, p. 1–13, 11 Oct. 2022. DOI 10.3791/64472.

ILYUSHINA, N. A.; EGOROVA, O.; RAKITSKII, V. Limitations of pesticide genotoxicity testing using the bacterial in vitro method. **Toxicology in Vitro**, vol. 57, p. 110–116, Jun. 2019. DOI 10.1016/j.tiv.2019.02.018.

ILYUSHINA, N. A.; EGOROVA, O. V; MASALTSEV, G. V; AVERIANOVA, N. S.; REVAZOVA, Y. A.; RAKITSKII, V. N.; GOUMENOU, M.; VARDAVAS, A.; STIVAKTAKIS, P.; TSATSAKIS, A. Genotoxicity of mixture of imidacloprid, imazalil and tebuconazole. **Toxicology Reports**, vol. 7, p. 1090–1094, 2020. DOI 10.1016/j.toxrep.2020.08.021.

JILLELLA, G. K.; KHAN, K.; ROY, K. Application of QSARs in identification of mutagenicity mechanisms of nitro and amino aromatic compounds against *Salmonella typhimurium* species. **Toxicology in Vitro**, vol. 65, p. 104768, Jun. 2020. DOI 10.1016/j.tiv.2020.104768.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, vol. 22, no. 4, p. 1050–1064, 18 May 2016. DOI 10.1080/10807039.2015.1133242.

LI, X.-X.; YU, M.-F.; RUAN, X.; ZHANG, Y.-Z.; WANG, Q. Phytotoxicity of 4,8-Dihydroxy-1-tetralone Isolated from *Carya cathayensis* Sarg. to Various Plant Species. **Molecules**, vol. 19, no. 10, p. 15452–15467, 26 Sep. 2014. DOI 10.3390/molecules191015452.

LIU, Y.; ZHANG, W.; WANG, Y.; LIU, H.; ZHANG, S.; JI, X.; QIAO, K. Oxidative stress, intestinal damage, and cell apoptosis: Toxicity induced by fluopyram in *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, vol. 286, no. P3, p. 131830, Jan. 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2021.131830.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, vol. 113, no. 3–4, p. 173–215, Mar. 1983. DOI 10.1016/0165-1161(83)90010-9.

MEYER, B.; FERRIGNI, N.; PUTNAM, J.; JACOBSEN, L.; NICHOLS, D.; MCCLAUGHLIN, J. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, vol. 45, no. 05, p. 31–34, 29 May 1982. DOI 10.1055/s-2007-971236.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, vol. 455, no. 1–2, p. 29–60, Nov. 2000. DOI 10.1016/S0027-5107(00)00064-6.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Summary para CID 11158353, Fluopyram. 2024. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluopyram>. Acesso em 3 de Agosto de 2024.

NOWELL, L. H.; MORAN, P. W.; SCHMIDT, T. S.; NORMAN, J. E.; NAKAGAKI, N.; SHODA, M. E.; MAHLER, B. J.; VAN METRE, P. C.; STONE, W. W.; SANDSTROM, M. W.; HLADIK, M. L. Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern U.S. streams. **Science of The Total Environment**, vol. 613–614, p. 1469–1488, Feb. 2018. DOI 10.1016/j.scitotenv.2017.06.156.

OECD. **Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test**. Section 4. Paris: OECD Publishing, 2020(OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4). DOI 10.1787/9789264071247-en.

ÖZKARA, A. Assessment of Mutagenic Activity of Karate Zeon Pesticide by Ames Test. **Afyon Kocatepe University Journal of Sciences and Engineering**, vol. 22, no. 3, p. 465–469, 30 Jun. 2022. DOI 10.35414/akufemubid.1069842.

PYON, J.-Y.; UDDIN, Md. R.; KIM, S.-W.; PARK, K.-W. Research Trends in Hormetic Stimulation Effects of Herbicides in Plants. **Korean Journal of Weed Science**, vol. 32, no. 3, p. 159–169, 30 Sep. 2012. DOI 10.5660/KJWS.2012.32.3.159.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, Version 4.2.2. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

RAJAK, P.; ROY, S.; GANGULY, A.; MANDI, M.; DUTTA, A.; DAS, K.; NANDA, S.; GHANTY, S.; BISWAS, G. Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? **Journal of**

Hazardous Materials Advances, vol. 10, no. February, p. 100264, May 2023. DOI 10.1016/j.hazadv.2023.100264.

RATHOD, P. H.; SHAH, P. G.; PARMAR, K. D.; KALASARIYA, R. L. The Fate of Fluopyram in the Soil–Water–Plant Ecosystem: A Review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 260, no. 1, p. 1, 5 Dec. 2022. DOI 10.1007/s44169-021-00001-7.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 12, p. e0146021, 30 Dec. 2015. DOI 10.1371/journal.pone.0146021.

RSTUDIO TEAM. **RStudio**: Integrated Development for R, Version 2023.03.0. Boston, MA, 2019. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>.

SALAY, G.; LUCARELLI, N.; GASCÓN, T. M.; CARVALHO, S. S. de; VEIGA, G. R. L. da; REIS, B. da C. A. A.; FONSECA, F. L. A. Acute Toxicity Assays with the *Artemia salina* Model: Assessment of Variables. **Alternatives to Laboratory Animals**, vol. 52, no. 3, p. 142–148, 5 May 2024. DOI 10.1177/02611929241242443.

STAVELEY, J. P.; GREEN, J. W.; NUSZ, J.; EDWARDS, D.; HENRY, K.; KERN, M.; DEINES, A. M.; BRAIN, R.; GLENN, B.; EHRESMAN, N.; KUNG, T.; RALSTON-HOOPER, K.; KEE, F.; MCMASTER, S. Variability in Nontarget Terrestrial Plant Studies Should Inform Endpoint Selection. **Integrated Environmental Assessment and Management**, vol. 14, no. 5, p. 639–648, 5 Sep. 2018. DOI 10.1002/ieam.4055.

SUN, T.; LI, M.; SALEEM, M.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. The fungicide “fluopyram” promotes pepper growth by increasing the abundance of P-solubilizing and N-fixing bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 188, no. November 2019, p. 109947, Jan. 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109947.

TINWELL, H.; ROUQUIÉ, D.; SCHORSCH, F.; GETER, D.; WASON, S.; BARS, R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 70, no. 3, p. 648–658, Dec. 2014. DOI 10.1016/j.yrtph.2014.09.011.

VENKATESWARA RAO, J.; KAVITHA, P.; JAKKA, N. M.; SRIDHAR, V.; USMAN, P. K. Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp,

Artemia salina. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 53, no. 2, p. 227–232, 1 Aug. 2007. DOI 10.1007/s00244-006-0226-9.

XU, N.; SUN, Y.; WANG, Y.; CUI, Y.; JIANG, Y.; ZHANG, C. Hormesis effects in tomato plant growth and photosynthesis due to acephate exposure based on physiology and transcriptomic analysis. **Pest Management Science**, vol. 79, no. 6, p. 2029–2039, 7 Jun. 2023. DOI 10.1002/ps.7381.

YAN, Z.; LI, P.; XIAO, Y.; CAO, L.; YAO, L. Phytotoxic Effects of Allelochemical Acacetin on Seed Germination and Seedling Growth of Selected Vegetables and Its Potential Physiological Mechanism. **Agronomy**, vol. 12, no. 5, p. 1038, 26 Apr. 2022. DOI 10.3390/agronomy12051038.

ARTIGO 4. EFEITOS DE CURTO PRAZO DA APLICAÇÃO DO HERBICIDA FLUMIOXAZINA NA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO SOLO

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹, Eliane Andreia dos Santos Oliveira², Samantha Salomão Caramori¹, Virgínia Damin² & Luciane Madureira Almeida¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central - Sede Anápolis - Ciências Exatas e tecnológicas, 459, Br 153, nº 3.105, CEP: 75132-903, Anápolis-GO, Brasil.

²Herbil, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia - Campus Samambaia, Av. Esperança s/n, CEP: 74.690-900, Goiânia-GO, Brasil

Resumo – Pesticidas podem afetar os microrganismos do solo e alterar funções como serviços ecossistêmicos e ciclos biogeoquímicos, consequentemente empobrecendo o solo. Embora a flumioxazina seja um herbicida eficiente para a cultura da soja, há pouca informação sobre seu efeito em espécies não-alvo do solo. Este estudo examina os efeitos a curto prazo de um herbicida à base de flumioxazina na microbiota do solo. Através de análises da atividade enzimática, do carbono da biomassa microbiana (CBM), da respiração basal do solo (RBS), do quociente metabólico (qCO_2), do amônio ($N-NH_4^+$) e do nitrato ($N-NO_3^-$), analisamos as respostas do solo à aplicação do herbicida durante um curto período. Os resultados indicam que o herbicida influencia seletivamente as enzimas do solo: a atividade da β -glucosidase diminuiu, enquanto a α -glucosidase, a fosfatase ácida e a glicina aminopeptidase não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A atividade da arilsulfatase apresentou um efeito de interação entre o tratamento e o tempo. As alterações em $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$ indicaram a influência do herbicida no ciclo dos nutrientes. Os parâmetros CBM, RBS e qCO_2 também responderam à aplicação do herbicida, refletindo alterações na atividade microbiana e no metabolismo do solo. A interação entre o tempo e o tratamento revelou uma dinâmica complexa, sugerindo que os efeitos do herbicida são moderados por fatores ambientais e variam ao longo do tempo. Este estudo destaca a necessidade de avaliar os impactos dos herbicidas no ambiente de forma abrangente, considerando os múltiplos efeitos bioquímicos e as condições ambientais variáveis que influenciam a microbiota do solo.

Palavras-chave: biomassa microbiana, ecotoxicologia, enzimas do solo, pesticidas, qCO_2

4.1 INTRODUÇÃO

O solo abriga uma vasta biodiversidade que é crucial para os ecossistemas terrestres. Estima-se que aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas vivam no solo, desempenhando várias funções ecossistêmicas (TOSTADO *et al.*, 2022). No entanto, a diversidade microbiana do solo tem sido afetada pelo uso crescente de pesticidas na agricultura

(WOŁEJKO *et al.* 2020), considerando que a maioria é tóxica para os microrganismos (TOSTADO *et al.*, 2022).

Os herbicidas são a classe de pesticidas mais utilizada na agricultura, sendo responsáveis por mais de metade do consumo mundial de pesticidas em 2020 (FAOSTAT, 2023). Embora necessários para o controle das ervas daninhas nas culturas, os efeitos dos herbicidas na saúde do solo continuam a exigir uma investigação aprofundada. Esta investigação é necessária uma vez que, durante as aplicações de herbicidas, as plantas retêm uma parte do herbicida e o solo absorve outra, tornando-se potencialmente biodisponível para microrganismos não-alvo (THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019). O herbicida sorvido no solo pode apresentar efeitos diretos ou indiretos nos microrganismos não-alvo. Os efeitos diretos estão associados à penetração do herbicida nas paredes celulares, interferindo no metabolismo normal e conduzindo à morte celular (TRIPATHI *et al.*, 2020). Os efeitos indiretos estão associados às alterações ambientais causadas pelos pesticidas (TRIPATHI *et al.*, 2020). Tanto os efeitos diretos como os indiretos podem resultar em impactos na biodiversidade do solo, o que, por sua vez, afeta a biomassa e a atividade microbiana do solo (THIOUR-MAUPRIVEZ *et al.*, 2019; PERTILE *et al.*, 2020). Assim, a avaliação de vários aspectos do solo, relacionados a sua fertilidade e atividade biológica, é essencial para fornecer informações vitais sobre a saúde do solo e garantir a sustentabilidade dos ecossistemas e da agricultura (TRIPATHI *et al.*, 2020). A utilização da atividade microbiana para avaliar a qualidade do solo deve-se ao fato que fornece respostas rápidas a um impacto ambiental devido à sua sensibilidade (NANNIPIERI *et al.*, 2003).

A flumioxazina tem se destacado como um herbicida eficaz no controle de plantas daninhas em diversas culturas, como soja, milho, sorgo, girassol e trigo (MEROTTO *et al.*, 2022). No entanto, suas características químicas a tornam altamente móvel no solo, persistente no ambiente e com potencial para atingir as águas subterrâneas. Este fato suscita preocupações quanto ao seu impacto em organismos não-alvo, como os organismos do solo (micro e macro) e os organismos aquáticos (EEFSA *et al.*, 2020).

Embora alguns estudos tenham investigado os efeitos da flumioxazina nas propriedades biológicas do solo e na diversidade, estrutura e composição da comunidade microbiana (PERTILE *et al.*, 2021, 2020; ARAUJO *et al.*, 2023), nenhum foi realizado em condições naturais (em campo). Os estudos realizados em condições de campo representam o comportamento real e as interações entre o pesticida, a microbiota e o ambiente.

Neste contexto, este estudo visa contribuir para a compreensão do impacto dos herbicidas nas propriedades biológicas do solo, ajudando a tomar decisões sobre a utilização de

herbicidas na agricultura. É importante ressaltar que a preservação da biodiversidade do solo é crucial para manter a sustentabilidade dos ecossistemas e a segurança alimentar global, e entender os efeitos dos herbicidas no solo é um passo fundamental nessa direção. Para este efeito, realizamos um experimento de campo para avaliar, em condições reais, o efeito da flumioxazina (Sumysoia®, Sumitomo) na atividade microbiana do solo. A hipótese deste trabalho é que a exposição ao pesticida à base de flumioxazina acarretará impactos mensuráveis na atividade enzimática (α -glucosidase, β -glucosidase, fosfatase, glicina aminopeptidase e arilsulfatase), parâmetros de nitrato e amônio (N-NH_4^+ , N-NO_3^-), carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$). Além disso, esperamos que estes efeitos se alterem ao longo do tempo, indicando uma resposta dinâmica do solo à presença do herbicida.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O experimento ocorreu entre novembro de 2021 e janeiro de 2022 em uma área da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás, região central de Goiás, Brasil. A área de estudo abrangeu 600 m². As coordenadas geográficas foram 16°35'58.80 "S, 49°17'33.98 "W, com altitude de 715 m (Figura 4.1a). A figura 4.2 apresenta as condições ambientais durante o experimento. O solo da área estudada foi classificado como latossolo amarelo distrófico, e a tabela 4.1 apresenta suas características.

Tabela 4.1 – Características químicas e texturais do solo da área experimental.

pH (CaCl ₂)	MO (%)	H+Al	Ca	Mg	Al	CTC	Mn (Mehl)	Fe (Mehl)	Cu (Mehl)	Zn (Mehl)	P (Mehl)
(cmolc dm ⁻³)						(mg dm ⁻³)					
4.91	1.56	3.12	2.49	1.13	0.08	6.98	41.50	20.20	1.96	2.59	13.27
		K (mg dm ⁻³)	Al sat.	B.S.	Clay	Silt	Sand				
		93.60	2.17	55.28	32	12	56				

MO = Matéria orgânica; CTC = Capacidade de troca de cátions; Al sat = Saturação de alumínio; SB = Saturação de bases.

Figura 4.1 – Mapa da área de estudo. **a)** área onde o estudo foi realizado, o quadrado vermelho representa o local exato onde as parcelas foram montadas. **b)** representação e dimensão das parcelas.

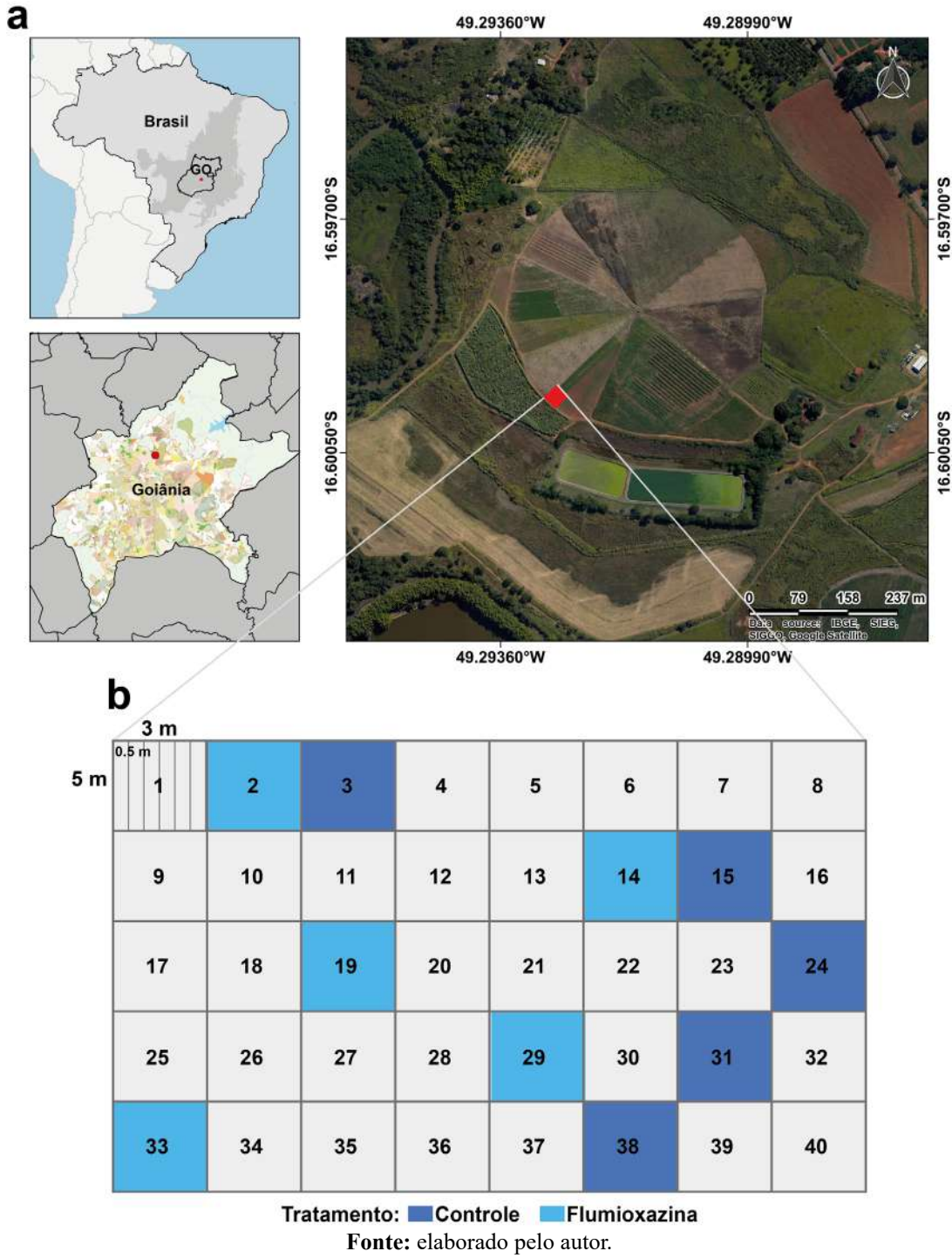
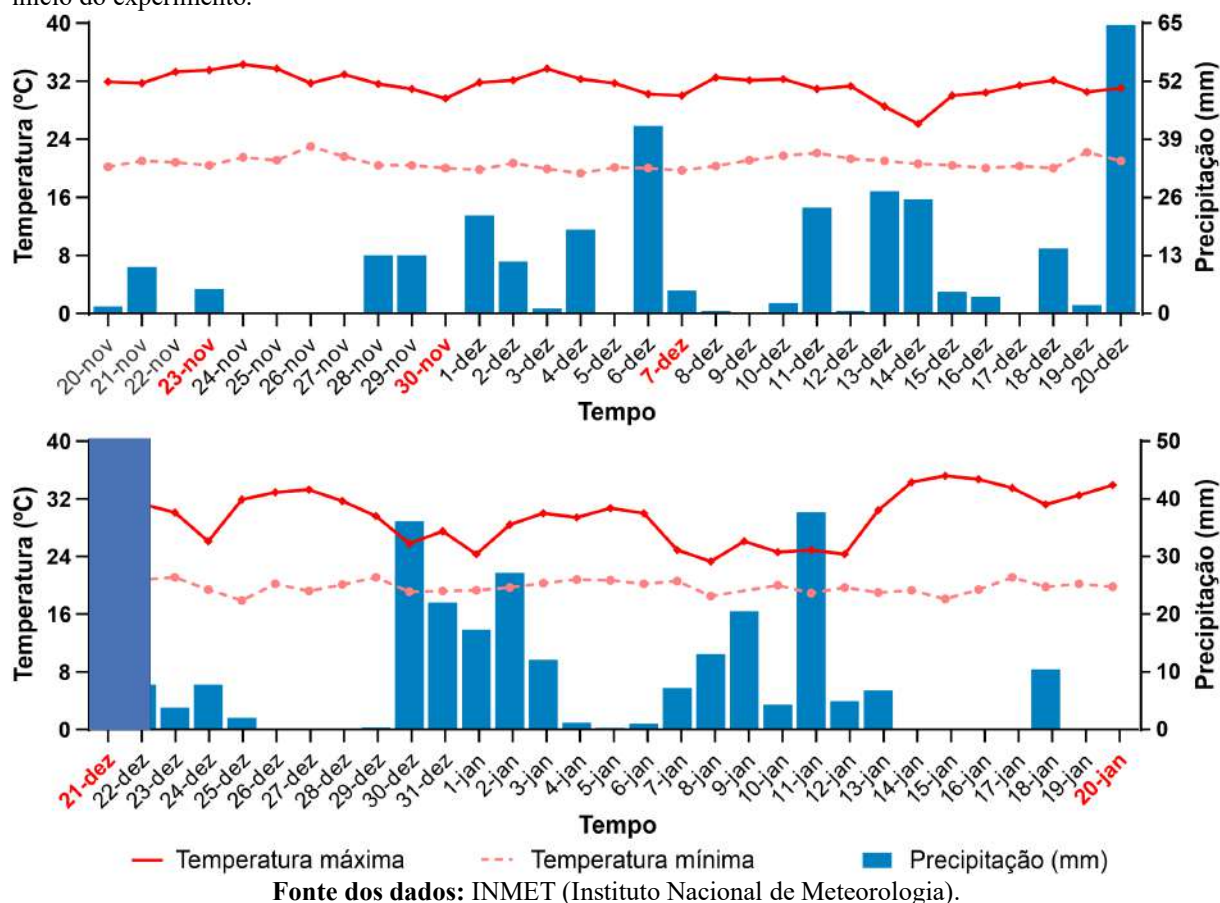


Figura 4.2 – Variáveis ambientais: gráfico de dispersão que exibe a temperatura máxima e mínima (à esquerda) e gráfico de barras que mostra a precipitação (à direita). As datas em vermelho representam os dias de coleta das amostras de solo, enquanto as datas em cinza, anteriores a 23-nov, indicam a temperatura e precipitação antes do início do experimento.



A área de 600 m² foi previamente mapeada e dividida em 40 parcelas iguais de 15 m² (3 × 5 m) (Figura 4.1b). Cinco parcelas foram sorteadas para representar a área controle, e outras cinco como a área tratada com herbicida. As demais parcelas receberam outros tratamentos que não serão abordados neste estudo. Soja foi cultivada após a aplicação dos pesticidas na área experimental, para que o solo não ficasse descoberto.

Preparo da calda e aplicação

A formulação comercial Sumysoia® (Sumitomo, contendo 500 g i.a. Kg⁻¹ de flumioxazina) foi aplicado na cultura da soja na dose de 100 g ha⁻¹ em calda equivalente a 200 L, conforme recomendação do fabricante para aplicação em cultura de sola. A calda foi preparada adicionando-se o herbicida à água e agitando-se até formar uma solução homogênea. Em seguida, a calda foi aplicada com um pulverizador costal, pressurizado com CO₂, e acoplado a uma barra de 2 m contendo quatro bicos de jato plano (XR 110.02) com espaçamento de 0,50 m.

Amostragem do solo

As amostras de solo foram coletadas em cinco períodos (0 - antes da aplicação, 7, 14, 28 e 58 dias após a aplicação do herbicida - DAA). Para cada período, foram coletadas aleatoriamente nove subamostras de solo de cada parcela na camada superficial do solo (0 a 5 cm - onde a atividade biológica é mais intensa (LANGE *et al.*, 2015) com auxílio de uma pá. Essas subamostras foram misturadas e homogeneizadas, obtendo-se uma amostra composta, que foi dividida em quatro partes para as análises enzimática, carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal do solo (RBS), amônio (N-NH_4^+) e nitrato (N-NO_3^-). As amostras foram colocadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório em caixas térmicas com gelo, onde foram peneiradas (2 mm) e armazenadas na geladeira até serem analisadas. O teor de umidade de cada amostra foi determinado através da secagem em estufa de 3 g de solo a 110 °C durante 48 h.

Atividade enzimática do solo

As atividades das enzimas α -glucosidase (EC 3.2.1.20), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), fosfatase ácida (EC 3.1.3.2), glicina aminopeptidase (EC 3.4.11.1) e arilsulfatase (EC 3.1.6.1) foram avaliadas como indicadores da atividade biológica e da qualidade do solo.

As enzimas, com exceção da arilsulfatase, foram analisadas como adaptações nos protocolos propostos por Allison e Vitousek (2005) e Jackson *et al.* (2013) para que a análise fosse feita em microplacas, o que permite a análise de muitas amostras em curto espaço de tempo e com custo mais reduzido. Uma quantidade de 0,3 g de solo foi pesada e homogeneizada em 2.000 μL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Em seguida, 400 μL desse extrato foram transferidos para cinco microtubos, nos quais 400 μL de substratos corresponderam às respectivas enzimas (material suplementar) foi adicionado (um tubo por enzima). O quinto tubo (branco da amostra) recebeu 400 μL de tampão acetato de sódio. Para o branco do substrato, foram utilizados 400 μL de tampão acetato de sódio e 400 μL do substrato. Os microtubos foram incubados por 1 h a 40 °C e depois centrifugados a $3.000 \times g$ por 5 min. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 10 μL de NaOH 1M em cada poço e, em triplicata, adicionou-se 220 μL do sobrenadante da amostra. A atividade enzimática foi medida por espectrofotometria a 410 nm.

A atividade da arilsulfatase (EC 3.1.6.1) foi medida utilizando o método de Whalen e Warman (1996) com as seguintes modificações. Inicialmente, 40 μL de tolueno foram adicionados a 0,3 g de solo (massa seca) e agitados durante uma hora a 20 °C. Em seguida, foram adicionados 1.200 μL de tampão acetato de sódio 0,5M pH 5,8, e o solo foi

homogeneizado. Em seguida, 600 μL do extrato foram transferidos para um microtubo (branco da amostra), e os 600 μL restantes receberam 150 μL de p-nitrofenil sulfato 4,7 mM. Para o branco de substrato, utilizou-se 600 μL de tampão acetato de sódio e 150 μL do substrato. Os microtubos foram incubados por 1 h a 37 °C. As amostras foram colocadas em contato com gelo por 5 min e depois centrifugadas a $11.000 \times g$ por cinco minutos. Em uma microplaca de 96 poços, foram adicionados 100 μL de NaOH 0,5 M nos poços e, em triplicata, foram adicionados 200 μL do sobrenadante das amostras. A atividade enzimática foi mensurada a partir da leitura por espectrofotometria a 400 nm.

A quantificação da atividade enzimática foi feita por comparação com uma curva padrão, com diferentes concentrações de p-nitrofenol. A atividade enzimática foi expressa em $\text{nmol pNP mg}^{-1} \text{ solo seco h}^{-1}$.

Teores de nitrogênio inorgânico

Uma quantidade de 4 g de solo foi misturada com 40 mL de KCl 1 M. A mistura foi agitada durante duas horas a 100 rpm e decantada. Após a decantação, 30 mL do extrato foram filtrados. Os valores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- foram obtidos pelo método de Bremner e Keeney (1966), que consiste em três etapas. A primeira compreende as extrações de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , a segunda proporciona a destilação por arraste de vapor e a última etapa realiza a titulação (BREMNER; KEENEY, 1966; CANTARELLA; TRIVELIN, 2001). Os valores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- foram somados para estimar a disponibilidade imediata de nitrogênio, divididos pelo valor estimado de nitrogênio para obter NH_4^+ (%) e NO_3^- (%), e expressos em mg Kg^{-1} de solo.

Biomassa e taxas de respiração microbiana

A determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) seguiu as modificações propostas por Knupp e Ferreira (2011) do protocolo proposto por Vance *et al.* (1987). Essa técnica consiste na quantificação do carbono após a digestão por irradiação. Foi utilizada uma quantidade de 20 g de solo, irradiando 10 g e não irradiando 10 g. Ambos receberam 30 mL de solução extratora de K_2SO_4 0,5 M, seguido de agitação a 100 rpm por 68 min e decantação. O extrato resultante foi filtrado, e para o processo de digestão foi utilizado uma solução sulfocrômica a 100 °C por 30 min. Após a digestão, a solução foi resfriada até 25 °C, e a absorbância foi medida a 600 nm. A concentração de carbono da biomassa foi expressa em mg kg^{-1} de solo.

A respiração basal do solo (RBS) foi determinada utilizando-se as modificações propostas por Silva *et al.* (2007) do protocolo proposto por (JENKINSON; POWLSON, 1976). Uma quantidade de 50 g de solo de cada amostra foi incubada a 25 °C por sete dias em frascos

de vidro hermeticamente fechados contendo 10 mL de solução de NaOH 1M para capturar o CO₂ liberado pelas amostras. Após a incubação, foi adicionado BaCl₂ 10% (m:v) para precipitar o carbonato de sódio formado durante a incubação e o excesso de NaOH foi determinado por titulação com solução de HCl 0,5 N, usando fenolftaleína 1% (m:v) como indicador. A RBS foi apresentada como média por hora, e o $q\text{CO}_2$ do solo foi calculado dividindo a RBS pelo CBM.

Análise dos dados

A análise estatística ANOVA mista de duas vias avaliou as diferenças potencialmente significativas nas variáveis de resposta entre as parcelas tratadas com herbicidas e as parcelas de controlo e se as diferenças persistiam ao longo do tempo. Esta análise permitiu comparações médias de grupos classificados por duas variáveis categóricas independentes: um fator entre sujeitos (grupo tratado vs. grupo de controlo) e um fator dentro dos sujeitos (tempo). A confiabilidade dos resultados foi garantida através da verificação dos pressupostos relevantes, incluindo outliers significativos, normalidade, homogeneidade das variâncias e covariâncias e esfericidade. Por vezes, apenas a esfericidade foi violada, mas nesses casos foi utilizada a correção de Greenhouse-Geisser. No caso de uma interação bidirecional significativa, a interação foi decomposta em efeitos principais simples e comparações simples entre pares. Os efeitos principais foram interpretados com uma ANOVA unidirecional da primeira variável independente em cada nível da segunda variável independente, utilizando a correção de Bonferroni. As comparações simples emparelhadas utilizaram o teste t entre os níveis de tratamento, com correção de Bonferroni. No entanto, a ANOVA unidirecional e o teste t emparelhado forneceram valores de p iguais, uma vez que havia apenas dois tratamentos (dois níveis); por conseguinte, foi considerado o valor da ANOVA unidirecional.

Para uma interação bidirecional não significativa, em que não houve interação, os efeitos principais para cada uma das duas variáveis (grupo e tempo) foram avaliados por meio de teste t pareado com correção de Bonferroni. No entanto, é apresentado apenas a comparação entre os tempos 0 e 58 dias. Os resultados completos podem ser visualizados Apêndice C.

Foi realizado também uma análise de variância multivariada (PERMANOVA) e uma análise de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) para avaliar a semelhança entre os tratamentos de acordo com as variáveis de resposta. A PERMANOVA foi utilizada para determinar diferenças potencialmente significativas na composição global das variáveis de resposta entre tratamentos e tempos. Para a análises as variáveis respostas foram padronizadas pelo método *standardize* do comando *decostand*. A PERMANOVA foi realizada considerando os fatores tratamento e fase, e utilizando 999 permutações com distância Euclidiana. A nMDS

foi utilizada para mostrar padrões e possíveis agrupamentos de tratamentos e tempos com base nas semelhanças entre os grupos de controle e tratados.

Todos os procedimentos estatísticos utilizaram o *software* R (R CORE TEAM, 2022), versão 4.2.2, e o *RStudio*, versão 2023.03.0 (RSTUDIO TEAM, 2019). Para a análise estatística foi utilizado os pacotes *rstatix* e *vegan*. Para a plotagem utilizou os pacotes *ggplot2* e *ggpubr*. As figuras foram criadas no Adobe Illustrator, versão 24.0.1.

4.3 RESULTADO

A figura 4.3 mostra a variação temporal das atividades enzimáticas dos microrganismos do solo tratados com flumioxazina e a testemunha (ausência de herbicida). Ambas as curvas apresentaram comportamento semelhante, mas houve algumas oscilações entre as curvas ao longo do tempo. A análise estatística revelou que o tempo causou a flutuação da atividade das enzimas α -glucosidase, fosfatase ácida e glicina aminopeptidase, indicada pela ANOVA mista de duas vias ($F_{(1,97;15,73)} = 23,37$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,71$; $F_{(1,85;14,79)} = 59,75$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,85$; and $F_{(4;32)} = 92,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,91$, respectivamente) (Figura 4.3a, c-d). Análises post-hoc indicaram que as variações na atividade dessas enzimas entre o tempo inicial (0 d) e o tempo final (58 d) foram diferentes ($p < 0,001$). Os resultados sugerem que o tempo foi relevante para a atividade enzimática, mas o tratamento com o herbicida e o grupo de controle comportaram-se de forma semelhante.

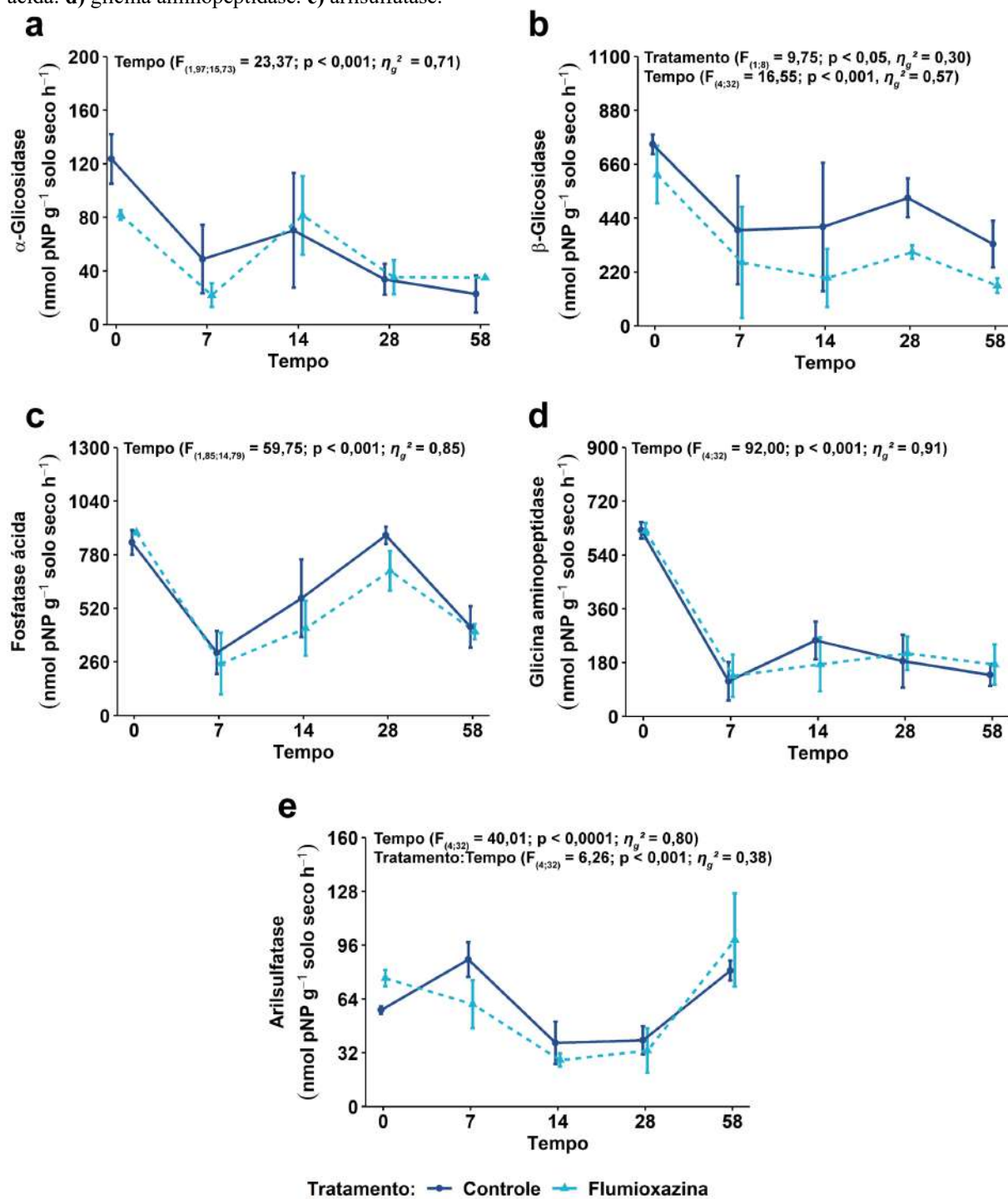
A ANOVA mista de duas vias indicou que o tratamento ($F_{(1;8)} = 9,75$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,30$) e o tempo ($F_{(4;32)} = 16,55$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,57$) (Figura 4.3b) influenciaram a atividade da β -glicosidase. A análise post-hoc mostrou que o tratamento com herbicida diminuiu significativamente a atividade enzimática em comparação com o controle ($p < 0,001$). Além disso, a atividade enzimática variou significativamente com o tempo (0-58 d, $p < 0,001$).

A arilsulfatase apresentou um efeito de interação significativo entre o tratamento e o tempo ($F_{(4;32)} = 6,26$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,38$) (Figura 4.3e). A análise post-hoc sugeriu diferenças significativas entre os tratamentos herbicidas aos 0 ($F_{(1;8)} = 63,8$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,89$) e 7 dias ($F_{(1;8)} = 11,4$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,59$).

Os parâmetros $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$, nitrogênio, $NH_4(\%)$, $NO_3(\%)$, MBC, SBR, e qCO_2 mostraram uma variação na magnitude do efeito do tratamento ao longo do tempo, sugerindo que o efeito do tratamento não foi constante durante o estudo ($F_{(4;32)} = 13,66$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,60$; $F_{(4;32)} = 11,62$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,54$; $F_{(4;32)} = 11,19$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,55$; $F_{(4;32)} = 34,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,76$; $F_{(4;32)} = 34,01$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,76$; $F_{(2,14;17,15)} = 11,93$; $p < 0,001$; η_g^2

= 0,54; $F_{(4;32)} = 7,98$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,42$; e $F_{(1,68;13,41)} = 19,57$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,64$; respectivamente) (Figura 4.4-5).

Figura 4.3 – Atividade enzimática do solo submetido a dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** α -glucosidase. **b)** β -glucosidase. **c)** fosfatase ácida. **d)** glicina aminopeptidase. **e)** arilsulfatase.

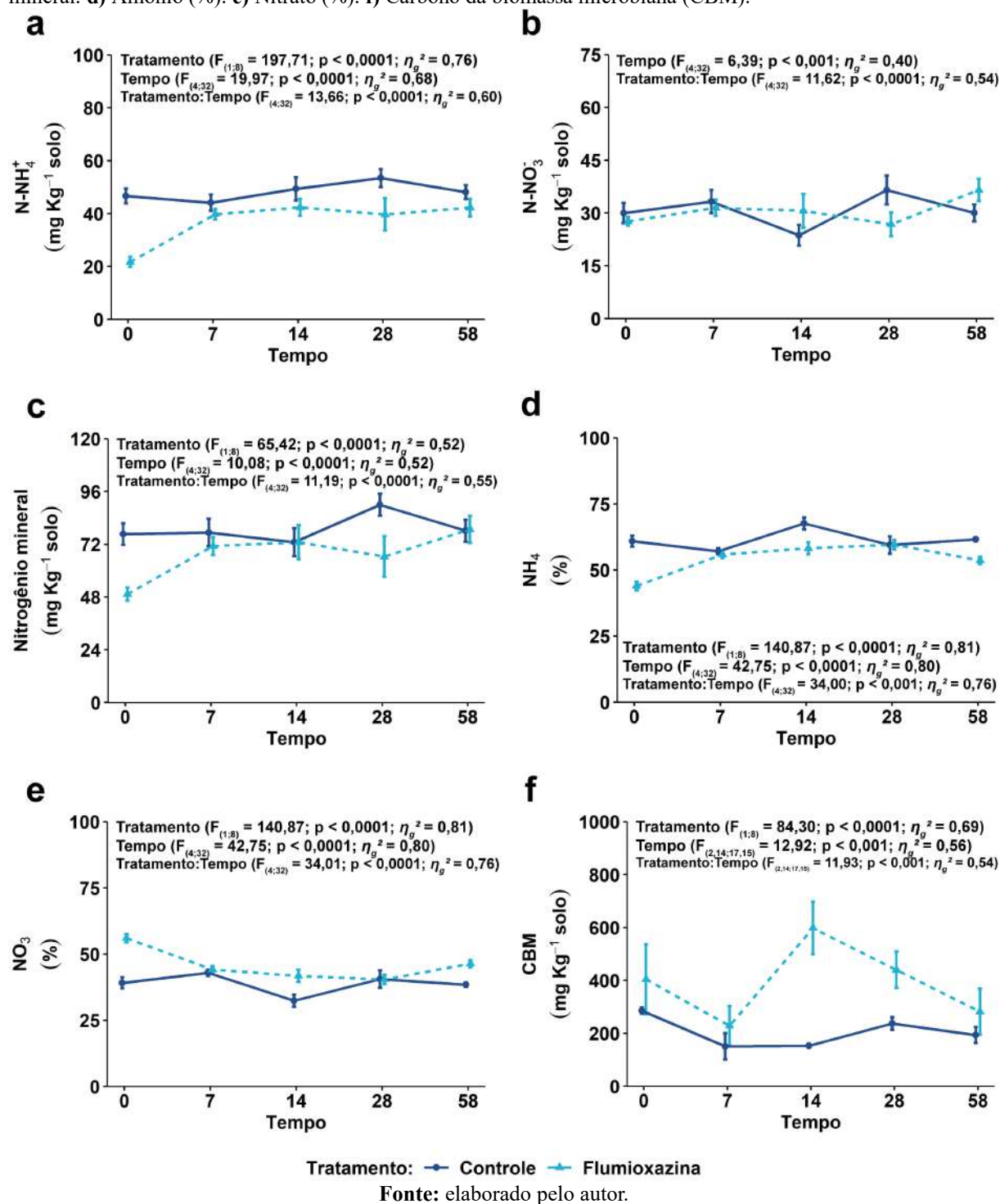


Fonte: elaborado pelo autor.

A análise post-hoc demonstrou que o tratamento com herbicida alterou os parâmetros do solo em vários momentos. Para o $N-NH_4^+$, os tratamentos com e sem herbicida diferiram aos

0 e 28 dias ($F_{(1;8)} = 269,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,97$ e $F_{(1;8)} = 19,50$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,71$, respectivamente) (Figura 4.4a).

Figura 4.4 – Parâmetros de atividade do solo dos dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** Amônio (N-NH_4^+). **b)** Nitrato (N-NO_3^-). **c)** Nitrogênio mineral. **d)** Amônio (%). **e)** Nitrato (%). **f)** Carbono da biomassa microbiana (CBM).

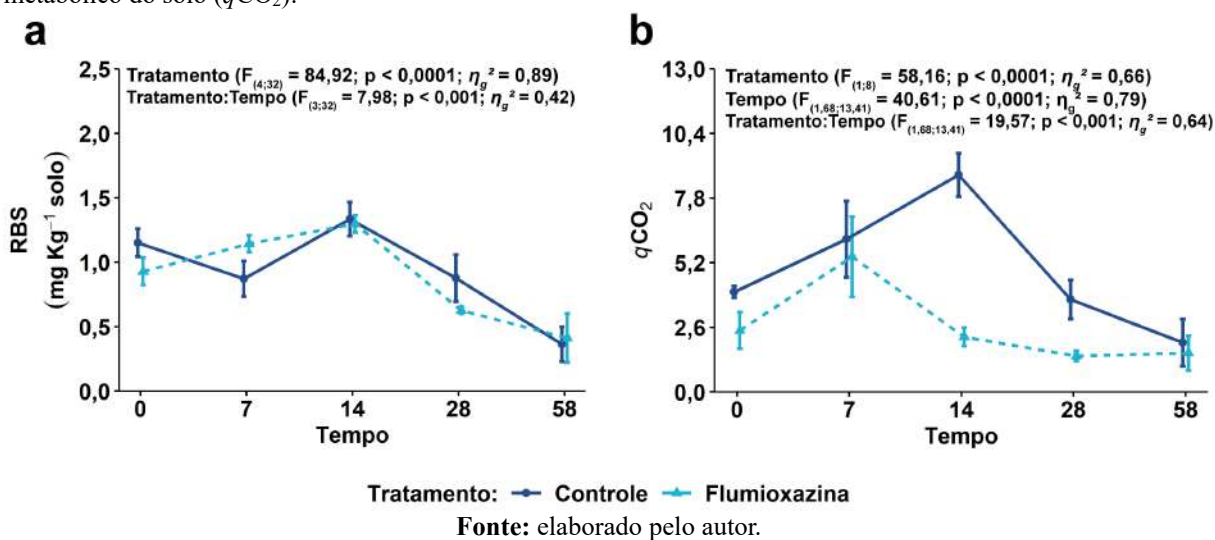


O N-NO_3^- apresentou diferença aos dias 28 e 58 após a aplicação do herbicida (DAA) ($F_{(1;8)} = 17,00$; $p < 0,5$; $\eta_g^2 = 0,68$ e $F_{(1;8)} = 13,60$; $p < 0,5$; $\eta_g^2 = 0,63$, respectivamente) (Figura

4.4b). O nitrogênio diferiu aos 0 e 28 dias ($F_{(1;8)} = 115,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,93$ e $F_{(1;8)} = 25,20$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,75$, respectivamente) (Figura 4.3c). O NH_4 (%) e NO_3 (%) diferiram entre o tratamento com herbicida e o controle, exceto aos 7 e 28 DAA ($F_{(1;8)} = 2,66$; $p = 0,70$; $\eta_g^2 = 0,25$ e $F_{(1;8)} < 0,05$; $p = 1$; $\eta_g^2 < 0,001$ para NH_4 (%); $F_{(1;8)} = 2,66$; $p = 0,70$; $\eta_g^2 = 0,25$ e $F_{(1;8)} = 0,007$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,001$, para NO_3 (%)) (Figura 4.4d-e). O CBM apresentou diferenças significativas entre os grupos aos 14 dias ($F_{(1;8)} = 99,80$; $p < 0,0005$; $\eta_g^2 = 0,93$) e aos 58 DAA ($F_{(1;8)} = 38,80$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,83$) (Figura 4.4f).

A RBS variou entre os grupos aos 7 DAA ($F_{(1;8)} = 15,70$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,66$). Já o $q\text{CO}_2$, o tratamento teve um efeito aos 0, 14 e 58 DAA ($F_{(1;8)} = 20,00$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,71$; $F_{(1;8)} = 237,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,97$; $F_{(1;8)} = 39,80$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,83$, respectivamente) (Figura 4.5a-b).

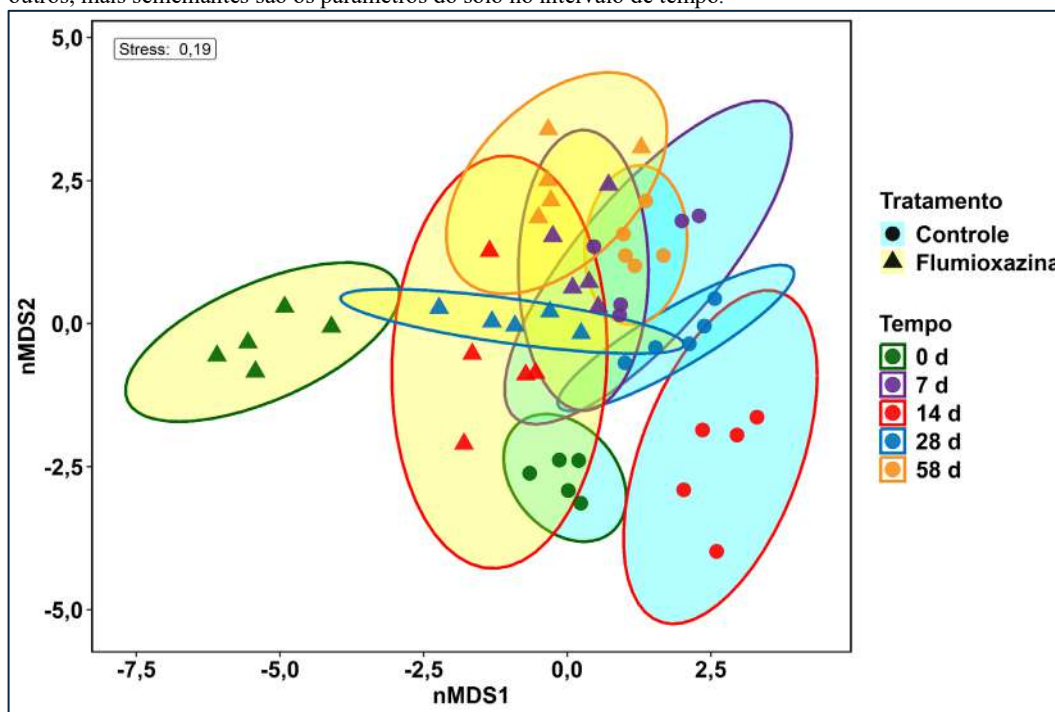
Figura 4.5 – Parâmetros de atividade do solo dos dois tratamentos (controle e flumioxazina), variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. **a)** Respiração Basal do solo (RBS). **b)** quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$).



De acordo com a PERMANOVA, a composição geral dos parâmetros do solo diferiu entre tratamentos e tempos. O tratamento ($F = 37,44$; $p < 0,01$) e o tempo ($F = 27,97$; $p < 0,01$) afetaram significativamente a composição dos parâmetros. Além disso, a interação entre o tratamento e o tempo teve um efeito significativo ($F = 9,34$; $p < 0,01$). A decomposição da soma de quadrados revelou que o tratamento explicou 16,52%, o tempo explicou 49,36% e a interação desses fatores explicou 17,65% da variação total. Mesmo que o tratamento com o herbicida tendo sido associado a uma variância menor, o nMDS mostrou uma clara separação entre os tratamentos, sugerindo que a aplicação do herbicida afetou significativamente as características do solo ao longo do tempo, corroborando com a interação encontrada na PERMANOVA. O valor de stress obtido foi de 0,19, o que indica uma visualização confiável (Figura 4.6).

Portanto, os resultados da PERMANOVA e do nMDS sugerem que a aplicação de herbicidas influenciou significativamente os parâmetros gerais de composição do solo ao longo do tempo.

Figura 4.6 – Gráfico de escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) da dissimilaridade na composição dos parâmetros do solo para os grupos de controle e tratados com herbicida. Os pontos coloridos representam cada amostra de solo num determinado momento, com as diferentes formas (círculos = controle, triângulos = tratamento com herbicida) a representar os grupos. As escalas nos eixos X e Y não têm unidades e representam a distância euclidiana entre as amostras. Quanto mais próximos os pontos estiverem uns dos outros, mais semelhantes são os parâmetros do solo no intervalo de tempo.



Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 DISCUSSÃO

Especialistas ambientais estão preocupados com os efeitos dos pesticidas no solo, defendendo a consideração da biodiversidade e da saúde do solo ao avaliar os riscos ambientais dos pesticidas e salientam que a contaminação do solo por pesticidas deve ser vista como parte do contexto mais vasto do declínio da biodiversidade em todo o mundo (TOSTADO *et al.*, 2022). Refletindo estas preocupações, o nosso estudo centrou-se na avaliação dos efeitos a curto prazo da aplicação de um herbicida, cujo ingrediente ativo é a flumioxazina, na microbiota do solo. Diferentes parâmetros avaliaram o efeito do herbicida na atividade microbiana do solo, tais como as atividades enzimáticas extracelulares, o carbono da biomassa microbiana, a respiração basal do solo e as taxas de amónio e nitrato. Os resultados mostram que o herbicida à base de flumioxazina tem efeitos significativos em certos parâmetros, embora o tempo tenha desempenhado um papel dominante, e as interações entre o tempo e o tratamento mostram uma dinâmica complexa dependente do tempo.

Focando nas respostas enzimáticas, observamos que a β -glicosidase, uma importante enzima extracelular utilizada como indicador da qualidade do solo, apresentou alteração em sua atividade em resposta à aplicação do herbicida. A arilsulfatase, por outro lado, embora não tenha respondido ao tratamento, apresentou uma interação significativa entre o tratamento e o tempo, indicando que a sua atividade foi influenciada por outros fatores que não o tratamento com o herbicida. Isto indica que os efeitos da flumioxazina não são estáticos, mas variam ao longo do tempo. Esta variação pode ser devido a fatores como disponibilidade do herbicida no solo, afetada pela precipitação e pela temperatura. Considerando sua sensibilidade ambiental, essas enzimas têm sido incluídas em avaliações de rotina por laboratórios de análise de solo para caracterizar a fertilidade integral do solo (MENDES *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2021; SANTOS *et al.*, 2022). A β -glicosidase é essencial na decomposição dos componentes celulósicos vegetais e na mineralização do carbono no solo (EIVAZI; TABATABAI, 1988), atuando na etapa final da decomposição da celulose (ADETUNJI *et al.*, 2017). A arilsulfatase realiza a hidrólise de ésteres de sulfato no solo, participando do ciclo do enxofre (KERTESZ; MIRLEAU, 2004). Portanto, a redução da atividade dessa enzima indica menor obtenção de enxofre, um macronutriente essencial para o crescimento das plantas.

Além destas enzimas, avaliámos também a α -glucosidase, a fosfatase ácida e a glicina aminopeptidase, cujas atividades não revelaram diferenças significativas entre os grupos controle e tratado com o herbicida. Para estas enzimas, o tempo provou ser um fator dominante na variação enzimática, como demonstrado pelos valores elevados de η_g^2 . Portanto, os fatores sazonais podem desempenhar um papel crítico nas funções bioquímicas do solo. É importante notar que a interpretação dos resultados da atividade enzimática do solo após a adição de pesticidas é complexa devido aos múltiplos efeitos diretos e indiretos e à influência de vários fatores ambientais (RIAH *et al.*, 2014). As propriedades dos pesticidas e do solo, as concentrações de pesticidas e as adaptações dos microrganismos podem influenciar os impactos dos pesticidas nos microrganismos do solo (YU *et al.*, 2006; IMFELD; VUILLEUMIER, 2012). As bactérias e os fungos do solo podem ter uma resposta adaptativa que envolve a capacidade de degradar pesticidas e/ou a tolerância geral da comunidade a produtos químicos tóxicos (IMFELD; VUILLEUMIER, 2012). Isso pode explicar por que a aplicação de herbicida não afetou as atividades das enzimas α -glicosidase, fosfatase ácida e glicina aminopeptidase.

Estudos que analisam os efeitos de herbicidas sobre as enzimas do solo têm apresentado resultados variados (RIAH *et al.*, 2014). Especificamente em relação à flumioxazina, uma investigação em condições laboratoriais mostrou que este herbicida alterou a atividade enzimática do solo num curto período, que foi recuperada ao longo do tempo (PERTILE *et al.*,

2020). Embora as enzimas do solo sejam relevantes na avaliação da qualidade do solo e na detecção de desequilíbrios nos ciclos biogeoquímicos (IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; LEE *et al.*, 2020; MICUTI *et al.*, 2020), as avaliações da qualidade do solo não podem ser baseadas apenas na atividade enzimática (ADETUNJI *et al.*, 2017), necessitando de outros parâmetros para uma avaliação abrangente e precisa.

Entre estes parâmetros, as taxas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- estão relacionadas com o ciclo do nitrogênio (N), os processos biológicos no solo e a disponibilidade de nutrientes. O N-NH_4^+ e o N-NO_3^- são formas de N encontradas no solo resultantes da transformação do N atmosférico (N_2) por bactérias fixadoras ou da decomposição da matéria orgânica por bactérias amonificadoras ou nitrificadoras. Estas formas de N podem ser absorvidas pelas plantas e perdidas por lixiviação, volatilização ou desnitrificação (STEIN; KLOTZ, 2016; ACZEL, 2019).

Neste estudo, observou-se que o herbicida aumentou significativamente os teores de N, N-NH_4^+ , e NH_4 (%) nos primeiros dias após a aplicação, em comparação com o grupo controle. No entanto, a dinâmica destes parâmetros variou ao longo do tempo entre os tratamentos. Inversamente, no início do experimento, os valores de N-NO_3^- eram próximos dos do controle, mas os valores foram mais elevados no final do experimento em comparação com o controle. O NO_3 (%) diminuiu significativamente em comparação com o grupo controle, diferindo também na dinâmica entre tratamentos ao longo do tempo. Estas variações podem refletir o estresse induzido pelo herbicida no microbiota do solo, que afeta a respiração basal e a biomassa microbiana. Este estresse pode ter consequências na capacidade dos microrganismos para metabolizar nutrientes, influenciando os processos biológicos do solo e a disponibilidade de nutrientes essenciais.

Estes resultados obtidos para o ciclo do N diferem de alguns estudos que encontram efeitos negativos dos herbicidas. A literatura relata que os herbicidas glifosato e paraquat prejudicam a simbiose das plantas com bactérias fixadoras de nutrientes, reduzindo os níveis de nitrogênio no solo e, consequentemente, o crescimento das plantas (MOHAMED *et al.*, 2021). Outro experimento utilizando atrazina e glifosato mostrou uma redução nas taxas de nitrificação e desnitrificação do solo (ZHANG *et al.*, 2018).

O CBM, a RBS e o $q\text{CO}_2$ são outros parâmetros que indicam a atividade microbiana. O CBM é a quantidade de carbono orgânico nos organismos do solo, e as alterações do solo podem afetar significativamente o seu valor. RBS é a taxa de liberação de CO_2 pelos microrganismos do solo durante a respiração celular, refletindo o seu metabolismo e atividade. Finalmente, $q\text{CO}_2$ é a razão entre RBS e CBM, expressando a eficiência metabólica dos microrganismos do

solo. O nosso estudo observou um aumento da CBM após 7 DAA, enquanto a RBS aumentou significativamente entre 0 e 14 DAA em comparação com o grupo de controle. No entanto, aos 14 DAA, a RBS diminuiu tanto no grupo tratado com herbicida como no grupo controle. O qCO_2 aumentou em ambos os grupos, mas apresentou uma redução após os 7 DAA no solo tratado e após os 14 DAA no controle, convergindo ambos para valores semelhantes no final do experimento (Figura 4.5b).

A redução subsequente seguida de um aumento da CBM pode refletir uma resposta inicial da comunidade microbiana ao estresse causado pelo herbicida, tentando metabolizar ou adaptar-se ao mesmo. Esse comportamento é semelhante ao observado com o glifosato e o sulfossulfuron, onde um aumento na disponibilidade de nutrientes pode estimular inicialmente o crescimento e a proliferação microbiana (MOLLAEE *et al.*, 2021). No final do experimento, a proximidade dos valores de CBM entre o solo tratado e o controle sugere que a comunidade microbiana pode ter desenvolvido mecanismos de resistência ou degradação do herbicida, ou que o efeito do herbicida diminuiu, possivelmente devido à lixiviação.

O aumento da RBS pode indicar uma tentativa de adaptação da biomassa microbiana do solo para metabolizar o herbicida (PERTILE *et al.*, 2020). Valores elevados de qCO_2 indicam maior consumo de energia pelos microrganismos para manter suas funções vitais, causando perda de carbono por respiração ou exsudação do solo. Esta perda resulta numa menor conversão de carbono em biomassa microbiana, diminuindo assim o potencial de sequestro de carbono (ASHRAF; WAQAS; RAHMAN, 2022). Um estudo anterior realizado em condições laboratoriais registou uma redução da CBM e um aumento do qCO_2 após a aplicação de um herbicida com flumioxazina (PERTILE *et al.*, 2020).

Há discussões sobre a realização adequada de experimentos para avaliar os efeitos dos pesticidas na microbiota do solo. Uma das limitações é que a maioria dos estudos é realizada em microcosmos, não refletindo as condições ambientais reais. Logo, os experimentos realizados em campo podem ser mais adequados, uma vez que podem representar o comportamento e a interação real dos pesticidas na microbiota do solo (RIAH *et al.*, 2014).

Por outro lado, a complexidade de compreensão e interpretação das respostas à aplicação de pesticidas no campo também gera limitações para essa metodologia, considerando os diferentes fatores ambientais que influenciam essas respostas (RIAH *et al.*, 2014). Assim, os indicadores microbianos têm sido cada vez mais criticados por sua difícil interpretação e por serem fortemente afetados por alterações ambientais ou propriedades físico-químicas do solo (IMFELD; VUILLEUMIER, 2012).

Diante dessas questões, o delineamento experimental e análise de dados em nosso experimento foi pensado para superar essas limitações. Além de analisar cada variável resposta individualmente e o possível efeito do herbicida sobre elas, também utilizamos uma análise multivariada que considerou a dissimilaridade entre os grupos. Esta técnica é conveniente para analisar padrões multivariados complexos em que diferentes variáveis resposta podem estar interligadas e afetar os resultados. Ainda, é possível identificar padrões significativos, mesmo quando as respostas individuais podem ser ambíguas ou não conclusivas. Por meio da análise de dissimilaridade, foi possível comparar os grupos, uma vez que o grupo controle estava sujeito às mesmas condições ambientais que o grupo tratado com o herbicida.

Os resultados da PERMANOVA mostram um efeito do tratamento, do tempo e da interação tratamento-tempo ($p < 0,001$ para todos), corroborando os resultados da ANOVA mista de duas vias que indicam diferenças substanciais induzidas pelas mudanças de tratamento e de tempo. Embora o herbicida à base de flumioxazina tenha tido um impacto significativo no solo, as mudanças ao longo do tempo foram mais decisivas na variação das variáveis estudadas. A representação do nMDS mostra também esta resposta. O gráfico nMDS (Figura 4.6) mostra a separação entre o grupo controle e o grupo tratado ao longo do tempo, demonstrando a influência significativa do herbicida nas características do solo. Esta separação indica diferenças na composição dos parâmetros entre os tratamentos ao longo do tempo. Vale ressaltar que antes da aplicação do herbicida (dia 0), os dois tratamentos apresentavam diferenças nas composições dos parâmetros. Após os 7 DAA, a composição passou a ser semelhante, voltando a ser diferente aos 14 DAA.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo avaliou, no campo, os efeitos de um herbicida à base de flumioxazina (Sumysoia®, Sumitomo) sobre a atividade microbiana do solo, focando em parâmetros como a atividade enzimática, a RBS, o CBM e a dinâmica dos nutrientes. Os resultados revelam uma interação complexa entre o tempo e o tratamento com o herbicida avaliado, demonstrando que os efeitos do herbicida variam significativamente ao longo do tempo e são fortemente influenciados pelas condições ambientais. As atividades da enzima β -glucosidase foram significativamente reduzidas pelo tratamento com herbicida. Foi também observada uma variação significativa nos níveis de N, N-NH_4^+ e N-NO_3^- , bem como nas medições do CBM, da RBS e do $q\text{CO}_2$. Estas alterações indicam uma interação complexa e dependente do tempo entre o tratamento com flumioxazina e a dinâmica bioquímica do solo.

Estes resultados evidenciam a complexidade das respostas ambientais à aplicação de pesticidas e reforçam a necessidade de considerar tanto os efeitos diretos como os interativos nos estudos de impacto ambiental. Além disso, os resultados destacam a complexidade da interpretação dos efeitos dos produtos químicos no ambiente, enfatizando a importância de estudos a longo prazo que incorporem análises temporais e sazonais para uma compreensão mais completa. Por outro lado, a capacidade de resposta rápida dos parâmetros avaliados aos impactos permite a sua utilização em estudos de monitoramento destinados a compreender melhor a dinâmica do solo e as respostas ecológicas à aplicação de pesticidas, sobretudo em sistemas agrícolas que dependem fortemente de produtos químicos para a gestão de pragas. Assim, é possível identificar problemas e procurar melhores práticas de gestão do solo, plantação e controlo de pragas antes que a qualidade do solo se deteriore, causando degradação e infertilidade.

Declaração de contribuição de autoria do CRediT

CFCC: Conceptualização, Curadoria de dados, Análise formal, Investigação, Metodologia, Validação, Visualização, Escrita - rascunho original, Escrita - revisão e edição. **EASO:** Conceptualização, Curadoria de dados, Investigação, Metodologia. **SSC:** Aquisição de financiamento, Metodologia, Recursos, Validação, Escrita - revisão e edição. **VD:** Conceptualização, Aquisição de financiamento, Administração do projeto, Recursos, Supervisão, Escrita - revisão e edição. **LMA:** Aquisição de financiamento, Administração do projeto, Recursos, Supervisão, Escrita - rascunho original, Escrita - revisão e edição.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer às agências brasileiras de financiamento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG). CFCC foi apoiado por uma bolsa de estudos da CAPES (88887.483362/2020-00).

REFERENCIAS

ACZEL, M. R. What Is the Nitrogen Cycle and Why Is It Key to Life? **Frontiers for Young Minds**, vol. 7, 12 Mar. 2019. DOI 10.3389/frym.2019.00041.

ADETUNJI, A. T.; LEWU, F. B.; MULIDZI, R.; NCUBE, B. The biological activities of β -glucosidase, phosphatase and urease as soil quality indicators: a review. **Journal of soil science**

and plant nutrition, vol. 17, no. 3, p. 794–807, Sep. 2017. DOI 10.4067/S0718-95162017000300018.

ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 37, no. 5, p. 937–944, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.09.014>.

ARAUJO, A. S. F.; PERTILE, M.; COSTA, R. M.; COSTA, M. K. L.; DE AVIZ, R. O.; MENDES, L. W.; DE MEDEIROS, E. V.; DA COSTA, D. P.; MELO, V. M. M.; PEREIRA, A. P. de A. Short-term responses of plant growth-promoting bacterial community to the herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Chemosphere**, vol. 328, p. 138581, Jul. 2023. DOI 10.1016/j.chemosphere.2023.138581.

ASHRAF, M. N.; WAQAS, M. A.; RAHMAN, S. Microbial Metabolic Quotient is a Dynamic Indicator of Soil Health: Trends, Implications and Perspectives (Review). **Eurasian Soil Science**, vol. 55, no. 12, p. 1794–1803, 8 Dec. 2022. DOI 10.1134/S1064229322700119.

BREMNER, J. M.; KEENEY, D. R. Determination and Isotope-Ratio Analysis of Different Forms of Nitrogen in Soils: 3. Exchangeable Ammonium, Nitrate, and Nitrite by Extraction-Distillation Methods. **Soil Science Society of America Journal**, vol. 30, no. 5, p. 577–582, 1 Sep. 1966. DOI 10.2136/sssaj1966.03615995003000050015x.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. *In*: VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J. C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (eds.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. p. 270–276.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 20, no. 5, p. 601–606, 1 Jan. 1988. DOI 10.1016/0038-0717(88)90141-1.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA); ANASTASSIADOU, M.; ARENA, M.; AUTERI, D.; BRANCATO, A.; BURA, L.; CARRASCO CABRERA, L.; CHAIDEFTOU, E.; CHIUSOLO, A.; CRIVELLENTI, F.; DE LENTDECKER, C.; EGSMOSE, M.; FAIT, G.; GRECO, L.; IPPOLITO, A.; ISTACE, F.; JARRAH, S.; KARDASSI, D.; LEUSCHNER, R.; ... VILLAMAR-BOUZA, L. Updated peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumioxazin. **EFSA Journal**, vol. 18, no. 9, Sep. 2020. DOI 10.2903/j.efsa.2020.6246.

FAOSTAT. Pesticides Use. 2023. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP>. Accessed on: 9 May 2023.

IMFELD, G.; VUILLEUMIER, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. **European Journal of Soil Biology**, vol. 49, p. 22–30, Mar. 2012. DOI 10.1016/j.ejsobi.2011.11.010.

JACKSON, C. R.; TYLER, H. L.; MILLAR, J. J. Determination of microbial extracellular enzyme activity in waters, soils, and sediments using high throughput microplate assays. **Journal of visualized experiments: JoVE**, no. 80, p. 1–9, 2013. <https://doi.org/10.3791/50399>.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 8, no. 3, p. 209–213, Jan. 1976. DOI 10.1016/0038-0717(76)90005-5.

KERTESZ, M. A.; MIRLEAU, P. The role of soil microbes in plant sulphur nutrition. **Journal of Experimental Botany**, vol. 55, no. 404, p. 1939–1945, 1 Aug. 2004. DOI 10.1093/JXB/ERH176.

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B. Eficiência da quantificação do carbono da biomassa microbiana por espectrofotometria comparada ao método titrimétrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, vol. 6, no. 4, p. 588–595, 31 Dec. 2011. DOI 10.5039/agraria.v6i4a1071.

LANGE, M.; EISENHAUER, N.; SIERRA, C. A.; BESSLER, H.; ENGELS, C.; GRIFFITHS, R. I.; MELLADO-VÁZQUEZ, P. G.; MALIK, A. A.; ROY, J.; SCHEU, S.; STEINBEISS, S.; THOMSON, B. C.; TRUMBORE, S. E.; GLEIXNER, G. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. **Nature Communications**, vol. 6, no. 1, p. 6707, 7 Apr. 2015. DOI 10.1038/ncomms7707.

LEE, S.-H.; KIM, M.-S.; KIM, J.-G.; KIM, S.-O. Use of Soil Enzymes as Indicators for Contaminated Soil Monitoring and Sustainable Management. **Sustainability**, vol. 12, no. 19, p. 8209, 5 Oct. 2020. DOI 10.3390/su12198209.

MENDES, I. C.; MARTINHÃO GOMES SOUSA, D.; DARIO DANTAS, O.; ALVES CASTRO LOPES, A.; BUENO REIS JUNIOR, F.; INES OLIVEIRA, M.; MONTANDON

CHAER, G. Soil quality and grain yield: A win–win combination in clayey tropical oxisols. **Geoderma**, vol. 388, p. 114880, Apr. 2021. DOI 10.1016/j.geoderma.2020.114880.

MENDES, I. de C.; SOUZA, L. M. de; SOUSA, D. M. G. de; LOPES, A. A. de C.; REIS JUNIOR, F. B. dos; LACERDA, M. P. C.; MALAQUIAS, J. V. Critical limits for microbial indicators in tropical Oxisols at post-harvest: The FERTBIO soil sample concept. **Applied Soil Ecology**, vol. 139, p. 85–93, Jul. 2019. DOI 10.1016/j.apsoil.2019.02.025.

MEROTTO, A.; GAZZIERO, D. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; SCURSONI, J.; GARCIA, M. A.; FIGUEROA, R.; TURRA, G. M. Herbicide use history and perspective in South America. **Advances in Weed Science**, vol. 40, no. spe1, p. 1–18, 31 Oct. 2022. DOI 10.51694/AdvWeedSci/2022;40:seventy-five010.

MICUTI, M.-M.; POPA (BURLACU), A.; BADULESCU, L.; ISRAEL-ROMING, F. Soil Enzymes - Bioindicators of Soil Health. **Scientific Papers-Series B-Horticulture**, vol. 64, no. 1, p. 679–684, 2020.

MOHAMED, M.; ALIYAT, F. Z.; BEN MESSAOUD, B.; SIMONE, C.; MARINA, M.; FILIPPO, G.; LAILA, N.; JAMAL, I. Effects of Pesticides Use (Glyphosate e Paraquat) on Biological Nitrogen Fixation. **Water, Air, & Soil Pollution**, vol. 232, no. 10, p. 419, 7 Oct. 2021. DOI 10.1007/s11270-021-05367-x.

MOLLAEE, M.; GHADIRI, H.; ZAREI, M.; HEIDARI, B.; CHESHMI, M.; CHAUHAN, B. S. Response of Soil Microbial Communities to Different Doses of Glyphosate and Sulfosulfuron in a Calcareous Soil. **Journal of Agricultural Science and Technology**, vol. 23, no. 5, p. 1149–1162, 2021.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, vol. 54, no. 4, p. 655–670, 17 Dec. 2003. DOI 10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x.

PERTILE, M.; ANTUNES, J. E. L.; ARAUJO, F. F.; MENDES, L. W.; VAN DEN BRINK, P. J.; ARAUJO, A. S. F. Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Scientific Reports**, vol. 10, no. 1, p. 7694, 6 Dec. 2020. DOI 10.1038/s41598-020-64648-3.

PERTILE, M.; SOUSA, R. M. S.; MENDES, L. W.; ANTUNES, J. E. L.; OLIVEIRA, L. M. de S.; DE ARAUJO, F. F.; MELO, V. M. M.; ARAUJO, A. S. F. Response of soil bacterial communities to the application of the herbicides imazethapyr and flumyazin. **European Journal of Soil Biology**, vol. 102, p. 103252, Jan. 2021. DOI 10.1016/j.ejsobi.2020.103252.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing, Version 4.2.2. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <http://www.r-project.org/>.

RIAH, W.; LAVAL, K.; LAROCHE-AJZENBERG, E.; MOUGIN, C.; LATOUR, X.; TRINSOUTROT-GATTIN, I. Effects of pesticides on soil enzymes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, vol. 12, no. 2, p. 257–273, 27 Jun. 2014. DOI 10.1007/s10311-014-0458-2.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development for R, Version 2023.03.0. Boston, MA, 2019. Disponível em: <http://www.rstudio.com/>.

SANTOS, J. V. dos; RAIMUNDO BENTO, L.; DIAS BRESOLIN, J.; CORSO MITSUYUKI, M.; PERONDI ANCHÃO OLIVEIRA, P.; MACEDO PEZZOPANE, J. R.; CARLOS DE CAMPOS BERNARDI, A.; CARVALHO MENDES, I.; MARTIN-NETO, L. The long-term effects of intensive grazing and silvopastoral systems on soil physicochemical properties, enzymatic activity, and microbial biomass. **CATENA**, vol. 219, p. 106619, Dec. 2022. DOI 10.1016/j.catena.2022.106619.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S. de; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$). **Comunicado Técnico 99. Embrapa, Seropédica**, p. 1–4, 2007.

STEIN, L. Y.; KLOTZ, M. G. The nitrogen cycle. **Current Biology**, vol. 26, no. 3, p. R94–R98, Feb. 2016. DOI 10.1016/j.cub.2015.12.021.

THIOUR-MAUPRIVEZ, C.; MARTIN-LAURENT, F.; CALVAYRAC, C.; BARTHELMEBS, L. Effects of herbicide on non-target microorganisms: Towards a new class of biomarkers? **Science of The Total Environment**, vol. 684, p. 314–325, Sep. 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.05.230.

TOSTADO, L.; BOLLMOHR, S.; BÄR, J.; BICKEL, U.; BOMBARDI, L. M.; BOURGIN, C.; BÖDEKER, W.; BRÜHL, C.; BUTSCHER-SCHADEN, H.; DECKEN, H. von der; GOULSON, D.; HAFFMANS, S.; HEIMRATH, J.; HOINKES, C.; HOLDINGHAUSEN, H.; LEMKEN, D.; LIEBETRAU, L.; MERTENS, M.; NABEL, M.; ... ZÜHLSDORF, A. **Pesticide Atlas: Facts and figures about toxic chemicals in agriculture**. 2nd ed. Berlin, Germany: Heinrich-Böll-Stiftung, 2022.

TRIPATHI, S.; SRIVASTAVA, P.; DEVI, R. S.; BHADOURIA, R. Influence of synthetic fertilizers and pesticides on soil health and soil microbiology. **Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 25–54. DOI 10.1016/B978-0-08-103017-2.00002-7.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 19, no. 6, p. 703–707, Jan. 1987. DOI 10.1016/0038-0717(87)90052-6.

WHALEN, J. K.; WARMAN, P. R. Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. **Biology and Fertility of Soils**, vol. 22, no. 4, p. 373–378, 1996. <https://doi.org/10.1007/s003740050128>.

YU, Y. L.; SHAN, M.; FANG, H.; WANG, X.; CHU, X. Q.; YUN, L. Y.; SHAN, M.; FANG, H.; WANG, X.; XIAO, Q. C. Responses of Soil Microorganisms and Enzymes to Repeated Applications of Chlorothalonil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 54, no. 26, p. 10070–10075, 1 Dec. 2006. DOI 10.1021/jf0624190.

ZHANG, M.; WANG, W.; TANG, L.; HEENAN, M.; XU, Z. Effects of nitrification inhibitor and herbicides on nitrification, nitrite and nitrate consumptions and nitrous oxide emission in an Australian sugarcane soil. **Biology and Fertility of Soils**, vol. 54, no. 6, p. 697–706, 14 Aug. 2018. DOI 10.1007/s00374-018-1293-6.

ARTIGO 5. EFEITOS TEMPORAIS DE PESTICIDA A BASE DE FLUOPIRAM NA SAÚDE DO SOLO

Carlos Filipe Camilo-Cotrim¹, José Tarciso de Paula Filho², Guilherme Dorneles Pereira², Samantha Salomão Caramori¹, Virgínia Damin² & Luciane Madureira Almeida¹

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual de Goiás, Câmpus Central – Sede Anápolis - Ciências Exatas e tecnológicas, 459, Br 153, nº 3.105, CEP: 75132-903, Anápolis-Go, Brasil

²Herbil, Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia - Campus Samambaia, Av. Esperança s/n, CEP: 74.690-900, Goiânia-Go, Brasil

Resumo – O uso de pesticidas na agricultura levanta preocupações sobre seus impactos nos ecossistemas do solo. Embora o fluopiram seja um fungicida e nematicida eficaz, ainda há lacunas a respeito do seu efeito no solo. Este estudo investigou os efeitos de um pesticida a base de fluopiram na saúde e qualidade do solo usando como parâmetros: a atividade enzimática; níveis de amônio (N-NH_4^+), nitrato (N-NO_3^-), nitrogênio mineral; o carbono da biomassa microbiana (CBM); a respiração basal do solo (SBR) e o quociente metabólico ($q\text{CO}_2$). Para isto, o solo, classificado como latossolo vermelho distrófico, foi tratado com a dose recomendada do pesticida para uso em campo, e as avaliações do efeito foram conduzidas em laboratório em intervalos de tempo definidos. Os resultados indicam que houve alterações, porém temporárias, nos parâmetros analisados em resposta à aplicação do pesticida. As enzimas α -glucosidase, β -glucosidase, fosfatase ácida, o CBM e $q\text{CO}_2$ foram sensíveis ao tratamento e evidenciaram o efeito do pesticida no solo. Efeitos mais pronunciados foram observados imediatamente após aplicação (24 h), embora os efeitos tenham se normalizado, ficando similar ao controle negativo, principalmente ao final do experimento, em 60 dias. Essa recuperação pode mascarar alterações na estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana. Além disso, os resultados mostram um efeito agudo do pesticida sobre o solo. Ao longo do tempo, não foi possível avaliar se o impacto nos parâmetros avaliados se prolonga. Esses achados destacam a necessidade de um monitoramento contínuo dos efeitos dos pesticidas, considerando a variabilidade temporal, para uma avaliação abrangente de seu impacto.

Palavras-chave: atividade enzimática, ecotoxicologia, impacto ambiental, microbiota do solo, saúde do solo

5.1 INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas na agricultura é uma prática comum para o controle de pragas e doenças, e é essencial para garantir alta produtividade e a qualidade das culturas (TOSTADO

et al., 2022). No entanto, o impacto dos pesticidas na saúde do solo é um problema que tem levantado preocupações ambientais e requer monitoramento constante (WOŁEJKO *et al.*, 2020). O solo é um componente fundamental dos ecossistemas terrestres e desempenha vários serviços ecossistêmicos. Destes serviços, muitos são desempenhados pelos microrganismos do solo, tais como a ciclagem de nutrientes, a decomposição da matéria orgânica e a manutenção da saúde do solo (PEREIRA *et al.*, 2018; ANIKWE; IFE, 2023). Assim, o uso de pesticidas pode perturbar a estrutura e a função das comunidades microbianas do solo, afetando diretamente seus serviços e sua saúde (PEREIRA *et al.*, 2018; BAWEJA; KUMAR; KUMAR, 2020).

O fluopiram é um ingrediente ativo utilizado na formulação de pesticidas, possui atividade fungicida e nematicida. Seu principal mecanismo é a inibição da succinato desidrogenase, ou seja, inibição da respiração mitocondrial (LEWIS *et al.*, 2016). Dados da literatura sugerem que o fluopiram possa ter efeitos prejudiciais sobre a biomassa e a diversidade microbiana do solo por causar alterações na estrutura da comunidade microbiana e apresentar riscos ambientais devido à sua persistência e mobilidade no solo (ZHANG *et al.*, 2014; RATHOD *et al.*, 2022). A meia vida do fluopiram é de 64,2 a 93,6 dias, fazendo com que ele tenha uma degradação lenta no solo (ZHANG *et al.*, 2014; SANTÍSIMA-TRINIDAD *et al.*, 2018). Apesar de já se ter informações a respeito do fluopiram, ainda são necessários mais estudos sobre seu impacto nas propriedades do solo, a fim de determinar os efeitos ecotoxicológicos e as consequências para a saúde do solo (RATHOD *et al.*, 2022). Dessa maneira, a combinação de indicadores químicos e biológicos do solo é considerado uma abordagem eficiente para avaliar a qualidade de solos (MENDES *et al.*, 2021). O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do fluopiram (Verango® Prime - Bayer CropScience) na qualidade do solo, por meio de experimentos em laboratório com o uso desses indicadores. A hipótese deste trabalho é que a exposição ao pesticida a base de fluopiram poderá causar impactos mensuráveis no metabolismo microbiano no solo, com reflexos na atividade enzimática. Espera-se também que estes efeitos mudem ao longo do tempo, indicando uma resposta dinâmica do solo à aplicação do pesticida.

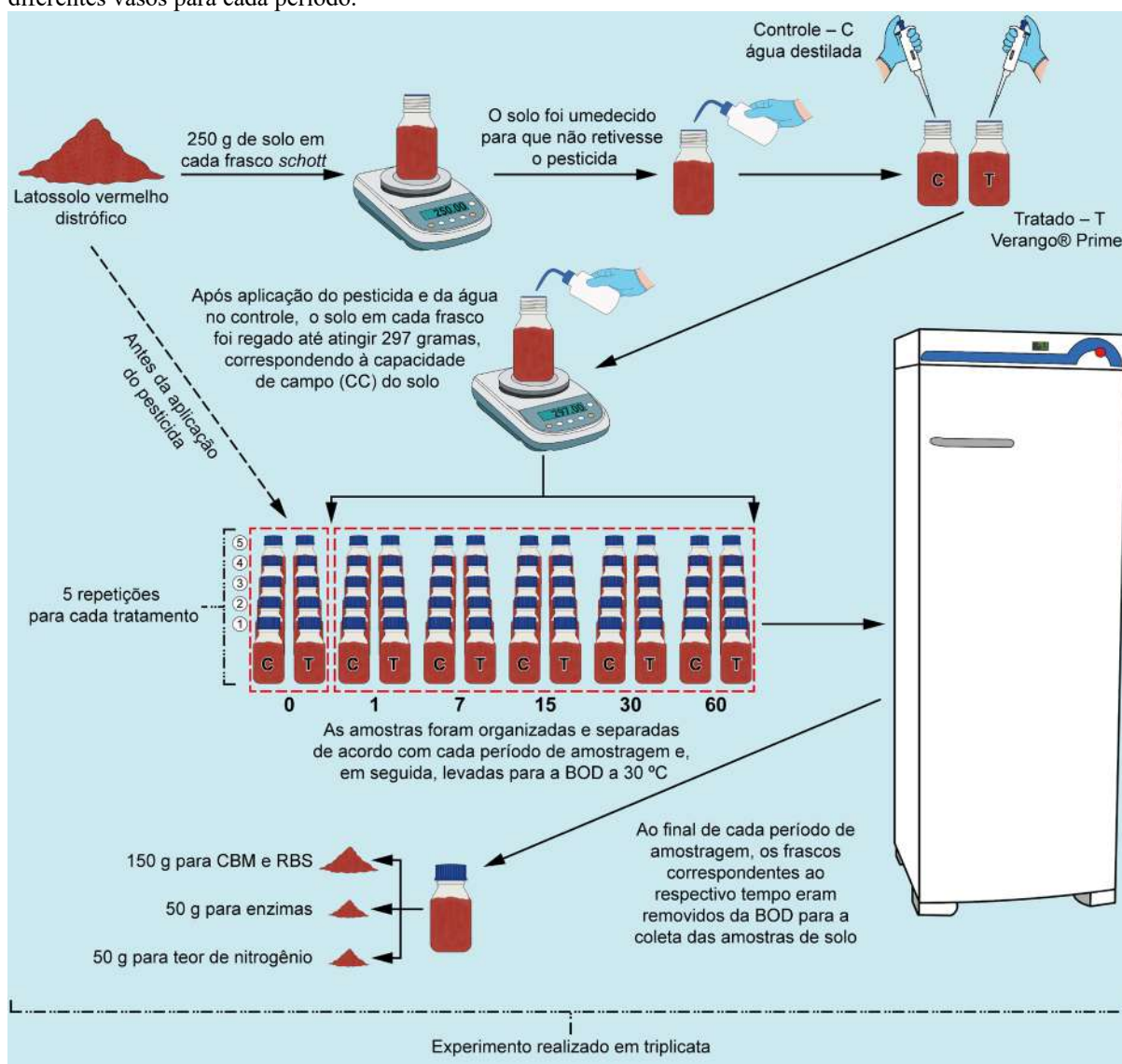
5.2 METODOLOGIA

Arranjo experimental

Para avaliar os efeitos do pesticida a base de fluopiram nos parâmetros bioquímicos e biológicos do solo, foi utilizado solo latossolo vermelho distrófico obtido de uma área sem histórico de impacto antrópico. Os parâmetros referentes a análise do solo estão na Tabela 5.1.

Antes do experimento, o solo foi peneirado em tamis de 2 mm. Em cada frasco *schott* de 250 mL foram adicionados 250 g de solo, sendo 50 g para análise enzimática, 50 g para análise do teor de nitrogênio inorgânico e 150 g para biomassa e taxas de respiração microbiana (Figura 5.1).

Figura 5.1 – Esquema experimental para avaliação dos efeitos do pesticida à base de fluopiram nos parâmetros do solo ao longo do tempo. O arranjo experimental inclui a aplicação do pesticida após o tempo 0, com coletas de amostras de solo realizadas nos tempos 0 (antes da aplicação), 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a aplicação. Cada ponto de coleta possui 5 réplicas por tratamento (controle e tratado), e o experimento foi repetido três vezes, utilizando diferentes vasos para cada período.



Fonte: elaborado pelo autor.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Cada frasco de solo foi aleatoriamente escolhido para um dos dois tratamentos: controle (sem aplicação de pesticida) e tratado (com aplicação de pesticida). As amostras de solo foram coletadas em seis períodos de avaliação: 0 (antes da aplicação), 1, 7, 15, 30 e 60 dias após a aplicação do pesticida. Para cada

tratamento foram utilizados cinco frascos (replicas) e diferentes fracos foram usados para cada período de avaliação. O experimento foi realizado em triplicata (Figura 5.1).

Tabela 5.1 – Características químicas e texturais do latossolo vermelho distrófico.

Argila	Silte	Areia	Ca	Mg	Al	H+Al	SB
(g Kg ⁻¹)			(cmolc dm ⁻³)			(%)	
440,00	110,00	450,00	3,5	1,8	0,0	1,7	76,16

K	P	Zn	MO	Carbono	C.T.C	pH
(mg dm ⁻³)			(g dm ⁻³)		mmolc dm ³	(CaCl ₂)
50,80	4,60	0,60	22,00	12,76	7,13	5,60

H + Al = acidez potencial; SB = saturação de bases; MO = matéria orgânica; CTC = capacidade de troca de cátions.

Preparo do pesticida

O produto comercial Verango® Prime (Bayer CropScience – contendo 500 g i.a. L⁻¹ de fluopiram) foi aplicado na dose recomendada para a cultura de soja. Para o cálculo da aplicação, foi utilizada a área do frasco para determinar exatamente a quantidade de pesticida a ser aplicado, correspondendo ao volume de calda aplicada no campo (0,5 L ha⁻¹ do produto em 150 L ha⁻¹ de água). Antes de aplicar o pesticida, o solo nos frascos foi umedecido para que não retivesse o pesticida. A aplicação foi realizada de forma uniforme com uma micropipeta. O controle recebeu água destilada na mesma quantidade do pesticida.

Após aplicação do pesticida, o solo em cada frasco foi regado até atingir 297 gramas, correspondendo à capacidade de campo (CC) do solo. Em seguida os frascos foram levados para BOD a 25 °C. Em cada período de amostragem, os frascos referentes ao tempo eram removidos da BOD para a coleta das amostras de solo. As amostras de solo foram colocadas em sacos plásticos e armazenadas em geladeira até a análise, que ocorria na mesma semana. O teor de umidade de cada amostra foi determinado por secagem em estufa a 110 °C por 48 h.

Atividade enzimática do solo

As atividades das enzimas α -glucosidase (EC 3.2.1.20), β -glucosidase (EC 3.2.1.21), fosfatase ácida (EC 3.1.3.2), glicina aminopeptidase (EC 3.4.11.1) e arilsulfatase (EC 3.1.6.1) foram avaliadas como indicadores da atividade biológica e da qualidade do solo. A análise da atividade enzimática foi realizada de acordo com a metodologia da página 122. A atividade enzimática foi expressa em nmol pNP g⁻¹ de solo seco h⁻¹.

Teor de nitrogênio inorgânico

Para determinar os valores de amônio (N-NH₄⁺) e nitrato (N-NO₃⁻), foi adotado o método de Bremner e Keeney (1966). Os valores de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻ foram somados para

estimar a disponibilidade de nitrogênio mineral (BREMNER; KEENEY, 1966; CANTARELLA; TRIVELIN, 2001). Os valores foram expressos em mg Kg^{-1} de solo.

Biomassa e taxas de respiração microbiana

O carbono da biomassa microbiana (CBM) foi determinado utilizando a metodologia adaptada de Knupp e Ferreira (2011) do protocolo de Vance *et al.* (1987). A respiração basal do solo (RBS) foi determinada utilizando as modificações propostas por Silva *et al.* (2007) ao protocolo de Jenkinson e Powlson (1976). O quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$) foi calculado dividindo a SBR pelo MBC. A concentração de carbono da biomassa foi expressa em mg kg^{-1} de solo.

Análise de dados

Todos os dados foram avaliados para os pressupostos dos resíduos da ANOVA two-way. Para todas as variáveis houve violação dos pressupostos, mesmo após a transformação log. Dessa maneira foi realizado uma ANOVA por ranks (*Aligned ranks transformation* ANOVA – ART ANOVA), que é uma abordagem não paramétrica adequada para detectar efeitos principais e interações em dados que violam os pressupostos da ANOVA two-way (WOBBROCK *et al.*, 2011). Os dados foram alinhados e ordenados usando a função *art* do pacote *ARTool* (KAY *et al.*, 2021). Após ajustar o modelo ART para as variáveis respostas, foi executado a função *anova*. Comparações post-hoc foram realizadas utilizando a função *art.con* do *ARTool*, que aplica o procedimento ART-C (Contrastes de Transformação Alinhada por Ranks). Este procedimento garante que os dados sejam corretamente alinhados e ordenados para permitir testes de contrastes precisos, evitando a inflação das taxas de erro tipo I (ELKIN *et al.*, 2021). As comparações post-hoc foram ajustadas pelo método de Bonferroni para correção de múltiplos testes.

Para avaliar os efeitos da aplicação do fluopiram nas variáveis de resposta ao longo do tempo foi utilizado o método de Curvas de Resposta Principal (CRP) (VAN DEN BRINK; BRAAK, 1999). A CRP é uma técnica multivariada que reduz a dimensionalidade dos dados, permitindo a visualização das mudanças na atividade do solo em resposta ao tratamento. Para a análise os dados foram logaritmizados ($\log_{10}$) para que todos fossem igualmente importantes na análise. Para análise foi utilizado a função *prc*, considerando tratamento e tempo como variáveis explicativas, do pacote *vegan* (OKSANEN *et al.*, 2022). A significância estatística do modelo, dos eixos canônicos e das variáveis explicativas foram avaliadas usando a função *anova.cca*, do pacote *vegan*, com 999 permutações.

A análise de CRP é utilizada tradicionalmente para dados de observações repetidas, porém utilizamos essa metodologia, pois apesar da independência temporal das observações, há uma dependência estrutural na nossa metodologia. No experimento, o latossolo vermelho distrófico utilizado para os tratamentos e tempos foi proveniente do mesmo local. Isso garante a homogeneidade da composição química, biológica e física do solo. Logo, há base comum para todas as observações, introduzindo uma dependência estrutural que justifica o uso da PRC. Apesar de termos utilizado a ART ANOVA como alternativa não paramétrica da ANOVA *two-way*, a ART ANOVA é uma técnica robusta que permite análises não paramétricas em experimentos fatoriais, incluindo aqueles com medidas repetidas, logo não fica conflitante com a análise CRP (WOBBROCK *et al.*, 2011).

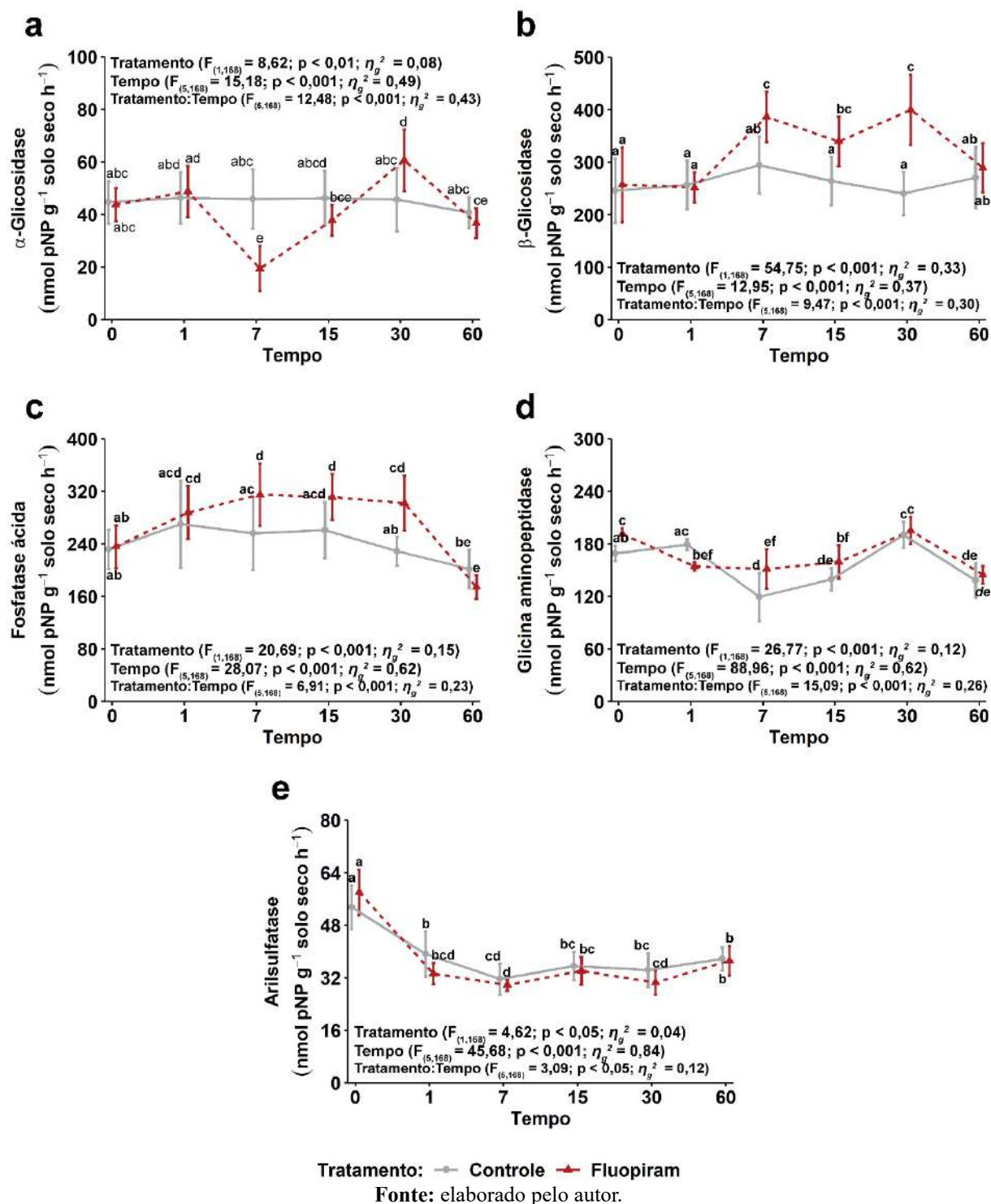
Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no *software RStudio*, versão 2024.04.1 (POSIT TEAM, 2024). As figuras foram criadas no *Adobe Illustrator*, versão 24.0.1 (www.adobe.com/products/illustrator).

5.3 RESULTADOS

A análise do solo revelou que atividade da α -glicosidase foi afetada pelo tratamento ($F_{(1,168)} = 8,62$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,08$) e pelo tempo ($F_{(5,168)} = 15,18$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,49$), com uma interação significativa entre ambos ($F_{(5,168)} = 12,48$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,43$). Esses resultados sugerem que o tempo desempenha um papel crucial na variação da atividade da α -glicosidase, sendo o impacto do tratamento mais evidente em certos momentos, como aos 7 dias (redução) e aos 30 dias (aumento) após a aplicação ($p < 0,05$) (Figura 5.2a). Já para a atividade da β -glicosidase também houve efeitos do tratamento ($F_{(1,168)} = 54,75$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,33$), tempo ($F_{(5,168)} = 12,95$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,37$), e interação ($F_{(5,168)} = 9,47$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,30$). O efeito da aplicação do pesticida na β -glicosidase foi mais distinto nos dias 7, 15 e 30 ($p < 0,05$) onde houve o aumento da atividade. Porém, ambas as enzimas, em 60 dias, tiveram resultado semelhante ao controle ($p > 0,05$) (Figura 5.2b).

Para a fosfatase ácida, o tratamento ($F_{(1,168)} = 20,69$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,15$), o tempo ($F_{(5,168)} = 28,07$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,62$) e sua interação ($F_{(5,168)} = 6,91$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,23$) foram significativos. Os resultados dos contrastes post-hoc para a interação indicam que a atividade da fosfatase ácida foi maior nos dias 7 e 30 ($p < 0,05$). Aos 60 dias, o tratamento com o pesticida não foi diferente do controle, sugerindo uma recuperação da atividade da fosfatase ácida ao nível do controle ($p > 0,05$) (Figura 5.2c).

Figura 5.2 – Atividade de parâmetros do solo de dois tratamentos (controle e tratado com pesticida a base de fluopiram) e variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. As letras de significância indicam diferenças estatisticamente significativas: letras sobre as barras representam diferenças significativas para as interações (tratamento e tempo).



A atividade da glicina aminopeptidase foi influenciada pelo tratamento ($F_{(1,168)} = 26,77$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,12$), pelo tempo ($F_{(5,168)} = 88,96$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,62$) e pela interação tratamento-tempo ($F_{(5,168)} = 15,09$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,26$). As comparações subsequentes mostraram que, no tempo 0, a atividade da glicina aminopeptidase foi maior no grupo tratado

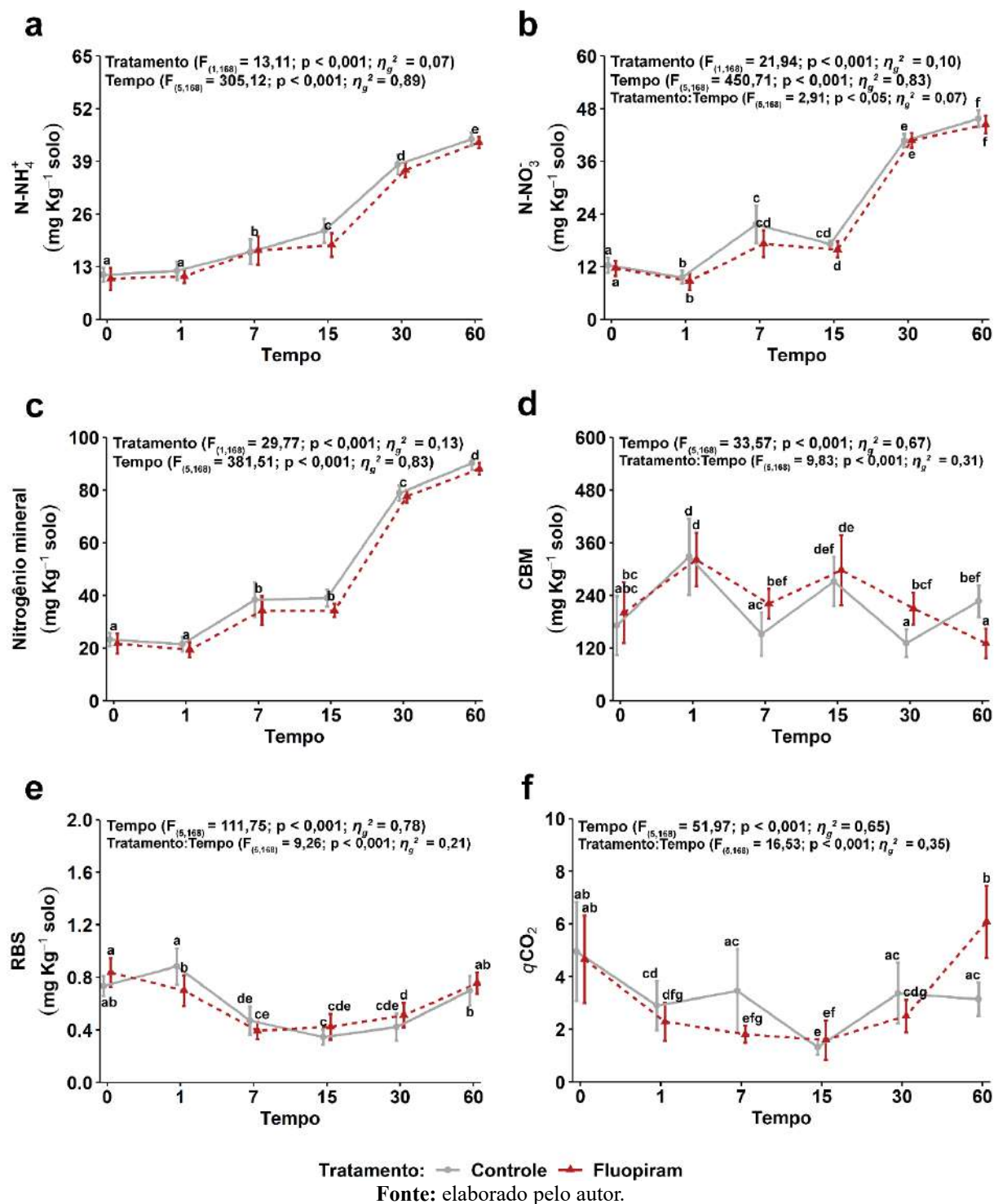
com pesticida comparado ao controle ($p < 0,05$), indicando diferenças iniciais entre as condições. No entanto, após a aplicação do tratamento, a atividade foi reduzida no grupo pesticida em comparação ao controle no dia 1 ($p < 0,05$). Após o dia 1, a atividade do controle reduziu enquanto a do grupo pesticida permaneceu estável. Nos dias 30 e 60, não houve diferença na atividade da glicina aminopeptidase entre os grupos pesticida e controle ($p > 0,05$) (Figura 5.2d).

A arilsulfatase também foi afetada pelo tratamento ($F_{(1,168)} = 4,62$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,04$), pelo tempo ($F_{(5,168)} = 45,68$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,84$) e pela interação tratamento-tempo ($F_{(5,168)} = 3,09$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,12$). Análises adicionais mostraram que a atividade da arilsulfatase variou significativamente ao longo do tempo dentro dos tratamentos, e que as diferenças entre os tratamentos se acentuaram em momentos específicos. A redução na atividade enzimática foi observada em ambos os grupos do tempo 0 para o tempo 1, e essa redução se manteve estável ao longo dos tempos subsequentes (Figura 5.2e).

Para o parâmetro $N-NH_4^+$, o tratamento mostrou significância ($F_{(1,168)} = 13,11$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,07$) e o tempo foi um fator extremamente significativo ($F_{(5,168)} = 305,12$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,89$). As médias gerais do controle e grupo tratado com pesticida foram diferentes ($p < 0,05$). Para o tempo, as maiores variações ocorreram ao longo do tempo, especialmente aos 60 dias após a aplicação (Figura 5.3a). Já para o $N-NO_3^-$ houve efeito do tratamento ($F_{(1,168)} = 21,94$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,10$), do tempo ($F_{(5,168)} = 450,71$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,83$) e da interação entre ambos ($F_{(5,168)} = 2,91$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,07$). No dia 7, houve um aumento na concentração de $N-NO_3^-$, com médias semelhantes entre os tratamentos. No dia 15, houve uma redução na concentração de $N-NO_3^-$ em ambos os grupos em comparação ao dia 7. O controle no dia 15 manteve uma média semelhante ao controle e pesticida no dia 7. O $N-NO_3^-$ do pesticida no dia 15 foi semelhante apenas ao valor no dia 7 para o mesmo tratamento (Figura 5.3b).

O nitrogênio mineral foi afetado pelo tratamento ($F_{(1,168)} = 29,77$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,13$) e pelo tempo ($F_{(5,168)} = 381,51$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,83$). A concentração de nitrogênio mineral foi maior no controle em comparação ao pesticida ($p < 0,05$). Ao longo do tempo, a concentração de nitrogênio mineral aumentou, sem diferença entre tempo 0 e tempo 1 ($p > 0,05$). Houve aumentos do tempo 0 para os tempos 7, 15, 30 e 60, com as maiores concentrações observadas nos tempos 30 e 60 ($p < 0,05$) (Figura 5.3c).

Figura 5.3 – Atividade de parâmetros do solo de dois tratamentos (controle e tratado pesticida a base de fluopiram) e variação ao longo do tempo (dias). As barras representam o desvio padrão. As letras de significância indicam diferenças estatisticamente significativas: letras sobre as barras representam diferenças significativas para as interações (tratamento e tempo) e para os efeitos simples do tempo. Para o efeito simples do tratamento, não foram adicionadas letras de significância.



O carbono da biomassa microbiano (CBM) foi afetado pelo tempo ($F_{(5,168)} = 33,57$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,67$) e pela interação tratamento-tempo ($F_{(5,168)} = 9,83$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,31$). A atividade de CBM variou ao longo do tempo em ambos os tratamentos. No controle, houve flutuações significativas entre os diferentes dias. No tratamento, com o pesticida também

ocorreram flutuações, mas os padrões de variação, em alguns momentos, foram diferentes em comparação ao controle. Em 60 dias, a concentração de CBM foi menor no tratamento com pesticida em comparação ao controle ($p < 0,05$), mas similar ao controle no tempo 0 ($p > 0,05$) (Figura 5.3d).

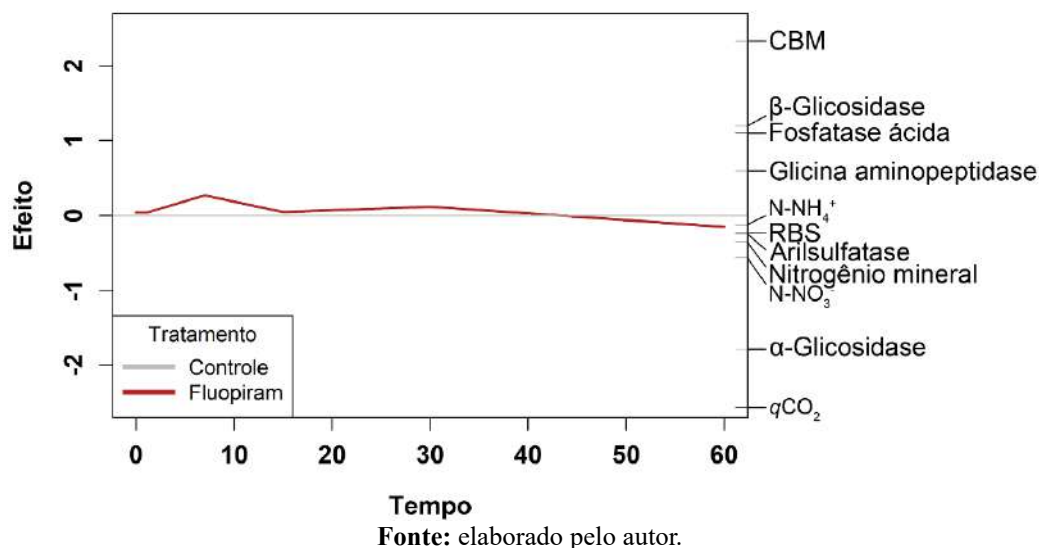
O tempo ($F_{(5,168)} = 111,75$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,78$) e a interação entre tratamento-tempo ($F_{(5,168)} = 9,26$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,22$) tiveram efeitos na respiração basal do solo (RBS). Embora o teste post-hoc indique que o pesticida tenha mostrado uma diferença na RBS no dia 1 ($p < 0,05$), essa diferença não foi consistente ao longo do tempo, com os dois tratamentos apresentando valores similares na maioria dos períodos (Figura 5.3e).

O quociente metabólico (qCO_2) foi afetado pelo tempo ($F_{(5,168)} = 51,97$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,65$) e pela interação tratamento-tempo ($F_{(5,168)} = 16,53$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,35$). Os resultados da análise post-hoc mostraram que, inicialmente, ambos os tratamentos apresentaram valores semelhantes de qCO_2 . No entanto, ao longo do tempo, foram observadas variações significativas. Em 60 dias, o valor de qCO_2 foi significativamente menor no controle e maior no pesticida, indicando uma diferença entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Figura 5.3e).

Para determinar a importância relativa do tempo e da aplicação do pesticida a base de fluopiram, foram examinados os componentes da inércia explicada pela análise de Curvas de Resposta Principal (CRP) utilizando os dados de log das variáveis respostas, como o tratamento e o tempo como fatores (Figura 5.4). Do valor de 1,98 da inércia total (variação total nas respostas multivariadas dos dados), 72,76% foram explicados por fatores conhecidos e não relacionados ao tratamento, como a variabilidade natural ao longo do tempo (variação condicional). A variação diretamente atribuível ao efeito do pesticida ao longo do tempo (variação restrita) foi de 8,02%, enquanto a variação residual ou erros (variação não restrita) foi de 19,23%.

Os pesos das variáveis (b_k) indicam a afinidade de cada variável com a resposta mostrada no diagrama CRP. Variáveis com pesos positivos tendem a diminuir em resposta ao tratamento, enquanto aquelas com pesos negativos tendem a aumentar em resposta ao tratamento. Isso ocorre porque um peso positivo indica que a variável responde de forma proporcional ao coeficiente canônico (C_{dt}), resultando em uma variação total negativa quando multiplicado pelo tratamento. Os pesos das variáveis foram os seguintes: α -glicosidase (-1,79), β -glicosidase (1,20), fosfatase ácida (1,10), glicina aminopeptidase (0,59), arilsulfatase (-0,25), $N-NH_4^+$ (-0,12), $N-NO_3^-$ (-0,57), nitrogênio mineral (-0,36), RBS (-0,23), CBM (2,34) e qCO_2 (-2,56).

Figura 5.4 – A análise CRP mostra a resposta das variáveis do solo aos tratamentos (controle e tratado com pesticida a base de fluopiram) ao longo do tempo. O eixo vertical representa os desvios dos tratamentos em relação ao controle. Os pesos das variáveis no eixo direito indicam a afinidade de cada variável com a resposta mostrada no diagrama, destacando como cada variável responde ao tratamento ao longo do tempo.



Os coeficientes canônicos (C_{dt}) representam a resposta média do tratamento ao longo do tempo em relação ao controle. Eles capturam a variação específica atribuída ao tratamento em cada ponto no tempo, contrastando essa resposta com a condição de controle. Na figura 5.4, o tratamento controle é representado por uma linha horizontal cinza, que serve de referência para avaliar sua relação com o tratamento. No modelo CRP, os coeficientes canônicos indicam a magnitude e a direção da resposta ao tratamento. Os coeficientes para a interação tratamento + tempo, contrastados com o controle, mostraram que o efeito da aplicação do pesticida é mais distinto no dia 7, seguido de uma diminuição gradual ao longo do tempo. Os coeficientes foram: 0,040 (dia 0); 0,036 (dia 1); 0,27 (dia 7); 0,048 (dia 15); 0,12 (dia 30) e -0,15 (dia 60).

O teste de significância global do modelo indicou que a variação explicada pelo modelo foi significativa ($F = 11,67$; $p < 0,05$), indicando que o pesticida explica uma quantidade significativa da variação das variáveis respostas. Os testes de significância dos eixos canônicos mostraram que os três primeiros eixos (RDA1, RDA2 e RDA3) foram altamente significativos ($p < 0,05$), reforçando o impacto da aplicação. O teste de significância das variáveis explicativas confirmou a significância do modelo ($F = 11,67$, $p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

A ação de pesticidas sob a atividade biológica do solo é uma questão importante e pouco explorada, o que exige pesquisas para o entendimento dos efeitos e monitoramento (WOŁEJKO *et al.*, 2020). Nosso estudo concentra-se na avaliação dos efeitos de um pesticida a base de

fluopiram na microbiota do solo, relatando potenciais impactos e possíveis riscos ambientais associados ao uso de pesticidas a base de fluopiram. De forma geral, os resultados indicam que o tratamento com o pesticida afetou as variáveis avaliadas, especialmente nos primeiros dias após aplicação. Entretanto, o tempo também foi um fator importante, contribuindo para a variação observada. Consequentemente, ambos os fatores – tratamento e tempo – foram importantes para a mudança nas variáveis do solo.

Para todas as cinco enzimas analisadas, houve efeito de interação entre tempo e tratamento. Isso indica que o impacto do pesticida não é constante ao longo do tempo e varia em diferentes períodos após a aplicação. Apesar de ser intuitivo que os efeitos mudem com o tempo, é importante ressaltar que a variação observada não é aleatória, já que a interação revela padrões específicos de variação. A interação pode ser resultado de processos biológicos subjacentes, como mudança na comunidade microbiana, disponibilidade de nutrientes ou resistência ao pesticida, que não seriam evidentes apenas com a interpretação dos efeitos principais, que também foram significativos.

Nos gráficos de interação das enzimas (Figura 5.2), é possível observar, que de forma geral, houve efeito da aplicação do pesticida após o primeiro dia. O efeito é mais evidente para α -glicosidase, β -glicosidase e fosfatase ácida. A aplicação do pesticida resultou em uma redução significativa na atividade da α -glicosidase aos 7 dias e um aumento aos 30 dias após a aplicação. Contudo, houve aumento na atividade da β -glicosidase nos dias 7, 15 e 30. A α -glicosidase e β -glicosidase estão diretamente envolvidas na degradação de carboidratos e celulose, respectivamente. Alterações nessas enzimas têm implicações diretas para o ciclo do carbono no solo, pois ambas estão envolvidas na degradação de carboidratos, mas atuando em substratos diferentes e, consequentemente, têm papéis distintos no ciclo do carbono (INAMDAR; SANGAWE; ADHAPURE, 2022). A disponibilidade de nutrientes e a matéria orgânica podem influenciar a atividade dessas enzimas (UWITUZE *et al.*, 2022). A diminuição e aumento dessas enzimas após aplicação do pesticida a base de fluopiram pode estar relacionado ao impacto na disponibilidade de substratos ou na comunidade microbiana do solo. Essas flutuações na atividade enzimática podem afetar a ciclagem de nutrientes e a decomposição da matéria orgânica no solo, já que são sensíveis e sua alteração pode afetar o carbono orgânico total e outros nutrientes (INAMDAR; SANGAWE; ADHAPURE, 2022; UWITUZE *et al.*, 2022). Consequentemente a aplicação do pesticida a base de fluopiram pode causar impactos temporários na atividade das enzimas α -glicosidase e β -glicosidase, refletindo mudanças na decomposição de carboidratos e celulose, essenciais para a ciclagem de nutrientes no solo.

O aumento da fosfatase ácida pode ser atribuído ao fato que o fluopiram estimula o aumento de bactérias solubilizadas de fosfato (SUN *et al.*, 2020). Essas bactérias produzem a fosfatase ácida para mineralizar compostos de fosforo orgânico, liberando fosfato inorgânico (PO_4^{3-}). Como consequência da liberação de PO_4^{3-} outras enzimas, relacionadas ao metabolismo do fósforo, podem ser estimuladas, como fosfatase alcalina e ATPase (VANCE; UHDE-STONE; ALLAN, 2003). Apesar de em um primeiro momento acreditarmos que há benefícios com o aumento de fosfato, como melhoria nutricional do solo (SUN *et al.*, 2020), pode haver consequências. Uma delas é o efeito de eutrofização pelo aumento de certas populações microbianas devido ao excesso de fosfato, levando a dominação de algumas espécies em detrimento de outras.

A atividade inicial da glicina aminopeptidase era maior no grupo tratado. A aplicação do pesticida a base de fluopiram causou a redução da glicina aminopeptidase, mas essa diferença desapareceu ao longo do tempo, indicando um impacto temporário na ciclagem de nitrogênio. Já a arilsulfatase, a atividade variou ao longo do tempo dentro dos tratamentos, porém a diferença se acentuou. A estabilidade sugere um impacto limitado na ciclagem de enxofre.

Em relação aos valores de N-NH_4^+ , N-NO_3^- e nitrogênio mineral, apesar do efeito do tratamento ser significativo e ter interação para N-NO_3^- , a magnitude do efeito (indicado pelos valores de η_g^2) foi relativamente pequeno. Isso implica que a significância do tratamento para N-NH_4^+ e nitrogênio mineral, bem como a interação para o nitrogênio mineral, embora relevante, não foi o principal fator responsável pelas observações observadas. Em contraste o tempo teve um η_g^2 muito maior, indicando que a maior parte da variação dos parâmetros pode ser atribuídas às mudanças ao longo do tempo.

Os valores de CBM não foram contantes e apresentaram variação com o tempo após a aplicação do pesticida a base de fluopiram. Apesar da variação ao longo do tempo, aos 60 dias o valor de CBM foi menor no tratamento em relação ao controle. Além disso, também houve aumento do $q\text{CO}_2$ em 60 dias. Resultado semelhante foi encontrado por Zhang *et al.* (2014) em que o fluopiram também reduziu o CBM e aumentou o $q\text{CO}_2$, indicando impacto. A manutenção energética é crucial para a integridade celular e viabilidade da população microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 2010). Logo, a aplicação do pesticida a base de fluopiram pode ter aumentado a demanda de energia para a manutenção microbiana, resultando em menos carbono disponível para a biomassa microbiana, levando a sua redução. Isso é mais evidente ao considerar o aumento do $q\text{CO}_2$.

O aumento do qCO_2 pode refletir uma elevada procura por carbono para a manutenção, e se o solo não conseguir repor esse carbono, a biomassa microbiana deverá diminuir (ANDERSON; DOMSCH, 2010). O qCO_2 é inversamente relacionado à eficiência do uso do carbono (CUE) pelos microrganismos. Um qCO_2 elevado indica uma baixa CUE, onde mais carbono é perdido como CO_2 durante a respiração, enquanto um qCO_2 baixo indica uma alta CUE, onde mais carbono é incorporado na biomassa microbiana (ASHRAF; WAQAS; RAHMAN, 2022). O aumento do qCO_2 em nosso estudo sugere uma diminuição na eficiência metabólica das comunidades microbianas no solo sob a influência do pesticida a base de fluopiram.

Em termos ecológicos a redução do CBM e o aumento do qCO_2 indicam menos eficiência do solo em sequestrar carbono. O aumento do qCO_2 também é associado a uma maior perda de carbono, como CO_2 , para a atmosfera, pois não é incorporado na biomassa microbiana do solo (ASHRAF; WAQAS; RAHMAN, 2022). Essa perda de CO_2 para atmosfera contribui para o efeito estufa, já que menos carbono é sequestrado no solo, o que compromete a capacidade dos solos atuarem como sumidouro de carbono a longo prazo, influenciando assim o ciclo do carbono (JEZIERSKA-TYS *et al.*, 2021).

Embora nossos dados não tenham mostrado um aumento consistente na RBS, Zhang *et al.* (2014) encontraram um aumento significativo na respiração basal em solos tratados com fluopiram. Porém, o solo usado no estudo era franco-siltoso. A ausência de aumento na RBS em nosso estudo pode ser explicada por diferenças nas condições experimentais ou nas comunidades microbianas presentes no solo.

Os resultados da análise CRP indicam que aplicação do pesticida teve um efeito significativo nas variáveis estudadas ao longo do tempo. Especificamente, α -glicosidase e qCO_2 apresentaram pesos negativos altos, indicando um aumento em resposta a aplicação. Em contrapartida, β -glicosidase, fosfatase ácida e CBM apresentaram pesos positivos altos, indicando uma diminuição em resposta ao tratamento. Os coeficientes de interação entre tratamento e tempo mostram que o efeito do fluopiram é mais pronunciado no dia 7, com uma diminuição gradual subsequente. Os valores próximos de 0 na CRP indicam que as variáveis têm pouca ou nenhuma afinidade com a resposta mostrada no diagrama. Ou seja, não apresentam uma resposta significativa ao tratamento, elas não aumentam nem reduzem.

Além disso, uma interpretação que se pode fazer com os resultados e com os gráficos é que os efeitos da aplicação do pesticida a base de fluopiram são de curto prazo, já que aparentemente uma recuperação após 60 dias. Logo, os dados sugerem que, embora a aplicação do fluopiram cause alterações imediatas e significativas nas propriedades do solo, os efeitos

não são duradouros. Entretanto, a recuperação pode ser um indicativo de impacto, por mascarar problemas subjacentes. Já foi relatado que pesticidas a base de fluopiram pode eliminar microrganismos do solo e favorecer o desenvolvimento de outros organismos, alterando assim a estrutura e função da comunidade microbiana do solo (ZHANG *et al.*, 2014; SANTÍSIMA-TRINIDAD *et al.*, 2018).

Assim, o fluopiram pode eliminar determinados microrganismos e os sobreviventes, da mesma espécie ou não, podem assumir as funções dos microrganismos eliminados. Como consequência há a alteração da estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana do solo (WOŁEJKO *et al.*, 2020). Logo, essa possível recuperação deve ser analisada com cautela, pois pode significar que a recuperação se dá devido a proliferação de outras espécies, sendo um aspecto importante a ser considerado no manejo agrícola e na avaliação dos impactos ecológicos de uso de pesticidas. Além disso, em um contexto agrícola onde há repetidas aplicações de pesticidas, a eliminação repetida de microrganismos sensíveis pode levar a uma redução na diversidade microbiana e a uma menor resiliência do solo a longo prazo.

5.5 CONCLUSÃO

Este estudo investigou os efeitos de um pesticida cujo ingrediente ativo é o fluopiram (Verango® Prime - Bayer CropScience) em parâmetros químicos e biológicos do solo. Nossos resultados demonstram que as enzimas α -glucosidase, β -glucosidase e fosfatase ácida foram mais sensíveis ao tratamento com o pesticida. O CBM e $q\text{CO}_2$ também responderam a aplicação do pesticida, sugerindo um possível impacto. Nossos resultados estão de acordo com o processo de homogeneização biótica, que fala que ecossistemas respondem a perturbações químicas com alterações em funções biológicas. As perturbações podem consistir na morte, deslocação ou dano pontual e discreto de um ou mais indivíduos, criando oportunidades para que novos indivíduos se estabeleçam. O fato de novos indivíduos estabelecerem pode, em um primeiro momento, indicar que as funções foram reestabelecidas, que houve recuperação. Entretanto, a recuperação pode mascarar o problema da alteração na estrutura e funcionalidade da comunidade microbiana. Logo, a recuperação pode não ser necessariamente uma recuperação do ecossistema original do solo.

Estes resultados demonstram, que embora pesticidas a base de fluopiram sejam eficientes como fungicidas e nematicidas, seu uso pode causar efeitos prejudiciais no solo. Embora o tempo tenha mostrado também um fator influente, a aplicação do pesticida causou mudanças detectáveis. Essas mudanças podem causar impactos na saúde e funcionalidade do solo. Dessa

maneira é fundamental o monitoramento contínuo dos efeitos dos pesticidas no solo, levando em conta a variabilidade temporal, para que a avaliação do impacto seja mais abrangente.

Contudo, os resultados demonstram efeito agudo do pesticida à base de fluopiram. Porém as avaliações realizadas não captaram os potenciais impactos bioquímicos e microbiológicos ao longo do tempo.

REFERENCIAS

ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K. H. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 42, no. 12, p. 2039–2043, Dec. 2010. DOI 10.1016/j.soilbio.2010.06.026.

ANIKWE, M. A. N.; IFE, K. The role of soil ecosystem services in the circular bioeconomy. **Frontiers in Soil Science**, vol. 3, 2 Nov. 2023. DOI 10.3389/fsoil.2023.1209100.

ASHRAF, M. N.; WAQAS, M. A.; RAHMAN, S. Microbial Metabolic Quotient is a Dynamic Indicator of Soil Health: Trends, Implications and Perspectives (Review). **Eurasian Soil Science**, vol. 55, no. 12, p. 1794–1803, 8 Dec. 2022. DOI 10.1134/S1064229322700119.

BAWEJA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, G. Fertilizers and Pesticides: Their Impact on Soil Health and Environment. *In*: GIRI, B.; VARMA, A. (eds.). **Soil Health**. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature, 2020. p. 265–285. DOI 10.1007/978-3-030-44364-1_15.

BREMNER, J. M.; KEENEY, D. R. Determination and Isotope-Ratio Analysis of Different Forms of Nitrogen in Soils: 3. Exchangeable Ammonium, Nitrate, and Nitrite by Extraction-Distillation Methods. **Soil Science Society of America Journal**, vol. 30, no. 5, p. 577–582, 1 Sep. 1966. DOI 10.2136/sssaj1966.03615995003000050015x.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. *In*: VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J. C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (eds.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2001. p. 270–276.

ELKIN, L. A.; KAY, M.; HIGGINS, J. J.; WOBBROCK, J. O. An Aligned Rank Transform Procedure for Multifactor Contrast Tests. 10 Oct. 2021. **The 34th Annual ACM Symposium on User Interface Software and Technology** [...]. New York, NY, USA: ACM, 10 Oct. 2021. p. 754–768. DOI 10.1145/3472749.3474784.

INAMDAR, A.; SANGAWA, V.; ADHAPURE, N. Enzymes in rhizosphere engineering. *In*: DUBEY, R. C.; KUMAR, P. (eds.). **Rhizosphere Engineering**. London, United Kingdom: Academic Press Elsevier, 2022. p. 259–272. DOI 10.1016/B978-0-323-89973-4.00009-0.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil—V. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 8, no. 3, p. 209–213, Jan. 1976. DOI 10.1016/0038-0717(76)90005-5.

JEZIERSKA-TYS, S.; JONIEC, J.; BEDNARZ, J.; KWIATKOWSKA, E. Microbiological Nitrogen Transformations in Soil Treated with Pesticides and Their Impact on Soil Greenhouse Gas Emissions. **Agriculture**, vol. 11, no. 8, p. 787, 17 Aug. 2021. DOI 10.3390/agriculture11080787.

KAY, M.; ELKIN, L. A.; HIGGINS, J. J.; WOBBROCK, J. O. **ARTool: Aligned Rank Transform for Nonparametric Factorial ANOVAs**. R package version 0.11.1, 2021. DOI 10.5281/zenodo.594511.

KNUPP, A. M.; FERREIRA, E. P. B. Eficiência da quantificação do carbono da biomassa microbiana por espectrofotometria comparada ao método titrimétrico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal of Agricultural Sciences**, vol. 6, no. 4, p. 588–595, 31 Dec. 2011. DOI 10.5039/agraria.v6i4a1071.

LEWIS, K. A.; TZILIVAKIS, J.; WARNER, D. J.; GREEN, A. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, vol. 22, no. 4, p. 1050–1064, 18 May 2016. DOI 10.1080/10807039.2015.1133242.

MENDES, I. C.; SOUSA, D. M. G.; DANTAS, O. D.; LOPES, A. A. C.; JUNIOR, F. B. R.; OLIVEIRA, M. I.; CHAER, G. M. Soil quality and grain yield: A win–win combination in clayey tropical oxisols. **Geoderma**, vol. 388, p. 114880, Apr. 2021. DOI 10.1016/j.geoderma.2020.114880.

OKSANEN, J.; SIMPSON, G. L.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; SZOECS, E.; WAGNER, H.; BARBOUR, M.; BEDWARD, M.; BOLKER, B.; BORCARD, D.; CARVALHO, G.; CHIRICO, M.; CACERES, M. De; DURAND, S.; ... WEEDON, J. **The Community Ecology Package: package “vegan 2.6-2.”** 2022.

PEREIRA, P.; BOGUNOVIC, I.; MUÑOZ-ROJAS, M.; BREVIK, E. C. Soil ecosystem services, sustainability, valuation and management. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, vol. 5, p. 7–13, Oct. 2018. DOI 10.1016/j.coesh.2017.12.003.

POSIT TEAM. **RStudio**: Integrated Development Environment for R, Version 2024.04.1. Boston, MA, 2024.

RATHOD, P. H.; SHAH, P. G.; PARMAR, K. D.; KALASARIYA, R. L. The Fate of Fluopyram in the Soil–Water–Plant Ecosystem: A Review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 260, no. 1, p. 1, 5 Dec. 2022. DOI 10.1007/s44169-021-00001-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s44169-021-00001-7>.

SANTÍSIMA-TRINIDAD, A. B. L.; DEL MAR MONTIEL-ROZAS, M.; DIÉZ-ROJO, M. Á.; PASCUAL, J. A.; ROS, M. Impact of foliar fungicides on target and non-target soil microbial communities in cucumber crops. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 166, no. March, p. 78–85, Dec. 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.09.074. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.074>.

SILVA, E. E. da; AZEVEDO, P. H. S. de; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo ($q\text{CO}_2$). **Comunicado Técnico 99. Embrapa, Seropédica**, p. 1–4, 2007. .

SUN, T.; LI, M.; SALEEM, M.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. The fungicide “fluopyram” promotes pepper growth by increasing the abundance of P-solubilizing and N-fixing bacteria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 188, no. November 2019, p. 109947, Jan. 2020. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109947.

TOSTADO, L.; BOLLMOHR, S.; BÄR, J.; BICKEL, U.; BOMBARDI, L. M.; BOURGIN, C.; BÖDEKER, W.; BRÜHL, C.; BUTSCHER-SCHADEN, H.; DECKEN, H. von der; GOULSON, D.; HAFFMANS, S.; HEIMRATH, J.; HOINKES, C.; HOLDINGHAUSEN, H.; LEMKEN, D.; LIEBETRAU, L.; MERTENS, M.; NABEL, M.; ... ZÜHLSDORF, A. **Pesticide Atlas: Facts and figures about toxic chemicals in agriculture**. 2nd ed. Berlin, Germany: Heinrich-Böll-Stiftung, 2022.

UWITUZE, Y.; NYIRANEZA, J.; FRASER, T. D.; DESSUREAUT-ROMPRÉ, J.; ZIADI, N.; LAFOND, J. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, and Extracellular Soil Enzyme Responses to

Different Land Use. **Frontiers in Soil Science**, vol. 2, no. June, 29 Jun. 2022. DOI 10.3389/fsoil.2022.814554.

VAN DEN BRINK, P. J.; BRAAK, C. J. F. Ter. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 18, no. 2, p. 138–148, 2 Feb. 1999. DOI 10.1002/etc.5620180207.

VANCE, C. P.; UHDE-STONE, C.; ALLAN, D. L. Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. **New Phytologist**, vol. 157, no. 3, p. 423–447, 3 Mar. 2003.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, vol. 19, no. 6, p. 703–707, Jan. 1987. DOI 10.1016/0038-0717(87)90052-6.

WOBBROCK, J. O.; FINDLATER, L.; GERGLE, D.; HIGGINS, J. J. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only anova procedures. 7 May 2011. **Proceedings of the SIGCHI Conference on Human Factors in Computing Systems [...]**. New York, NY, USA: ACM, 7 May 2011. p. 143–146. DOI 10.1145/1978942.1978963.

WOŁEJKO, E.; JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A.; WYDRO, U.; BUTAREWICZ, A.; ŁOZOWICKA, B. Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. **Applied Soil Ecology**, vol. 147, no. November 2019, p. 103356, Mar. 2020. DOI 10.1016/j.apsoil.2019.09.006.

ZHANG, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; WU, X.; ZHENG, Y. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 108, p. 273–280, Oct. 2014. DOI 10.1016/j.ecoenv.2014.07.018.

ARTIGO 6. BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS: ESTRATÉGIA PARA MITIGAÇÃO DE DANOS AMBIENTAIS (RESULTADOS PRELIMINARES)

Apresentação – Este capítulo, apesar de não finalizado é inserido na versão final com dados preliminares, pois não poderia ficar de fora devido a sua importância e significado. A ideia em usar fungos para degradação de pesticidas existe desde os primeiros momentos em que eu estava imaginando a tese. Onde os capítulos iniciais iriam explorar os impactos ambientais dos pesticidas e este capítulo apontaria uma estratégia para mitigar danos causados, acelerando a degradação destas moléculas e diminuindo a persistência de pesticidas no meio ambiente. Devido a pandemia a ideia ficou para mais tarde, quando conseguimos os recursos o tempo já estava curto. Mesmo assim iniciei o projeto e a primeira etapa está concluída e os resultados parciais foram apresentados na edição de 2024 do Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão do Campus Central – CET (EEPEX) (Figura D.1). Além disso, com este projeto, concorreremos o Prêmio Goiás Sustentável 2024 promovido pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável de Goiás (SEMAD). Fomos ganhadores na categoria em que o projeto concorreu (Figura D.2-3). Afim que conheçam o projeto, irei fornecer o resumo que foi enviado para concorrer ao Prêmio Goiás Sustentável 2024 (Apêndice D).

6.1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo, da água e do ar por pesticidas leva a vários problemas de saúde pública, juntamente com problemas ambientais (KUMAR *et al.*, 2021; RAJAK *et al.*, 2023). Com isso, percebe-se que a contaminação por pesticidas é um problema para o meio ambiente e prejudicial para todas as formas de vida. Devido os problemas acarretados pelo uso de pesticidas, a redução dos resíduos presentes no solo e na água é uma preocupação de segurança (KUMAR *et al.*, 2021). Uma forma de solucionar esse problema é a biodegradação, com isso seria possível erradicar moléculas de pesticidas de áreas contaminadas (KUMAR *et al.*, 2021; PATHAK *et al.*, 2022).

Os fungos estão entre os candidatos promissores para serem explorado para o processo de biodegradação de pesticidas. Fungos são organismos quimioheterotróficos com capacidade metabólica de quebrar moléculas complexas, utilizando-as como fonte de energia. Toda essa capacidade se dá devido ao arsenal enzimático intra e extracelular capaz de atacar e metabolizar uma ampla classe de compostos (VAKSMAA *et al.*, 2023).

Com base nisso, neste primeiro momento é essencial a triagem de fungos e enzimas eficientes para a biodegradação de pesticidas, reduzindo os riscos para o meio ambiente e a saúde humana (PATHAK *et al.*, 2022). Sendo assim, esta primeira etapa tem como objetivo

procurar fungos que sejam candidatos para ensaios de biodegradação de moléculas de pesticidas. Para a triagem, será testada a capacidade de tolerância de diferentes isolados fúngicos obtidos de diferentes substratos, apresentando assim diferentes estratégias de vida.

6.2 METODOLOGIA

Capacidade de tolerância das linhagens fúngicas

As 68 linhagens fúngicas avaliadas fazem parte da coleção de culturas do FungiLab/UEG. Os fungos preservados pelo método castellani foram reativados em meio BDA (Agar Batata Dextrose). Após o desenvolvimento em meio BDA, discos de ágar de 5 mm de diâmetro com micélio fúngico foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo meio sólido BDA + concentração de campo dos pesticidas. As concentrações de campo foram calculadas de acordo com a quantidade de ingrediente ativo na formulação comercial, ou seja, para o fluopiram (Verango® Prime) – 1,67 mg mL⁻¹; para a flumioxazina (Sumisoya®) – 0,25mg mL⁻¹; e para o S-metolaclopro (Dual Gold®) – 6,4 mg mL⁻¹. Os pesticidas foram adicionados ao meio BDA esterilizado até atingir a concentração final de campo. As culturas fúngicas foram incubadas a 30 °C no escuro. O diâmetro de crescimento (em mm) foi medido após duas semanas de crescimento. Placas sem pesticidas e somente BDA foram usadas como controle. A porcentagem de inibição do crescimento no meio BDA contendo pesticida será determinada utilizando a seguinte fórmula (XIAO; KONDO, 2019):

$$CT = \frac{DCA}{DCC}$$

Onde:

CT – Coeficiente de tolerância;

DCA e DCC – Diâmetro da colônia na amostra e controle, respectivamente.

Para fungos leveduriformes, foi considerada a aparência nos tratamentos com pesticidas, comparada ao controle negativo.

Extração de DNA e identificação dos isolados fúngicos

Para se determinar as espécies de fungos que foram mais promissoras na etapa de tolerância, o DNA genômico dos isolados foi extraído de culturas previamente crescidas em meio BDA usando o kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, EUA), seguindo o protocolo do fabricante e quantificado por fluorometria usando o *Quantus™ Fluorometer* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Os *primers* ITS5/ITS4 (WHITE *et al.*, 1990) foram usados para reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar a região

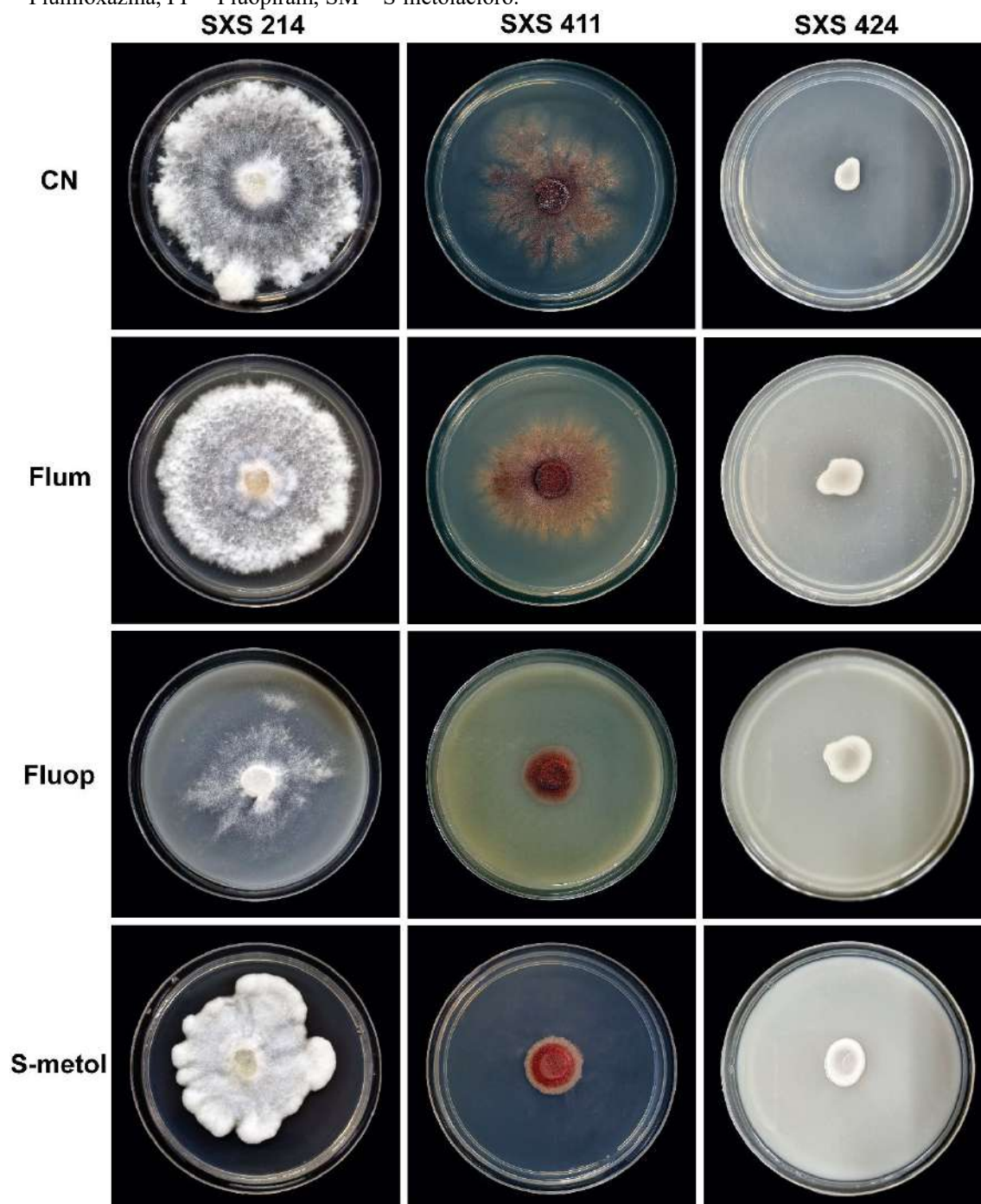
espaçadora transcrito interno (ITS). As reações de PCR foram realizadas com um volume de 25 μL , contendo 2,5 μL de Tampão de reação 10 $\times$ (Cellco, Brasil), 2 μL de dNTP Mix a 25 mM (Cellco, Brasil), 2,5 μL de cada primer a 5 μM , 0,5 μL de 0,25 U Taq DNA polimerase *High Fidelity* (Cellco, Brasil), 1 μL de DNA a 10 ng μL^{-1} e q.s.p. de água destilada estéril. O protocolo de termociclagem da PCR utilizou os seguintes parâmetros: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 55 °C por 30 seg e extensão a 72 °C por 1 min; a reação terminou com uma extensão final de 7 min a 72 °C e armazenamento a 4 °C. Os amplicons foram purificados usando Exo-SAP Mix (Cellco, Brasil) e sequenciados, com o mesmo conjunto de primers da amplificação, em um sequenciador ABI 3730xl (MacroGen Ltd., Coreia do Sul).

As sequências obtidas foram visualizadas e montadas as consenso no software *Staden Package 2.0* (STADEN; BEAL; BONFIELD, 1998), e então, comparadas com sequências do banco de dados disponível no *GenBank* através da ferramenta de busca *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para a identificação prévia dos isolados, baseado no valor de porcentagem de identificação.

6.3 RESULTADOS

Dos 68 fungos avaliados, três isolados se destacaram como promissores (Figura 6.1). O isolado SXS 214 apresentou coeficiente de tolerância de 0,90 para a Flumioxazina, 0,88 para o Fluopiram e 0,73 para o S-metolacoloro. O isolado SXS 411 obteve coeficiente de tolerância de 0,84 para a Flumioxazina, 0,30 para o Fluopiram e 0,40 para o S-metolacoloro. O isolado SXS 424, uma bactéria (de início achávamos que era um fungo leveduriforme), teve sua morfologia nos tratamentos com pesticidas semelhante à do controle negativo (CN).

Figura 6.1 – Crescimento de isolados fúngicos em contato com os pesticidas. CN = Controle negativo, FM = Flumioxazina, FP = Fluopiram, SM = S-metolacoloro.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com base na comparação com sequências do banco de dados disponível no *GenBank*, baseado no valor de porcentagem de identificação os isolados foram identificados como sendo: *Fusarium verticillioides* (SXS 411 – 100%) e *Trametes versicolor* (SXS 214 – 99%).

6.4 DISCUSSÃO

O *Fusarium verticillioides* é um fungo filamentoso fitopatogênico que afeta o milho, arroz, sorgo, trigo, cana-de-açúcar, banana e aspargos provocando podridão (DEEPA; ACHAR; SREENIVASA, 2021). Além de causar doenças em plantas, é prejudicial à saúde humana devido a produção de micotoxinas indutoras de câncer, como a fumonisina (MISSMER *et al.*, 2006). Apesar disso, é considerado não patogênico para humanos saudáveis, porém podem causar infecções oportunistas levando a fusariose invasiva (MUHAMMED *et al.*, 2013). Na literatura há indícios que *F. verticillioides* secreta um conjunto de enzimas, incluindo celulases, hemicelulases (RAVALASON *et al.*, 2012). É apontado como uma espécie potencial na biorremediação por ser capaz de degradar glifosato e lindano, utilizando essas moléculas como fontes de carbono e energia (GUILLÉN-JIMÉNEZ *et al.*, 2012; GUO *et al.*, 2022). Isso poderia explicar a tolerância que a espécie apresentou ao ser expostas as concentrações dos três pesticidas, sendo um indício que pode estar usando as moléculas de fluopiram, flumioxazina e S-metolaclopro como fonte de carbono para seu crescimento.

Já a espécie *Trametes versicolor* é um fungo de podridão branca mais investigado, onde a aplicação industrial deste fungo e seus metabólitos está longe de atingir o potencial máximo (TIŠMA *et al.*, 2021). Produz diferentes enzimas lignolíticas extracelulares, como a lacase, e de outras classes também. Algumas já são produzidas comercialmente pela *Sigma-Aldrich*, *Creative Enzymes*, *Jena Bioscience* e *United States Biological*. A lacase bruta tem diversas aplicações ambientais, como descoloração de tinta, descoloração de águas residuais com corantes ácidos, degradação do bisfenol A. Além disso, *T. versicolor* apresenta outras aplicações como: remoção de fenóis de águas residuais farmacêuticas, remoção do antibiótico, remoção de diuron de ambientes aquosos, tratamento de águas residuais urbana. Também tem em grande potencial como fonte renovável para produção de bioetanol e biogás (TIŠMA *et al.*, 2021). Além disso, polissacarídeos de *T. versicolor* demonstraram induzir efeito inibitório direto do crescimento celular e apoptose em células cancerígenas (HABTEMARIAM, 2020). Estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que os polissacarídeos extraídos do *T. versicolor* têm atividade imunológica e oncológica significativa em pacientes com câncer de pulmão, cânceres gastrointestinais, e câncer de mama (STANDISH *et al.*, 2008). Além disso, tem demonstrado capacidade em degradar uma variedade de pesticidas por meio de processos enzimáticos do citocromo P450, laccases, e outras enzimas, para utilizar as moléculas como fonte de carbono *T. versicolor* (FRAGOEIRO; MAGAN, 2005; HU *et al.*, 2020, 2022).

6.5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dois fungos que apresentaram o melhor potencial em tolerar os pesticidas são dois opostos. Um que apresenta uma série de benefícios (*Trametes versicolor*) enquanto outro, apesar de alguns benéficos, apresenta malefícios (*Fusarium verticillioides*). Entretanto ambas toleraram bem a exposição aos três pesticidas, mostrando que conseguem sobreviver. Dessa maneira, as duas linhagens podem ser utilizadas na próxima etapa, que é o ensaio de biodegradação. A bactéria também terá seu potencial biodegradar os pesticidas após ser identificada.

REFERÊNCIAS

- FRAGOEIRO, S.; MAGAN, N. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. **Environmental Microbiology**, vol. 7, no. 3, p. 348–355, 10 Mar. 2005. DOI 10.1111/j.1462-2920.2005.00699.x.
- GUILLÉN-JIMÉNEZ, F. de Ma.; CRISTIANI-URBINA, E.; CANCINO-DÍAZ, J. C.; FLORES-MORENO, J. L.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E. Lindane biodegradation by the *Fusarium verticillioides* AT-100 strain, isolated from *Agave tequilana* leaves: Kinetic study and identification of metabolites. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 74, p. 36–47, Oct. 2012. DOI 10.1016/j.ibiod.2012.04.020.
- GUO, J.; SONG, X.; LI, R.; ZHANG, Q.; ZHENG, S.; LI, Q.; TAO, B. Isolation of a degrading strain of *Fusarium verticillioides* and bioremediation of glyphosate residue. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 182, p. 105031, Mar. 2022. DOI 10.1016/j.pestbp.2021.105031.
- HABTEMARIAM, S. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) Polysaccharides in Cancer Therapy: Targets and Efficacy. **Biomedicines**, vol. 8, no. 5, p. 135, 25 May 2020. DOI 10.3390/biomedicines8050135.
- HU, K.; BARBIERI, M. V.; LÓPEZ-GARCÍA, E.; POSTIGO, C.; LÓPEZ DE ALDA, M.; CAMINAL, G.; SARRÀ, M. Fungal degradation of selected medium to highly polar pesticides by *Trametes versicolor*: kinetics, biodegradation pathways, and ecotoxicity of treated waters. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, vol. 414, no. 1, p. 439–449, 15 Jan. 2022. DOI 10.1007/s00216-021-03267-x.
- HU, K.; PERIS, A.; TORÁN, J.; ELJARRAT, E.; SARRÀ, M.; BLÁNQUEZ, P.; CAMINAL, G. Exploring the degradation capability of *Trametes versicolor* on selected hydrophobic pesticides through setting sights simultaneously on culture broth and biological matrix. **Chemosphere**, vol. 250, p. 126293, Jul. 2020. DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.126293.
- KUMAR, M.; YADAV, A. N.; SAXENA, R.; PAUL, D.; TOMAR, R. S. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 31, p. 101883, Jan. 2021. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101883.
- MISSMER, S. A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRILL, A. H.; ROTHMAN, K. J.; HENDRICKS, K. A. Exposure to Fumonisin and the Occurrence of Neural Tube Defects

along the Texas–Mexico Border. **Environmental Health Perspectives**, vol. 114, no. 2, p. 237–241, Feb. 2006. DOI 10.1289/ehp.8221.

MUHAMMED, M.; ANAGNOSTOU, T.; DESALERMOS, A.; KOURKOUMPETIS, T. K.; CARNEIRO, H. A.; GLAVIS-BLOOM, J.; COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. *Fusarium* Infection. **Medicine**, vol. 92, no. 6, p. 305–316, Nov. 2013. DOI 10.1097/MD.0000000000000008.

DEEPA, N.; ACHAR, P. N.; SREENIVASA, M. Y. Current Perspectives of Biocontrol Agents for Management of *Fusarium verticillioides* and Its Fumonisin in Cereals—A Review. **Journal of Fungi**, vol. 7, no. 9, p. 776, 18 Sep. 2021. DOI 10.3390/jof7090776.

PATHAK, V. M.; VERMA, V. K.; RAWAT, B. S.; KAUR, B.; BABU, N.; SHARMA, A.; DEWALI, S.; YADAV, M.; KUMARI, R.; SINGH, S.; MOHAPATRA, A.; PANDEY, V.; RANA, N.; CUNILL, J. M. Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 17 Aug. 2022. DOI 10.3389/fmicb.2022.962619.

RAJAK, P.; ROY, S.; GANGULY, A.; MANDI, M.; DUTTA, A.; DAS, K.; NANDA, S.; GHANTY, S.; BISWAS, G. Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? **Journal of Hazardous Materials Advances**, vol. 10, no. February, p. 100264, May 2023. DOI 10.1016/j.hazadv.2023.100264.

RAVALASON, H.; GRISEL, S.; CHEVRET, D.; FAVEL, A.; BERRIN, J.-G.; SIGOILLOT, J.-C.; HERPOËL-GIMBERT, I. *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. **Bioresource Technology**, vol. 114, p. 589–596, Jun. 2012. DOI 10.1016/j.biortech.2012.03.009.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden Package, 1998. *Em*: MISENER, S.; KRAWETZ, S. A. (eds.). **Bioinformatics Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 1998. p. 115–130. DOI 10.1385/1-59259-192-2:115.

STANDISH, L. J.; WENNER, C. A.; SWEET, E. S.; BRIDGE, C.; NELSON, A.; MARTZEN, M.; NOVACK, J.; TORKELSON, C. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. **Journal of the Society for Integrative Oncology**, vol. 6, no. 3, p. 122–8, 2008. DOI 10.2310/7200.2008.0016.

TIŠMA, M.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P.; ŠELO, G.; TOLJ, I.; ŠPERANDA, M.; BUCIĆ-KOJIĆ, A.; PLANINIĆ, M. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, vol. 330, p. 124997, Jun. 2021. DOI 10.1016/j.biortech.2021.124997.

VAKSMAA, A.; GUERRERO-CRUZ, S.; GHOSH, P.; ZEGHAL, E.; HERNANDO-MORALES, V.; NIEMANN, H. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. **Frontiers in Marine Science**, vol. 10, 6 Mar. 2023. DOI 10.3389/fmars.2023.1070905.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.; OTHERS. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: San Diego., 1990. vol. 18, p. 315–322.

XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and bioconversion of endrin by white rot fungi, *Phlebia acanthocystis* and *Phlebia brevispora*. **Mycoscience**, vol. 60, no. 4, p. 255–261, Jul. 2019. DOI 10.1016/j.myc.2019.04.004.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo fica evidente os efeitos que pesticidas à base de fluopiram e flumioxazina podem acarretar. O pesticida à base de fluopiram apresenta potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e pode afetar parâmetros de qualidade do solo em curtos períodos, pois o tempo pode influenciar na resposta. Já a flumioxazina também apresentou potencial em afetar a qualidade do solo, também em um curto período, pois o tempo também foi determinante na resposta. De forma geral, esses resultados demonstram que esses pesticidas podem sim afetar organismos não-alvo, incluindo humanos, além de poderem contribuir para a degradação e empobrecimento do solo, considerando sucessivas aplicações. Além disso, o ensaio *A. cepa* demonstrou, novamente, ser um bioensaio bastante poderoso em identificar substâncias com potencial genotóxico o que reforça seu uso em testes para avaliação de genotoxicidade, talvez até substituindo ou reduzindo o uso de animais. Por fim, o sucesso dos fungos *Trametes versicolor* e *Fusarium verticillioides* em tolerar os pesticidas avaliados abre caminhos para avaliação de estratégias de mitigação dos impactos ambientais causados por essas substâncias, como a persistência no ambiente. A biodegradação seria uma forma de minimizar os danos provocados em organismos não-alvo além de contribuir para a sustentabilidade agrícola, além da segurança hídrica e alimentar.

APÊNDICE A. TABELAS ARTIGO 1: O que o teste *Allium cepa* pode dizer sobre a segurança de pesticidas? Uma revisão

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Ciclohexi- mida	-	Não	Lab	NI	30, 100 e 150 mg L ⁻¹	30h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, APFM, IAN e IAC	Não	-	-	(BAŠIĆ- ZANINOVIĆ; PAPEŠ; FRANEKIĆ, 1991)
PA	-	Glifosato iso- propilamina	-	Não	Lab	NI	720, 1440 e 2880 µg L ⁻¹	24, 48h e 5 dias	A	Rz	IM, AC e CR	RIM e IAC	Não	-	-	(RANK <i>et al.</i> , 1993)
PA	-	Lindano	-	Não	Lab	NI	0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,0, 2,4, 2,8, 3,2, 3,6, 4,0 mg L ⁻¹	24h	A	Rz	TDR e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(KUMAR; KHAN; SINHA, 1995)
							4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 mg L ⁻¹									
		Malatião					1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg L ⁻¹									
		Metil para- tion					40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 52,5, 65 mg L ⁻¹									
PA	-	Hidrazida maleica	-	Não	Lab	NI	0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0 mg L ⁻¹	48h	A	Rz	IM, AC e AN	IAC	Não	-	-	(RANK; NIELSEN, 1997)
							40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 52,5, 65 mg L ⁻¹									

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Diuron	-	Não	Lab	CE ₅₀	40, 80, 160 ppm	6, 24 e 48h	A	Rz	IM, AC, AN, BN e AMR	RIM, IAC, IAN, IIUTL, AM, CAH, AM e CEP	Não	-	-	(CHAUHAN <i>et al.</i> , 1998)
PA	-	Carbetamida	-	Não	Lab	NI	0,4, 0,6, 0,8 mM	1h	A	Rz	PT e M	IAC, ICEOM e AM	Sim	1, 5 e 15 min	Não	(GIMÉNEZ- ABIÁN <i>et al.</i> , 1998)
PA	-	Atrazina	-	Não	Lab	RF	25%, 50%, 75%, 100%	4, 8, 12 e 24h	A	Rz	IM, AC, AN, QDNA, QRNA e EM	RIM, APFM, RDNA- RNA, IAC e IAN	Não	-	-	(EL-GHAMERY; EL-NAHAS; MANSOUR, 2000)
PA	-	Captan Zinebe	-	Não	Lab	DL ₅₀	500, 750, 1000 e 2000 ppm	1h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Sim	4, 12, 24, 48h	Não	(RAO; SRINIVAS; PRASADA RAO, 2000)
PA	-	Pentacloro- fenol	-	Não	Lab	NI	1, 5, 10 µM	24h	A	Rz	IM e AN	RIM e IAN	Não	-	-	(REPETTO <i>et al.</i> , 2001)
PA	-	Hidrazida maleica	-	Não	Lab	CE ₅₀	0,5, 1,0, 5,0, 10,0 mg L ⁻¹	48h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(RANK <i>et al.</i> , 2002)
PA	-	Metolacoloro	-	Não	Lab	L	4,5, 22,5 e 45,0 mg L ⁻¹	30, 90, 180, 360 min e 72h	A	Rz	AN	ANN e RNU	Não	-	-	(ARKHIPCHUK; GARANKO, 2002)
PA	-	Pentacloro- fenol	-	Não	Lab	NI	0,5, 1, 2 e 3 ppm	96h e 14 dias	A	Rz	AMR, CR, IM, AC e AN	AM, CDR, RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(ATEEQ <i>et al.</i> , 2002)
		Butaclor					5, 10, 15 e 20 ppm									
							25, 50, 75 e 100 ppm									
		2,4-d					5, 10, 15 e 20 ppm									
							1, 2, 3 e 4 ppm									

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Atrazina	-	Não	Lab	NMCs	0,1, 0,5, 1,0 e 5,0 µg L ⁻¹	48h e 5 dias	A	Rz	AMR, CR, IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(BOLLE <i>et al.</i> , 2004)
PA	-	Imazapir	-	Não	Lab	CE ₅₀	500, 1000, 2000, 6000 µL L ⁻¹	48h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004)
PA	-	Hidrazida maleica	-	Não	Lab	NI	10-6, 10-5, 10-4, 10-3M	4, 8, 12, 24 e 48h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(MARCANO <i>et al.</i> , 2004)
PA	-	Dinocap	-	Não	Lab	CE ₅₀	6,25, 12,5, 25, 50, 100 mg L ⁻¹	12, 24 e 48h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(ÇELIK <i>et al.</i> , 2005)
PA	-	2,4-D, He- xacro- benzeno, Malathion, Carbaril, DDT e En- dosulfan	-	Não	Lab	NI	0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 ppb	48h	A	Rz	EB	AEROD	Não	-	-	(FATIMA; AHMAD, 2006)
PA	-	Quizalofope- p-etil	-	Não	Lab	CE ₅₀	0,75, 1,5, 3 ppm	24, 48, 72 e 96h	A	Rz	CR, IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(MUSTAFA; SUNA ARIKAN, 2008)
PA	-	Glifosato isopropila- mina	-	Não	Lab	NI	0,5, 1, 2 e 5%	24 e 48h	A	Rz	IM e EA	RIM e AREA	Não	-	-	(ACAR <i>et al.</i> , 2010)
PA	-	Carbofurano	-	Não	Lab	CE ₅₀	20, 40, 80 ppm	24h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Sim	24h	RP	(SAXENA; GUPTA; MURTHY, 2010)
PA	-	Metolcarbe	-	Não	Lab	CE ₅₀	100, 200, 400 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	AIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(LIMAN <i>et al.</i> , 2010)
PA	-	Ethion	-	Não	Lab	NI	25, 50, 75 e 100%	3, 6, 12 e 24h	A	Rz	IM, AC e EM	RIM, IAC e APFM	Não	-	-	(LAMSALE <i>et al.</i> , 2010)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Oximatrina	-	Não	Lab	NI	1, 5 e 10 g L ⁻¹	72h	A	Rz	IM, AC, CR e NR	RIM, RNR e RCR	Não	-	-	(AKDENIZ; ÖZMEN, 2011)
PA	-	Fenaminosulf	-	Não	Lab	CE ₅₀	12,5, 25, 50 ppm	24 e 96h	A	Rz	IM, EM e EC	AIM, APFM e CDDNA	Não	-	-	(LIMAN <i>et al.</i> , 2011)
PA	-	Clorfenvin- fos e Fenbu- conazol	-	Não	Lab	CE ₅₀	10, 40, 60, 80 e 100 ppm	24 e 48h	A	Rz	IM, EM, AC, AN, QDNA e EC	RIM, APFM, IAC, IAN, R2CDNA e CDDNA	Não	-	-	(TÜRKOĞLU, 2012)
PA	-	Flusilazol	-	Não	Lab	CE ₅₀	10, 20, 30 e 45 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, AC, CN e EG	RIM, IAC, ACN, CDDNA e CIG	Não	-	-	(OZAKCA; SILAH, 2013)
PA	-	Sulcotriona	-	Não	Lab	NI	5 x 10 ⁻⁵ , 3 x 10 ⁻⁵ , 1 x 10 ⁻⁵ , 5 x 10 ⁻⁶ , 3 x 10 ⁻⁶ , 5 x 10 ⁻⁷ , 5 x 10 ⁻⁸ e 5 x 10 ⁻⁹ M	48h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(GOUJON <i>et al.</i> , 2014)
PA	-	Atrazina	-	Sim	Lab	NI	0,7, 2,1, 6,3, 18 e 54 µg mL ⁻¹	-	PF	Ra	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2014)
PA	-	Dicloreto de paraquat	-	Sim	Lab	CUC	0,38 mg mL ⁻¹	24h	PF	Ra	AC	CDDNA	Não	-	-	(GRILLO <i>et al.</i> , 2014)
PA	-	Difenocona- zol Tebuconazol	-	Não	Lab	CUC	7,81, 15,63, 31,25, 62,50 e 125,00 µg mL ⁻¹ 12,50, 25,00, 50,00, 100,00 e 200,00 µg mL ⁻¹	48 e 96h	PF	Ra	G, VG, CR, IM, AC, AN e MM	RIM, RTG, RCR, IAC, IAN e CDDNA	Não	-	-	(BERNARDES <i>et al.</i> , 2015)
PA	-	Dodine	-	Não	Lab	CE ₅₀	0,04, 0,08, 0,16 mL L ⁻¹	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(ÇÖRDÜK <i>et al.</i> , 2015)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Dioxacarbe	-	Não	Lab	CE ₅₀	6, 25, 12,5, 25, 50 e 100 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(EREN <i>et al.</i> , 2015)
PA	-	Anilofos	-	Não	Lab	CE ₅₀	25, 50 e 100 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, EM, AC e AN	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(ÖZKARA <i>et al.</i> , 2015a)
PA	-	Piracarbólida	-	Não	Lab	CE ₅₀	25, 50 e 100 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(ÖZKARA <i>et al.</i> , 2015b)
PA	-	Imazethapyr	-	Não	Lab	CE ₅₀	10, 20, 40 ppm	24, 48, 72 e 96h	A	Rz	IM, EM, EC e AC	RIM, APFM, IAC e CDDNA	Não	-	-	(LIMAN; CİĞERCI; ÖZTÜRK, 2015)
PA	-	Benfuracarbe	-	Não	Lab	CE ₅₀	37,5, 75 e 150 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(EREN <i>et al.</i> , 2016)
PA	-	Deltametrina e Tralo- metrina	-	Sim	Lab	IL	0,1, 0,5, 1, 5 e 10 mg L ⁻¹	24h	A	Rz	IM, EM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(BALAJI <i>et al.</i> , 2017)
PA	-	Mesotriona Atrazina	-	Não	Lab	CER	1,8, 7, 30, 115 e 460 µg L ⁻¹ 1,5, 6,25, 25, 100 e 400 µg L ⁻¹	5 dias	PF	Ra	IM, AC e AN	SE	Não	-	-	(FELISBINO <i>et al.</i> , 2018)
PA	-	Pendimeta- lina	-	Não	Lab	NI	0,033, 0,044, 0,055 e 0,066 g kg ⁻¹	1, 7, 15, 30 e 45 dias	S	Rz	IM, AC, AN, NR e CR	RIM, RNR, RCR, IAC e IAN	Não	-	-	(VERMA; SRIVASTAVA, 2018b)
PA	-	Malatião	-	Não	Lab	CE ₅₀	0,05, 0,10, 0,50, 1,00, 1,50%	12 e 24h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(SHEIKH; PATOWARY; LASKAR, 2020)
PA	-	Pinoxadena	-	Não	Lab	CE ₅₀	1,25, 2,5 e 5 mg L ⁻¹	24, 48, 72 e 96h	A	Rz	IM, AC, AN, EM e EC	RIM, APFM, IAC, IAN e CDDNA	Não	-	-	(AYDIN; LIMAN, 2020)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
PA	-	Imazalil	-	Não	Lab	CE ₅₁	0,5, 1 e 2 µg mL ⁻¹	24, 48, 72 e 96h	A	Rz	IM, AC, AN, EM e EC	RIM, APFM, IAC, IAN e CDDNA	Não	-	-	(ÇILDIR; LIMAN, 2020)
PA	-	Clopiralida	-	Não	Lab	CE ₅₀	25, 50 e 100 µg L ⁻¹	24 e 96h	A	Rz	IM, AC, EC e EM	RCR, RIM, APFM e IAC	Não	-	-	(AMAC; LIMAN, 2021)
PA	-	Oxicloreto de cobre	-	Não	Lab	CE ₅₀	0,25, 0,5, 1, 2, 3 e 4 mg L ⁻¹ 0,25, 0,5 e 1 mg L ⁻¹	24, 48, 72 e 96h	A	Rz	CR, IM, AC, EC e DM	RCR, RIM, IAC, CDDNA e APFM	Não	-	-	(LIMAN <i>et al.</i> , 2021)
PA	-	Piraclostro- bina	-	Sim	Lab	NI	50, 100 e 200 mg L ⁻¹	24h	A	Ra	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(GAO <i>et al.</i> , 2021)
PA	-	Dibrometo de diquat	-	Não	Lab	CE ₅₀	30, 60 e 120 mg L ⁻¹	72h e 10 dias	A	Rz	CR, PF, NR, TL, AN, AC, EC, MDA, EA, C, CT e IM	RNR, ATL, RCR, RPF, IAC, IAN, CDDNA, CPL, AREA, RCab, RCT e RIM	Não	-	-	(ACAR, 2021)
PA	-	Malatão	-	Não	Lab	CUC	0,5 e 1,0 mg ml ⁻¹	48h	A	Ra	G, AC, AN e IM	IAC, IAN e RIM	Não	-	-	(GHISI <i>et al.</i> , 2021)
FC	- Trimilttox	Metil para- tion Mancozebe	Não	Não	Lab	NI	0,1%, 0,25%, 0,75%, 1,0%, 2,0%	5h	PF	Ra	IM, AC e AN	IAC e IAN	Sim	24h	RP	(AHMAD; YASMIN, 1992)
FC	Roundup	Glifosato isopropila- mina	Não	Não	Lab	NI	720, 1440 e 2880 µg L ⁻¹	24, 48h e 5 dias	A	Rz	IM, AC e CR	RIM e IAC	Não	-	-	(RANK <i>et al.</i> , 1993)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Gramoxone	Paraquat	Não	Não	Lab	MAE	3,7, 7,5 e 15 mL L ⁻¹	6 e 24h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	6h	Não	(EL-ABIDIN SALAM <i>et al.</i> , 1993)
FC	Ronstar	Oxadiazon	Não	Não	Lab	NI	1000, 2000, 3000, 4000 ppm	3, 6, 9 e 12h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC, IAN e RFCDN	Não	-	-	(BUTT; VAHIDY, 1994)
FC	Stomp 330E	Pendimeta- lina	Não	Não	Campo	RF	1,32 e 2,0 Kg ia ha ⁻¹	0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 63, 77 e 91 dias	P and S	PI, F and B	RP	RR	Não	-	-	(TSIROPOULOS; MILIADIS, 1998)
FC	Cyperkill 25% CE	Cipermetrina	Não	Não	Lab	CE ₅₀	5, 10 e 20 mL L ⁻¹	6 e 24h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	24h	RP	(CHAUHAN; SAXENA; GUPTA, 1999)
	Sumicidina 20% CE	Fenvalerato					7, 14 e 28 mg L ⁻¹									
FC	Esteran 48	2,4-D	Não	Não	Lab	NI	50, 100, 500, 1000, 5000, 10000, 50000 ppm	3, 6, 12 e 24h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(GÖMÜRGEN, 2000)
FC	Racer	Fluroclori- dona	Não	Não	Lab	CE ₅₀	20, 40 e 80 ppm	12, 24 e 48h	A	Rz	IM, EM, AC e AN	RIM, RCR, APFM, IAN e IAC	Não	-	-	(YÜZBAŞIOĞLU <i>et al.</i> , 2003)
FC	Afugan	Pirazofos	Não	Não	Lab	CE ₅₀	10, 20, 40, 60 ppm	12, 24 e 48h	A	Rz	IM, EM, AC e AN	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(YÜZBAŞIOĞLU , 2003)
FC	Arsenal 250	Imazapir	Sim	Não	Lab	CE ₅₀	0,25, 0,50, 1,0, 100 µL L ⁻¹	48h	A	Rz	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, 2004)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Devicyper 10% CE	Cipermetrina	Não	Não	Lab	DL ₅₀	5, 10, 25, 50 ppm	1h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, AIM, IAC e IAN	Sim	4, 12, 24, 48h	Não	(RAO; NARASIMHAM; SUBBARAO, 2005)
	Farsa 10% CE	Alfa- cipermetrina					1, 5, 10, 15 ppm									
	Triumphcard 20% CE	Fenvalerato					5, 10, 25, 50 ppm									
FC	Avenoxan	2,4-D	Não	Não	Lab	NI	0,1%, 0,2% e 0,4%	3, 6, 12 e 24h	A	Rz and A	AN, AC e EP	IAN, IAC e CEP	Não	-	-	(KAYMAK; MURANLI, 2005)
FC	Benlato WP 50%	Benomil	Não	Não	Lab	NI	1, 2, 5, 10 e 20 mM	7 dias	A	Rz	CR, IM, AC e AN	RIM, RCR, IAC e IAN	Não	-	-	(DANE; DALGIÇ, 2005)
FC	MON-37500	Sulfosulfuron	Não	Não	Lab	NI	0,001, 0,01, 0,03 e 0,05 mg L ⁻¹	7 dias	PF	Ra	CR, EP e PF	RCR, RPF, RPS e AM	Não	-	-	(SANTIN- MONTANYÁ <i>et al.</i> , 2006)
FC	Basalina 45% CE	Flucloralina	Não	Não	Lab	CE ₅₀	4,5, 9 e 18 ppm	24, 48h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, AM, IAC e IAN	Sim	24h	Não	(MISHRA; SRIVASTAVA; GUPTA, 2006)
FC	Avenoxan	2,4-D	Não	Não	Lab	NI	0,1%, 0,2%, e 0,4%	3, 6, 12h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(TARTAR; KAYMAK; MURANLI, 2006)
FC	Raxil FS 060	Tebuconazol	Não	Não	Lab	NI	0,8%, 6,6%, 26,4%	2 dias	A	Rz	GPC	CAH e PDN	Não	-	-	(AKTAÇ <i>et al.</i> , 2007)
FC	Trifluralina	Trifluralina	Não	Não	Lab	RF	0,42, 0,84, 1,67 e 3,34 ppm	24h	PF	Ra	IM, AC e AN	RIM, IAC, IAN e IMC	Sim	48h	RP	(FERNANDES; MAZZEO; MARIN- MORALES, 2007)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	-	Clorpirifós	Não	Não	Lab	CL ₅₀	0,017%, 0,034% e 0,068%	20h	PF	Ra	IM, AC e EM	RIM e IAC	Não	-	-	(ASITA; MAKHALEMELE , 2008)
	Alpha-thrin 100 SC	Alfa- cipermetrina					0,183%, 0,365% e 0,730%									
	Virikop	Oxicloreto de cobre					1,250%, 2,500% e 5,000%									
	Springbok	Glifosato					0,036%, 0,073% e 0,146%									
FC	Raxil	Tebuconazol	Não	Não	Lab	CE ₅₀	1800, 2400, 4200 e 6000 ppm	3, 6, 12 e 24h	A	Rz	AN, AC e EP	RIM, IAC e CEP	Não	-	-	(FISUN; RASGELE, 2009)
FC	Iloxan	Diclofope- metil	Não	Não	Lab	CE ₅₀	37,50, 75,00, 150,00 mg L ⁻¹	12, 24 e 48h	A	Rz	IM, EM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(YÜZBAŞIOĞLU; ÜNAL; SANCAK, 2009)
FC	Gesaprim 50% CE	Atrazina	Não	Não	Lab	CE ₅₀	15, 30, 60 mg L ⁻¹	4 e 24h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	24h	RP	(SRIVASTAVA; MISHRA, 2009)
FC	-	Trifluralina	Não	Não	Lab	RF	0,42, 0,84, 1,67 e 3,34 mg L ⁻¹	24h	PF	Ra	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	48h	RP	(FERNANDES; MAZZEO; MARIN- MORALES, 2009)
FC	-	Oxyfluorfen	Não	Não	Campo	NI	250 e 500 g ia ha ⁻¹	55 e 118 dias	P	B and CV	RP	PR	Não	-	-	(SONDHIA, 2010)
FC	-	Azadiractina	Não	Não	Lab	RF	0,00005%, 0,00010%, 0,00015%, 0,00020%	24h	A	Rz	IM, EM, AN e AC	RIM, APFM, IAC e IAN	Sim	-	NI	(KWANKUA <i>et al.</i> , 2010)
FC	Stomp 330 CE	Pendimeta- lina	Não	Não	Lab	RF	0,033, 0,066, 0,132 e 0,264 g L ⁻¹	24 e 48h	A	Rz	CR, AMR, IM, AC, AN e PT	RCR, RIM, IAN, IAC, AM e AM	Sim	48h	RP	(TYLICKI <i>et al.</i> , 2010)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Hormoban	Dicamba MCPA	Não	Não	Lab	CE ₅₀	0,0115, 0,023 e 0,046%	24h	PF	Ra	IM, EM e AC	RIM e IAN	Não	-	-	(ASITA; MATEBESI, 2010)
	Storm killer	Flocumafena					0,025, 0,05, 0,1%									
	Villa	Alfa- cipermetrina					1,67, 3,38 e 6,67%									
	Fungi-nil	Clorotalonil					1,02, 2,12 e 4,24%									
	Bexadust	Lindano					15, 30, 60%									
	Aphicide	Dimetoato					0,046, 0,092 e 0,18%									
	Karbadust	Carbaril					5,91, 11,03 e 22,06%									
	Basagran	Bentazona					0,035, 0,07 e 0,14%									
FC	Propineb 70 WP	Propinebe	Não	Não	Lab	NI	1.225 e 2.250 g ia h ⁻¹	10, 11, 13, 15, 17, 20 e 25 dias	P	B, CV and F	RP	PR	Não	-	-	(PARIHAR; SHARMA, 2011)
FC	Roundup UltraMax	Glifosato	Não	Não	Lab	L	100, 250, 500 mg L ⁻¹	72h	PF	Ra	G, CR, PF, MDA, AC, AN, IM e AMR	RIM, RTG, RCR, RPF, IAN, IAC, CPL e AM	Não	-	-	(ÇAVUŞOĞLU <i>et al.</i> , 2011)
FC	Azzuro	Zinebe	Não	Não	Lab	L	1 e 10 µg L ⁻¹	30h	A	Rz	IM , AC e M	RIM, IAC, AM, PBPPA, PFA e PFMA	Não	-	-	(ANDRIOLI <i>et al.</i> , 2012)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Eforia SC	Thiame- thoxam	Não	Não	Lab	NI	100, 250, 500 mg Kg ⁻¹	72h	PF	Ra	G, CR, PF, MDA, AC, AN, IM e AMR	RIM, RTG, RCR, RPF, CPL, IAN, IAC e AM	Não	-	-	(ÇAVUŞOĞLU <i>et al.</i> , 2012)
FC	Emar	Benzoato de emamectina	Não	Não	Lab	NI	0,1 e 0,2 mL L ⁻¹	8, 12, 16 e 24h	A	Rz	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(AL-AHMADI, 2013)
	Confidor	Imidacloprida					0,15 mL L ⁻¹									
FC	Targa Super	Quizalofop- p-etil	Não	Não	Campo	RF	50 e 100 g ia ha ⁻¹	0, 1, 3, 5, 7, 10 e 90 dias	A	CV and B	RP	RR	Não	-	-	(SAHOO <i>et al.</i> , 2013)
FC	Malathion 500 EC50%	Malatião	Não	Não	Lab	CUC	1,5, 0,75, 0,37 e 0,18 mg mL ⁻¹	24 e 48h	PF	Ra	IM, AC e AN	IAC e IAN	Sim	48h	Não	(BIANCHI; MANTOVANI; MARIN- MORALES, 2015)
FC	-	Bentazona	Não	Não	Ambos	RF e CE ₅₀	550 mL de 2,5%	7 e 14 dias	P and A	Rz	CR, NR, MDA, PT, AC e AN	RNR, RCR, CPL, PR, IAC, IAN e CDDNA	Não	-	-	(ODJEGBA; ADENIRAN, 2015)
FC	-	Prometryn	Não	Não	Lab	RF	2, 3, 4 e 6 g L ⁻¹	12, 24 e 36h	A	Rz	IM, EM, AC, AN, QDNA e EC	RIM, APFM, IAC, IAN, R2CDNA e CDDNA	Não	-	-	(KARAISSMAILO GLU, 2015)
FC	Fernex DS	Diniconazol	Não	Não	Lab	NI	25, 50, 100 ppm	72h	PF	Ra	G, CR, PF, MDA, AC, AN, IM e AMR	RTG, RCR, RPF, IAN, IAC e CAH	Não	-	-	(DEMIRTAŞ; ÇAVUŞOĞLU; YALÇIN, 2015)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	-	Paraquat	Não	Não	Lab	NI	10, 50 e 100 ppm	72h	PF	Ra	G, CR, PF, MDA, AC, AN, Mi e AMR	RTG, RCR, RPF, IAN, IAC e AM	Não	-	-	(ACAR <i>et al.</i> , 2015)
FC	-	Trifluralina	Não	Não	Lab	L	0,84 mg L ⁻¹	20h	PF	Ra	AC, AN e MM	IAC, IAN e ANN	Sim	48h	Não	(MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015)
FC	Verosil	Imazethapyr	Não	Não	Lab	NI	0,0001, 0,001, 0,01, 1, 10 e 100 mg ia L ⁻¹	96h	PF	Ra	IM, AC, AN e G	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(MAGDALENO <i>et al.</i> , 2015)
FC	-	Imidacloprida	Não	Não	Lab	RF	20, 40, 80 mg m-2	96h	PF	Ra	IM, AC, AN e G	IAC e IAN	Não	-	-	(RODRÍGUEZ <i>et al.</i> , 2015)
FC	Topik 80 CE	Clodinafopropargil	Não	Não	Lab	CE ₅₀	30, 60, 120; 150 e 240 ppm	48h	A	Rz	IM, EM e AC	RIM, APFM e IAC	Não	-	-	(BOUMAZA <i>et al.</i> , 2016)
FC	Clorimurom Nortox	Clorimuron-etil	Não	Não	Lab	RF	50%, 75%, 100% e 125%	72h	PF	Ra	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	48h	Não	(SILVEIRA <i>et al.</i> , 2016)
	Imazaquim Ultra Nortox	Imazaquin														
FC	-	Benodanil	Não	Não	Lab	CE ₅₀	12,5, 25 e 50 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(AKYIL <i>et al.</i> , 2016)
FC	Endosri ES	Endosulfan	Não	Não	Lab	CE ₅₀	30, 60 e 120 ppm	24h	A	Rz and A	IM, AC, AN, e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(KUCHY; WANI; KAMILI, 2016)
	Nuvan NU	Diclorvós					100, 200 e 400 ppm									
	Kvistin KS	Carbendazim					250, 500 e 1000 ppm	48h								

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Luna expe- rience 400 SC	Fluopiram Tebuconazol	-	Não	Campo	RF	75 + 75 e 150 + 150 g ia ha ⁻¹	1h, 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20 e 52 dias	P	CV and B	RP	PR	Não	-	-	(PATEL <i>et al.</i> , 2016)
FC	Boral	Sulfentrazo- na	Não	Não	Lab	CUC	0,036, 0,36 e 3,6 g L ⁻¹	24h	PF	Ra	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Sim	48h e 72h	RP e não	(BIANCHI; CASIMIRO FERNANDES; MARIN- MORALES, 2016)
	Evidence	Imidaclopri- da					0,006, 0,6 e 1,2 g L-2									
FC	-	Fipronil	Não	Não	Lab	RF	1, 2,5, 5 e 10 ppm	6, 12 e 24h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(KARAISSMAILO GLU, 2017)
FC	-	Picloram	Não	Não	Lab	RF	0,67, 1,34, 2,01, 2,68, 3,35 e 4,02 mg L ⁻¹	24 e 48h	MC	Rz	IM, AC e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(ÖZEL <i>et al.</i> , 2018)
FC	-	Diazinon	Não	Não	Lab	CE ₅₀	40, 80 e 160 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, AC, AN e VG	IAC, IAN, CDDNA, CIG e PMC	Não	-	-	(PANDIR, 2018)
FC	-	Carbendazim	Não	Não	Lab	NI	2,5, 5, 7,5 e 10 mg kg ⁻¹	1, 7, 15, 30 e 45 dias	S	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(VERMA; SRIVASTAVA, 2018a)
FC	Mancozeb 75% WP	Mancozebe	Não	Não	Lab	L	10, 30, 50, 70, 90, 110, 130 e 150 ppm	24h	PF	Ra	G, S, CR, DPA, V e T	RTG, RS, rRAP, RCR, RVPA, RT, AREA e RPPAR	Não	-	-	(FATMA <i>et al.</i> , 2018a)
	Clorpirifós 20% CE	Clorpirifós					5, 10, 15, 20, 25 e 30 ppm									
FC	Mancozeb 75% WP	Mancozebe	Não	Não	Lab	NI	10, 30, 50, 70, 90,110, 130 e 150 ppm	24 e 48h	A	Rz	NR, CR, IM e AC	RIM, RCR, RNR e IAC	Não	-	-	(FATMA <i>et al.</i> , 2018b)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoe- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	- -	Malatão Fenthion	Não	Não	Lab	NI	0,075, 0,75 e 7,5 M	2h	A	Rz	EC e A	CDDNA e PMC	Não	-	-	(CORTÉS- ESLAVA <i>et al.</i> , 2018)
FC	Galigan 240 CE	Oxyfluorfen	Não	Não	Lab	NI	0,5, 1,0 e 1,5%	3, 4 e 24h	A	Rz	IM, AC, AN e EM	RIM, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(BONCIU, 2018)
FC	-	Cipermetrina	Não	Não	Lab	NI	0,2, 0,4, 0,6 e 0,8 g L ⁻¹	12h	AI and S	Ra	IM, CR, C, Ca, EP e TU	RIM, RCR, RCab, RTU e RC	Não	-	-	(AVEEK <i>et al.</i> , 2019)
FC	Demond CE 25	Deltametrina	Não	Não	Lab	CE ₅₀	50, 100 e 200 ppm	24, 48 e 72h	A	Rz	IM e EM	RIM e APFM	Não	-	-	(ÖZKARA, 2019)
FC	-	Metiocarbe	Não	Não	Lab	NI	2,5, 5,0 e 7,5 mg L ⁻¹	72h	A	Rz	NR, CR, PF, AN, AC, IM, AMR, MDA e EA	RIM, RNR, RCR, RPF, IAN, IAC, AM, CPL e AREA	Não	-	-	(TÜTÜNCÜ <i>et al.</i> , 2019)
FC	- -	Quizalofope- p-etil Cicloxidim	Não	Não	Lab	RF	0,5%, 1% e 1,5%	24h	A	Rz	CR, IM, EM, AC e AN	RIM, RCR, APFM, IAC e IAN	Não	-	-	(ROSCULETE <i>et al.</i> , 2019)
FC	Sialex Rovral	Procimidona Iprodiona	Não	Não	Lab	RF	31,25, 52,50, 125, 250 e 500 µg mL ⁻¹ 46,88, 93,75, 187,5, 375 e 750 µg mL ⁻¹	48 e 96h	PG	Ra	G, CR, IM, AC, AN e MM	RIM, RTG, RVG, RCR, IAC, IAN e CDDNA	Não	-	-	(BERNARDES <i>et al.</i> , 2019)
FC	Sumilarv 0,5 G	Piriproxifeno Piridalila	Não	Não	Lab	OMS	0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 e 1000 ppm	24h	A	Ra	IM, AC e AN	RIM, IAC e IAN	Não	-	-	(ALVES <i>et al.</i> , 2019)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formula- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoen- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Glifotim	Glifosato isopropila- mina	Não	Não	Lab	L	250 mg L ⁻¹ e 500 mg L ⁻¹	4 dias	A	Rz	IM, GR, PF, EP, B, TU, CM, Su e TD	RCR, AB, RTA e CMDMT	Não	-	-	(DATCU <i>et al.</i> , 2020)
	DMA	2,4-D					2 mg L ⁻¹ e 4 mg L ⁻¹									
FC	Warrant 700 WG	Imidaclopi- da	Não	Não	Lab	RF	1,75, 17,5, 175 e 1750 µg mL ⁻¹	24, 48, 72 e 96h	PF	Ra	G, GR, EI, IM, AC e AN	RCR, RAB, RIM e ACC	Não	-	-	(FIORESI <i>et al.</i> , 2020)
	Rovral SC	Iprodiona					7,5, 75, 750 e 7500 µg mL ⁻¹									
FC	-	Malatião	Não	Não	Lab	NI	0,05, 0,13, 0,26, 0,39 e 0,52 g L ⁻¹	4, 8, 18h e 5 dias	SN	Rz	IM, TU, O, MDA, EA, EC, CR e DM	RCR, RIM, RTA, ARO, CPL, AREA e CDDNA	Não	-	-	(SRIVASTAVA; SINGH, 2020)
FC	-	Propanil	Não	Não	Lab	NI	2, 4, 6, 8, 10 e 12 mg L ⁻¹	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, AC, AN e CR	RIM, RCR, IAC e IAN	Não	-	-	(MERCADO; CALEÑO; SUÁREZ, 2020)
FC	-	Glifosato	Não	Não	Lab	L	5, 10, 15, 25 e 30 mg L ⁻¹	24, 48 e 72h	A	Rz	IM, AC, AN e CR	RIM, RCR, IAC e IAN	Não	-	-	(MERCADO; CALEÑO, 2020)
FC	DMA® 806 BR	2,4-D	Não	Não	Lab	RF	0, 2,35, 4,7, 9,4, 18,8 e 37,6 mg kg ⁻¹ de solo	7 e 14 dias	S	Ra and BR	G, PF, EP e CR	RTG	Não	-	-	(TRIQUES <i>et al.</i> , 2021)
	Regent® 800 WG	Fipronil					0, 0,52, 1,04, 2,08, 4,16 e 8,32 mg kg ⁻¹ de solo	7 dias						-	-	
FC	Seltima	Piraclostro- bina	Não	Sim	Lab	NI	50, 100 e 200 mg L ⁻¹	24h	A	Ra	IM e AC	RIM e IAC	Não	-	-	(GAO <i>et al.</i> , 2021)
FC	Linuron	Linuron	Não	Não	Lab	NI	0,1 mg mL ⁻¹	12 e 24h	A	Rz	IM, EM, AC e EI	RIM, APFM, IAC e ACC	Sim	12 e 24h	RP	(ERGIN; INCEER; ERGIN, 2020)

Continua ...

Tabela A.1 – Artigos analisados e dados extraídos.

Continuação

Pro- dutos ^a	Formu- la- ções comerciais	Princípio ativo	Avaliou os sur- factantes	Nanoe- capsula- do	Condi- ção ^b	Determi- nação da concentra- ção/ dose ^c	Concentração/ dose utilizada	Período de exposição	Tipo de exposi- ção ^d	Parte ex- posta ^e	Biomar- cadores ^f	Efeitos encontra- dos ^g	Recuperação			Referências ⁱ
													Fez?	Tempo	Houve recupe- ração? ^h	
FC	Torpedo CE	Abamectina	Não	Não	Lab	L	0,025, 0,050 e 0,100 mL L ⁻¹	72h	A	Rz	CR, AN, IM, AC, MDA, AMR, EA e PF	RTG, RPF, RCR, RIM, IAC, IAN, AREA e CAH	Não	-	-	(MACAR, 2021b)
FC	Elandor®	Imidaclopri- da	Não	Não	Lab	RF	200 ppm	24 e 72h	A	Rz	NR, CR, AC, AN, IM e EM	RCR, AIM, IAN, IAC e APFM	Não	-	-	(MERT; BETÜL, 2020)
	Goldplan®	Acetamiprida					400 ppm									
FC	Envedor SC 240 See More	Espirodiclo- feno	Não	Não	Lab	CUC	20 mg L ⁻¹	72h	A	Rz	CR, PF, IM, AC, AN, EC, MDA, EA, DM e AMR	RTG, RCR, RPF, RIM, IAC, IAN, CDDNA, CPL, AREA e CAH	Não	-	-	(ÇAVUŞOĞLU <i>et al.</i> , 2021)
FC	Domark 10 EC	Tetraconazol	Não	Não	Lab	CE ₅₀	1,00, 5,00 e 10,00 mg L ⁻¹	3 dias	A	Rz	G, CR, PF, IM, AC, AN, MDA, EA e AMR	RIM, IAC, IAN, AREA, CPL e CAH	Não	-	-	(MACAR, 2021a)
FC	Fernex DS	Diniconazol	Não	Não	Lab	L	100 mg L ⁻¹	72h	A	Rz	PF, G, IM, AC, AN, EA, MDA e AMR	RCR, RPF, RTG, RIM, IAC, IAN, CPL, AREA e CAH	Não	-	-	(MACAR <i>et al.</i> , 2021)

^aFormulação comercial (FC) e Princípio Ativo (PA);

^bLaboratório (Lab);

^cConcentração ecologicamente relevante (CER), Concentração efetiva (CE), Concentração letal (CL), Concentração usada no campo (CUC), Dose letal (DL), Índice letal (IL), Literatura (L), Ministério da Agricultura do Egito (MAE), Não informado (NI), Níveis máximos de contaminantes (NMCs), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Recomendação do fabricante (RF);

^dÁgua (A), Algodão (Al), Meio de cultura (MC), Papel filtro (PF), Papel de germinação (PG), Pulverização (P), Solo (S) e Solução nutritiva (SN);

^eAntera (A), Broto (Br), Bulbo (B), Cebola verde (CV), Folha (F), Planta inteira (PI), Radícula (Ra) e Raiz (Rz);

^fAberrações cromossômicas (AC), Alterações morfológicas da raiz (AMR), Anormalidade nuclear (AN), Apoptose (A), Biomassa (B), Biossíntese de nucleosídeos (BN), Carotenóides (Ca), Células necróticas (CN), Clorofila a e b (C), Clorofila total (CT), Conteúdo mineral (CM), Crescimento da raiz (CR), Densidade do tecido (TD), Desenvolvimento da parte aérea (DPA), Docking molecular (DM), Ensaio do cometa (EC), Enzima de biotransformação (EB), Enzimas antioxidantes (EA), Estabilidade genômica (EG), Estágios da interfase (EI), Estágios da mitose (EM), Esterilidade do pólen (EP), Germinação (G), Glicosaminoglicanos da parede celular (GPC), Índice mitótico (IM), Malondialdeído (MDA), Marcadores moleculares (MM), Microtúbulos (M), Número de raízes (NR), Osmoprotetores (O), Peso fresco (PF), Peso seco (PS), Proteína tubulina (PT), Quantificação de DNA (QDNA), Quantificação de RNA (QRNA), Resíduo de pesticida (RP), Sobrevivência (S), Suculência (Su), Taxa de divisão relativa (TDR), Taxa de lesões (TL), Teor de proteína (TP), Teor de umidade (TU), Tolerância (T), Velocidade de germinação (VG) e Vigor (V);

^gAfetou os microtúbulos (AM), Alteração da resposta das enzimas antioxidantes (AREA), Alterações da porcentagem de fases mitóticas (APFM), Alterações da resposta osmoprotetora (ARO), Alterações morfológicas (AM), Alterações no ciclo celular (ACC), Aumento da atividade EROD (AEROD), Aumento da biomassa (AB), Aumento da taxa de lesão (ATL), Aumento das células necróticas (ACN), Aumento do índice mitótico (AIM), Aumento do número de nucléolos (ANN), Causou alterações histológicas (CAH), Causou danos ao DNA (CDDNA), Causou deterioração da raiz (CDR), Causou efeitos em proplastídeos (CEP), Causou esterilidade do pólen (CEP), Causou instabilidade genômica (CIG), Causou menor deposição mineral nos tecidos (CMDMT), Causou peroxidação lipídica (CPL), Indução de aberrações cromossômicas (IAC), Indução de anormalidades nucleares (IAN), Indução de centros extra organizadores de microtúbulos (ICEOM), Indução de minicélulas (IMC), Inibição da incorporação de uridina timidina e leucina (IIUTL), Persistência do resíduo (PR), Provocou banda pré-profásica anormal (PBPPA), Provocou degradação do núcleo (PDN), Provocou fragmoplasto aberrante (PFA), Provocou fuso mitótico anormal (PFMA), Provocou morte celular (PMC), Redução da clorofila a e b (RCab), Redução da clorofila total (RCT), Redução da frequência de células em divisão normal (RFCDN), Redução da parte aérea (RPA), Redução da proporção entre parte aérea e raiz (RPPAR), Redução da sobrevivência (RS), Redução da taxa de germinação (RTG), Redução da tolerância (RT), Redução da velocidade de germinação (RVG), Redução das aberrações cromossômicas (RAB), Redução de DNA e RNA (RDNA-RNA), Redução de nucléolos únicos (RNU), Redução de Proteínas (RP), Redução do conteúdo de DNA 2C (R2CDNA), Redução do crescimento radicular (RCR), Redução do índice mitótico (RIM), Redução do número de raízes (RNR), Redução do peso fresco (RPF), Redução do peso seco (RPS), Redução do resíduo (RR), Redução do teor de água (RTA), Redução do teor de umidade (RTU), Redução do vigor da parte aérea (RVPA), Redução dos carotenóides (RC) e Sem efeito (SE);

^hNão informado (NI) e Recuperação parcial (PR).

ⁱReferências

- ACAR, A. In vivo toxicological assessment of diquat dibromide: cytotoxic, genotoxic, and biochemical approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 34, p. 47550–47561, 2021.
- ACAR, A.; ÇAVUŞOĞLU, K.; TÜRKMEN, Z.; ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E. The Investigation of Genotoxic, Physiological and Anatomical Effects of Paraquat Herbicide on *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 80, n. 3, p. 343–351, 2015.
- ACAR, O.; DEMIRBAS, S.; ILHAN, D.; OZDINC, N. The effects of glyphosate isopropylamine on mitotic activity, superoxide dismutase and peroxidase activities of *Allium cepa* L. root tip cells. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 19, n. 3, p. 522–525, 2010.
- AHMAD, S.; YASMIN, R. Effects of Methyl Parathion and Tri-miltox on the Mitosis of *Allium cepa*. **CYTOLOGIA**, v. 57, n. 1, p. 155–160, 1992.
- AKDENIZ, D.; ÖZMEN, A. Antimitotic effects of the biopesticide oxymatrine. **Caryologia**, v. 64, n. 1, p. 117–120, 2011.
- AKTAÇ, T.; YILMAZ, G.; DANE, F.; BAKAR, E. Demonstration of the effects of raxil (Tebuconazole) on the cell wall (Glycocalyx) of the root tip cells in onion (*Allium cepa* L.) using alcian blue. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 16, n. 7, p. 817–820, 2007.
- AKYIL, D.; ÖZKARA, A.; ERDOĞMUŞ, S. F.; EREN, Y.; KONUK, M.; SAĞLAM, E. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Benodanil by using Allium and Micronucleus assays. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 35–40, 2016.
- AL-AHMADI, M. S. Cytogenetic effects of two synthetic pesticides on mitotic chromosome on root tip cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 78, n. 1, p. 3–8, 2013.
- ALVES, P. e. S. S.; OLIVEIRA, M. das D. A. de; ALMEIDA, P. M. de; MARTINS, F. A.; CAVALCANTE, A. A. de C. M.; ANDRADE, T. de J. A. dos S.; FEITOSA, C. M.; RAI, M.; REIS, A. C. dos; JÚNIOR, J. S. da C.; MARCOS DE ALMEIDA, P.; MARTINS, F. A.; AMÉLIA DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, A.; DE JESUS AGUIAR DOS SANTOS ANDRADE, T.; FEITOSA, C. M.; RAI, M.; CAMPINHO DOS REIS, A.; SOARES DA COSTA JÚNIOR, J. Determination by chromatography and cytotoxotoxic and oxidative effects of pyriproxyfen and pyridalyl. **Chemosphere**, v. 224, p. 398–406, 2019.

- AMAÇ, E.; LIMAN, R. Cytotoxic and genotoxic effects of clopyralid herbicide on *Allium cepa* roots. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 35, p. 48450–48458, 2021.
- ANDRIOLI, N. B.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M. L.; MUDRY, M. D. Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1–2, p. 48–53, 2012.
- ARKHIPCHUK, V. v.; GARANKO, N. N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, n. 3, p. 187–194, 2002.
- ASITA, A. O.; MAKHALEMELE, R. Genotoxicity of Chlorpyrifos, Alpha-thrin, Efekto virikop and Springbok to onion root tip cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 23, p. 4244–4250, 2008.
- ASITA, A. O.; MATEBESI, L. P. Genotoxicity of hormoban and seven other pesticides to onion root tip meristematic cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 27, p. 4225–4232, 2010.
- ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 514, n. 1–2, p. 105–113, 2002.
- AVEEK, S.; JYOTI, P. S.; JAYDEB, J.; SOMASHREE, M. Effect of cypermethrin on growth, cell division and photosynthetic pigment content in onion, maize and grass pea. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 23, n. 8, p. 126–129, 2019.
- AYDIN, G.; LIMAN, R. Cyto-genotoxic effects of Pinoxaden on *Allium cepa* L. roots. **Journal of Applied Genetics**, v. 61, n. 3, p. 349–357, 2020.
- BALAJI, A. P. B.; SASTRY, T. P.; MANIGANDAN, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Environmental benignity of a pesticide in soft colloidal hydrodispersive nanometric form with improved toxic precision towards the target organisms than non-target organisms. **Science of The Total Environment**, v. 579, p. 190–201, 2017.
- BAŠIĆ-ZANINOVIĆ, T.; PAPEŠ, D.; FRANEKIĆ, J. Cycloheximide genotoxicity in in vitro and in vivo test systems. **Mutation Research Letters**, v. 263, n. 4, p. 203–210, 1991.
- BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; DA SILVA FERREIRA, M. F. Toxicity of Difenconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 7, p. 207, 2015.
- BERNARDES, P. M.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; ARAGÃO, F. B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M. F. da S. Toxicological effects of comercial formulations of fungicides based on procymidone and iprodione in seedlings and root tip cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 20, p. 21013–21021, 22 2019.
- BIANCHI, J.; CASIMIRO FERNANDES, T. 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.
- BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, n. February, p. 102–111, 2015.
- BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M. G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, n. 2, p. 137–141, 2004.
- BONCIU, E. Evaluation of cytotoxicity of the herbicide Galigan 240 EC to plants. **Scientific Papers. Series A. Agronomy**, v. 61, n. 1, p. 175–178, 2018.
- BOUMAZA, A.; LALAOUI, K.; KHALLEF, M.; SBAYOU, H.; TALBI, H.; HILALI, A. Assessment of cytotoxic and genotoxic effects of clodinafop-propargyl commercial formulation on *Allium cepa* L. **Journal of Materials and Environmental Science**, v. 7, n. 4, p. 1245–1251, 2016.
- BUTT, S. k; VAHIDY, A. A. Cytotoxic effects of herbicide ronstar on meristematic cells of *Allium cepa* L. **Pakistan Journal of Botany**, v. 26, n. 1, p. 69–74, 1994.
- ÇAVUŞOĞLU, D.; YALÇIN, E.; ÇAVUŞOĞLU, K.; ACAR, A.; YAPAR, K. Molecular docking and toxicity assessment of spirodiclofen: protective role of lycopene. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 40, p. 57372–57385, 2021.
- ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; ÇAVUŞOĞLU, K.; ÇİÇEK, F. Investigation of toxic effects of the glyphosate on *Allium cepa*. **Tarım Bilimleri Dergisi**, v. 17, n. 2, p. 131–142, 2011.

- ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E.; TÜRKMEN, Z.; YAPAR, K.; SAĞIR, S. Physiological, anatomical, biochemical, and cytogenetic effects of thiamethoxam treatment on *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 11, p. 635–643, 2012.
- ÇELİK, M.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; ARSLAN, O.; KASAP, R. Effects of Dinocap on the Mitosis of *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 70, n. 1, p. 13–22, 2005.
- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181–189, 1999.
- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; SUNDARARAMAN, V.; GUPTA, S. K. Diuron-Induced Cytological and Ultrastructural Alterations in the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 62, n. 3, p. 152–163, 1998.
- ÇILDIR, D. S.; LIMAN, R. Cytogenetic and genotoxic assessment in *Allium cepa* exposed to imazalil fungicide. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 20335–20343, 2020.
- ÇÖRDÜK, N.; AKINCI, N.; YÜCEL, G.; KAYA, N.; AKI, C. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of dodine (1-dodecylguanidium acetate) by *Allium cepa*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 12A, p. 4527–4531, 2015.
- CORTÉS-ESLAVA, J.; GÓMEZ-ARROYO, S.; RISUEÑO, M. C.; TESTILLANO, P. S. The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. **Environmental Pollution**, v. 240, p. 77–86, 2018.
- DANE, F.; DALGIÇ, Ö. The effects of fungicide benomyl (benlate) on growth and mitosis in onion (*Allium cepa* L.) root apical meristem. **Acta Biologica Hungarica**, v. 56, n. 1–2, p. 119–128, 2005.
- DATCU, A.-D.; CIOBANU, D.-G.; BOROS, B.-V.; OSTAFE, V.; NICOLETA, I. A new approach for phytotoxicity testing using *Allium cepa* bulbs. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 25, n. 2, p. 1488–1494, 2020.
- DEMIRTAŞ, G.; ÇAVUŞOĞLU, K.; YALÇIN, E. Anatomic, Physiologic and Cytogenetic Changes in *Allium cepa* L. Induced by Diniconazole. **CYTOLOGIA**, v. 80, n. 1, p. 51–57, 2015.
- EL-ABIDIN SALAM, A. Z.; HUSSEIN, E. H. A.; EL-ITRIBY, H. A.; ANWAR, W. A.; MANSOUR, S. A. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 319, n. 2, p. 89–101, 1993.
- EL-GHAMERY, A. A.; EL-NAHAS, A. I.; MANSOUR, M. M. The Action of Atrazine Herbicide as an Inhibitor of Cell Division on Chromosomes and Nucleic Acids Content in Root Meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **CYTOLOGIA**, v. 65, n. 3, p. 277–287, 2000.
- EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; AKYIL, D.; ÖZKARA, A. Mutagenic and cytotoxic activities of benfuracarb insecticide. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 637–643, 2016.
- EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; AKYIL, D.; ÖZKARA, A.; KONUK, M.; SAĞLAM, E. Cytotoxic and genotoxic effects of dioxacarb by human peripheral blood lymphocytes CAs and *Allium* test. **Cytotechnology**, v. 67, n. 6, p. 1023–1030, 2015.
- ERGIN, T.; INCEER, H.; ERGIN, B. Investigation of Antimutagenic Effect of *Rosa canina* L. Against Linuron Induced DNA Damage on Root Meristematic Cells of *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 85, n. 3, p. 233–237, 2020.
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. *Allium cepa* derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. **Chemosphere**, v. 62, n. 4, p. 527–537, 2006.
- FATMA, F.; VERMA, S.; KAMAL, A.; SRIVASTAVA, A. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 1, p. 115–123, 2018a.
- FATMA, F.; VERMA, S.; KAMAL, A.; SRIVASTAVA, A. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. **Chemosphere**, v. 195, p. 864–870, 2018b.
- 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, n. January, p. 83–88, 2018.
- 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.

- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.
- FIORESI, V. S.; VIEIRA, B. de C. R.; CAMPOS, J. M. S. de; SOUZA, T. da S. Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 22, p. 28066–28076, 2020.
- FISUN, K.; RASGELE, P. G. Genotoxic Effects of Raxil on Root Tips and Anthers of *Allium cepa* L. **Caryologia**, v. 62, n. 1, p. 1–9, 2009.
- GAO, Y.; LIU, Y.; QIN, X.; GUO, Z.; LI, D.; LI, C.; WAN, H.; ZHU, F.; LI, J.; ZHANG, Z.; HE, S. Dual stimuli-responsive fungicide carrier based on hollow mesoporous silica/hydroxypropyl cellulose hybrid nanoparticles. **Journal of Hazardous Materials**, v. 414, n. October 2020, p. 125513, 2021.
- GHISI, N. C.; SILVA, V. B.; ROQUE, A. A.; OLIVEIRA, E. C. Integrative analysis in toxicological assessment of the insecticide Malathion in *Allium cepa* L. system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 83, p. e240118, 2021.
- GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G.; NAVARRETE, M. H.; DE LA TORRE, C. Microtubular structures developed in response to a carbamate herbicide in plant mitosis. **Protoplasma**, v. 200, n. 1–2, p. 65–70, 1997.
- GIMÉNEZ-ABIÁN, M. I.; PANZERA, F.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J. F.; DE LA TORRE, C.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Immediate disruption of spindle poles and induction of additional microtubule-organizing centres by a phenylcarbamate, during plant mitosis. **Protoplasma**, v. 204, n. 3–4, p. 119–127, 1998.
- GÖMÜRGEN, A. N. Cytological Effect of the Herbicide 2,4-D isooctylester 48% on Root Mitosis of *Allium cepa*. **CYTOLOGIA**, v. 65, n. 4, p. 383–388, 2000.
- GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, n. 1, p. 47–54, 2014.
- GRILLO, R.; PEREIRA, A. E. S.; NISHISAKA, C. S.; DE LIMA, R.; OEHLKE, K.; GREINER, R.; FRACETO, L. F. Chitosan/tripolyphosphate nanoparticles loaded with paraquat herbicide: An environmentally safer alternative for weed control. **Journal of Hazardous Materials**, v. 278, p. 163–171, 2014.
- GRISOLIA, C. K.; BILICH, M. R.; FORMIGLI, L. M. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 1, p. 123–126, 2004.
- KARASMAILOGLU, M. C. Investigation of the potential toxic effects of prometryne herbicide on *Allium cepa* root tip cells with mitotic activity, chromosome aberration, micronucleus frequency, nuclear DNA amount and comet assay. **Caryologia**, v. 68, n. 4, p. 323–329, 2015.
- KARASMAILOGLU, M. C. Assessments on the potential genotoxic effects of fipronil insecticide on *Allium cepa* somatic cells. **Caryologia**, v. 70, n. 4, p. 378–384, 2017.
- KAYMAK, F.; MURANLI, F. D. G. The cytogenetic effects of avenoxan on *Allium cepa* and its relation with pollen sterility. **Acta Biologica Hungarica**, v. 56, n. 3–4, p. 313–321, 2005.
- KUCHY, A. H.; WANI, A. A.; KAMILI, A. N. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6895–6906, 2016.
- KUMAR, D.; KHAN, P. K.; SINHA, S. P. Cytogenetic toxicity and no-effect limit dose of pesticides. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 309–314, 1995.
- KWANKUA, W.; SENGSAI, S.; KULEUNG, C.; EUAWONG, N. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 949–954, 2010.
- LAMSAL, K.; GHIMIRE, B. K.; SHARMA, P.; GHIMIRAY, A. K.; KIM, S. W.; YU, C. Y.; CHUNG, M.; LEE, Y. S.; KIM, J. S.; SHAKYA, S. R. Genotoxicity evaluation of the insecticide ethion in root of *Allium cepa* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 27, p. 4204–4210, 2010.
- LIMAN, R.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium test*. **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1056–1061, 2010.

- LIMAN, R.; ALI, M. M.; CİĞERCI, İ. H.; İSTİFLİ, E. S.; SARIKURKCU, C. Cytotoxic and genotoxic evaluation of copper oxychloride through *Allium test* and molecular docking studies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 33, p. 44998–45008, 2021.
- LIMAN, R.; CİĞERCI, İ. H.; AKYIL, D.; EREN, Y.; KONUK, M. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, n. 1, p. 61–64, 2011.
- LIMAN, R.; CİĞERCI, İ. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 38–42, 2015.
- MACAR, O. Multiple toxic effects of tetraconazole in *Allium cepa* L. meristematic cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 8, p. 10092–10099, 2021a.
- MACAR, T. K. Investigation of cytotoxicity and genotoxicity of abamectin pesticide in *Allium cepa* L. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 2, p. 2391–2399, 2021b.
- MACAR, T. K.; MACAR, O.; YALÇIN, E.; ÇAVUŞOĞLU, K. Preventive efficiency of Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) fruit extract in diniconazole fungicide-treated *Allium cepa* L. roots. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 2534, 2021.
- MAGDALENO, A.; PERALTA GAVENSKY, M.; FASSIANO, A. v.; RÍOS DE MOLINA, M. C.; SANTOS, M.; MARCH, H.; MORETTON, J.; JUÁREZ, Á. B. Phytotoxicity and genotoxicity assessment of imazethapyr herbicide using a battery of bioassays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 23, p. 19194–19202, 2015.
- MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221–226, 2004.
- MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9796–9806, 2015.
- 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.
- MERCADO, S. A. S.; CALEÑO, J. D. Q.; SUÁREZ, J. P. R. Cytogenotoxic effect of propanil using the *Lens culinaris* Med and *Allium cepa* L test. **Chemosphere**, v. 249, p. 126193, 2020.
- MERT, M.; BETÜL, B. Investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of the *Euphorbia rigida* bieb. Extract. **Caryologia**, v. 73, n. 4, p. 65–75, 2020.
- MISHRA, K. K.; SRIVASTAVA, K.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of fluchloralin in mouse bone marrow and root meristem cells of *Allium cepa*. **Journal of Industrial Pollution Control**, v. 21, n. 2, p. 333–342, 2006.
- MUSTAFA, Y.; SUNA ARIKAN, E. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Caryologia**, v. 61, n. 1, p. 45–52, 2008.
- ODJEGBA, V. J.; ADENIRAN, R. A. Bentazone herbicide induces genotoxic effect and physiological disorders in non-targeted *Allium cepa* L. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 4, p. 375–379, 2015.
- OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 1, p. 38–43, 2013.
- ÖZEL, Ç. A.; OZKUL, M.; ÜNAL, F.; YÜZBAŞIOĞLU, D. Evaluation of genotoxicity of picloram by *Allium* test in plant tissue culture. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 27, n. 12, p. 8133–8138, 2018.
- ÖZKARA, A. Assessment of cytotoxicity and mutagenicity of insecticide demond EC 25 in *Allium cepa* and ames test. **Caryologia**, v. 72, n. 2, p. 21–27, 2019.
- ÖZKARA, A.; AKYIL, D.; EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**, v. 67, n. 5, p. 783–791, 2015a.
- ÖZKARA, A.; AKYIL, D.; EREN, Y.; ERDOĞMUŞ, S. F.; KONUK, M.; SAĞLAM, E. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of pyracarbolid by *Allium* test and micronucleus assay. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 337–341, 2015b.
- PANDIR, D. Assesment of the Genotoxic Effect of the Diazinon on Root Cells of *Allium cepa* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, p. e18160390, 2018.

- PARIHAR, N. S.; SHARMA, B. N. Persistence of Propineb (Polymeric Zinc 1, 2-Propylene Bisdithiocarbamate) Fungicide in Onion and Cropped Soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 5, p. 545–547, 2011.
- PATEL, B. v.; CHAWLA, S.; GOR, H.; UPADHYAY, P.; PARMAR, K. D.; PATEL, A. R.; SHAH, P. G. Residue decline and risk assessment of fluopyram + tebuconazole (400SC) in/on onion (*Allium cepa*). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 20871–20881, 2016.
- PEREIRA, A. E. S.; GRILLO, R.; MELLO, N. F. S.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Application of poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles containing atrazine herbicide as an alternative technique to control weeds and reduce damage to the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 268, p. 207–215, 2014.
- RANK, J.; JENSEN, A.-G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L. H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 300, n. 1, p. 29–36, 1993.
- RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, v. 136, n. 1, p. 13–18, 2002.
- RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1–2, p. 121–127, 1997.
- RAO, B. v.; NARASIMHAM, T. L.; SUBBARAO, M. v. Relative Genotoxic Effects of Cypermethrin, Alphamethrin and Fenvalerate on the Root Meristems of *Allium cepa*. **CYTOLOGIA**, v. 70, n. 3, p. 225–231, 2005.
- RAO, B. v.; SRINIVAS, N.; PRASADA RAO, P. V. v. Clastogenecity of captan and zineb in *Allium* meristem assay. **Journal of Environmental Biology**, v. 21, n. 2, p. 157–160, 2000.
- REPETTO, G.; JOS, A.; HAZEN, M. J.; MOLERO, M. L.; DEL PESO, A.; SALGUERO, M.; CASTILLO, P. del; RODRÍGUEZ-VICENTE, M. C.; REPETTO, M. A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. **Toxicology in Vitro**, v. 15, n. 4–5, p. 503–509, 2001.
- 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.
- ROSCULETE, C. A.; BONCIU, E.; ROSCULETE, E.; OLARU, L. A. Determination of the Environmental Pollution Potential of Some Herbicides by the Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects on *Allium cepa*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, p. 75, 2019.
- SAHOO, S. K.; MANDAL, K.; SINGH, G.; KUMAR, R.; CHAHIL, G. S.; BATTU, R. S.; SINGH, B. Residual behavior of quizalofop ethyl on onion (*Allium cepa* L.). **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1711–1718, 2013.
- SANTÍN-MONTANYÁ, I.; ALONSO-PRADOS, J.; VILLARROYA, M.; GARCÍA-BAUDÍN, J. Bioassay for Determining Sensitivity to Sulfosulfuron on Seven Plant Species. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 41, n. 6, p. 781–793, 2006.
- SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K.; MURTHY, R. C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 93–100, 2010.
- SHEIKH, N.; PATOWARY, H.; LASKAR, R. A. Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 16, n. 3, p. 291–299, 2020.
- SILVEIRA, M. A. D.; RIBEIRO, D. L.; DOS SANTOS, T. A.; VIEIRA, G. M.; CECHINATO, C. N.; KAZANOVSKI, M.; GRÉGIO D'ARCE, L. P. Mutagenicity of two herbicides widely used on soybean crops by the *Allium cepa* test. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 1215–1222, 2016.
- SONDHIA, S. Persistence and bioaccumulation of oxyfluorfen residues in onion. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 162, n. 1–4, p. 163–168, 2010.
- SRIVASTAVA, A. K.; SINGH, D. Assessment of malathion toxicity on cytophysiological activity, DNA damage and antioxidant enzymes in root of *Allium cepa* model. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 886, 2020.

- SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p. 8–12, 2009.
- TARTAR, G.; KAYMAK, F.; MURANLI, F. D. G. Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. **Caryologia**, v. 59, n. 3, p. 241–247, 2006.
- TRIQUES, M. C.; OLIVEIRA, D.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; DE MENEZES-OLIVEIRA, V. B. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2,4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, 2021.
- TSIROPOULOS, N. G.; MILIADIS, G. E. Field Persistence Studies on Pendimethalin Residues in Onions and Soil after Herbicide Postemergence Application in Onion Cultivation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 291–295, 1998.
- TÜRKOĞLU, Ş. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 224–230, 2012.
- TÜTÜNCÜ, E.; YALÇIN, E.; ACAR, A.; YAPAR, K.; ÇAVUŞOĞLU, K. Investigation of the Toxic Effects of a Carbamate Insecticide Methiocarb in *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 84, n. 2, p. 113–117, 2019.
- TYLICKI, A.; KOWALSKA-WOCHNA, E.; OŚCILOWICZ, A.; ILASZ, R. Mitodepressive and cytotoxic effects of short-term exposure to relatively small doses of pendimethalin evaluated by *Allium* test. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, n. 1, p. 193–199, 2010.
- VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Cyto-genotoxic consequences of carbendazim treatment monitored by cytogenetical analysis using *Allium* root tip bioassay. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 190, n. 4, p. 238, 2018a.
- VERMA, S.; SRIVASTAVA, A. Morphotoxicity and cytogenotoxicity of pendimethalin in the test plant *Allium cepa* L. - A biomarker based study. **Chemosphere**, v. 206, p. 248–254, 2018b.
- YÜZBAŞIOĞLU, D. Cytogenetic Effects of Fungicide Afugan on the Meristematic Cells of *Allium cepa* L. **CYTOLOGIA**, v. 68, n. 3, p. 237–243, 2003.
- YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; SANCAK, C. Genotoxic effects of herbicide Illoxan (Diclofop-Methyl) on *Allium cepa* L. **Turkish Journal of Biology**, v. 33, n. 4, p. 283–290, 2009.
- YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; SANCAK, C.; KASAP, R. Cytological effects of the herbicide racer “flurochloridone” on *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 97–105, 2003.

Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo

Ingrediente ativo	Tipo de pesticida	Origem da substância	Grupo de substâncias	Status de disponibilidade de ingredientes ativos	Status de aprovação na União Europeia
2,4-D	Herbicida	Sintético	Alquilclorofenoxi	Atual	Sim
Abamectina	Inseticida	Natural	Derivado de micro-organismos	Atual	Sim
Acetamiprid	Inseticida	Sintético	Neonicotinoide	Atual	Sim
Alpha-cipermetrina	Inseticida	Sintético	Piretroide	Atual	Sim
Anilofos	Herbicida	Sintético	Organofosforado	Desconhecido	Não
Atrazina	Herbicida	Sintético	Triazina	Atual	Não

Continua ...

Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo

Continuação

Ingrediente ativo	Tipo de pesticida	Origem da substância	Grupo de substâncias	Status de disponibilidade de ingredientes ativos	Status de aprovação na União Europeia
Azadiractina	Inseticida	Natural	Tetranortriterpenoide	Atual	Sim
Benfuracarbe	Inseticida	Sintético	Carbamato	Atual	Não
Benodanil	Fungicida	Sintético	Anilida	Obsoleto	Não
Benomilo	Fungicida	Sintético	Benzimidazol	Atual	Não
Bentazona	Herbicida	Sintético	Benzotiazinona	Atual	Sim
Captano	Fungicida	Sintético	Ftalimida	Atual	Sim
Carbaril	Inseticida	Sintético	Carbamato	Atual	Não
Carbendazima	Fungicida	Sintético	Benzimidazol	Atual	Não
Carbetamida	Herbicida	Sintético	Carbamato	Atual	Sim
Carbofurano	Inseticida	Sintético	Carbamato	Banido	Não
Cloreto de clorfenfós	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Clorimuron-etil	Herbicida	Sintético	Sulfonilureia	Desconhecido	Não
Clorotalonil	Fungicida	Sintético	Cloronitrila	Atual	Não
Clorpirifós	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Clodinafop-propargil	Herbicida	Sintético	Ariloxifenoxipropionato	Atual	Sim
Clopiralide	Herbicida	Sintético	Piridina	Atual	Não
Oxicloreto de cobre	Fungicida	Sintético	Composto inorgânico	Atual	Sim
Cicloheximida	Fungicida	Sintético	Antibiótico antifúngico	Obsoleto	Desconhecido
Cicloxydim	Herbicida	Sintético	Cicloexanediona	Atual	Sim
Cipermetrina	Inseticida	Sintético	Piretroide	Atual	Sim
DDT	Inseticida	Sintético	Organoclorado	Banido	Não
Deltametrina	Inseticida	Sintético	Piretroide	Atual	Sim
Diazinona	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Dicamba	Herbicida	Sintético	Ácido benzóico	Atual	Sim
Diclorvós	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Diclofop-metil	Herbicida	Sintético	Ariloxifenoxipropionato	Atual	Sim
Difenoconazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Sim

Continua ...

Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo

Continuação

Ingrediente ativo	Tipo de pesticida	Origem da substância	Grupo de substâncias	Status de disponibilidade de ingredientes ativos	Status de aprovação na União Europeia
Dimetoato	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Diniconazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Não
Dinocape	Herbicida	Sintético	Dinitrofenol	Atual	Não
Dioxacarbe	Inseticida	Sintético	Carbamato	Obsoleto	Não
Dibrometo de diquat	Herbicida	Sintético	Bipiridil	Atual	Não
Diurão	Herbicida	Sintético	Fenilamida	Atual	Não
Dodina	Fungicida	Sintético	Guanidina	Atual	Sim
Emamectina benzoato	Inseticida	Natural	Derivado de micro-organismos	Atual	Sim
Endossulfano	Inseticida	Sintético	Organoclorado	Atual	Não
Etion	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Fenaminossulf	Fungicida	Sintético	Diazenossulfonato	Obsoleto	Não
Fenbuconazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Sim
Fention	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Fenvalertrina	Inseticida	Sintético	Piretroide	Atual	Não
Fipronil	Inseticida	Sintético	Fenilpirazol	Atual	Não
Flocoumafen	Rodenticida	Sintético	Anticoagulante cumarínico	Atual	Não
Fluclorlina	Herbicida	Sintético	Cloroanilina	Obsoleto	Desconhecido
Fluopiram	Fungicida	Sintético	Benzamida piramida	Atual	Sim
Flurocloridona	Herbicida	Sintético	Pirrolidina	Atual	Sim
Flusilazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Não
Glifosato	Herbicida	Sintético	Fosfonoglicina	Atual	Sim
Glifosato isopropilamina	Herbicida	Sintético	Fosfonoglicina	Atual	Desconhecido
Hexaclorobenzeno	Fungicida	Sintético	Hidrocarboneto clorado	Banido	Não
Imazalil	Fungicida	Sintético	Imidazol	Atual	Sim
Imazapir	Herbicida	Sintético	Imidazolinona	Atual	Não
Imazaquina	Herbicida	Sintético	Imidazolinona	Atual	Não
Imazetapir	Herbicida	Sintético	Imidazolinona	Atual	Não

Continua ...

Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo

Continuação

Ingrediente ativo	Tipo de pesticida	Origem da substância	Grupo de substâncias	Status de disponibilidade de ingredientes ativos	Status de aprovação na União Europeia
Imidacloprido	Inseticida	Sintético	Neonicotinoide	Atual	Não
Iprodiona	Fungicida	Sintético	Dicarboximida	Atual	Não
Lindano	Fungicida	Sintético	Organoclorado	Banido	Não
Linurão	Herbicida	Sintético	Ureia	Atual	Não
Malationa	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Sim
Hidrazida maleica	Herbicida	Sintético	Piridazina	Atual	Sim
Mancozebe	Fungicida	Sintético	Carbamato	Atual	Não
MCPA	Herbicida	Sintético	Ácido ariloxialcanoico	Atual	Sim
Mesotriona	Herbicida	Sintético	Triketona	Atual	Sim
Metiocarbe	Inseticida	Sintético	Carbamato	Atual	Não
Metil paratião	Inseticida	Sintético	Organofosforado	Atual	Não
Metolacoloro	Herbicida	Sintético	Cloroacetamida	Atual	Não
Metolcarbe	Inseticida	Sintético	Carbamato	Obsoleto	Sim
Oxadiazona	Herbicida	Sintético	Oxidiazol	Atual	Não
Oxifluorfenol	Herbicida	Sintético	Difenil éter	Atual	Sim
Oximatrina	Inseticida	Natural	Alcaloides de quinolizidina	Atual	Não
Paraquat	Herbicida	Sintético	Bipiridílio	Atual	Não
Dicloreto de Paraquat	Herbicida	Sintético	Composto de amônio quaternário	Atual	Não
Pendimetalina	Herbicida	Sintético	Dinitroanilina	Atual	Sim
Pentacloretofenol	Inseticida	Sintético	Organoclorado	Desconhecido	Não
Piclorama	Herbicida	Sintético	Piridina	Atual	Sim
Pinoxaden	Herbicida	Sintético	Fenilpirazol	Atual	Sim
Procimidona	Fungicida	Sintético	Dicarboximida	Atual	Não
Prometrina	Herbicida	Sintético	Triazina	Atual	Não
Propanil	Herbicida	Sintético	Anilida	Atual	Não
Propinebe	Fungicida	Sintético	Carbamato	Atual	Não
Piracarbolido	Fungicida	Sintético	Anilida	Obsoleto	Desconhecido

Continua ...

Tabela A.2 – Propriedades do ingrediente ativo

Continuação

Ingrediente ativo	Tipo de pesticida	Origem da substância	Grupo de substâncias	Status de disponibilidade de ingredientes ativos	Status de aprovação na União Europeia
Piraclostrobina	Fungicida	Sintético	Estrobilurina	Atual	Sim
Pirazofos	Fungicida	Sintético	Fosforotiolato	Atual	Não
Piridalil	Inseticida	Sintético	Piridina	Atual	Sim
Piriproxifeno	Inseticida	Sintético	Piridina	Atual	Sim
Quizalofop-P-etil	Herbicida	Sintético	Ariloxifenoxipropionato	Atual	Sim
Spirodiclofeno	Inseticida	Sintético	Ácido tetronic	Atual	Não
Sulcotriona	Herbicida	Sintético	Triketona	Atual	Sim
Sulfentrazona	Herbicida	Sintético	Arl triazolinona	Atual	Não
Sulfossulfurona	Herbicida	Sintético	Sulfonilureia	Atual	Sim
Tebuconazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Sim
Tetraconazol	Fungicida	Sintético	Triazol	Atual	Sim
Tiametoxam	Inseticida	Sintético	Neonicotinoide	Atual	Não
Tralomethrina	Inseticida	Sintético	Piretroide	Atual	Não
Trifluralina	Herbicida	Sintético	Dinitroanilina	Atual	Não
Zinebe	Fungicida	Sintético	Carbamato	Atual	Não

APÊNDICE B. TABELA ARTIGO 3: Explorando a toxicidade de pesticida à base de fluopiram em espécies não-alvo

Tabela B.1 – Mutagenicidade de pesticidas em cepas de *Salmonella typhimurium*.

Tratamento	Dose (mg placa ⁻¹)	Mutagenicidade			
		TA100		TA98	
		Média ± DP	IM	Média ± DP	IM
Fluopiram	CN ¹	278 ± 10 ^{bd}	1,00	30 ± 1 ^{c2}	1,00
	0,017	260 ± 34 ^{bc}	0,94	30 ± 4 ^c	1,00
	0,050	217 ± 15 ^c	0,78	37 ± 6 ^b	1,23
	0,210	227 ± 11 ^c	0,82	28 ± 3 ^c	0,92
	0,418	236 ± 28 ^{bc}	0,85	24 ± 2 ^{de}	0,78
	0,835	276 ± 51 ^{bc}	0,99	27 ± 1 ^{cd}	0,89
	1,67	277 ± 53 ^{bc}	1,00	21 ± 1 ^e	0,68
	5,00	256 ± 43 ^{bc}	0,92	16 ± 2 ^f	0,52
	CP ²	3112 ± 333 ^a	11,21	239 ± 20 ^a	7,88

Os valores apresentados são a média ± desvio padrão (DP) das réplicas obtidas em três experimentos independentes;

¹Controle Negativo (CN);

²Controle Positivo (CP): 0,15 mg azida sódica placa⁻¹ para TA100 e 0,05 mg 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) placa⁻¹ para TA98;

³One-way ANOVA e teste de Tukey;

⁴Kruskal-Wallis e teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner;

Letras em comum na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p > 0,05).

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05).

APÊNDICE C. RESULTADOS ESTATÍSTICOS ARTIGO 4: Efeitos de curto prazo da aplicação do herbicida flumioxazina na atividade biológica do solo

Substratos utilizados para a análise enzimática do solo:

- α -glucosidase = p-nitrofenil- α -d-glucopiranosídeo 5 mM;
- β -glucosidase = p-Nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 2,42 mM;
- Fosfatase ácida = sal di(tris) de 4-Nitrofenil fosfato 0,2 mM;
- Glicina aminopeptidase = p-nitroanilida de glicina 1 mM;
- Arilsulfatase = 4-nitrofenil sulfato de potência 4,7 mM.

Resultado dos testes estatísticos:

α -Glicosidase – ANOVA mista de duas vias – Violação da esfericidade. Aplicada a correção de Greenhouse-Geisser.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 2,86$; $p = 0,13$; $\eta_g^2 = 0,05$)
- Tempo ($F_{(1,97;15,73)} = 23,37$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,71$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(1,97;15,73)} = 3,29$; $p = 0,06$; $\eta_g^2 = 0,26$)

Post-hoc

- Tempo – Testes t emparelhados para a variável Tempo, ignorando o grupo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0-7 $p < 0,001$
 - 0-14 $p = 0,89$
 - 0-28 $p < 0,001$
 - 0-58 $p < 0,001$
 - 7-14 $p = 0,15$
 - 7-28 $p = 1$
 - 7-58 $p = 1$
 - 14-28 $p = 0,15$
 - 14-58 $p < 0,05$
 - 28-58 $p = 1$

β -Glicosidase – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 9,75$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,30$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 16,55$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,57$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 0,27$; $p = 0,90$; $\eta_g^2 = 0,02$)

Post-hoc

- Tratamento – Testes t emparelhados para a variável tratamento, ignorando o tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - Controle-Flumioxazina $p < 0,001$
- Tempo – testes t emparelhados para a variável tempo, ignorando o tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.

- 0-7 $p < 0,01$
- 0-14 $p < 0,01$
- 0-28 $p < 0,001$
- 0-58 $p < 0,001$
- 7-14 $p = 1$
- 7-28 $p = 1$
- 7-58 $p = 1$
- 14-28 $p = 1$
- 14-58 $p = 1$
- 28-58 $p < 0,01$

Fosfatases ácida – ANOVA mista de duas vias – Violação da esfericidade. Aplicada a correção de Greenhouse-Geisser.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 4,06$; $p = 0,08$; $\eta_g^2 = 0,12$)
- Tempo ($F_{(1,85;14,79)} = 59,75$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,85$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(1,85;14,79)} = 1,96$; $p = 0,18$; $\eta_g^2 = 0,15$)

Post-hoc

- Tempo – testes t emparelhados para a variável tempo, ignorando o tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0-7 $p < 0,001$
 - 0-14 $p < 0,01$
 - 0-28 $p = 1$
 - 0-58 $p < 0,001$
 - 7-14 $p < 0,05$
 - 7-28 $p < 0,001$
 - 7-58 $p < 0,05$
 - 14-28 $p < 0,05$
 - 14-58 $p = 0,91$
 - 28-58 $p < 0,001$

Glicina aminopeptidase – ANOVA mista de duas vias – Violação da esfericidade. Aplicada a correção de Greenhouse-Geisser.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 0,002$; $p = 0,97$; $\eta_g^2 < 0,0001$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 92,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,91$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 1,21$; $p = 0,32$; $\eta_g^2 = 0,12$)

Post-hoc

- Tempo – testes t emparelhados para a variável tempo, ignorando o tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0-7 $p < 0,001$
 - 0-14 $p < 0,001$
 - 0-28 $p < 0,001$
 - 0-58 $p < 0,001$
 - 7-14 $p = 0,1$

- 7-28 $p = 0,98$
- 7-58 $p = 1$
- 14-28 $p = 1$
- 14-58 $p = 1$
- 28-58 $p = 1$

Arilsulfatase – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 0,09$; $p = 0,76$; $\eta_g^2 = 0,003$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 40,01$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,80$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 6,26$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,38$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 63,8$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,89$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 11,4$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,59$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 3,00$; $p = 0,60$; $\eta_g^2 = 0,27$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 0,76$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,09$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 2,08$; $p = 0,94$; $\eta_g^2 = 0,21$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p = 0,60$
 - 28 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
 - 58 – Controle-Flumioxazina $p = 0,94$

N-NH₄⁺ – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 197,71$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,76$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 19,67$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,68$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 13,66$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,60$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 269,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,97$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 6,97$; $p = 0,15$; $\eta_g^2 = 0,46$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 8,30$; $p = 0,1$; $\eta_g^2 = 0,51$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 19,50$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,71$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 9,48$; $p = 0,075$; $\eta_g^2 = 0,54$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,001$

- 7 – Controle-Flumioxazina $p = 0,15$
- 14 – Controle-Flumioxazina $p = 0,10$
- 28 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$
- 58 – Controle-Flumioxazina $p = 0,75$

N-NO₃⁻ – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 0,01$; $p = 0,92$; $\eta_g^2 < 0,0002$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 6,39$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,40$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 11,62$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,54$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 2,86$; $p = 0,64$; $\eta_g^2 = 0,26$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 0,94$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,10$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 7,60$; $p = 0,12$; $\eta_g^2 = 0,49$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 17,00$; $p < 0,5$; $\eta_g^2 = 0,68$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 13,60$; $p < 0,5$; $\eta_g^2 = 0,63$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p = 0,64$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p = 0,12$
 - 28 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$
 - 58 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$

Nitrogênio mineral – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 65,42$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,52$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 10,08$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,52$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 11,19$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,55$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 115,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,93$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 3,35$; $p = 0,52$; $\eta_g^2 = 0,30$)
 - 14 ($F_{(1;8)} < 0,001$; $p = 1$; $\eta_g^2 < 0,001$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 25,20$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,75$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 0,03$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,004$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,001$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 0,52$

- 14 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
- 28 – Controle-Flumioxazina $p < 0,01$
- 58 – Controle-Flumioxazina $p = 1$

NH₄ (%) – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 140,87$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,81$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 42,75$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,80$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 34,00$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,76$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 207,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,96$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 2,66$; $p = 0,70$; $\eta_g^2 = 0,25$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 42,30$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,84$)
 - 28 ($F_{(1;8)} < 0,05$; $p = 1$; $\eta_g^2 < 0,001$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 133,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,94$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 0,70$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p < 0,001$
 - 28 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
 - 58 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$

NH₃ (%) – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 140,87$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,81$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 42,75$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,80$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 34,01$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,76$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 207,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,96$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 2,66$; $p = 0,70$; $\eta_g^2 = 0,25$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 42,30$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,84$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 0,007$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,001$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 133,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,94$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 0,70$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p < 0,001$

- 28 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
- 58 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$

CBM – ANOVA mista de duas vias.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 84,30$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,69$)
- Tempo ($F_{(2,14;17,15)} = 12,92$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,56$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(2,14;17,15)} = 11,93$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,54$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 3,98$; $p = 0,41$; $\eta_g^2 = 0,33$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 3,74$; $p = 0,45$; $\eta_g^2 = 0,32$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 99,80$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,93$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 38,80$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,83$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 4,62$; $p = 0,32$; $\eta_g^2 = 0,37$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p = 0,41$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 0,45$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$
 - 28 – Controle-Flumioxazina $p < 0,01$
 - 58 – Controle-Flumioxazina $p = 0,21$

RBS – ANOVA mista de duas vias – Violação da esfericidade. Aplicada a correção de Greenhouse-Geisser.

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 0,88$; $p = 0,38$; $\eta_g^2 = 0,28$)
- Tempo ($F_{(4;32)} = 84,92$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,89$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(4;32)} = 7,98$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,42$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 11,00$; $p = 0,05$; $\eta_g^2 = 0,58$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 15,70$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,66$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 0,30$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,04$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 9,24$; $p = 0,08$; $\eta_g^2 = 0,54$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 0,21$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,03$)
- Teste T – Comparações emparelhadas entre níveis de tratamento. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p = 0,05$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p = 1$

- 28 – Controle-Flumioxazina $p = 0,08$
- 58 – Controle-Flumioxazina $p = 1$

$q\text{CO}_2$ – ANOVA mista de duas vias

- Tratamento ($F_{(1;8)} = 58,16$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,66$)
- Tempo ($F_{(1,68;13,41)} = 40,61$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,79$)
- Tratamento:Tempo ($F_{(1,68;13,41)} = 19,57$; $p < 0,001$; $\eta_g^2 = 0,64$)

Post-hoc

- Anova – Efeito do tratamento em cada ponto de tempo. Os valores de p são ajustados utilizando o método de correção de testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 ($F_{(1;8)} = 20,00$; $p < 0,05$; $\eta_g^2 = 0,71$)
 - 7 ($F_{(1;8)} = 0,50$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,06$)
 - 14 ($F_{(1;8)} = 237,00$; $p < 0,0001$; $\eta_g^2 = 0,97$)
 - 28 ($F_{(1;8)} = 39,80$; $p < 0,01$; $\eta_g^2 = 0,83$)
 - 58 ($F_{(1;8)} = 0,64$; $p = 1$; $\eta_g^2 = 0,07$)
- Teste t – Comparações pareadas entre os níveis do Tratamento. Os valores de p são ajustados usando o método de correção para testes múltiplos de Bonferroni.
 - 0 – Controle-Flumioxazina $p < 0,05$
 - 7 – Controle-Flumioxazina $p = 1$
 - 14 – Controle-Flumioxazina $p < 0,0001$
 - 28 – Controle-Flumioxazina $p < 0,01$
 - 58 – Controle-Flumioxazina $p = 0,05$

Resultado PERMANOVA

	Df	SumOfSqs	R2	F	Pr(>F)	
Tratamento	1	105,20	0,16515	37,4365	0,001	***
Tempo	4	314,40	0,49356	27,9699	0,001	***
Tratamento:Tempo	4	104,99	0,16482	9,3403	0,001	***
Residual	40	112,41	0,17646			
Total	49	637,00	1,00000			

APÊNDICE D. MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 6

Figura D.1 – Banner apresentado no EEPEX.

POSTER

EEPEX 2024

Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão

21 | 22 de maio

Campus Central
de Ciências Exatas e Tecnológicas

Universidade
Estadual de Goiás

IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS FÚNGICOS COM POTENCIAL PARA BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS

Carlos Filipe Camilo Cotrim, Mestre, UEG/CET, carlosfcamil@gmail.com; Lucas Leonardo da Silva, Doutor, UEG/CET, lucasleo.bio@gmail.com; Solange Xavier dos Santos, Doutora, UEG/CET, solange.xavier@ueg.br; Virginia Damin, Doutora, UEG/Escola de Agronomia, virginiamdamin@ueg.br; Luciane Madureira Almeida, Doutora, UEG/CET, luciane.almeida@ueg.br

Área do trabalho: PESQUISA. Curso: Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais do Cerrado

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são essenciais para a agricultura, melhorando a qualidade e quantidade das lavouras¹. Contudo, causam contaminação do solo, água e ar, resultando em problemas de saúde pública e ambientais^{2,3}. Além disso, têm uma natureza persistente no meio ambiente^{1,4}. A biodegradação com fungos, que possuem enzimas de baixa especificidade, é uma solução para reduzir resíduos de pesticidas⁵.

Este estudo investiga a tolerância de isolados fúngicos a pesticidas, visando identificar linhagens com potencial para biodegradação futura.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Para identificar isolados fúngicos com tolerância a pesticidas, foram avaliados 51 isolados de fungos filamentosos e 17 isolados de fungos leveduriformes.

As linhagens fúngicas foram submetidas a testes de tolerância em meio sólido, cultivadas em meio de cultura de sais minerais com doses recomendadas de Flupirame (1,67 mg mL⁻¹), Flumioxazina (0,5 mg mL⁻¹) e S-metolaclopr (6,4 mg mL⁻¹). Os pesticidas foram adicionados ao meio esterilizado para atingir a concentração final de campo.

Discos de ágar com micélio fúngico foram inoculados em placas de Petri contendo o meio com pesticidas e incubados a 30 °C no escuro. O diâmetro de crescimento foi medido durante duas semanas, comparado com placas controle sem pesticidas.

A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada usando a fórmula:

$$CT = \frac{DCA}{DCC}$$

Onde: CT é o coeficiente de tolerância, DCA e DCC são o diâmetro da colônia na amostra e controle, respectivamente.

Para fungos leveduriformes, foi considerada a aparência nos tratamentos com pesticidas, comparada ao controle negativo.

3. RESULTADOS

Dos 68 fungos avaliados, três isolados se destacaram como promissores (Figura 1). O isolado SXS 214 apresentou coeficiente de tolerância de 0,90 para a Flumioxazina, 0,88 para o Flupirame e 0,73 para o S-metolaclopr. O isolado SXS 411 obteve coeficiente de tolerância de 56,37 para a Flumioxazina, 19,90 para o Flupirame e 26,99 para o S-metolaclopr. O isolado SXS 424, um fungo leveduriforme, teve sua morfologia nos tratamentos com pesticidas semelhante à do controle negativo (CN), conforme pode ser observado nas figuras 1 e 2. Todos os isolados analisados foram depositados na coleção de culturas do FungiLab/UEG.



Figura 2. Crescimento de isolados fúngicos em contato com os pesticidas. FP = Flupirame, SM = S-metolaclopr.

4. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi identificado três isolados fúngicos promissores (SXS 214, SXS 411 e SXS 424) com boa capacidade de tolerar os três pesticidas avaliados (Flupirame, Flumioxazina e S-metolaclopr).

Esses resultados são significativos, pois destacam o potencial desses isolados para aplicações práticas em biodegradação de pesticidas.

A tolerância observada é um indicio de que os isolados são capazes de metabolizar ou degradar os pesticidas avaliados devido a mecanismos de resistência naturais. Os fungos podem degradar moléculas complexas por meio de enzimas hidrolíticas, lignolíticas, oxidativas, desidrogenases, redutases, esterases, lipases e conjugativas.

Esse arsenal enzimático se dá pelo fato que os fungos possuem sistemas enzimáticos extracelulares complexos e poderosos. Os fungos são capazes de degradar compostos lignolíticos como corantes e poluentes no meio ambiente devido à baixa especificidade das enzimas fúngicas⁶.

5. CONCLUSÃO

Os isolados fúngicos SXS 214, SXS 411 e SXS 424 se destacaram pela tolerância significativa aos pesticidas Flupirame, Flumioxazina e S-metolaclopr, mostrando potencial para biodegradação. Esses resultados apontam para possíveis aplicações práticas na biorremediação, oferecendo uma abordagem promissora para mitigar os impactos negativos dos pesticidas no meio ambiente.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado (processo nº 88887.483362/2020-00) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro recebido por meio das Chamadas 03/2022 e 09/2022.

7. REFERÊNCIAS

- SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, v. 1, n. 11, p. 1446, 2019.
- KUMAR, M. et al. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 31, p. 101863, 2021.
- RAJAK, P. et al. Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? *Journal of Hazardous Materials Advances*, v. 10, n. February, p. 100264, 2023.
- PATIL, V. M. et al. Current status of pesticide effects on environment, human health and its eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, 2022.
- YAKSMAA, A. et al. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. *Frontiers in Marine Science*, v. 10, 2023.
- SWATHY, K. et al. Biodegradation of pesticide in agricultural soil employing entomopathogenic fungi: Current state of the art and future perspectives. *Heliyon*, v. 10, n. 1, p. e23405, 2024.

TEMA

O FUTURO DO TRABALHO | O TRABALHO DO FUTURO

Figura D.2 – Certificado Prêmio Goiás Sustentável – SEMAD.

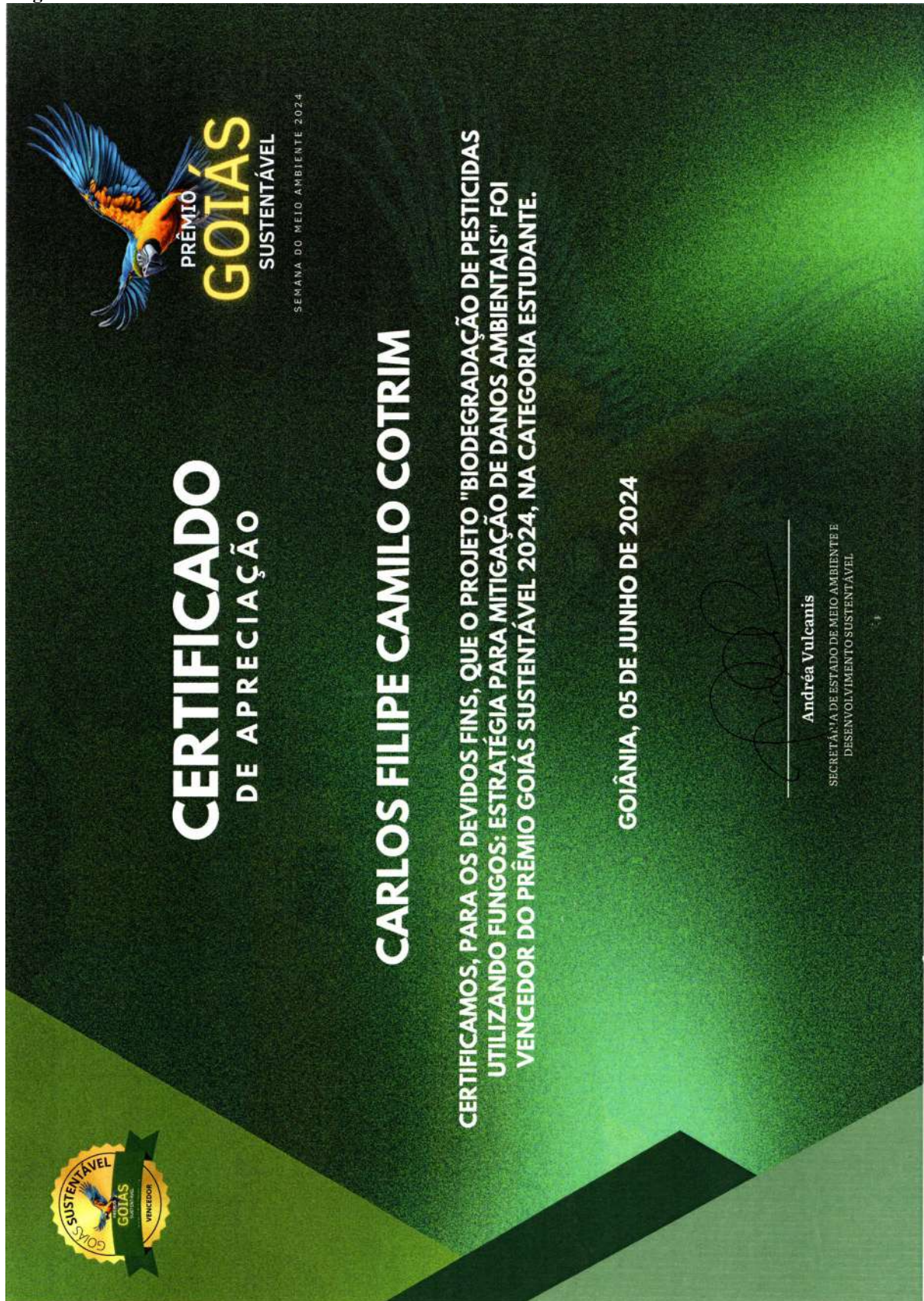


Figura D.3 – Fotos da premiação.



BIODEGRADAÇÃO DE PESTICIDAS UTILIZANDO FUNGOS: ESTRATÉGIA PARA MITIGAÇÃO DE DANOS AMBIENTAIS

Resumo – O uso global de pesticidas, embora melhore a produtividade e qualidade das culturas, traz riscos à saúde humana e ambiental, como a contaminação do solo e de recursos hídricos. Em 2021, o uso agrícola global de pesticidas foi de cerca de 3,77 milhões de toneladas, resultando em resíduos, cujas moléculas são, muitas vezes, persistentes no ambiente. Técnicas de biorremediação, como a biodegradação, podem ser utilizadas para minimizar impactos dos pesticidas e até mesmo recuperar áreas contaminadas. Contudo, ainda não existem métodos eficazes e comercialmente disponíveis para solucionar este problema. O objetivo desta proposta é utilizar fungos para biodegradar moléculas comerciais de pesticidas (Fluopiram – Verango® Prime, Flumioxazina – Sumisoya®, S-metolacoloro – Dual Gold®) e identificar os mecanismos biológicos e químicos envolvidos no processo. Para isso, será realizado um teste de tolerância com diferentes isolados fúngicos para selecionar o isolado com o melhor potencial de degradação dos pesticidas que serão avaliados. Após será conduzido o ensaio de biodegradação onde o sucesso do processo será avaliado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa. Análises enzimáticas e proteômica serão feitas para identificar enzimas chave no processo. Técnicas de modelagem molecular e inteligência artificial serão empregadas para simular interações enzima-pesticida para uma possível otimização do processo. Com a execução da proposta espera-se contribuir para solucionar o problema da contaminação por pesticidas, melhorando a sustentabilidade da agricultura e protegendo a saúde pública e preservando o meio ambiente. Esta pesquisa vai de encontro com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 das Nações Unidas, fortalecendo assim o progresso do Estado de Goiás e do Brasil. O projeto conta com o financiamento das Chamadas 03/2022 e 09/2022 FAPEG.

INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas na agricultura está associado a diversas ameaças devido ao uso irracional que ignora os riscos associados para biosfera devido a contaminação do solo, da água e do ar (RAJAK *et al.*, 2023). A contaminação leva a vários problemas de saúde pública, juntamente com problemas ambientais (KUMAR *et al.*, 2021). Embora os pesticidas sejam benéficos no ponto de vista de produção agrícola, existe essa outra face, onde podem acarretar consequências devido sua bioampliação em organismos não-alvo e natureza persistente (SHARMA *et al.*, 2019; PATHAK

et al., 2022). Com isso, percebe-se que a contaminação por pesticidas é um problema para o meio ambiente e prejudicial para todas as formas de vida. Devido os problemas acarretados pelo uso de pesticidas, a redução dos resíduos presentes no solo e na água é uma preocupação de segurança (KUMAR *et al.*, 2021). Uma forma de solucionar esse problema é a biodegradação, com isso seria possível erradicar moléculas de pesticidas de áreas contaminadas (KUMAR *et al.*, 2021; PATHAK *et al.*, 2022).

Os fungos estão entre os candidatos promissores para serem explorado para o processo de biodegradação de pesticidas. Fungos são organismos quimioheterotróficos com capacidade metabólica de quebrar moléculas complexas, utilizando-as como fonte de energia. Toda essa capacidade se dá devido ao arsenal enzimático intra e extracelular capaz de atacar e metabolizar uma ampla classe de compostos (VAKSMAA *et al.*, 2023).

Apesar de existirem trabalhos que exploram o uso de isolados fúngicos para biodegradarem moléculas de pesticidas (PINTO *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017; XIAO; KONDO, 2020; FENG *et al.*, 2021), ainda não existe nenhum método ou produto disponível para realizar a biorremediação de áreas contaminadas. Percebe-se então que estratégias e trabalhos sobre biorremediação e biodegradação de pesticidas não foram exaustivamente explorados (GONÇALVES; DELABONA, 2022) o que faz com que haja uma lacuna.

Com isso, são necessários mais estudos antes que a abordagem de se utilizar fungos para degradar pesticidas seja declarada bem-sucedida (PATHAK *et al.*, 2022). Pesquisas voltadas para encontrar enzimas capazes de degradar pesticidas estão se tornando cada vez mais vitais, além de ser necessário encontrar organismos mais potentes, novos genes e novas abordagens de biodegradação (PATHAK *et al.*, 2022). A utilização de ferramentas ômicas para investigar a composição genética detalhada, o modo de ação e até mesmo as múltiplas vias de degradação envolvidas na biodegradação de pesticidas combinadas com bioinformática e ferramentas estatísticas podem ajudar na compreensão e solucionar lacunas (GANGOLA *et al.*, 2022).

Há também o uso de inteligência artificial (IA), em combinação com aprendizado de máquina e redes neurais artificiais que pode melhorar a precisão e eficiência dos métodos de biodegradação. A IA pode, por exemplo, reunir e analisar dados de várias fontes para gerar previsões e recomendações precisas sobre as condições ideais para que a biodegradação ocorra (BANERJEE *et al.*, 2024).

Isso posto, este estudo é essencial para a triagem de fungos e enzimas eficientes para a biodegradação de pesticidas, reduzindo os riscos para o meio ambiente e a saúde humana (PATHAK *et al.*, 2022). A este respeito, com um esforço interdisciplinar, nossa proposta visa contribuir em solucionar essa lacuna, expandido o conhecimento para o desenvolvimento de uma solução prática, aplicável e sustentável para um dos maiores desafios enfrentados atualmente, que é a contaminação do solo e, consequentemente, dos recursos hídricos por moléculas de pesticidas. A integração de diferentes áreas do conhecimento e técnicas proporcionará a aquisição de dados precisos e robustos.

METODOLOGIA

As etapas metodológicas são apresentadas em fluxograma na figura 1. São fornecidos os parâmetros que serão avaliados e resultados que serão fornecidos com a execução de cada etapa.

Figura 1 – Fluxograma com as etapas do projeto e resultados que serão obtidos em cada uma.



Fonte: elaborado pelo autor.

Os isolados fúngicos que serão avaliadas quanto ao seu potencial para degradar os pesticidas já foram isolados, e estão depositados na coleção de culturas do FungiLab/UEG. Os isolados fúngicos serão submetidos, em triplicada, a teste de tolerância em meio sólido. O teste de degradação será feito somente com o isolado que melhor tolerar os pesticidas avaliados. Os isolados serão cultivados em BDA, acrescentando a dose de campo recomendada para cultura de soja de cada um dos pesticidas (Fluopiram (Verango® Prime) – 1,67 mg mL⁻¹; Flumioxazina (Sumisoya®) – 0,5 mg mL⁻¹; S-metolaclopro (Dual Gold®) – 6,4 mg mL⁻¹). As culturas fúngicas serão incubadas a 30 °C no escuro. O diâmetro de crescimento (em mm) será medido duas semanas. Placas sem pesticidas e somente BDA servirão como controle. A porcentagem de inibição do crescimento no meio BDA contendo pesticida será determinada utilizando a seguinte fórmula (XIAO; KONDO, 2019):

$$CT = \frac{DCA}{DCC}$$

Onde:

CT - Coeficiente de tolerância;

DCA e DCC - Diâmetro da colônia na amostra e controle, respectivamente.

O isolado que melhor tolerar os pesticidas será inoculado em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 90 mL de meio líquido contendo a concentração de campo de cada pesticida. Os frascos serão cobertos por papel alumínio e ficarão sob agitação por 30 dias a 30 °C. Para os controles, algumas culturas permanecerão vivas e não receberão pesticida, enquanto outras culturas serão inativadas por autoclavagem (121 °C, 20 min) antes da adição dos pesticidas. Após 30 dias de incubação, as culturas serão preparadas para a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS) (HU *et al.*, 2019). A eficiência da degradação dos pesticidas será calculada pela seguinte fórmula (FENG *et al.*, 2021):

$$ED (\%) = \frac{(Ci - Cf)}{Ci} * 100$$

Onde:

ED – Eficiência de degradação;

Ci e Cf – Concentração inicial e final, respectivamente.

Para identificar as proteínas/enzimas associadas a degradação dos pesticidas, os grupos (controles e tratado) terão o perfil proteômico comparado a fim de verificar proteínas diferencialmente expressas. Para isso, o sobrenadante obtido pela centrifugação do meio líquido de cada um dos grupos (controles e tratados) serão enviadas para análise em um centro especializado em análises proteômicas. As opções de centros especializados em proteômica são:

- Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD – UNICAMP) – <https://www.lactad.unicamp.br/br>
- Laboratório de Proteômica (LMProt/UFGM) – <https://sites.icb.ufmg.br/celam/lmprot/>
- Centro de Facilidades para a Pesquisa (CEFAP – USP) – <https://cefap.icb.usp.br/>

Com base no perfil proteômico, as principais enzimas envolvidas no processo de degradação das moléculas de pesticidas serão analisadas usando modelagem computacional para simular as interações das enzimas com o princípio ativo dos pesticidas. Com isso, será possível identificar e descrever possíveis sistemas moleculares e vias de degradação dos pesticidas pelo fungo. Todos os cálculos serão realizados usando o pacote Gaussian09 (FRISCH *et al.*, 2009). As constantes cinéticas das reações químicas serão calculadas usando o código *Transitivity Code* (MACHADO *et al.*, 2019).

Todos os experimentos serão realizados em triplicata. Os dados serão fornecidos com média $\pm$ desvio padrão. As análises estatísticas serão realizadas no software R, versão 4.2.2 e RStudio, versão 2023.03.0.

RESULTADOS ESPERADOS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Primeiramente espera-se que com a execução do projeto se alcance o objetivo proposto. Espera-se identificar, em meio os isolados fúngicos estudados, o isolado que possui o melhor potencial biotecnológico para a biodegradação de pesticidas. Com a identificação e o teste de biodegradação, espera-se que o isolado fúngico escolhido apresente a capacidade de degradar os pesticidas, por meio de enzimas extracelulares, utilizando-os como fonte energética para seu crescimento. Por meio da investigação enzimática e análise proteômica, espera-se caracterizar as enzimas chave e possíveis vias metabólicas, sendo possível esclarecer os mecanismos utilizados para a degradação. Os dados da aplicação de modelagem molecular e inteligência artificial fornecerão um panorama da eficiência e especificidade do processo de biodegradação. Esses resultados serão cruciais para otimizar os processos de biorremediação, permitindo o desenvolvimento de métodos eficientes e direcionados para descontaminação do solo.

Os dados contribuirão para a conscientização dos impactos do uso de pesticidas, promovendo a conscientização e equilíbrio entre preservação ambiental e agricultura. Além disso, espera-se que os resultados contribuam para o desenvolvimento de novas soluções para recuperação de solos contaminados e consequentemente preservação de recursos hídricos. As descobertas podem ser aplicadas no desenvolvimento de produtos ou serviços para a indústria e agricultura devido ao potencial de inovação dos resultados. A soma dos resultados proporcionará contribuições e avanços notáveis no campo da ciência, tecnologia e inovação, em harmonia com os princípios da bioeconomia e em alinhamento com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável da Agenda 2030 das Nações Unidas, fortalecendo assim o progresso do Estado de Goiás e do Brasil.

Por fim, a partir dos resultados obtidos na presente proposta de pesquisa, que se concentra na identificação e caracterização de um isolado fúngico eficiente na biorremediação de pesticidas, bem como na análise de enzimas envolvidas no processo, uma direção para trabalhos futuros envolve o isolamento, produção e aplicação da enzima identificada. Onde o gene da enzima identificada em nosso estudo será clonado em um sistema de expressão apropriado. O objetivo será a otimização da produção da enzima em escala piloto. Este passo será fundamental para viabilizar a aplicação da enzima na remediação de solos contaminados em larga escala. Além disso, estudos de impacto ambiental e toxicidade serão necessários e essenciais para garantir a segurança da enzima. Após, estratégias de imobilização da enzima serão empregadas para melhorar sua estabilidade e avaliação de aspectos regulatórios serão feitos para uma possível implementação prática e regulamentação do processo para obtenção da enzima (registro de patente).

EXEQUIBILIDADE

A exequibilidade do projeto se dá pela metodologia estabelecida e alinhada com o objetivo do projeto. Para alcançar o objetivo, o projeto se baseia na infraestrutura e na expertise dos laboratórios colaboradores (parceria já estabelecida) para cada etapa específica do projeto o que assegurará a exequibilidade do projeto. A seleção e análise de linhagens fúngicas serão conduzidas no FungiLab (UEG), que possui um acervo de linhagens fúngicas isoladas de diferentes substratos e com estratégias de vida diferentes. O laboratório possui condições ideais e equipamentos para os testes de tolerância e biodegradação. O Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LaCEM – IQ UFG) conta com os equipamentos necessários para a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS), permitindo uma avaliação precisa da eficiência de degradação dos pesticidas. Para os estudos bioquímicos das enzimas, o laboratório de

Biotecnologia (LaBiotec UEG) conta com infraestrutura e dispõem de equipamentos necessários para análise e coleta de dados. O projeto se beneficiará de uso de modelagem molecular e inteligência artificial, com suporte do Laboratório de Modelagem de Transformações Físicas e Químicas (*Mphyschem* Lab - UEG) e do Núcleo de Computação de Alto Desempenho (UEG).

Além disso, contamos com o fomento de dois editais para custear a análise proteômica. Chamada 03/2022 FAPEG Apoio a Pesquisa “Toxicidade e micoremediação de solos contaminados com pesticidas” com valor de R\$ 30.000,00, e Chamada 09/2022 FAPEG “Citogenotoxicidade de pesticidas e estratégias para mitigação do seu efeito” com valor de R\$ 50.000,00.

REFERENCIAS

BANERJEE, D.; ADHIKARY, S.; BHATTACHARYA, S.; CHAKRABORTY, A.; DUTTA, S.; CHATTERJEE, S.; GANGULY, A.; NANDA, S.; RAJAK, P. Breaking boundaries: Artificial intelligence for pesticide detection and eco-friendly degradation. **Environmental Research**, vol. 241, p. 117601, Jan. 2024. DOI 10.1016/j.envres.2023.117601.

FENG, M.; ZHOU, J.; YU, X.; WANG, H.; GUO, Y.; MAO, W. Bioremediation of triphenyl phosphate by *Pycnoporus sanguineus*: Metabolic pathway, proteomic mechanism and biotoxicity assessment. **Journal of Hazardous Materials**, vol. 417, no. May, p. 125983, 2021. DOI 10.1016/j.jhazmat.2021.125983.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A. V.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; GOMPERTS, R.; MENNUCCI, B.; HRATCHIAN, H. P.; ORTIZ, J. V.; ... FOX, D. J. **Gaussian09 Revision D.01**. 2009.

GANGOLA, S.; BHATT, P.; KUMAR, A. J.; BHANDARI, G.; JOSHI, S.; PUNETHA, A.; BHATT, K.; RENE, E. R. Biotechnological tools to elucidate the mechanism of pesticide degradation in the environment. **Chemosphere**, vol. 296, 2022. DOI 10.1016/j.chemosphere.2022.133916.

GONÇALVES, C. R.; DELABONA, P. da S. Strategies for bioremediation of pesticides: challenges and perspectives of the Brazilian scenario for global application – A review. **Environmental Advances**, vol. 8, p. 100220, Jul. 2022. DOI 10.1016/j.envadv.2022.100220.

HU, K.; DENG, W.; ZHU, Y.; YAO, K.; LI, J.; LIU, A.; AO, X.; ZOU, L.; ZHOU, K.; HE, L.; CHEN, S.; YANG, Y.; LIU, S. Simultaneous degradation of β -cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by *Eurotium cristatum* ET1, a novel “golden flower fungus” strain isolated from Fu Brick Tea. **Microbiology Open**, vol. 8, no. 7, 12 Jul. 2019. DOI 10.1002/mbo3.776.

KUMAR, M.; YADAV, A. N.; SAXENA, R.; PAUL, D.; TOMAR, R. S. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 31, p. 101883, Jan. 2021. DOI 10.1016/j.bcab.2020.101883.

MACHADO, H. G.; SANCHES-NETO, F. O.; COUTINHO, N. D.; MUNDIM, K. C.; PALAZZETTI, F.; CARVALHO-SILVA, V. H. “Transitivity”: A Code for Computing Kinetic and Related Parameters in Chemical Transformations and Transport Phenomena. **Molecules**, vol. 24, no. 19, p. 3478, 25 Sep. 2019. DOI 10.3390/molecules24193478.

PATHAK, V. M.; VERMA, V. K.; RAWAT, B. S.; KAUR, B.; BABU, N.; SHARMA, A.; DEWALI, S.; YADAV, M.; KUMARI, R.; SINGH, S.; MOHAPATRA, A.; PANDEY, V.; RANA, N.; CUNILL, J. M. Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review. **Frontiers in Microbiology**, vol. 13, 17 Aug. 2022. DOI 10.3389/fmicb.2022.962619.

PINTO, A. P.; SERRANO, C.; PIRES, T.; MESTRINHO, E.; DIAS, L.; TEIXEIRA, D. M.; CALDEIRA, A. T. Degradation of terbuthylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. **Science of The Total Environment**, vol. 435–436, p. 402–410, Oct. 2012. DOI 10.1016/j.scitotenv.2012.07.027.

RAJAK, P.; ROY, S.; GANGULY, A.; MANDI, M.; DUTTA, A.; DAS, K.; NANDA, S.; GHANTY, S.; BISWAS, G. Agricultural pesticides – friends or foes to biosphere? **Journal of Hazardous Materials Advances**, vol. 10, no. February, p. 100264, May 2023. DOI 10.1016/j.hazadv.2023.100264.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A. S.; PARIHAR, R. D.; DAR, O. I.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A. K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, vol. 1, no. 11, p. 1446, 21 Nov. 2019. DOI 10.1007/s42452-019-1485-1.

VAKSMAA, A.; GUERRERO-CRUZ, S.; GHOSH, P.; ZEGHAL, E.; HERNANDO-MORALES, V.; NIEMANN, H. Role of fungi in bioremediation of emerging pollutants. **Frontiers in Marine Science**, vol. 10, 6 Mar. 2023. DOI 10.3389/fmars.2023.1070905.

WANG, Y.; LI, H.; FENG, G.; DU, L.; ZENG, D. Biodegradation of diuron by an endophytic fungus *Neurospora intermedia* DP8-1 isolated from sugarcane and its potential for remediating diuron-contaminated soils. **PLOS ONE**, vol. 12, no. 8, p. e0182556, 15 Aug. 2017. DOI 10.1371/journal.pone.0182556.

XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and bioconversion of endrin by white rot fungi, *Phlebia acanthocystis* and *Phlebia brevispora*. **Mycoscience**, vol. 60, no. 4, p. 255–261, Jul. 2019. DOI 10.1016/j.myc.2019.04.004.

XIAO, P.; KONDO, R. Biodegradation and biotransformation of pentachlorophenol by wood-decaying white rot fungus *Phlebia acanthocystis* TMIC34875. **Journal of Wood Science**, vol. 66, no. 1, p. 2, 16 Dec. 2020. DOI 10.1186/s10086-020-1849-6.