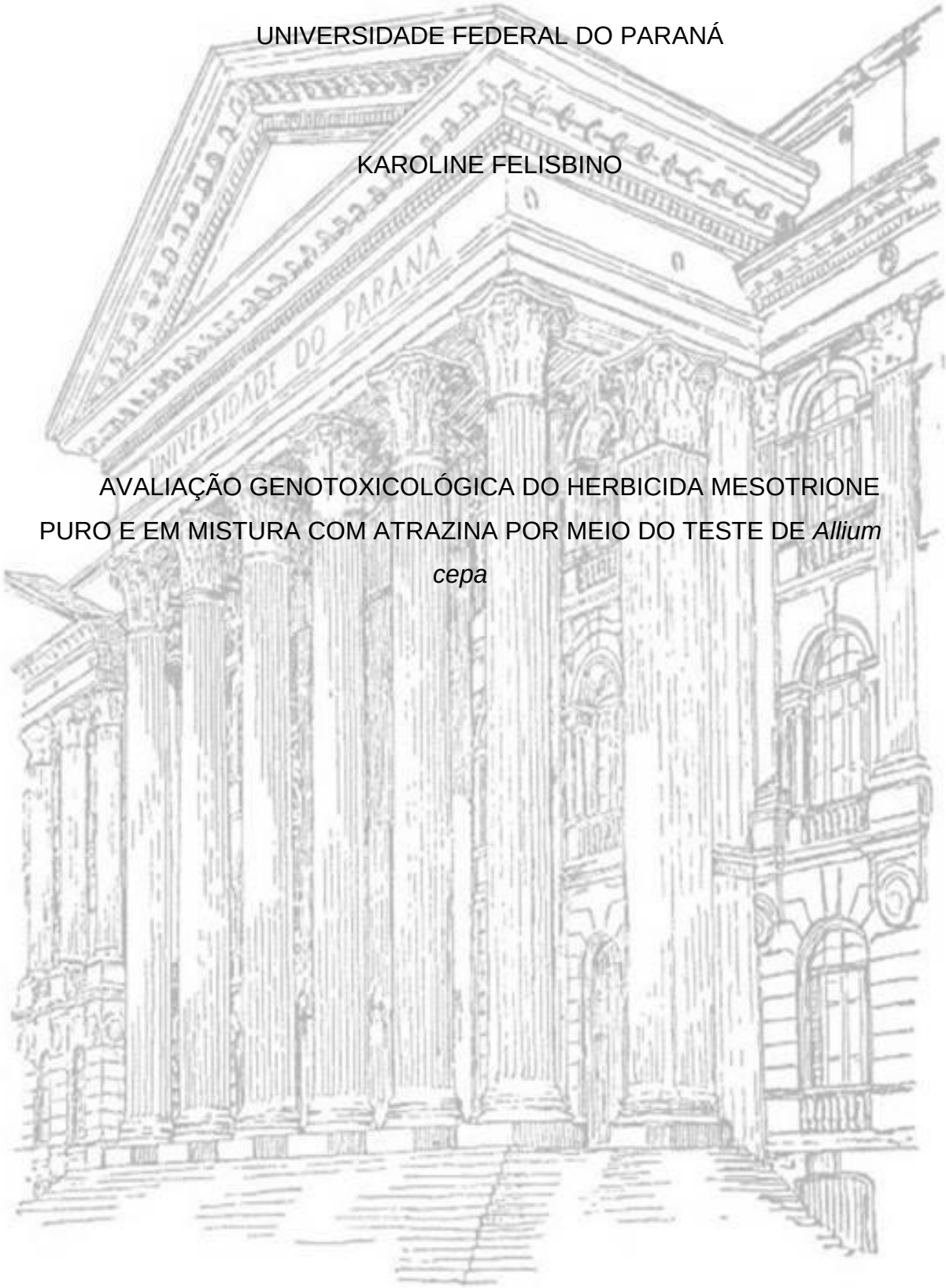
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KAROLINE FELISBINO



AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA DO HERBICIDA MESOTRIONE PURO E EM MISTURA COM ATRAZINA POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa*

CURITIBA

2016

KAROLINE FELISBINO

AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA DO HERBICIDA MESOTRIONE PURO E EM MISTURA COM ATRAZINA POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Morais Leme
Coorientadora: Profa. Dra. Marta Margarete Cestari

CURITIBA

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

PARECER

Os abaixo assinados, membros da banca examinadora da defesa de dissertação de mestrado, a qual se submeteu **KAROLINE FELISBINO**, para obtenção do título de Mestre em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética são de parecer que se aprove a candidata.
Secretaria da Coordenação do Programa do Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 29 de março de 2016

Doutor Bruno Francisco Sant'Anna dos Santos
Universidade Federal do Paraná - Membro Titular

Doutora Taynah Vicari
Pós-doutoranda/Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Membro Titular

Doutora Daniela Morais Leme
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR - Presidente

Visto

Doutora Lupe Furtado Alle
Coordenadora
Programa de Pós-Graduação em Genética/UFPR

Lupe Furtado Alle
Coordenadora do PPG-GEN / UFPR
Matrícula 200309

Centro Politécnico - Jardim das Américas - Caixa Postal 19071 - CEP 81531-980 - Curitiba, Brasil
Tel (+41) 33611587 / 33611684 – *Fax* (+41) 33611793 – *e-mail* ppg-gen@ufpr.br

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcuta

Dedico este trabalho a Deus, que nunca falta, e sempre me abençoa com sabedoria, paciência e amor.

A minha família, que tanto amo:
Aos meus pais, pois nada seria sem eles.

Aos meus irmãos, pelo apoio, incentivos e por estarem sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Daniela Morais Leme, pela excelente orientação e dedicação.

À Prof. Dra. Marta Margarete Cestari, pela oportunidade maravilhosa, e por esses 3 anos de ensinamento e inspiração.

Aos professores da pós do departamento de genética, todos excelentes educadores, terão eternamente minha admiração.

Aos professores membros das bancas pelas colaborações.

Ao Murilo Odilon Nichele Scroccaro, por ser um ótimo secretário, sempre resolvendo os problemas e muito dedicado.

*Gostaríamos de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (*CAPES*) por apoiar nosso trabalho.*

Aos professores da Universidade Positivo do curso de Ciências Biológicas, por me incentivarem a fazer o mestrado e a amar ainda mais a profissão.

A prof. Dra. Danielle Malheiros, que me orientou no TCC na graduação. Me ensinou tanto, sendo essa pessoa maravilhosa e amiga. Tenho uma admiração enorme e sempre vou guardar no coração com todo carinho. Obrigada pelo apoio e incentivo.

A todos do Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR, por estarem sempre disponíveis e dispostos a ajudar.

Ao pessoal do laboratório de Citogenética Animal e Mutagenese Ambiental. Aqueles que se tornaram meus eternos amigos, e amo de paixão, Juliana Roratto Lirola e Gabrieli Limberger Galvan. E também aqueles que eu admiro e que me ajudaram muito, Taynah Vicari, Rodrigo Disner, Tati Klingel, Laercio Piancini, Gustavo Souza, Ronaldo dos Santos e Cintya Motta.

Aos estagiários do laboratório, que sempre foram dispostos a aprender e a ajudar a todos.

Aos meus amigos de todas as horas, que mesmo nos vendo pouco por causa da correria da vida sempre estão em meus pensamentos, além de sempre me colocarem pra cima quando eu preciso, neste parágrafo são tantos que não citarei nomes, mas eles sabem bem.

A todos aqueles que me ajudaram de alguma forma, como vizinhos e colegas, em especial a Ana Elisa Oliveira.

Aos meus familiares que sempre se preocupam e torcem por mim. Amo a todos.

As minhas companheiras, Sandy e Fifi, que me fazem sorrir quando preciso.

Aos meus irmãos, que tanto amo. Sempre estão presentes e me ajudando em tudo que podem, além de todo amor, amizade, respeito e confiança. Melhores irmãos que alguém poderia ter (Tayná, Giovana e Thiago Felisbino).

Aos meus amados pais, Wilmar e Rosane Felisbino. Sem eles eu nada seria. São tudo pra mim, eu não tenho nem palavras pra agradecer tanto amor e dedicação. Apenas posso dizer que Deus me deu os melhores pais do mundo todo, e que eu sou muito feliz por eles existirem. Deram-me tudo que eu precisei na vida, coisas materiais, sentimentais e a melhor família.

Obrigada ao Papai do céu, por todas as oportunidades e as bênçãos alcançadas. Por ter atendido minhas preces e me dado força nas vezes em que tive dificuldades.

Enfim, obrigada a todos que me ajudaram, me incentivaram e que torceram pelo meu sucesso profissional.

RESUMO

O uso em larga escala de praguicidas vincula-se a necessidade de controle de organismos indesejados (pragas) em áreas agrícolas e urbanas. Dentre os praguicidas, a classe dos herbicidas é a mais utilizada. A Atrazina (ATZ) é um herbicida da classe das triazinas empregada no combate a plantas daninhas, principalmente, em culturas de milho e cana-de-açúcar. No entanto, efeitos adversos a organismos não alvos têm sido relatado para este herbicida, o que resultou em sua proibição em países da Comunidade Europeia. Desta forma, alternativas a ATZ têm sido desenvolvidas, como o herbicida Mesotrione (MES). Diferentemente da ATZ, pouco se sabe sobre os possíveis efeitos nocivos do MES aos organismos vivos. É importante ressaltar que os herbicidas também podem ser aplicados em misturas para aumentar a eficiência no combate às pragas. Já há relatos na literatura do uso combinado de ATZ e MES em áreas agrícolas de países que não tiveram a ATZ banida. Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e o potencial de indução de danos no DNA do herbicida MES puro e em mistura com a ATZ por meio do teste de *Allium cepa*. Para isso, sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em diferentes concentrações de MES (1,8; 7; 30; 115 e 460 µg/L) e ATZ (1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg/L) e a 3 misturas destes herbicidas, como segue: ATZ 1,5 µg/L + MES 1,8 µg/L (M1); ATZ 6,25 µg/L + MES 7 µg/L (M2); ATZ 25 µg/L + MES 30 µg/L (M3). As análises estatísticas (Mann-Whitney) foram realizadas comparando o índice mitótico (IM), frequência de aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) dos tratamentos com os resultados do controle negativo (CN). Dos resultados obtidos, efeitos citotóxicos não foram evidenciados para o MES, uma vez que não houve uma redução significativa do IM. Assim como para mutagenicidade e genotoxicidade, também não foi observado aumento ou redução significativa nos resultados. Quanto a ATZ, este herbicida mostrou ausência de citotoxicidade, porém, seus efeitos genotóxicos já relatados na literatura foram confirmados. O MES isolado não apresentou periculosidade nas condições testadas, podendo ser uma alternativa menos nociva ao uso da ATZ. Contudo, estudos toxicológicos adicionais, empregando outros sistemas teste (e.g. mamíferos), são necessários para uma melhor estimativa dos possíveis efeitos adversos do

herbicida MES a organismos não alvos. Em relação as misturas, foi observado um aumento significativo no IM apenas para M1. As misturas M1 e M3 quando comparadas ao CN, demonstraram um aumento significativo de AC. No entanto, para análise de células com MN, todas as misturas apresentaram diferença significativa em relação ao CN. Portanto, as misturas de ATZ + MES nas concentrações testadas, demonstraram maiores efeitos nocivos na espécie *A. cepa* do que as concentrações isoladas. Os resultados de MN demonstram que há então um efeito aditivo entre os herbicidas, já que para ambos não havia indicativo de mutagenicidade, com exceção de ATZ na maior concentração (400 µg/L) que não foi avaliada em mistura. Com isso, os herbicidas em misturas complexas se tornam mais nocivos aos organismos não alvos. Além disso, esses resultados também indicam que se devem averiguar melhor o uso de MES, já que este herbicida se torna mais nocivo quando em associação.

Palavras-chave: contaminação ambiental; praguicidas; plantas não alvos; citotoxicidade; danos no DNA.

ABSTRACT

Use large-scale pesticide is linked to the need to control unwanted organisms (pests) in agricultural and urban areas. Among the pesticides, the class of herbicides stands out as the use. Atrazine (ATZ) is a class of herbicidal triazines employed in combatting weeds, especially in crops of maize and sugarcane. However, adverse effects to non-target organisms have been reported for this herbicide, which resulted in a ban in the European Community countries. Thus, ATZ alternatives have been developed, such as herbicides mesotrione (MES). Unlike ATZ, little is known about the possible harmful effects of MES to living organisms. Importantly, herbicides can also be applied in mixtures to increase efficiency in the fight against pests. Already there are reports in the literature of the combined use of ATZ and MES in agricultural areas of countries that did not have the ATZ banned. Based on these, this study aimed to evaluate the cytotoxic effects and the potential for damage induction in DNA pure MES herbicide and mixed with ATZ through the *Allium cepa* test. For this purpose, seeds of *A. cepa* underwent germination MES at different concentrations (1.8; 7; 30; 115 and 460 mg / L) and ASW (1,5; 6,25; 25; 100 and 400 ug / G) 3 and mixtures of these herbicides, as follows: ATZ 1.5 g / L MES + 1.8 mg / L (M1); ATZ 6.25 g / L MES + 7 g / L (M2); ATZ 25 g / L MES + 30 g / L (M3). Statistical analysis (Mann-Whitney) were performed comparing the mitotic index (MI), frequency of chromosomal aberrations (CA) and micronuclei (MN) of treatment with the results of negative control (NC). From the results obtained, Cytotoxic effects were not shown in the MES, once there was not a significant reduction in the MI. As for mutagenicity and genotoxicity, no significant increase or reduction in the results was also observed. As for ATZ, this herbicide showed no cytotoxicity, but their genotoxic effects already reported in the literature were confirmed. The MES isolated did not show hazardous conditions tested except the concentrations 7 and 115 mg / L, may be a less harmful alternative to using the ATZ. However, additional toxicological studies using other test systems (e.g. mammals) are needed to better estimate the possible adverse effect of the herbicide MES non-target organisms. For mixtures, there was a significant increase in MI M1 only. The M1 and M3 mixtures when compared to the CN, showed a significant increase in AC. However, for cells with MN analysis, all blends

showed significant difference compared to the CN. Therefore, mixtures of ATZ + MES in concentrations showed greater adverse effects on species A. strain of the isolated concentrations. The results demonstrate that the MN then there is an additive effect between the herbicides, both as to there was not indicative of mutagenicity, except ATZ in higher concentration (400 µg/L) that has not been evaluated in combination. Thus, the herbicides in complex mixtures become more harmful to non-target organisms. In addition, these results also indicate that the use of MES should be better investigated, since this herbicide becomes more harmful when in association.

Keywords: environmental contamination; pesticides; non-target plants; cytotoxicity; DNA damage.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PRAGUICIDAS 17
2.1.1 ATRAZINA 18
2.1.2 MESOTRIONE 20
2.1.3 MISTURAS DE HERBICIDAS 22
2.2 PLANTAS NÃO ALVOS 23
2.3 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE AMBIENTAL UTILIZANDO VEGETAIS SUPERIORES - ENFÂSE NO TESTE DE *Allium cepa* 25
2.3.1 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS 27
2.3.2 MICRONÚCLEO 28
3. OBJETIVOS 30
4. MATERIAIS E MÉTODOS 31
4.1 Material 31
4.2 Preparo das amostras teste 31
4.3 Bioensaios com sementes de A. cepa (tratamento contínuo) 31
4.4 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* 32
4.5 Análise dos resultados 32
ARTIGO 1 34
AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA DO HERBICIDA MESOTRIONE PURO E EM MISTURA COM ATRAZINA POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa* 34
5. CONCLUSÕES GERAIS 48
6. REFERENCIAS 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema do teste de *A. cepa.* 33

Figura 2: Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos herbicidas Mesotrione (MES) e Atrazina (ATZ) e suas misturas. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alterações em células meristemáticas de Allium cepa expostas aos herbicidas Mesotrione e Atrazina em suas formas isoladas. 41

Tabela 2: Tipos de Aberrações Cromossômicas e Anormalidades Nucleares observadas em células meristemáticas de Allium cepa expostas ao herbicida Atrazina. 43

Tabela 3: Alterações em células meristemáticas de Allium cepa expostas às misturas dos herbicidas Mesotrione e Atrazina. 46

Tabela 4: Tipos de Aberrações Cromossômicas e Anormalidade Nucleares observadas em células meristemáticas de Allium cepa expostas às misturas de Mesotrione e Atrazina. 47

LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Aberrações Cromossômicas
AN – Alterações Nucleares
ATZ – Atrazina
CN – Controle Negativo
CP – Controle Positivo
HPPD - 4-hidroxifenilpiruvato
IA – Ingrediente Ativo
IM – Índice Mitótico
M1 – Mistura 1
M2 – Mistura 2
M3 – Mistura 3
MES – Mesotrione
MMS – Metil Metanosulfanato
MN – Micronúcleos
VPM – Valor Máximo Permitido

1. INTRODUÇÃO

As atividades antrópicas têm como resultado a liberação de diferentes poluentes ao meio ambiente. Tal fato é motivo de preocupação de órgãos governamentais e pesquisadores, uma vez que pode ocorrer um comprometimento da qualidade dos ecossistemas e saúde dos organismos vivos (CAJARAVILLE et al., 2000).

Poluentes aquáticos são provenientes de diversas fontes, como efluentes industriais, doméstico e agrícolas (RASHED, 2001), sendo os herbicidas o grupo de praguicidas mais utilizado em todo mundo (COLE et al., 2000; CASSAL et al., 2014), no combate de ervas daninhas.

O herbicida atrazina (ATZ) proporciona a eliminação de plantas daninhas ao interromper a fotossíntese e foi largamente utilizado em todo o mundo durante as últimas décadas (ISLAM et al., 2002), porém, já foi banido pela Comunidade Europeia, devido à sua periculosidade já demonstrada na literatura (SALABERRIA et al., 2009). No Brasil, a ATZ ainda é utilizada (MOREIRA, et al., 2014).

Outros herbicidas, como sulcotrione e mesotrione (MES), vêm sendo estudados para substituir a ATZ (BONNET et al., 2008). O MES é um aleloquímico eficaz no combate de plantas daninhas que interfere na respiração celular da planta, levando à morte. No entanto, são poucos os dados disponíveis sobre os efeitos nocivos do MES aos organismos vivos não alvos (MITCHELL et al., 2001; BONNET et al., 2008). Adicionalmente, trabalhos com vegetais são ainda mais escassos, por isso o presente trabalho se torna pioneiro para a avaliação de efeitos nocivos do herbicida MES em plantas.

Contudo, um determinado xenobiótico pode apresentar diferentes efeitos quando em associação a outros poluentes presentes no ambiente. Assim, amostras ambientais são categorizadas como misturas complexas e, efeitos aditivos e/ou sinérgicos devem ser também considerados na avaliação toxicológica de xenobióticos (ALTENBURGER et al., 2015).

Em países que não tiveram o uso banido de ATZ, misturas de herbicidas, como ATZ em associação ao MES, têm sido utilizadas como uma alternativa mais eficaz no combate de plantas daninhas resistentes (BELFRY;

SIKKEMA, 2015). Além disso, mesmo aplicados separadamente nas culturas, os herbicidas podem se combinar no ambiente, originando misturas complexas, principalmente quando se trata de poluentes persistentes. A longa persistência da ATZ (BOLOGNESI, 2003; DOUGLASS et al., 2014) faz com que este herbicida ainda seja encontrado no ambiente mesmo após seu uso banido. Desta forma, estudos toxicológicos que visem avaliar não apenas herbicidas em suas formas isoladas, mas também em misturas, são necessários com o intuito de estimar efeitos aditivos e/ou sinérgicos.

Os diferentes habitats podem ser expostos por diversos praguicidas, (HUIYUN et al., 2009; FERNANDEZ; GARDINALI, 2016), onde há uma alta biodiversidade muito importante para o ecossistema (OLSZYK et al., 2004; NASH et al., 2005). Com isso, pode gerar acumulo dessas substâncias em sedimentos e seres vivos (HAN, et al., 2009; MAGNUSSON, et al., 2013).

As plantas são de extrema importância para o ecossistema, por serem a base da cadeia alimentar e fornecer energia aos seres vivos não fotossintetizantes (SCHMITZ, et al., 2015). Por isso, quando estes organismos são expostos a herbicidas ocorre um prejuízo na qualidade dos alimentos de herbívoros e consequentemente de predadores maiores. Portanto, para que ocorra uma proteção eficiente ao meio ambiente e conservação da biodiversidade estudos em plantas não alvos devem ser realizados (SCHMITZ, et al., 2015).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR PRAGUICIDAS

O Brasil é o maior consumidor de praguicidas do mundo. Desta forma, se faz necessário o monitoramento da quantidade desses compostos nos recursos hídricos, principalmente os destinados ao abastecimento público. Além disso, o Brasil ainda mantém uso de praguicidas que já foram banidos em outros países, ou seja, no mínimo de 10 produtos proibidos na União Europeia (UE), Estados Unidos, China e outros países ainda estão em uso no Brasil (ANVISA, 2012).

Há no Brasil uma legislação sobre o uso de praguicidas, e se fosse aplicada com rigor minimizaria os riscos e danos causados por essas substâncias. Junto a isso há um alto custo de análises, além de uma falta de estrutura e comunicação entre os envolvidos, no comércio, uso e controle destes praguicidas (LONDRES, 2011; BARBOSA et al., 2015).

A lei proíbe os registros de agrotóxicos quando: revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica; se revelem mais perigosos para o homem do que os testes de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados; e cujas características causem danos ao meio ambiente (BRASIL, 1989).

Além disso, os registros de praguicidas têm prazo indeterminado e a reavaliação toxicológica de produtos comercializados não é uma prática comum como em outros lugares do mundo, tal como na Comunidade Europeia e Estados Unidos. Aliás, a fiscalização inadequada em nosso país e o uso indiscriminado dessas substâncias (LONDRES, 2011), acarretam em diversos problemas para o ambiente e organismos vivos, até mesmo para os próprios agricultores (KÖRBES et al., 2010).

É importante salientar que o impacto de um praguicida depende de diferentes fatores, como o modo de dispersão, concentração e a toxicidade do composto (WERF, VAN DER, 1996). São diversos os efeitos causados por

praguicidas, como interação direta com o DNA, incorporação no material genético durante a replicação, problemas no fuso mitótico ou meiótico, entre outros (TIMBREL, 2002). Além disso, os praguicidas podem seguir um caminho de ar, solo, águas superficiais até águas subterrâneas, além de possuírem um poder de acumulação (OLSZYK et al., 2004). Levando em consideração que o ambiente aquático quando exposto a praguicidas pode levar a um desequilíbrio no crescimento de populações da flora e fauna, essas substâncias requerem controle específico de distribuição, comercialização e utilização (CONAMA, 2009).

2.1.1 ATRAZINA

A ATZ (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é considerada um herbicida sistêmico e seletivo e sua atuação é no controle pré e pós-emergente em plantas daninhas de folhas largas em culturas de aspargo, milho, sorgo, cana-de-açúcar e abacaxi (JAVARONI et al., 1999).

Este herbicida é um dos componentes mais utilizados na agricultura no combate de plantas indesejadas (ELDRIDGE et al., 1999; ACKERMAN, 2007). Sua atuação é no bloqueio da fotossíntese no fotossistema II das plantas daninhas, sendo interrompido o transporte de elétrons, o que resulta em uma falha da respiração e, consequentemente, a morte da planta (THOMPSON et al., 1974).

A ATZ foi introduzida no mercado em 1950 e banida na Europa em 2004, porém, em outros países o uso desse herbicida é contínuo e preocupante (SALABERRIA et al., 2009). Além disso, alguns anos atrás a ATZ já era um dos contaminantes ambientais mais comuns encontrados em águas de superfície e subterrâneas (COVA et al., 1989), porém estudo atual como de Gupta et al. (2015) demonstraram que a ATZ ainda vem se mostrando o herbicida mais utilizado do mundo.

No Brasil, a ATZ é considerada um dos 10 praguicidas mais comercializados. No ano de 2009, um valor de 10.133,80 toneladas de Ingrediente Ativo (IA) foi vendido e este montante sofreu um aumento para 27.139,56 no ano de 2012 (IBAMA, 2012). Além disso, uma análise de cromatografia líquida, realizada com 64 amostras de rios e água potável do

estado de São Paulo, mostrou que a ATZ é o contaminante mais abundante quando comparada a 12 outros praguicidas analisados (MONTAGNER et al., 2014).

A ATZ apresenta tempo de meia vida de 10 meses a 5 anos e, devido a sua alta persistência no ambiente (COMBER, 1999; DOUGLASS et al., 2014), diversos estudos tem como objetivo desenvolver métodos para remoção deste poluente dos ambientes impactados. Dentre os métodos de degradação da ATZ, há métodos baseados no uso de feixes de elétrons, que converte este herbicida em ácido cianúrico (XU et al., 2015) e métodos empregando microrganismos, como as bactérias, que promovem processos de biodegradação deste poluente (DOUGLASS et al., 2015; FANG et al., 2015).

Adicionalmente, sabe-se que a ATZ, apesar de ser um herbicida eficaz no combate a plantas daninhas, induz diferentes efeitos nocivos a organismos vivos. Células meristemáticas de raízes de *A. cepa* e *V. faba* foram expostas a ATZ em concentrações pelo menos 2325 vezes maiores do que a máxima avaliada no presente trabalho e foi observado um decréscimo progressivo de Índice Mitótico conforme o aumento da concentração (EI-GHAMERY, et al., 2000). Entretanto, em outro trabalho realizado com *A. cepa* em concentrações próximas as utilizadas neste estudo (7,5 µg/L) foi observada nenhuma alteração na avaliação de IM (MASTRANGELO et al., 2006).

Assim como verificado neste estudo, diversos outros trabalhos realizados com ATZ demonstram que o herbicida causa efeitos genotóxicos em diferentes organismos, tal como em humanos, avaliado a partir da análise em células sanguíneas, por meio de cultura de linfócitos (em concentrações 250 vezes maiores do que 400 µg/L) e mamárias (sendo a menor concentração avaliada por eles um valor de 2,5 vezes a mais do que a maior concentração de nosso trabalho), porém ambos em concentrações superiores as avaliadas em nosso estudo (RIBAS, et al., 1998; HUANG, et al., 2015). ATZ também induz genotoxicidade no fungo *Neurospora crassa* (GRIFFITIS, 1979), em peixes das espécies *Oreochromis niloticus*, com observou resultados significativos nas concentrações 6,25; 12,5 e 25 µg/L (as mesmas avaliadas no presente estudo) (VENTURA, et al., 2008) e *Rhamdia quelen* por

meio do ensaio cometa em eritrócitos, que demonstrou efeito em concentrações 5 vezes superiores as nossas (PIANCINI, et al., 2015a).

Em vegetais, dados como aumento na quantidade de material genético, células multinucleadas, perdas e ganhos cromossômicos e outras anormalidades em células de grãos de pólen (LIANE et al., 1967). Em milho, plântulas expostas a altas concentrações de ATZ apresentaram AC do tipo quebras, pontes, atrasos e células poliplóides (POPA et al. 1986). Em *A. cepa,* Srivastava e Mishra (2009) observaram AC em resposta ao ATZ em concentrações 37,5 vezes mais elevadas do que as empregadas no presente trabalho.

Por exemplo, *C. auratus* (peixe dourado) expostos até 15 µg/L (um pouco mais que o dobro da concentração 6,25 µg/L e 1,6 vezes menor do que a de 25 µg/L usadas no presente trabalho) de ATZ não demonstrou nenhuma diferença significativa em relação ao CN (CAVAS, 2011). No entanto, em concentrações superiores as avaliadas em estudos, com *Channa punctatus* (NWANI et al., 2011) e ratos Wistar, a ATZ demonstraram aumentos significativos de MN comparados ao CN (CAMPOS-PEREIRA et al., 2012).

Em plantas, como *Tradescantia* não parece ser diferente, já que em exposição a altas concentrações (ao menos 2,5 vezes maior que a máxima do presente estudo) de ATZ foi observado aumento significativo no teste de MN (MOHAMMED; MA, 1999). Tal como na espécie *V. faba* que em contato ao herbicida ATZ demonstrou a indução de MN dependente da dose (sendo a menor delas 437,5 vezes maior do que a nossa maior concentração avaliada) (MARCO, et al., 1992).

2.1.2 MESOTRIONE

O herbicida MES (membro da benzoylcyclohexane-1,3-diona), pertence ao grupo químico das Tricetonas. Este herbicida é obtido pelo isolamento de um aleloquímico leptospermone secretado por *Callistemon citrinus*, popularmente conhecido como escova-de-garrafa. São seletivos de milho, devido à rápida absorção da planta (MITCHEL et al., 2001). É um composto

eficaz no combate a plantas daninhas de folhas largas, as quais se mostraram resistentes a outros herbicidas (SUTTON et al., 2002). Este herbicida vem sendo utilizado em substituição a ATZ, já que a mesma tem sido banida em alguns países (STEVOVIC et al., 2008).

A persistência do MES no ambiente é baixa, sendo degradado em um período curto de tempo após sua aplicação (BARCHANSKA; RUSEK, 2012), tendo em vista que a meia vida deste herbicida é diferente conforme o meio, como água (89-97 dias), cera epicuticular (2-32 horas) (HALLE, et al., 2010) e solo (4-34 dias) (POSE-JUAN, et al., 2015).

Apesar disso, o herbicida ainda é encontrado no meio ambiente, por isso técnicas de remoção realizadas tem demonstrado eficiência, tais como processos de oxidação (BENSALAH et al., 2011; JOVIC et al., 2013) e biodegradação por bactérias (DURAND et al., 2006).

O MES atua na inibição de 4-hidroxifenilpiruvato (HPPD) no combate a plantas daninhas (MITCHEL et al., 2001). HPPD é uma enzima que faz a conversão de tirosina em pastoquinona e α-tocoferol (MORAN, 2005). Ao inibir a atividade enzimática de HPPD, ocorre acúmulo de tirosina em quantidades relativamente tóxicas e, consequentemente, a redução de pastoquinona. A redução de pastoquinona, por sua vez, interfere na biossíntese dos carotenóides e fotoproteção das plantas, o que resulta no branqueamento dos tecidos (COLE et al., 2000). A fotossíntese também é afetada pela diminuição no transporte de elétrons, o que leva a formação de radicais livres, os quais atuam na peroxidação de diferentes componentes celulares (*e.g.* membranas, proteínas, pigmentos, DNA, etc), acarretando na morte celular (FUERST; NORMAN, 1991).

Ao contrário da ATZ, são poucos os dados na literatura sobre os efeitos nocivos do MES aos organismos vivos não alvos. No entanto, um estudo de avaliação da capacidade de indução de estresse oxidativo e danos no DNA em peixes (*Oreochromis niloticus*; *Geophagus brasiliensis*) expostos por 96 horas, demonstrou que a concentração relevante ambientalmente (1,8 µg/L) não apresentou efeitos adversos quanto aos biomarcadores avaliados. No entanto, a exposição dos peixes a concentrações de MES superiores ou iguais a 7 µg/L resultaram na indução de estresse oxidativo e danos no DNA

(PIANCINI et al., 2015b). Vale ressaltar que, o teste de cometa utilizado pelo autor, analisa quebras genômicas, ou seja, fragmentos cromossômicos, que podem vir a formar mutações após serem processadas e não reparadas (GONTIJO et al,. 2003).

Segundo Bonnet et al. (2008), o herbicida MES apresentou menor toxicidade em *T. pyriformis*, mas uma toxicidade igual ou superior em *V. fischeri* quando comparada a ATZ. No entanto, no que diz respeito a fitotoxicidade, a ATZ é capaz de induzir efeitos genotóxicos/mutagênicos no sistema teste de *A. cepa*, como aqui reportado e em outros trabalhos encontrados na literatura (EI-GHAMERY et al., 2000; BOLLE et. al., 2004).

2.1.3 MISTURAS DE HERBICIDAS

A contaminação ambiental se dá pela presença de xenobióticos provenientes de diversas fontes. Com isso, contaminantes presentes no ecossistema, seja este aéreo, aquático ou terrestre, não se encontram isolados, o que resulta na exposição dos organismos vivos a misturas complexas (JHA, 2008).

Substâncias químicas altamente persistentes podem ser misturadas a contaminantes distintos mesmo após seu uso já ter sido banido, o que pode ser considerado uma forma não proposital da formação de misturas complexas no ambiente (LONDRES, 2011). Além disso, diversas substâncias são liberadas já em associação ao ambiente. Portanto, essas misturas compostas de diferentes substâncias químicas de efeitos específicos para cada organismos, que são utilizadas normalmente em áreas agrícolas, podem ser transportadas pelos corpos d’água e apresentar riscos para espécies que não sejam alvo destas (SHINN, et al., 2015).

O uso de herbicidas em associação leva a um melhor controle das plantas daninhas (ZAGONEL; FERNANDES, 2007). Por exemplo, o uso de ATZ em associação ao MES, ou outros herbicidas, são utilizados no combate de plantas daninhas resistentes a herbicidas em suas formas isoladas (CREECH et al., 2004; BELFRY; SIKKEMA, 2015).

Dados existentes na literatura mostram o uso combinado de ATZ e MES no controle de plantas daninhas (ARMEL et al., 2005; HUGIE et al., 2008), principalmente naquelas resistentes ao herbicida ATZ aplicado isoladamente (WOODYARD et al. 2009). No entanto, além da eficácia em eliminar as plantas daninhas, a mistura entre herbicidas, principalmente inibidores de HPPD juntamente com inibidores de fotossistema II, como MES e ATZ respectivamente, vem sendo comumente utilizada para manter a qualidade do crescimento e produtividade dos pés de milhos, já que herbicidas isolados têm prejudicado a saúde, reprodução e crescimento dessas culturas (CHOE et al., 2014; YU et al., 2015).

Adicionalmente, como foi dito anteriormente sobre contaminantes de longa persistência, a ATZ é um exemplo (BOLOGNESI, 2003; DOUGLASS et al., 2014), já que ela pode acabar se misturando a outros herbicidas, como MES, o qual é utilizado como substituto da ATZ em países que o uso já foi banido (BONNET et al., 2008; STEVOVIC et al., 2008). Entretanto, a toxicidade de misturas complexas não é avaliada pela soma dos efeitos de cada produto, pois os contaminantes podem apresentar diferentes efeitos quando em associação a outros poluentes presentes no ambiente. Assim, amostras ambientais categorizadas como misturas complexas podem ter efeitos aditivos, quando o efeito da mistura é o mesmo da soma de cada contaminante em sua forma isolada, e/ou sinérgicos, quando há um aumento no efeito de um agente quando em associação a outro (ALTENBURGER et al., 2015). Portanto, mesmo que o resultado sinérgico do uso de misturas de praguicidas pareça uma alternativa mais eficiente, a segurança ambiental é posta em risco (TORNISIELO et al., 2013).

2.2 PLANTAS NÃO ALVOS

Estudos têm demonstrado que herbicidas, incluindo ATZ, podem inibir a síntese de clorofilas de plantas no meio aquático (HUIYUN et al., 2009), entre outros organismos não alvos de regiões submersas de águas marinhas. Além de demonstrar um nível elevado de acumulação, em tecidos e na água

(FERNANDEZ; GARDINALI, 2016), os sedimentos também podem estar comprometidos (MAGNUSSON, et al., 2013).

No ambiente terrestre a contaminação do solo por praguicidas acaba expondo diversos organismos que habitam o local, principalmente as plantas, as quais muitas vezes não são de fato o alvo específico do contaminante (HAN, et al., 2009). Logo, locais com uma alta biodiversidade muito importante para o ecossistema são frequentemente prejudicados com a presença dessas substâncias nesse ecossistema (NASH et al., 2005).

A aplicação de um herbicida tem por consequência a exposição não apenas dos organismos desejados, mas também de diferentes organismos não alvos, como as plantas que habitam o local, mas não prejudicam a plantação em si. Além disso, a utilização de praguicidas pode interferir no crescimento, reprodução, extinção local de alguns organismos e prejudicar a qualidade dos alimentos de herbívoros de forma direta, ou agir de forma indireta em predadores maiores. Tal fato torna relevante o estudo dos danos causados a plantas não alvos para a proteção do meio ambiente e conservação da biodiversidade (SCHMITZ et al., 2015). Vale ressaltar ainda que os herbicidas podem atingir as plantas pelo ar, assim como pelo transporte por meio da água e do solo (OLSZYK et al., 2004) e seus efeitos podem se dar por diferentes formas, fases de reprodução e tempos de exposição (BOUTIN, et al., 2014).

Outro ponto importante que ressalta a importância de estudos de em plantas não alvos, é a diferença que os organismos apresentam quanto à suscetibilidade aos efeitos nocivos causados por xenobióticos. Alguns vegetais podem ser mais sensíveis do que outros e, consequentemente, podem responder de forma diferente frente a um determinado agente químico, o que leva a diferenças na avaliação de risco em diferentes plantas (WHITE; BOUTIN, 2007).

Contudo, os herbicidas podem causar diversos efeitos nocivos em plantas não alvos, como a diminuição do comprimento das raízes (QI, et al., 2015); citotoxicidade (EI-GHAMERY et al., 2000); indução de alterações no material genético (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009) e mais drasticamente podem prejudicar a produtividade das culturas, assim como levar a extinção

de uma espécie. Todos estes fatores conferem um alto risco ambiental quanto ao uso de herbicidas em relação a vegetais não alvos.

2.3 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE AMBIENTAL UTILIZANDO VEGETAIS SUPERIORES: ENFÂSE NO TESTE DE *Allium cepa*

Os vegetais são importantes organismos modelo utilizados para a avaliação da genotoxicidade de poluentes (MAJER et al., 2005). O uso de vegetais superiores nos estudos de monitoramento ambiental é muito vantajoso por ser rápido, barato e relativamente fácil, quando comparado a outros ensaios (*e.g.* peixes), além de não haver necessidade de processamento da amostra e com isso poder trabalhar com a amostra bruta, ou seja, permite trabalhar com amostras contendo poluentes dispersos, sem necessidade de extração do composto em si, além de não haver necessidade de processos de esterilização como em ensaios como cultivo celular.

A avaliação de genotoxicidade em vegetais superiores permite adicionalmente, avaliar diversos *endpoints* genéticos que podem ser observados num organismo inteiro ou em órgãos específicos (GRANT, 1994). Como testes de aberrações cromossômicas (AC), micronúcleo (MN) e lesões primárias no DNA (Ensaio Cometa) que são os mais empregados e adequados para o monitoramento ambiental com uso de plantas como sistema-teste (YILDIZ et al., 2009).

Além disso, os vegetais são seres eucariontes, e seu material genético assemelha-se ao de animais, o que possibilita uma melhor comparação entre estes dois grupos de organismos. Há uma complexidade estrutural e química nas células eucariontes, como presença de envoltório nuclear, proteínas histonas, citoesqueleto e organelas o que as diferenciam das células procarióticas na divisão celular e também na propensão a mutações, sendo as células eucarióticas menos propensas devido à alta complexidade dos mecanismos de reparo (GRANT, 1994).

Além da capacidade de detecção de mutágenos diretos, estudos demonstram que os vegetais superiores dispõem de um sistema de

metabolização de xenobióticos, o qual é capaz de converter pro-mutágenos em mutágenos (HIGASHI, 1988; PLEWA et al., 1996; COTELLE et al., 1999; FATIMA; AHMAD, 2006; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

O protocolo do teste de *A. cepa* permite avaliar danos no DNA nas diferentes fases do ciclo mitótico, sem a necessidade de grande infraestrutura laboratorial. A região meristemática utilizada pelo teste de *A. cepa* é um material adequado para estudos citológicos, pois apresenta rápido crescimento e grande quantidade de células em divisão celular (FISKESJÖ, 1993).

Segundo Fiskesjö (1993), a espécie dispõe de excelentes condições cromossômicas com suas células somáticas diplóides, com 16 cromossomos distribuídos em 8 pares homólogos (2n=16). Além disso, o ensaio requer um tempo curto de preparação quando comparado a outros ensaios. O teste de *A. cepa* permite avaliar tanto a toxicidade, pela inibição da germinação e comprimento da raiz, quanto à genotoxicidade e mutagenicidade pela quantificação, respectivamente, de AC e micronúcleos (MN) (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, diferentes trabalhos avaliam outro parâmetro, que compreende a análise do Índice Mitótico (IM), *i.e.* a quantificação de células que se encontram nas fases da divisão celular, para a estimativa da citotoxicidade (FERNANDES et al., 2007; KUMARI et al., 2011).

Diferentes estudos já têm mostrado uma correlação na detecção de mutágenos entre plantas e outros sistemas teste (GRANT, 1978). Plantas, como *A. cepa* e *V. faba*, demonstraram pelo teste de AC e trocas de cromátides irmãs, uma correlação positiva em relação ao hamster chinês e linfócitos humanos (PAVLICA et al., 1991). Rank e Nielsen (1994) também conseguiram demonstrar uma correlação de 82% entre *A. cepa* e roedores realizando testes de carcinogenicidade. Desta forma, *A. cepa* se tornou um organismo modelo e de uso frequente em testes genéticos de monitoramento ambiental, devido à possibilidade de extrapolação dos resultados a outros organismos, como mamíferos (GRANT, 1982).

Ma e colaboradores (1995) realizaram um estudo comparativo de sensibilidade utilizando diferentes substâncias clastogênicas e demonstraram uma maior sensibilidade para *A. cepa* em relação a outros vegetais

superiores, como *V. faba*, na detecção de mutágenos. Desta forma, a alta sensibilidade na detecção de mutágenos associada à boa correlação com outros sistemas teste, tem destacado o uso de *A. cepa* em estudos de avaliação de diferentes poluentes ambientais (GRANT, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Atualmente, há muitos estudos que demonstram a eficácia da utilização do teste de *A. cepa* na avaliação de genotoxicidade ambiental, com as mais variadas substâncias, incluindo nanopartículas (KLANCNIK, et al., 2011), metais (SETH, et al., 2008), praguicidas (FERNANDES, et al., 2009; LIMAN, et al., 2015; BIANCHI, et al., 2016).

2.3.1 ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Alterações químicas ou físicas no DNA podem ser produzidas por compostos genotoxicantes presentes no ambiente (AKCHA et al., 2004). Devido à grande interferência de efeitos genotóxicos em relação a problemas ecológicos, a detecção e quantificação dos danos genéticos são de grande interesse para estudos ambientais. Além disso, os danos causados por substâncias genotóxicas levam a redução da biodiversidade e um risco mais elevado ao desenvolvimento de tumores (ZEGURA et al., 2009). A detecção de diferentes tipos de danos ao DNA são utilizadas como biomarcadores em estudos de avaliação de genotoxicantes (SHUGART, 1990). Dentre estes, os testes de AC são considerados de fundamental importância, visto que conseguem detectar efeitos precedentes de tumores (MATEUCA et al., 2006).

As substâncias potencialmente genotóxicas tendem a promover quebras no DNA como mecanismos de ação primária. Estas lesões podem ser reparadas e não induzir a formação de mutações. No entanto, ao invés de corrigidas, essas lesões podem se tornar irreversíveis e também proporcionar a morte celular (MAJER et al., 2005).

AC podem ser de dois tipos, estrutural ou numérica (KANNA; SHARMA, 2013). Dentre as AC que causam mudanças na estrutura dos cromossomos, como exemplo podemos citar os fragmentos cromossômicos, que podem ser resultantes de quebras cromossômicas, inibição do fuso ou replicação

alterada do DNA e pontes cromossômicas. Essas AC estruturais podem ser resultantes de quebras nos cromossomos, seguidas da união de fragmentos em novas posições, o que resulta em uma alteração da forma e/ou tamanho de um cromossomo. As AC numéricas podem ser consequências de segregações anormais, resultando em aneuploidias ou poliploidias, ou seja, ganho o perda de um ou mais cromossomos inteiros. Ambos os tipos de AC surgem espontaneamente ou por ação de genotoxicantes (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Sendo assim, as AC podem ser resultantes de dois modos diferentes de ação dos xenobióticos no material genético, clastogênico e/ou aneugênico (AL-SABTI; METCALFE, 1995). O modo de ação clastogênico se refere à indução de quebras cromossômicas, enquanto que o modo de ação aneugênico resulta em perdas cromossômicas, devido a deficiências no funcionamento da maquinaria do fuso mitótico. AC como aderências, multipolaridade e C-metáfases são resultados de problemas no fuso mitótico, sendo caracterizadas como AC aneugênicas (LEME; MARIN-MORALES, 2008). Desta forma, a análise de AC pode estimar, além da genotoxicidade, o modo de ação de um determinado xenobiótico, resultando em uma análise mais precisa sobre a periculosidade deste agente (RANK; NIELSEN, 1997).

2.3.2 MICRONÚCLEO

O Teste de MN teve início com o trabalho de Boller e Schmid (1970) em células de Hamster. Depois disso, Heddle (1973) usou o teste com roedores expostos a radiação e substituiu as técnicas convencionais de citogenética para avaliação de alterações cromossômicas. Além dos roedores, a técnica foi adaptada posteriormente para diferentes organismos, como humanos, peixes e vegetais superiores (GRANT, 1982; HOOFTMAN; DE RAAT, 1982; UEDA et al., 1992; FENECH, 2000).

MN são resultantes de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal das células filhas após o processo de divisão celular. Desta forma, o MN é visualizado como um pequeno núcleo desconectado do núcleo principal da célula, com a mesma

coloração e refrigência (RIBEIRO et al., 2003). Essas alterações são verificadas em células que retém a capacidade de divisão celular. Desta forma, este ensaio, apesar de suas vantagens sobre o teste de AC pois não necessita de um conhecimento cariotípico prévio do sistema teste, não é efetivo em células não proliferativas ou nas quais a cinética da divisão celular não seja bem conhecida e controlada (FENECH, 2000).

Além da detecção de mutagenicidade, o tamanho do MN pode contribuir para a determinação do modo de ação do agente teste. Isso está relacionado com o fato de que MN provenientes de eventos aneugênicos são maiores do que os resultantes de eventos clastogênicos (YAMAMOTO; KIKUCHI, 1980). No entanto, esse método só é preciso quando há uma regularidade em relação ao tamanho dos cromossomos, como na espécie *A. cepa*. Espécies que apresentam cromossomos irregulares quanto ao tamanho necessitam de técnicas adicionais, como a técnica de FISH, empregando sondas centroméricas e/ou teloméricas, para a definição do modo de ação clastogênico e/ou aneugênico pelo teste do MN (HEDDLE et al., 1991; FENECH, 2000; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3. OBJETIVOS

- O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos citotóxicos e a capacidade de indução de danos no DNA (genotoxicidade/mutagenicidade) do herbicida MES puro e em mistura com ATZ.

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho compreenderam:

- Avaliação da periculosidade do MES e ATZ nas formas puras em experimento dose-resposta quanto à citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC) e mutagenicidade (MN);
- Avaliação da periculosidade do MES e ATZ em misturas em experimento dose-resposta quanto à citotoxicidade (IM), genotoxicidade (AC) e mutagenicidade (MN).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os herbicidas avaliados foram mesotrione (MES - CAS nº 104206-82-8, pureza 99,5%, Sigma-Aldrich®) e atrazina (ATZ - CAS n° 1912-24-9, pureza 98.8%, Chem Service®).

Quanto ao material biológico, foram utilizadas sementes de *A. cepa* da variedade baia periforme e da marca Top Seed®.

4.2 Preparo das amostras teste

O MES foi diluído em água destilada e utilizado nas concentrações de 1,8; 7; 30; 115 e 460 µg/L, sendo que 1,8 µg/L é uma concentração ecologicamente relevante, pois é a concentração carreada a corpos d'água pela chuva (BARCHANSKA; RUSEK, 2012). As concentrações de ATZ utilizadas nesse trabalho: 1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg/L, sendo que a concentração de 25 µg/L é recomendada para uso em culturas de milho (VENTURA et al., 2008) e 1,5 µg/L é o valor aproximado da concentração máxima de agroquímicos permitida pela legislação brasileira (2 µg/L) para águas destinadas a preservação da vida aquática (CONAMA, 2005). Para as misturas foram preparadas soluções mãe de 4 mg/L diluídas em água destilada, para ATZ e MES, respectivamente. As concentrações foram definidas de acordo com as utilizadas para o ensaio dos isolados e que haviam relevância ambiental. Foram realizadas 3 misturas: Mistura 1 (M1), atrazina 1,5 µg/L + mesotrione 1,8 µg/L; Mistura 2 (M2), atrazina 6,25 µg/L + mesotrione 7 µg/L e Mistura 3 (M3), atrazina 25 µg/L + mesotrione 30 µg/L. Assim como as concentrações dos herbicidas testados isoladamente, as misturas foram preparadas utilizando água ultrapura.

4.3 Bioensaios com sementes de *A. cepa* (tratamento contínuo)

Sementes de *A. cepa*, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro (100 sementes/placa), foram submetidas à germinação em diferentes concentrações dos herbicidas MES e ATZ puros e a diferentes misturas destes herbicidas. Quando as raízes atingiram cerca de 2 cm de comprimento (5 dias), elas foram coletadas e fixadas em álcool ácido-acético (3:1–v/v) por 6 horas em temperatura ambiente. Após este tempo, realizou-se a troca por fixador recém-preparado, para armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas (Figura 1).

Todos os experimentos foram realizados em estufa incubadora BOD, com temperatura constante (25°C) e ausência de luz. Os tratamentos controles foram realizados em água ultrapura (CN - controle negativo) e em 10 mg/L de metil metanosulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich®) para o controle positivo (CP).

4.4 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa*

O teste de AC e MN em células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado de acordo Grant (1982) e Leme; Marin-Morales (2008).

As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram recobertos com lamínulas e, suavemente, esmagados em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética (Entellan®), para serem, posteriormente, analisadas.

4.5 Análise dos resultados

Para avaliar os danos celulares, 10 lâminas por tratamento foram preparadas. Aproximadamente 500 células por lâmina foram quantificadas, o que totaliza 5000 células por tratamento.

A determinação do número de células em divisão celular foi utilizada para estabelecimento do IM, o qual por sua vez é utilizado como indicativo de

citotoxicidade. A genotoxicidade foi determinada pela observação e quantificação de qualquer tipo de AC a anormalidade nuclear nas células meristemáticas de todos os tratamentos. A avaliação dos efeitos mutagênicos se deu pela contagem de células micronucleadas.

As AC foram diferenciadas em dois tipos, aneugênicas e clastogênicas, posteriormente foram quantificadas e comparadas para determinar o modo de ação dos herbicidas avaliados.

Os resultados foram comparados estatisticamente com o CN, como segue. A distribuição dos dados foi testada pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk e posteriormente analisadas pelo teste de Mann-Whitney. O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

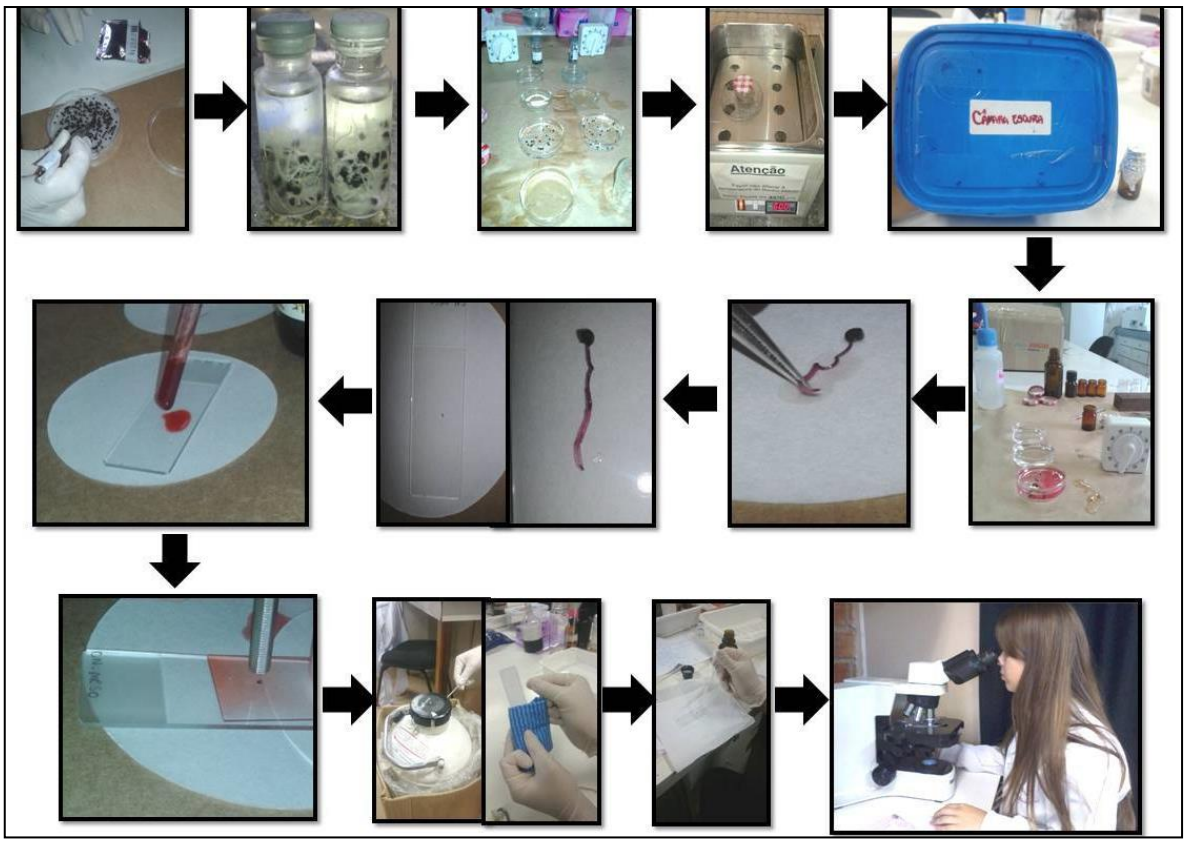


Figura 1: Esquema do teste de *A. cepa.*

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO GENOTOXICOLÓGICA DO HERBICIDA MESOTRIONE PURO E EM MISTURA COM ATRAZINA POR MEIO DO TESTE DE *Allium cepa*

Karoline Felisbino[a,b]; Laercio D.S. Piancini[a]; Ronaldo S. Filho[a]; Marta Margarete Cestari[a]; Daniela Moraes Leme[a]*

[a]Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR/Brasil.

[b]Centro Universitário Cesumar (UniCesumar), Curitiba-PR/Brasil.

*Autor de correspondência: Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciência Biológica - Departamento de Genética. Rua Francisco H. dos Santos, s/n, Jardim das América, 81531-990, Curitiba/PR-Brasil. Tel.: +55 41 3361-1740. E-mail: danielamoraisleme@gmail.com ou daniela.leme@ufpr.br.

Resumo

O Mesotrione (MES) é um herbicida da família triketone, que vem sendo empregado como alternativa ao uso da Atrazina (ATZ), a qual apresenta alta persistência no ambiente e já foi banida em alguns países devido sua toxicidade à organismos não alvos. Apesar de ser considerado um eco-friendly herbicide, dados da literatura sobre os possíveis efeitos deletérios do MES, em sua forma pura e/ou em mistura com outros herbicidas, ainda são escassos. Para avaliar o potencial de indução de morte celular e danos no DNA do MES, sementes de *Allium cepa* (vegetal superior – monocotiledónea) foram expostas a este herbicida puro e em mistura com a ATZ, sendo posteriormente quantificado o número de células em divisão celular (citotoxicidade) e de células portadoras de aberrações cromossômicas (AC) (genotoxicidade) e micronúcleos (MN) (mutagenicidade). Quando avaliado na forma pura, o MES (1,8 a 460 µg/L) não demonstrou citotoxicidade e nem a capacidade de induzir danos no DNA (genotoxicidade/mutagenicidade). Os resultados obtidos para a ATZ (1,5 a 400 µg/L) confirmaram seu potencial genotóxico já relatado na literatura. A avaliação das misturas de MES+ATZ (1,8+1,5; 7+6,25; 30+25 µg/L, respectivamente), evidenciaram que o MES apresenta, em baixas concentrações, um efeito potencializador da ação genótoxica da ATZ, pela obtenção de frequências significativas de AC e MN maiores do que os efeitos aditivos esperados. Conclui-se que o MES, em sua forma pura, parece ser uma alternativa segura ao uso da ATZ quanto aos danos (celulares e DNA) causados às plantas não alvos (monocotiledôneas), porém, restrições do uso combinado do MES à herbicidas genotoxicantes devem ser consideradas, devido a sua ação co-mutagen.

Palavras-chaves: Herbicidas; plantas não alvos; citotoxicidade; genotoxicidade; aberrações cromossômicas; micronúcleos.

1. Introdução

Praguicidas têm sido amplamente utilizados para o controle de diferentes pragas, a fim de manter as práticas de agricultura moderna (MONTAGNER et al., 2014). Contudo, ao mesmo tempo que são eficientes no controle de pragas, diversos praguicidas têm sido categorizados como toxicantes ambientais, devido aos efeitos adversos causados à organismos não alvos (TSABOULA et al., 2016). Dentro os praguicidas, os herbicidas, que tem como finalidade combater plantas daninhas, é a classe mais empregada em todo mundo (COLE et al., 2000; CASSAL et al., 2014) e, consequentemente, foco de atenção de estudos e regulamentação toxicológica.

O herbicida Mesotrione (MES) [2-(4-methylsulfonyl-2-nitrobenzoyl)cyclohexane-1,3-dione], é um synthetic triketone, como um modo de ação distinto que envolve a biossíntese de carotenoides, permitindo seu maior espectro de ação e especificidade contra plantas daninhas, sendo aplicado em cultura de milho (DUMAS et al., 2017). MES, assim como os demais synthetic triketones, apresenta baixa persistência no ambiente, sendo degradado em um período curto de tempo (~ 4 a 32 dias) após sua aplicação (CHAABANE et al., 2008; BARCHANSKA AND RUSEK, 2012). Desta forma, o MES tem sido empregado em substituição a Atrazina (ATZ) (Cole et al., 2000; MITCHEL et al., 2001, BONNET et al., 2008), a qual foi banida de países da Comunidade Europeia, devido à seus efeitos tóxicos em organismos não alvos (*e.g.* mamíferos, fungos, peixes, plantas, etc.) (EI-GHAMERY, et al., 2000; VENTURA, et al., 2008; SALABERRIA et al., 2009; HUANG, et al., 2015; PIANCINI, et al., 2015ª; WIRBISKY; FREEMAN, 2016; SILVEYRA, et al., 2017) e relativa persistência no ambiente (BOLOGNESI, 2003; DOUGLASS et al., 2014).

Apesar do MES ser considerado um eco-friendly herbicide, since they result from the hemi-synthesis of a natural phytotoxin (DUMAS et al., 2017), há poucos estudos sobre o seu potencial deletério à organismos não alvos (ALFERNESS; WIEB, 2002; BONNET et al., 2008; PIANCINI, et al., 2015b), principalmente em relação as plantas.

Plantas são a base dos ecossitemas terestres e aquáticos, desempenhando o importante papel de produtor primário da cadeia alimentar, sendo associadas a biodiversidade e ecosystem services, como a polinização (BOUTIN et al., 2012). Desta forma, a conservação dos ecossistemas naturais requer a protenção das plantas e, neste contexto, o grupo de xenobióticos mais preocupante compreende os herbicidas. Uma vez que herbicidas são projetados para eliminar ou suprimir plantas daninhas, o movimento desses praguicidas, principalmente os não seletivos, para áreas não agrícolas podem causar efeitos indesejáveis em plantas sensíveis não alvo (WHITE; BOUTIN, 2007; BOUTIN et al., 2012; SCHMITZ et al., 2015).

Visando a proteção de produtores primários terrestres (*i.e.* plantas) com consequente conservação dos habitats naturais, avaliações de fitotoxicidade de herbicidas à plantas não alvo são requeridas no registro de praguicidas por diversas agências regulatórias (USEPA, 1996; OECD 2006).

Em geral, os testes de fitotoxicidade compreendem avaliação de parâmetros macroscópicos, como germinação e desenvolvimento de raíz. No entanto, as primeiras interações entre químicos e life-forms inicia-se na superfície ou interior celular (LILLICRAP et al., 2016) (*e.g.* danos genéticos), o que pode acarretar em uma maior sensibilidade dos *endpoints* celulares na predição da segurança de um agente químico, principalmente em testes de curta duração.

O uso de vegetais superiores como ferramentas de detecção no monitoramento de contaminantes ambientais com potencial de causar danos genéticos já é recomendado em diferentes organizações academicas e governamentais (EPA, 1996). Dentre as espécies de vegetais empregadas em ecogenotoxicity testing, *Allium cepa* - uma monodicotiledônia - se destaca, devido a sua favorável condição cromossômica (cromossomos grandes e em número reduzido), a qual facilita a análise de danos genéticos (Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos) (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Levando-se em consideração o uso em larga escala de herbicidas e seus possíveis efeitos adversos a organismos não alvos, como as plantas, o presente trabalho avaliou os efeitos ecotoxicogenéticos do herbicida MES, the second most-sold herbicide in the world (DUMAS et al., 2017) por meio do

teste de Aberrações Cromossômicas (AC) e Micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*. Adicionalmente, uma vez que herbicidas podem estar presentes simultaneamente no ambiente, seja por a persistência prolongada, como no caso da ATZ, ou uso combinado (ARMEL et al., 2005; HUGIE et al., 2008), misturas de MES e ATZ também foram avaliadas quanto ao potencial ecogenotoxicológico.

2. Material and Methods

2.1. Herbicidas testados e suas concentrações

Os herbicidas Mesotrione (MES, CAS nº 104206-82-8, pureza 99,5%, Pestanal®) e Atrazina (ATZ, CAS n° 1912-24-9, pureza 98.8%, Chem Service®) foram avaliados na forma de princípio ativo.

Para a avaliação ecogenotoxicológica do herbicida MES em sua forma isolada, foram utilizadas as seguintes concentrações: 1,8; 7; 30; 115 e 460 µg/L. Esta faixa de concentração foi definida com base na concentração ecologicamente relevante de 1,8 µg/L, a qual é a concentração carreada para corpos d'água pela chuva (BARCHANSKA; RUSEK, 2012) e em trabalhos prévios de nosso grupo de pesquisa, que mostraram alterações bioquímicas em peixes nativos expostos ao MES (PIANCINI, et al., 2015b).

O herbicida ATZ também foi avaliado em sua forma isolada, a fim de confirmar sua genotoxicidade já reportada na literatura e comparar os dados do teste de *A. cepa* obtido para este herbicida com os de MES. Desta forma, a ATZ foi avaliada neste trabalho utilizando as concentrações 1,5; 6,25; 25; 100 e 400 µg/L, sendo que a concentração de 25 µg/L é a recomendada para uso em culturas de milho (VENTURA et al., 2008) e a de 1,5 µg/L é o valor aproximado da concentração máxima de ATZ permitida pela legislação brasileira (2 µg/L) para águas destinadas a preservação da vida aquática (CONAMA, 2005).

O herbicida MES também foi avaliado em mistura com a ATZ nas seguintes concentrações: MES 1,8 µg/L + ATZ 1,5 µg/L [Mistura 1 (M1)]; MES

7 µg/L + ATZ 6,25 µg/L [Mistura 2 (M2)] e MES 30 µg/L + ATZ 25 µg/L [Mistura 3 (M3)].

Todas as soluções teste foram preparados utilizando-se água ultrapura.

2.2. Bioensaio com sementes de Allium cepa

Sementes de *A. cepa* (2n=16 cromossomos), mesmo lote e variedade (Cebola “Baia Periforme”), foram submetidas à germinação (25°C e ausência de luz) em placas de Petri (100 sementes/placa) contendo as diferentes concentrações dos herbicidas MES e ATZ e suas misturas (MES+ATZ). Os tratamentos controles negativo (CN) e positivo (CP) foram realizados, respectivamente, em água ultrapura e 10 mg/L de Metil Metanosulfonato (MMS, CAS 66-27-3, Sigma-Aldrich®).

Raízes com *c.a.* de 2 cm de comprimento (5 dias) foram coletadas, fixadas em alcohol–acetic acid (3:1-v/v) e armazenadas à 4°C até a confecção das lâminas citológicas. As lâminas citológicas foram preparadas utilizando células meristemáticas de *A. cepa*, segundo o protocolo descrito por Leme and Marin-Morales (2008).

5000 células por tratamento foram avaliadas (500 células/lâmina, 10 lâminas/tratamento) quanto: (1) ao número de células em divisão celular [Índice Mitótico (IM)], indicativo do endpoint citotoxicidade; (2) à células meristemáticas portadoras de qualquer tipo de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), indicativo do endpoint genotoxicidade; à células micronucleadas, indicativo do endpoint mutagenicidade. Adicionalmente, as AC e AN foram agrupadas quanto as do tipo aneugênicas (perda, atraso, aderência e broto) e as do tipo clastogênicas (ponte e quebra cromossômicas) para determinação do modo de ação (MoA) genotóxico dos herbicidas testados.

Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente em relação ao CN pelo teste estatístico de Mann-Whitney com nível de significância de 5%.

3. Resultados e discussão

A elevada introdução de herbicidas no ambiente, pela prática de controle primário de ervas daninhas no sistema agrícola moderno, e os consequentes relatos dos efeitos adversos desses xenobióticos à organismos não alvo (MONTAGNER et al., 2014), tem estimulado o uso de *eco-friendly* herbicides, a fim de assegurar a proteção dos ambientes naturais. Neste contexto, os herbicidas triketones, como o MES, são tidos como herbicidas menos nocivos ao ambiente por serem derivados de tecnologias baseadas em produtos naturais (aleloquimicos) (VYVYAN, 2002). Contudo, o fato de ser derivado de um produto natural, não descarta a possibilidade de efeitos tóxicos do MES a organismos não alvos (VYVYAN, 2002; DUMAS et al., 2017).

No presente estudo, o herbicida MES não foi capaz de inibir o IM, bem como aumentar os níveis de AC+AN e micronúcleos (MN), nas concentrações testadas (Tabela 1), o que o categoriza como um agente não-citotóxico e não-genotóxico pelo sistema teste de *A. cepa*. No entanto, efeitos tóxicos à microorganismos aquáticos (*Vibrio fischeri* e *Tetrahymena pyriformis*) (BONNET et al., 2008; JOLY et al., 2013) e algas (MORO et al., 2012; NI et al., 2014) e efeitos genotóxicos em peixes (PIANCINI et al., 2015b) já foram reportados na literatura. Essas diferenças de respostas, indicam que o MES, ao contrário de outros herbicidas, como a ATZ, apresenta um efeito espécie específico, o que pode estar relacionado à capacidade de xenobióticos detoxificação e defesas antioxidantes do organismo exposto.

Tabela 1. Alterações em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos herbicidas Mesotrione e Atrazina em suas formas isoladas.

Concentrações (µg/L)	Índice Mitótico		Alterações de genotoxicidade		Alterações de Mutagenicidade	
	%	M±sd	%	M±sd	%	M±sd
			MES			
CN	100	182 ± 56,06	100	0,30 ± 0,67	100	1,70 ± 2,00
1,8	95	174 ± 40,17	100	0,30 ± 0,48	112	1,90 ± 1,52
7	106	194 ± 37,41	233	0,70 ± 0,48	71	1,20 ± 1,62
30	105	191 ± 26,44	67	0,20 ± 0,42	159	2,70 ± 1,95
115	76	138 ± 28,84	133	0,40 ± 0,69	176	3,00 ± 1,70
460	88	161 ± 26,71	67	0,20 ± 0,42	118	2,00 ± 1,70
CP	99	181 ± 43,18	1500	4,40 ± 3,27*	3276	55,70 ± 18,81*
			ATZ			
CN	100	209 ± 75,52	100	1,08 ± 1,16	100	2,78 ± 2,03
1,5	122	254 ± 42,23	200	3,60 ± 1,77*	345	3,79 ± 2,44
6,25	135	280 ± 40,71	367	6,60 ± 2,41*	336	3,70 ± 2,26
25	122	255 ± 58,96	411	7,39 ± 3,92*	636	6,99 ± 7,26
100	127	265 ± 45,15	361	6,51 ± 3,55*	391	4,30 ± 3,83
400	126	262 ± 52,63	206	4,03 ± 3,99*	1214	13,33 ± 5,29*
CP	143	298 ± 77,90	328	6,40 ± 2,41*	582	38,52 ± 23,11*

MES: Mesotrione; ATZ: Atrazina; CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (MMS a 10 mg/L). Dados expressos em porcentagem (%) e média (M) ± Desvio padrão (sd). 5000 células analisadas por tratamento, *diferença significativa em relação ao CN ($p<0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney.

Sabe-se que interações organismo-xenobiótico desencadeiam vias de defesa, como Cytochrome P450 e sistema antioxidante (*e.g.* superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), sendo este último restrito a indutores de espécies reativas de oxigênio (ROS), na tentativa de evitar possíveis efeitos adversos causados pelo xenobiótico. Respostas ao estresse causados por herbicidas via ROS no organismo exposto já é bem documentada na literatura (ALBERTO et al., 2016), inclusive para o MES, para o qual foi demostrada a capacidade de indução de estresse oxidativo em duas espécies de peixe (*Oreochorimis niloticus* and *Geophagus brasiliensis*) (PIANCINI et al., 2015b). A elevada capacidade de metabolização de herbicidas triketones via P450 presentes em algumas plantas, como o milho (monocotiledônea), que faz com que elas sejam insensíveis aos efeitos dessa classe de herbicidas, também já é reportada na literatura (DUMAS et al., 2017). Desta forma, a ausência de efeitos citotóxicos e genotóxicos/mutagênicos em células meristemáticas de *A. cepa* expostas ao MES, sugere a presença de um eficiente sistema de defesa neste organismo vegetal modelo, que permite a rápida eliminação desse herbicida antes dele exercer sua ação tóxica.

Ao contrário do MES, a ATZ induziu alterações genotóxicas, pelo aumento pdas frequências de AC+AN em todas as concentrações testadas, e mutagênicas, pelo aumento da frequência de MN na maior concentração testada (Tabela 1). Adicionalmente, a ATZ exerceu sua ação genotóxica tanto por um MoA clastogênico como aneugênico, sendo a predominância do MoA dependente de concentração (1,5 e 6,25 µg/L – clastogênico; 25 e 100 µg/L - aneugênico) (Tabela 2, Figura 1). Tais resultados corroboram com estudos toxicológicos da ATZ, os quais reportam a ação genotóxica/mutagênica desse herbicida para diferentes organismos (ÇAVAS, 2011; NWANI et al., 2011; CAMPOS-PEREIRA et al., 2012; VENTURA et al., 2008; GRIFFITIS, 1979; RIBAS et al., 1998; PIANCINI et al., 2015b; HUANG et al., 2015), incluindo sistemas vegetais (e.g. *a. cepa, vicia faba, tradescantia*) (POPA et al., 1986;

MARCO et al., 1992; MOHAMMED; MA, 1999; EI-GHAMERY et al., 2000; BOLLE et al., 2004; SRIVASTAVA; MISHRA, 2009).

Tabela 2: Tipos de Aberrações Cromossômicas e Anormalidades Nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao herbicida Atrazina.

AC e AN	Concentrações de ATZ (µg/L)						
	CN	**1,5**	**6,25**	**25**	**100**	**400**	**CP**
Clastogênicas							
Ponte cromossômica	0,24	0,6*	0,58*	0,44	0,52	0,49	0,58*
Quebra cromossômica	0,00	0,00	0,08	0,00	0,06	0,04	0,00
Total	0,24	0,6*	0,66*	0,44	0,58*	0,53	0,58*
Aneugênicas							
C-metáfases	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00
Perda cromossômica	0,10	0,08	0,06	0,16	0,14	0,08	0,24
Aderência cromossômica	0,00	0,02	0,26*	0,64*	0,46*	0,11	0,10*
Atraso cromossômico	0,00	0,02	0,00	0,08	0,04	0,00	0,06
Broto nuclear	0,02	0,02	0,06	0,08	0,06	0,10	0,20
Total	0,12	0,14	0,38*	1,02*	0,70*	0,29*	0,60*

ATZ: Atrazina; CN: controle negativo (água ultrapura); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L). Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento, *diferença significativa em relação ao CN ($p<0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney.

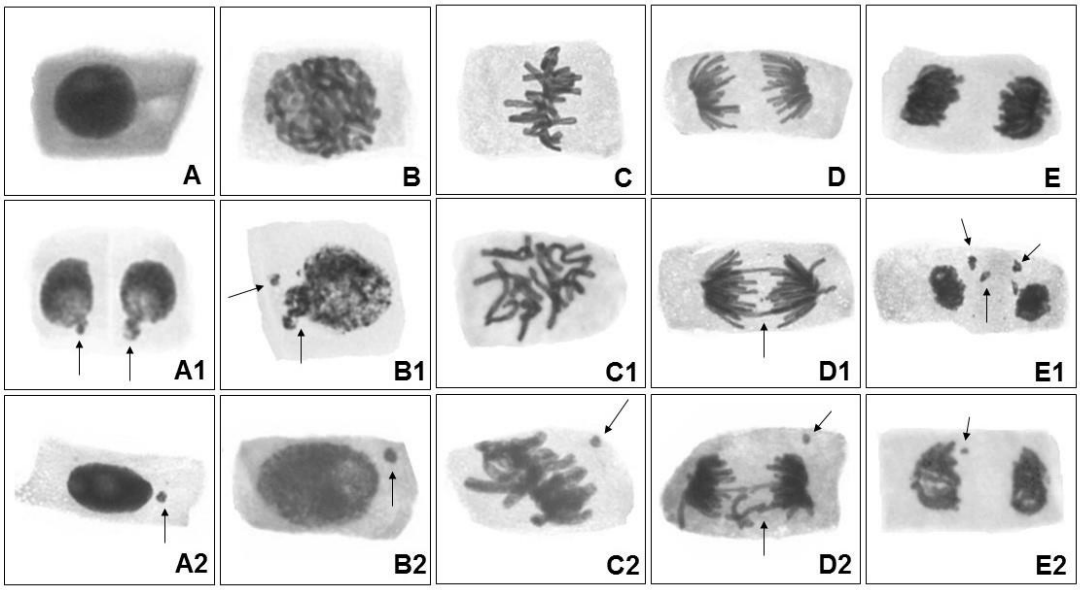


Figura 1: Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas aos herbicidas Mesotrione (MES) e Atrazina (ATZ) e suas misturas. (A) Núcleo interfásico normal; (A1) Broto nuclear; (A2) Micronúcleo (MN) em intérfase; (B) Prófase normal; (B1) Prófase com broto e MN nuclear; (B2) Prófase com MN; (C) Metáfase normal; (C1) C-metáfase; (C2) Metáfase com MN; (D) Anáfase normal; (D1) Anáfase com ponte cromossômica; (D2) Anáfase com perdas e atrasos cromossômicos e MN; (E) Telófase normal; (E1) Telófase com quebras cromossômicas; (E2) Telófase com MN.

Apesar de estudos mostrarem que o MES pode ser um toxicante espécie-dependente, principalmente em relação aos organismos aquáticos, incluindo as algas, a ausência de genotoxicidade aqui encontrada, associada aos efeitos genotóxicos/mutagênicos da ATZ, indicam que o MES pode ser uma alternativa segura quanto a manutenção da integridade do material genético (DNA) em casos de exposição a plantas terrestres não-alvo (monocotiledôneas).

Em geral, órgãos regulatórios ao redor do mundo requerem, prioritariamente, avaliações toxicológicas dos ingredientes ativos e/ou produtos acabados de forma isolada para registro de produtos químicos (TSABOULA et al., 2016). Contudo, no real cenário ambiental, contaminantes estão presentes simultaneamente em um mesmo ambiente (misturas

complexas) e suas interações podem resultar em alterações da toxicidade (*i.e.* sinergismo, potenciação, inibição interações, entre outros) predita na avaliação dos produtos isolados (CEDERGREEN, 2014; BJERGAGER et al., 2017).

Herbicidas podem ser aplicados em misturas para aumentar a eficiência do combate às plantas daninhas (ALTENBURGER et al., 2015). Adicionalmente, os herbicidas podem se encontrar no ambiente mesmo quando aplicados separadamente, principalmente quando se trata de um herbicida de alta persistência, levando a formação de misturas químicas (BOLOGNESI, 2003; DOUGLASS et al., 2014). Frente a isso, o presente trabalho também objetivou avaliar o MES em mistura com a ATZ, devido ao uso combinado desses dois herbicidas em países que ainda permitem o uso da ATZ (BELFRY; SIKKEMA, 2015) e pela presença da ATZ no ambiente (alta persistência) (MONTAGNER et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

As misturas MES+ATZ se mostraram genotóxicas e mutagênicas, pelo aumento significativo da incidência AC+AN (M1 e M3) e MN (todas misturas testadas) em células meristemáticas de *A. cepa* (Tabela 3). Além disso, a avaliação dos tipos de AC e AN permitiu verificar que as misturas exercem sua genotoxicidade tanto pelo MoA clastogênico como aneugênico (Tabela 4, Figura 1). A comparação dos resultados obtidos para as misturas MES+ATZ em relação aos obtidos pela avaliação dos produtos na forma isolada, indicam a ATZ como o contribuinte dos efeitos genotóxico/mutagênico observados. Adicionalmente, essa comparação também evidenciou aumento ou redução dos efeitos em relação aos efeitos aditivos esperados, dependendo da concentração dos componentes individuais da mistura: M1 – aumento genotoxicidade (1,7x) e mutagenicidade (1,2x); M2 – aumento mutagenicidade (1,8x); M3 – redução genotoxicidade e mutagenicidade (0,7x ambos). Tal resultado sugere que o MES tem a capacidade de atuar como um potencializador (co-mutagen) e um inibidor (anti-mutagen) da ação genotóxica/mutagênica da ATZ, dependo de sua concentração em mistura com herbicidas genotoxicantes.

Tabela 3: Alterações em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às misturas dos herbicidas Mesotrione e Atrazina.

Misturas (µg/L)	Índice Mitótico		Alterações de genotoxicidade			Alterações de Mutagenicidade		
	%	M±sd	%	M±sd	Observação	%	M±sd	Observação
CN	100	217 ± 34,1	100	0,4 ± 0,5		100	1,6 ± 2,1	
M1	123	268 ± 60,9	750	3 ± 1,8*	Potenciação	306	4,9 ± 2,5*	Potenciação
M2	99	215 ± 31,3	325	1,3 ± 1,7	Inibição	375	6 ± 7,1*	Potenciação
M3	101	219 ± 42,6	525	2,1 ± 1,6*	Inibição	275	4,4 ± 4,6*	Inibição
CP	135	294 ± 54,7	575	2,3 ± 2,0*		2694	43,1 ± 49,6*	

M1: Mistura 1 (MES 1,8 µg/L + ATZ 1,5 µg/L); M2: Mistura 2 (MES 7 µg/L +ATZ 6,25 µg/L); M3: Mistura 3 (MES 30 µg/L +ATZ 25 µg/L); CN: Controle Negativo (água ultrapura); CP: Controle Positivo (MMS a 10 mg/L). Dados expressos em porcentagem (%) e média (M) ± Desvio padrão (sd). 5000 células analisadas por tratamento, *diferença significativa em relação ao CN ($p<0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney.

Tabela 4: Tipos de Aberrações Cromossômicas e Anormalidade Nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às misturas de Mesotrione e Atrazina.

AC e AN	CN	MISTURAS MES+ATZ			CP
		M1	M2	M3	
Clastogênicas					
Ponte cromossômica	0,06	0,16	0,18	0,20	0,02
Quebra cromossômica	0,00	0,08	0,02	0,02	0,08
Total	0,06	0,24*	0,20	0,22*	0,08
Aneugênicas					
C-metáfases	0,00	0,10*	0,00	0,00	0,00
Perda cromossômica	0,02	0,08	0,02	0,08	0,08
Aderência cromossômica	0,00	0,12*	0,02	0,04	0,00
Atraso cromossômico	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00
Broto nuclear	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
Total	0,02	0,30*	0,06	0,14*	0,10*

CN: controle negativo (água ultrapura); CP: controle positivo (MMS a 10 mg/L); M1: Mistura 1 (MES 1,8 µg/L + - ATZ 1,5 µg/L); M2: Mistura 2 (MES 7 µg/L + ATZ 6,25 µg/L); M3: Mistura 3 (MES 30 µg/L + ATZ 25 µg/L); Dados expressos em frequência (%). 5000 células analisadas por tratamento, *diferença significativa em relação ao CN ($p<0,05$), de acordo com o teste de Mann-Whitney.

A redução da toxicidade à organismos aquáticos (*Vibrio fischeri* – Microtox® test) pela combinação do MES ao herbicida nicosulfuron, em concentrações de MES superiores a máxima aqui testada em mistura (30 µg/L), já foi relatada na literatura (JOLY et al., 2013). Contudo, ainda não existem relatos da ação co-mutagênica do MES, sendo importante ressaltar que esse efeito foi verificado nas concentrações que ambientalmente relevantes de ambos herbicidas (M1: 1,8 + 1,5 µg/L, MES e ATZ, respectivamente).

4. Conclusão

Os resultados do presente estudo mostraram que o MES, na forma isolada, não é capaz de induzir morte celular (citotoxicidade), bem como danos no DNA (genotoxicidade/mutagenicidades), no sistema teste de *A. cepa*, indicando que o mesmo pode ser uma alternativa ao uso de herbicidas genotoxicantes (*e.g.* ATZ) com o intuito de assegurar a integridade de plantas não alvos (monocotiledôneas). No entanto, a sugestão do MES como um eco-*friendly* herbicide não é válida para casos de interações com herbicidas genotoxicantes (*e.g.* ATZ), devido a sua atuação como co-mutageno em baixas concentrações. Desta forma, o potencial uso do MES em mistura deve considerar seu efeito potencializador de genotoxicantes, a fim de evitar efeitos nocivos a organismos expostos.

No que diz respeito a ATZ, o presente estudo confirma a sua ação genotóxica, inclusive em concentração inferior (1,5 µg/L) a recomendada pela legislação brasileira a águas superficiais (2 µg/L). Tal achado reforça a necessidade de substituição do uso da ATZ por herbicidas menos tóxicos e/ou revisão de seus valores considerados ambientalmente seguros em países que ainda utilizam esse herbicida.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) por financiar esta pesquisa.

5. Conclusões gerais

Os herbicidas MES e ATZ não demonstram efeitos citotóxicos quando em suas formas isoladas, porém quando em associação demonstram um aumento significativo, podendo ser indicativo de tumores devido à proliferação desordenada. Na avaliação de AC, ATZ isolada é capaz de causar efeitos genotóxicos desde a menor concentração avaliada aqui de 1,5 µg/L, a qual é próxima da quantidade permitida em corpos d'água (2 µg/L). MES sozinho

não demonstra um potencial de genotoxicidade. No entanto quando em mistura demonstram aumento significativo para AC em algumas concentrações. MES não demonstra indícios de mutagenicidade, porém o herbicida ATZ causa mutagenicidade em concentrações maiores ou iguais a 400 µg/L. Além disso, o MES se mostrou um herbicida de efeito clastogênico, mas ATZ e as misturas podem causar efeitos clastogênicos e aneugênicos.

Contudo, mesmo MES tem demonstrado ser um bom substituto de ATZ por apresentar ser menos nocivo em estudo com plantas. No entanto nosso trabalho é pioneiro na avaliação do herbicida MES em plantas, por isso sugerimos que mais estudos devem ser realizados para uma avaliação mais completa sobre causas e efeitos em plantas não alvos. As misturas demonstraram que os herbicidas quando isolados eram menos nocivos do que quando em associação, em especial o herbicida MES. Logo, os herbicidas não devem ser utilizados em associação por acarretarem em maiores efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Sendo assim, a ideia de substituição do herbicida ATZ pelo MES pode não ser eficiente em caso de ATZ ainda estar presente no local de ação.

6. REFERENCIAS

ACKERMAN, F. The Economics of Atrazine. International Journal of Occupational and Environmental Health, v. 13, p. 441–449, 2007.

AKCHA, F.; TANGUY, A.; LEDAY, G.; PELLUHET, L.; BUDZINSKI, H.; CHIFFOLEAU, J-F. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels Mytilus sp ., collected on the French Atlantic Coast. Marine Environmental Research, v. 58, p. 753–756, 2004.

ALBERTO, DIANA; SERRA, ANNE-ANTONELLA; SULMON, CÉCILE; GOUESBET, GWENOLA; COUÉE, IVAN, 2012. Herbicide-related signaling in plants reveals novel insights for herbicide use strategies, environmental risk assessment and global change assessment challenges. Science of the Total Environment, 569–570, 1618–1628.

ALFERNESS, P.; WIEB, L. Determination of Mesotrione Residues and Metabolites in Crops, Soil, and Water by Liquid Chromatography with. Journal Of Agricultural And Food Chemistry, v. 50, p. 3926–3934, 2002.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research, v. 343, p. 121–135, 1995.

ALTENBURGER, R; AIT-AISSA, S.; ANTCZAK, P.; BACKHAUS, T.; BARCELÓ, D.; SEILER, T.B.; BRION, F.; BUSCH, W.; CHIPMAN, K.; ALDA, M.L.; UMBUZEIRO, G.A.; ESCHER, B.I.; FALCIANI, F.; FAUST, M.; FOCKS, A; HILSCHEROVA, K.; HOLLENDER, J.;HOLLERT, H.; JÄGER, F.; JAHNKE, A.; KORTENKAMP, A.; KRAUSS, M.; LEMKINE, G.F.; MUNTHE, J.; NEUMANN, S.; SCHYMANSKI, E.L.; SCRIMSHAW, M.; SEGNER, H.; SLOBODNIK, J.; SMEDES, F.; KUGHATHAS, S.; TEODOROVIC, I.; TINDALL, A.J.; TOLLEFSEN, K.F.; WALZ, K.F.; WILLIAMS, T.D.; BRINK, P.J.V.; GILS, J.; VRANA, B.; ZHANG, X.; BRACK, W. Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. Science of the Total Environment, v. 512–513, p. 540–551, 2015.

ANVISA - UFPR – Relatório sobre Mercado e Regulação de Agrotóxicos 2012.

ARMEL, G.R.; HALL, G.J.; WILSON, H.P.; CULLEN, N. Mesotrione plus atrazine mixtures for control of Canada thistle (Cirsium arvense). Weed Science, v. 53, p. 202-211, 2005.

BARBOSA, A.M.C.; SOLANO, M.L.M.; UMBUZEIRO, G.A. Pesticides in drinking water – the Brazilian monitoring program. Public Health, v. 3, p.246, 2015.

BARCHANSKA, H.; RUSEK, M. New procedures for simultaneous determination of mesotrione and atrazine in water and soil . Comparison of the degradation processes of mesotrione and atrazine. Environmental Monitoring and Assessment, v. 184, p. 321–334, 2012.

BELFRY, K. D.; SIKKEMA, P. H. Preplant and Postemergence Control of Glyphosate-Resistant Giant Ragweed in Corn. Agricultural Sciences, v. 6, p. 256–262, 2015.

BENSALAH, N.; KHODARY, A.; ABDEL-WAHAB, A. Kinetic and mechanistic investigations of mesotrione degradation in aqueous medium by Fenton process. Journal of Hazardous Materials, v. 189, p. 479–485, 2011.

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

BJERGAGER, MAJ-BRITT ANDERSEN; DALHOFF, KRISTOFFER; KRETSCHMANN, ANDREAS; NØRGAARD, KATRINE BANKE; MAYER, PHILIPP; CEDERGREEN, NINA. Determining lower threshold concentrations for synergistic effects. Aquatic Toxicology, v. 182, p. 79–90, 2017.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of Atrazine Assessed With the Allium cepa Test. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 43, p. 137–141, 2004.

BOLLER, K.; SCHMID, W. Chemische Mutagenese beim Sauger. Das Knochenmark des Chinesischen Hamsters als in vivo-Testsystem . Hamatologische Befunde nach Behandlung mit Trenimon. Humangenetik, v. 11, p. 35–54, 1970.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. Mutation Research, v. 543, p. 251–272, 2003.

BONNET, J. L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: Tetrahymena pyriformis and Vibrio fischeri. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 55, p. 576–583, 2008.

BOUTIN, C.; STRANDBERG, B.; CARPENTER, D.; MATHIASSEN, S.K.; THOMAS, P.J. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications? Environmental Pollution, v. 185, p. 295 – 306, 2014.

BRASIL. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989.

CAJARAVILLE, M. P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C. e VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula : a practical approach. The Science of the Total Environmental, v. 247, p. 295–311, 2000.

CAMPOS-PEREIRA, F.D.; OLIVEIRA, C.A.; PIGOSO, A.A.; SILVA-ZACARIN, E.C.M.; BARBIERI, R.; SPATTI, E.F.; MARIN-MORALES, M.A.; SEVERI-AGUIAR, G.D.C. Early cytotoxic and genotoxic effects of atrazine on Wistar rat liver: A morphological, immunohistochemical, biochemical, and molecular study. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 78, p. 170–177, 2012.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F. DE; FERREIRA, R. P.; GONÇALVES, D.; SIMÃO, R. S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Digital, v. 18, p. 437–445, 2014.

ÇAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine–based herbicide on fish Carassius auratus using the micronucleus test and the comet assay. Food and Chemical Toxicology, v. 49, p. 1431–1435, 2011.

CEDERGREEN, NINA. Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology. Chemical Synergists in Environmental Toxicology, v. 9, e96580, 2014.

CHAABANE, H.; VULLIET, E.; CALVAYRAC, C.; COSTE, C.M.; COOPER, J.F. Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. Pest Management Science, Sussex, v.64, p.86- 93, 2008.

CHOE, E.; WILLIAMS, M.M.; BOYDSTON, R.A.; HUBER, J.L.; HUBER, S.C.; PATAKY, J.K. Photosystem II-Inhibitors Play a Limited Role in Sweet Corn Response to 4-Hydroxyphenyl Pyruvate Dioxygenase-Inhibiting Herbicides. Agronomy Journal , v. 106, p. 1317-1323, 2014.

COLE, D.; PALLETT, K.; RODGERS, M. HERBICIDES DISCOVERING NEW MODES OF ACTION FOR HERBICIDES AND THE IMPACT OF GENOMICS. The Royal Society of Chemistry, p. 223–229, 2000.

COMBER, S. D. W. Abiotic persistence of atrazine and simazine in water. Pesticide Science, v. 55, p. 696–702, 1999.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente, Ministério do Meio Ambiente, 4ª Reunião do Grupo Trabalho - 19 e 20 de março de 2009, Dispõe sobre a pesquisa, o registro, a comercialização e utilização de agrotóxicos em ambientes aquáticos, Versão Com Emendas.

CONAMA Resolução No 357, de 17 de Março de 2005 – Classificação dos Corpos de Água. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

CONAMA Resolução No 357, de 17 de Março de 2005 – Classificação dos Corpos de Água, 2005. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J.-F.; JEAN-FRANÇOIS, F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium r Vicia -micronucleus and the Tradescantia -micronucleus assays. Mutation Research, v. 426, p. 167–171, 1999.

COVA, D.; ROSSINI, L.; NATALI, P.; TREVISAN, M.; RE, A. A. M. DEL. Assessment of the Toxicological Risk of Pesticides and its Correlation to the Physico - chemical Characteristics and Tissue Distribution. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 27, p. 531–537, 1989.

CREECH, J.E.; MONACO, T.A.; EVANS, J.O. Photosynthetic and growth responses of Zea mays L and four weed species following post-emergence treatments with mesotrione and atrazine. Pest Management Science, v. 60, p. 1079–1084, 2004.

DOUGLASS, J. F.; RADOSEVICH, M.; TUOVINEN, O. H. Mineralization of atrazine in the river water intake and sediments of a constructed flow-through wetland. Ecological Engineering, v. 72, p. 35–39, 2014.

DOUGLASS, J. F.; RADOSEVICH, M.; TUOVINEN, O. H. Molecular analysis of atrazine-degrading bacteria and catabolic genes in the water column and sediment of a created wetland in an agricultural / urban watershed. Ecological Engineering, v. 83, p. 405–412, 2015.

DUMAS E.; GIRAUDO, M.; GOUJON, E.; HALMA, M.; KNHILI, E.; STAUFFERT, M.; BATISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; BOHATIER, J.; BOUCHARD, P.; CELLE-JEANTON, H.; COSTA GOMES, M.; DELBAC, F.; FORANO, C.; GOUPIL, P.; GUIX, N.; HUSSON, P.; LEDOIGT, G.; MALLET, C.; MOUSTY, C.; PRÉVOT, V.; RICHARD, C.; SARRAUT, S., 2017. Fate and ecotoxicological impact of new generation herbicides from the triketone family: An overview to assess the environmental risks. Journal of Hazardous Materials, 325, 136–156.

DURAND, S.; LE, B.; MARTIN, A.; SANCELME, M.; DELORT, A.M.; BESSE-HOGAN, P.; COMBOURIEU, B. Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a Bacillus strain . Metabolite profiling using liquid chromatography / electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., v. 20, p. 2603–2613, 2006.

EI-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, p. 277-287, 2000.

ELDRIDGE, J. C.; WETZEL, L. T.; STEVENS, J. T.; SIMPKINS, J. W. The mammary tumor response in triazine-treated female rats: A threshold-mediated interaction with strain and species-specific reproductive senescence. Steroids, v. 64, p. 672–678, 1999.

EPA US. Ecological effects test guidelines. Gammarid acute toxicity test OPPTS 850.1020, 1996.

FANG, H.; LIAN, J.; WANG, H.; CAI, L.; YU, Y. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation

in repeatedly treated soils. Journal of Hazardous Materials, v. 286, p. 457–465, 2015.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. Mutation Research, v. 609, p. 81–91, 2006.

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

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of Allium cepa exposed to tri X uralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 88, 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, p. 1680–1686, 2009.

FERNANDEZ, M.V.; GARDINALI, P.R. Risk assessment of triazine herbicides in surface waters and bioaccumulation of Irgarol and M1 by submerged aquatic vegetation in Southeast Florida. Science of the Total Environment, v. 541, p. 1556–1571, 2016.

FISKESJÖ, G. The Allium Test in Wastewater Monitoring. Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal, v. 8, p. 291–298, 1993.

FUERST, E. P.; NORMAN, M. A. Weed Science Society of America Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport1. Weed Science Society of America, v. 39, p. 458–464, 1991.

GONTIJO, Á. M. M. C.; BARRETO, R. E.; SPEIT, G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI. D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results. Mutation Research, v. 534, 165-172, 2003.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium A report of the U S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Research, v. 99, p. 273–291, 1982.

GRANT, W. F. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. Environmental Health Perspectives, v. 27, p. 37–43, 1978.

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

GUPTA, V. K.; YOLA, M. L.; EREN, T.; ATAR, N. Sensors and Actuators B : Chemical Selective QCM sensor based on atrazine imprinted polymer: Its application to wastewater sample. Sensors & Actuators: B. Chemical, v. 218, p. 215–221, 2015.

HALLE, A.; LAVIEILLE, D.; RICHARD, C. The effect of mixing two herbicides mesotrione and nicosulfuron on their photochemical reactivity on cuticular wax film. Chemosphere, v. 79, p. 482–487, 2010.

HAN, A.; YUE, L.; LI, Z.; WANG, H.; WANG, Y.; YE, Q.; LU, L.; GAN, J. Plant availability and phytotoxicity of soil bound residues of herbicide ZJ0273, a novel acetolactate synthase potential inhibitor. Chemosphere, v. 77, p. 955–961, 2009.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research, v. 18, p. 187–190, 1973.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M. D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, Ph.; MAcGREGOR, J.T. Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage : Past , Present , and Future. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 18, p. 277–291, 1991.

HIGASHI, K. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. Mutation Research, v. 197, p. 273–288, 1988.

HOOFTMAN, R. N.; de RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow Umbra pygmea by ethyl methanesulphonate. Mutation Research, v. 104, 147–152, 1982.

HUANG, P.; YANG, J.; NING, J.; WANG, M.; SONG, Q. Atrazine Triggers DNA Damage Response and Induces DNA Double-Strand Breaks in MCF-10A Cells. International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 14353-14368, 2015.

HUGIE, J.A.; BOLLERO, G.A.; TRANEL, P.J.; RIECHERS, D.E. Defining the Rate Requirements for Synergism Between Mesotrione and Atrazine in Redroot Pigweed (Amaranthus Retroflexus). Weed Science, v. 56, p. 265–270, 2008.

HUIYUN, P.; XIAOLU, L.; XIAOHUA, X.; SHIXIANG, G. Phytotoxicity of four herbicides on Ceratophyllum demersum, Vallisneria natans and Elodea nuttallii. Journal of Environmental Sciences, v. 21, p. 307–312 (2009).

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins. Brasília DF, p. 18, 2012.

ISLAM, M. O.; HARA, M.; MIYAKE, J. Induction of P-glycoprotein, glutathione-S-transferase and cytochrome P450 in rat liver by atrazine. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 12, p. 1–6, 2002.

JAVARONI, R. DE C. A.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas Atrazina e Alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. Química Nova, v. 22, p. 58–64, 1999.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. Mutagenesis, v. 23, 207-221, 2008.

JOLY, P.; BONNEMOY, F.; CHARVY, J.C.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Toxicity assessment of the maize herbicides S-metolachlor, benoxacor, mesotrione and nicosulfuron, and their corresponding commercial formulations, alone and in mixtures, using the Microtox® test. Chemosphere, v.93, p. 2444–2450, 2013.

JOVIC, M.; MANOJLOVI, D.; STANKOVI, D.; DOJCINOVIC, B.; OBRADOVIC, B.; GASIC, U.; ROGLIC, G. Degradation of triketone herbicides, mesotrione and sulcotrione using advanced oxidation processes cinovi c Bratislav Obradovi c s Gaˇ si c. Journal of Hazardous Materials, v. 260, p. 1092–1099, 2013.

KLANCNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT,J.; DOLENCKOCE, J. Use ofamodified Allium test withnanoTiO2. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 74, p. 85–92, 2011.

KÖRBES, D.; SILVEIRA, A. F.; HYPPOLITO, M. A.; MUNARO, G. Alterações no sistema vestibulococlear decorrentes da exposição ao agrotóxico : revisão de literatura Vestibulocochlear system alterations caused by exposure to. Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia, v. 15, p. 146–152, 2010.

KUMARI, M.; KHAN, S. S.; PAKRASHI, S.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of Allium cepa. Journal of Hazardous Materials, v. 190, p. 613–621, 2011.

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

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

LIANE, G.H.L.; FELTNER, K.C.; LIANG, Y.T.S.; MORRILL, J.L. Cytogenetic effects and responses of agronomic characters in grain sorghum (Sorghum vulgare Pers.) following atrazine application. Crop Science, v. 7, p. 245-248, 1967.

LILLICRAP, ADAM; SPRINGER, TIM; TYLER, CHARLES R. A., 2016. Tiered assessment strategy for more effective evaluation of bioaccumulation of chemicals in fish. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 75, 20-26.

LIMAN, R.; CIĞERCI, I.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.

LONDRES, F. Agrotóxicos no Brasil. Um guia para ação em defesa a vida. 1a edição ed.Rio de Janeiro Brasil, 2011.

MAGNUSSON, M.; HEIMANN, K.; RIDD, M.; NEGRI, A.P. Pesticide contamination and phytotoxicity of sediment interstitial water to tropical benthic microalgae. Water research, v. 47, p. 5211- 5221, 2013.

MAJER, B. J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. Use of Plant Bioassays for the Detection of Genotoxins in the Aquatic Environment *. Acta hydrochimica et hydrobiologica, v. 33, p. 45–55, 2005.

MARCO, A.; SIMONE, C.; RAGLIONE, M.; TESTA, A.; TRINCA, S. Importance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of Vicia faba treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide. Mutation Research, v. 279, p. 9–13, 1992.

MASTRANGELO, S.; TOMASSETTI, M.; CARRATU, M.R.; EVANDRI,M.G.; BOLLE, P. Quercetin Reduces Chromosome Aberrations Induced by Atrazine in the Allium cepa Test. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 47, p. 254-259, 2006.

MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P.V.; DECORDIER, I.; KRISCHVOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. Biochimic, v. 88, p. 1515-1531, 2006.

MITCHELL, G.; BARTLETT, D. W.; FRASER, T. E. M.; HAWKES, T.R.; HOLT, D. C.; TOWSON, J. K.; WICHERT, R. A. Mesotrione : a new selective herbicide for use. Pest Management Science, v. 128, 2001.

MOHAMMED, K.B.; MA, T.H. Tradescantia-micronucleus and stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. Mutation Research, v. 426, p. 193-199, 1999.

MONTAGNER, C.C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R.D.; JARDIM, W.F.; JARDIM, I. C. S. F.; UMBUZEIRO, G.A. Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of S˜ao Paulo (Brazil). Analytical Methods, v. 6, p. 6668, 2014.

MORAN, G. R. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Archives of Biochemistry, v. 433, p. 117–128, 2005.

MOREIRA, R.A.; MANSANO, A.S.; SILVA, L.C.; ROCHA, O. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans Daphnia magna, Ceriodaphnia silvestrii and Macrothrix flabelligera. Acta Limnologica Brasiliensia, v. 26, no. 1, p. 1-8, 2014.

MORO, CLAIRE VALIENTE; BRICHEUX, GENEVIEVE; PORTELLI, CHRISTOPHE; BOHATIERz, JACQUES. Comparative effects of the herbicides chlortoluron and Mesotrione on freshwater microalgae. Environmental Toxicology and Chemistry, v, 31, 4, p. 778–786, 2012.

NASH, S.M.B.; MCMAHON, K.; EAGLESHAM, G.; MULLER, J.F. Application of a novel phytotoxicity assay for the detection of herbicides in Hervey Bay and the Great Sandy Straits. Marine Pollution Bulletin, v. 51, p. 351–360, 2005.

NI, YAN; LAI, JINHU; WAN, JINBAO; CHEN, LIANSHUI, 2014. Photosynthetic responses and accumulation of mesotrione in two freshwater algae. Environ. Sci.: Processes Impacts, 16, 2288–2294.

NWANI, C.D., NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; KUMAR, P.; LAKRA, W.S. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine based herbicide to freshwater fish Channa punctatus (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. Environmental toxicology and pharmacology, v. 3, p. 314–322, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Terrestrial Plants Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test (No. 208) and Vegetative Vigour Test (No. 227). In: OECD Guidelines for Testing Chemicals. Paris (France), 2006.

OLSZYK, D.M.; BURDICK, C.A.; PFLEEGER, T.G.; LEE, E.H.; WATRUD, L.S. Assessing the Risks to Non-Target Terrestrial Plants from Herbicides. Journal of Agricultural Meteorol, v. 60, p. 221-242, 2004.

PAVLICA, M.; PAPES, D.; NAGY, B. 2 , 4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. Mutation Research, v. 263, p. 77–81, 1991.

PIANCINI, L.D.S.; GUILOSKI, I.C.; ASSIS, H.C.S.; CESTARI, M.M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. Toxicology Reports, v. 2, p. 1157-1163, 2015b.

PIANCINI, L.D.S.; SANTOS, G.S.; TINCANI, F.H.; CESTARI, M.M. Piscine micronucleus test and the comet assay reveal genotoxic effects of Atrazine

herbicide in the neotropical fish Rhamdia quelen. Ecotoxicol. Environ. Contam, v. 10, p. 55-60, 2015a.

PLEWA, M. J.; WAGNER, E. D.; STAVREVA, D. A.; GICHNER, T. Plant activation and its role in environmental antimutagenesis mutagenesis and. Mutation Research, v. 350, p. 163–171, 1996.

POPA, N.E.; ZAKRZHEVSKAYA, A.M.; KOZHOKARU, R.V.; ENAKI, D.K. Cytogenetic effect of some herbicides on maize seedlings. Weed Abstracts, Farnham Royal, v. 35, p. 50, 1986.

POSE-JUAN, E.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M.J.; HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.S. Application of mesotrione at different doses in an amended soil: Dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. Science of the Total Environment, v. 536, p. 31–38, 2015.

QI, Y.; LIU, D.; ZHAO, W.; LIU, C.; ZHOU, Z.; WANG, P. Enantioselective phytotoxicity and bioacitivity of the enantiomers of the herbicide napropamide. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 125, p. 38–44, 2015.

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, v. 390, p. 121–127, 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. Mutation Research, v. 312, p. 17–24, 1994.

RASHED, M. N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. Environmental International, v. 27, p. 27–33, 2001.

RIBAS, G.; SURRALLES, J.; CARBONELL, E.; CREUS, A.; XAMENA, N.; MARCOS, R. Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes. Mutation Research, v. 416, p. 93–99, 1998.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ulbra, p. 173-200, 2003.

SALABERRIA, I.; HENRIK, B.; ASENSIO, V.; OLSVIK, P.A.; ANDERSEN, R. A.; JENSSEN, B. M. Effects of atrazine on hepatic metabolism and

endocrine homeostasis in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Toxicology and Applied Pharmacology, v. 234, p. 98–106, 2009.

SCHMITZ, J.; STAHLSCHMIDT, P.; BRÜHL, C.A. Protection of terrestrial non-target plant species in the regulation of environmental risks of pesticides. Umweltbundesamt, v.20, p. 1862-4804, 2015.

SETH, C.S.; MISRA,V.; CHAUHAN, L.K.S.; SINGH, R.R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of Allium cepa: cytogenetic and Comet assay approach. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 71, p. 711–716, 2008.

SHINN, C.;SANTOS, M.M.; LEK, S.; GRENOUILLET, G. Behavioral response of juvenile rainbow trout exposed to an herbicide mixture. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 112, p. 15–21, 2015.

SHUGART, L. R. 5-methyl deoxycytidine content of dna from bluegill sunfish (Lepomis macrochirus) exposed to benzo [a] pyrene. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 9, p. 205–208, 1990.

SILVEYRA, G.R.; CANOSA, I.S.; RODRÍGUEZ, E.M.; MEDESANI, D.A., 2017. Effects of atrazine on ovarian growth, in the estuarine crab Neohelice granulata. Comparative Biochemistry and Physiology, 192,1–6.

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 ,p. 8–12, 2009.

STEVOVIC, V.; STANISAVLJEVIC, R.; DJUKIC, D.; DJUROVIC, D. The effect of plant density on forage and seed yields and quality of red clover (trifolium pratense l). Cereal Research Communications, v. 36, p. 1395–2094, 2008.

SUTTON, P.; RICHARDS, C.; BUREN, L.; GLASGOW, L. Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. Pest Management Science, v. 58, p. 981–984, 2002.

THOMPSON, O. C.; TRUELOVE, B.; DAVIS, D. E. Effects of Triazines on Energy Relations of and Chioroplasts Mitochondria. Weed Science Society of America, v. 22, p. 164–166, 1974.

TIMBREL, J. Introduction to Toxicology. 3o ed. London, 2002.

TORNISIELO, V.L.; BOTELHO, R.G.; ALVES, P.A.T.; BONFLEUR, E.J.; MONTEIRO, S.H. In: ANDREW J. PRICE; KELTON, J.A. Pesticide Tank Mixes: An Environmental Point of View. Herbicides - Current Research and Case Studies in Use, cap. 18, p. 473-47, 2013.

TSABOULA, AGGELIKI; PAPADAKIS, EMMANOUIL-NIKOLAOS; VRYZAS, ZISIS; KOTOPOULOU, ATHINA; KINTZIKOGLOU, KATERINA; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, EUPHEMIA, 2016. Environmental and human risk hierarchy of pesticides: A prioritization method, based on monitoring, hazard assessment and environmental fate. Environment International, 91, 78–93.

UEDA, T., HAYASHI, M., KOIDE, N., SOFUNI, T., KOBAYASHI, J. A preliminary study of the micronucleus test by acridine orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. Water Science and Technology, v. 25, 235-240, 1992.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D. D. F. DE; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in Oreochromis niloticus (Perciformes , Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 90, p. 42–51, 2008.

VYVYAN, JAMES R. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. Tetrahedron, v. 58, p. 1631-1646, 2002.

WERF, H. M. G. VAN DER. Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 60, p. 81–96, 1996.

WHITE, A.L.; BOUTIN, C. Herbicidal effects on nontarget vegetation: investigating the limitations of current pesticide registration guidelines Environmental Toxicology and Chemistry, v. 26, p. 2634–2643, 2007.

WIRBISKY, SARA E.; FREEMAN, JENNIFER L. Atrazine exposure elicits copy number alterations in the zebrafish genome. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 194, p. 1–8, 2017.

WOODYARD, A.J.; HUGIE, J.A.; RIECHERS, D.E. Interactions of Mesotrione and Atrazine in Two Weed Species with Different Mechanisms for Atrazine Resistance. Weed Science, v. 57, p. 369–378, 2009.

XU, G.; YAO, J.; TANG, L.;YANG, X.; ZHENG, M.; WANG, H. Electron beam induced degradation of atrazine in aqueous solution. Chemical engineering journal, v. 15, 2015.

YAMAMOTO, K.I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. Mutation Research, v.71, p.127-131, 1980.

YILDIZ, M.; HAKKI, I.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Chemosphere Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in Allium cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere, v. 75, p. 934–938, 2009.

YU, L.; EERD, L.L.V.; O'HALLORAN, I.; SIKKEMA, P.H.; ROBINSON, D.E. Response of four fall-seeded cover crops to residues of selected herbicides. Crop Protection, v. 75, p. 11-17, 2015.

ZAGONEL, J.; FERNANDES, E.C. Controle de plantas daninhas e seletividade do herbicida tembotrione na cultura do milho. Weeds control and selectivity of tembotrione herbicide in the corn culture. Revista Brasileira de Herbicidas, v.6, p.42-49, 2007.

ZEGURA B, HEATH E, CERNOSA A, FILIPIC M. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. Chemosphere, v. 75, p. 1453-1460, 2009.