
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR)

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE UMA
FORMULAÇÃO COMERCIAL DE 2,4-D (DICLOROFENOXIACÉTICO) UTILIZANDO OS
ORGANISMOS TESTES *Allium cepa* e *Tradescantia pallida***

CLEITON PEREIRA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Fevereiro/2015

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E
GENOTOXICIDADE DE UMA FORMULAÇÃO COMERCIAL DE 2,4-D
(DICLOROFENOXIACÉTICO) UTILIZANDO OS ORGANISMOS TESTES**

Allium cepa e Tradescantia pallida

CLEITON PEREIRA DE SOUZA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Fevereiro/2015

581.652 Souza, Cleiton Pereira de
S729i Investigação da toxicidade, citotoxicidade e
 genotoxicidade de uma formulação comercial de 2,4-D
 (diclorofenoxiacético) utilizando os organismos testes *Allium*
 cepa e *Tradescantia pallida* / Cleiton Pereira de Souza. - Rio
 Claro, 2015
 75 f. : il., figs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Herbicidas. 2. Auxina sintética. 3. Clorofenoxiacéticos.
4. Bioindicadores vegetais. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO: Investigação da toxicidade do herbicida 2,4-D (Diclorofenoxiacético) comercial utilizando os organismos testes *Allium cepa* e *Tradescantia*


AUTOR: CLEITON PEREIRA DE SOUZA

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biotecnologia de Rio Claro


Prof. Dr. GERALDO STACHETTI RODRIGUES
Centro Nacional de Pesquisa, Monitoramento e Avaliação de Impacto ambiental, Laboratório de Gestão Ambiental, EMBRAPA, Jaguariúna/SP


Profa. Dra. THÁIS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES
Pós-doutoranda do Departamento de Biologia, UNESP, Instituto de Biotecnologia, Rio Claro/SP

Data da realização: 20 de fevereiro de 2015.

Título alterado para: Investigação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de uma formulação comercial de 2,4-D (diclorofenoxiacético) utilizando os organismos testes *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*

À minha mãe, irmão
e ao meu pai,
que teria se sentido orgulhoso,
os grandes e verdadeiros
amores da minha vida.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à minha família, em especial, meus pais e irmão, que sempre estiveram comigo e fizeram de tudo para que eu conseguisse conquistar meus objetivos. Meus pais que quase nunca se importam consigo mesmos, se contentam com o básico e se esforçam para me proporcionar o melhor possível. A vocês minha eterna gratidão.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti, por me orientar, por ser mãe, terapeuta, pela paciência, pelo carinho, pelos ensinamentos científicos e para a vida. Obrigado por acolher tão bem no seu grupo de pesquisa um retirante do "Sertão".

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales por sempre me ajudar de maneira direta e indireta, pelo conhecimentos transmitidos, pelo carinho, pela atenção, meu muito obrigado.

À Profa. Dra. Márcia Regina Brochetto Braga, por ter me destinado uma de suas vagas para que eu pudesse ingressar no mestrado.

Aos fofotes, Vinicius, Nilton, Camila, Luiza, Maria Paula, Annelise, Thays, Jorge, Júlia, Cristina, Ana Claudia, Yadira, Raphael, Cintya e Janaína, vocês fazem meus dias mais felizes e com certeza nosso grupo de pesquisa é o mais lindo de todos. Vini e Yadi, meu agradecimento especial a vocês, pela ajuda e parceria com meus experimentos.

À minha família de coração, Bairral, Franco, Maria Tereza, Raquel e Túlio, vocês com certeza são os amigos aos quais William Shakespeare se referia, a família que a vida me permitiu escolher. Obrigado pelos conselhos, broncas, apoio e carinho.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental e também aos demais amigos do departamento de Biologia.

À minhas amigadas construídas em Três Lagoas Camila Hossotani, Flávia, Letícia, Nayla, Carol e Elenita, atualmente nos vemos raramente, estamos longe na distância, mas sempre perto no coração e sempre que nos vemos percebo que nada mudou. Obrigado por serem minhas amigas.

À Dona Adelina e sua filha Lilian, que me receberam no pensionato quando cheguei em Rio Claro e sempre me tratou quase como um membro de sua família

Agradeço os técnicos Gerson, Roberta, Mônica, Silvia e à secretária e desenhista Cristiane, ao jardineiro senhor João, pela paciência, ajuda e compreensão.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela oportunidade, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim garanto que todos foram muito importantes e só tenho a agradecer por tudo, se hoje estou concluindo mais esta etapa, é porque tive a ajuda e o companheirismo de vocês. Meu muito obrigado.

*“A poesia está guardada nas palavras -
é tudo que eu sei.
Meu fado é o de não saber quase tudo.
Sobre o nada eu tenho profundidades.
Não tenho conexões com a realidade.
Poderoso para mim não é aquele que descobre ouro.
Para mim poderoso é aquele que descobre as
insignificâncias (do mundo e as nossas).
Por essa pequena sentença me elogiaram de imbecil.
Fiquei emocionado.
Sou fraco para elogios.”*

Manoel de Barros- Tratado Geral Das Grandezas Do Ínfimo

RESUMO

O herbicida seletivo de maior destaque, desenvolvido na década de 1940, é o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), uma auxina sintética cujo modo de ação é semelhante ao das auxinas naturais, porém com maior estabilidade na planta e por isso, mais eficaz que o hormônio natural. O uso constante e indiscriminado desta classe de agroquímicos tem causado sérios danos ao meio ambiente. Diante do exposto o presente trabalho objetivou investigar a toxicidade do herbicida 2,4-D comercial DMA 806 BR[®] utilizando os organismos testes *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. Foi intuito ainda comparar os resultados aqui obtidos investigando a formulação comercial com os dados já constantes na literatura que investigaram o princípio ativo do ácido 2,4-diclorofenoxiacético para verificar se há interação aditiva e/ou sinérgica entre o ingrediente e as demais substâncias que compõem o produto comercial. Para avaliar a ação do herbicida 2,4-D comercial foram testadas três concentrações, a utilizada em campo, metade e um quarto. Com sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação de forma contínua para avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade das três concentrações do herbicida testadas. O controle positivo foi feito com o herbicida Trifluralina[®] (0.95 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e o negativo com água destilada. O ensaio foi conduzido em triplicata. Para avaliar genotoxicidade por meio do teste de micronúcleo com *T. pallida*, 10 hastes florais jovens com botões fechados, foram coletadas e expostas as três concentrações do 2,4-D comercial por 8 horas, seguidas de 24 horas de recuperação em água destilada sob constante aeração. O mesmo foi feito com controle positivo metil metano sulfonato ($7.7 \times 10^{-3} \mu\text{L mL}^{-1}$) e controle negativo em água destilada. Foram contabilizadas 3.000 tétrades por tratamento. A distribuição dos dados em relação a normalidade foi realizada com o teste Shapiro-Wilk, o teste paramétrico utilizado foi Anova/Tukey e o não paramétrico Kruskal-Wallis/Dunn ($p < 0,05$). A estatística foi realizada comparando os resultados dos tratamentos com o controle negativo. O herbicida foi tóxico e citotóxico para *A. cepa* e genotóxico para *A. cepa* e *T. pallida*. Pelos resultados obtidos, sugere-se que há pouca ou nenhuma interação entre o princípio ativo e as demais substâncias que compõem a formulação comercial, uma vez que os efeitos aqui registrados, foram semelhantes aos descritos na literatura. O presente estudo demonstrou que a formulação comercial do herbicida 2,4-D testada foi capaz de induzir anormalidades nos organismos testes empregados, sugerindo cautela no uso de compostos similares.

Palavras-chave: Herbicida, clorofenoxiacéticos, auxinas sintéticas, bioindicadores vegetais.

ABSTRACT

The most prominent selective herbicide, developed in the 1940s, is the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), with an auxin whose mode of action is similar to the natural auxin, but with greater stability in plant and therefore, more effective than the natural hormone. The constant and indiscriminate use of this agrochemical class has caused serious damage to the environment. Given the above the present study aimed to investigate the toxicity of the commercial 2,4-D herbicide DMA 806 BR[®], using the *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* as models. It was still aimed to compare the results obtained by investigating a commercial formulation with data already constants in the literature that investigated the active ingredient (2,4-diclofenoxiacético acid) to check for additive interaction and/or synergic ingredient and other substances contained in the commercial product. Three concentrations of commercial 2,4-D herbicide were tested to assess the toxic potential effects: field concentration, half and a quarter of field concentration. One hundred seeds of *A. cepa* were subjected to continuously germination for evaluating the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of the three tested concentrations. The positive control was performed with the herbicide Trifluralin[®] (0.95 $\mu\text{L mL}^{-1}$) and negative control with distilled water. The experiment was conducted in triplicate. To assess genotoxicity by means of the micronucleus test with *T. pallida*, 10 young flowers stems with closed buds were collected and exposed to three different concentrations of 2,4-D Commercial for 8 hours, followed by 24 hours recovery in distilled water under constant aeration. The positive control was performed with methyl methane sulfonate positive control ($7.7 \times 10^{-3} \mu\text{L mL}^{-1}$) and negative control in distilled water. Three thousand tetrads were counted per treatment. Data distribution for normality was performed with the Shapiro-Wilk test, the parametric test was performed with ANOVA/ Tukey and the nonparametric test with Kruskal-Wallis/Dunn ($p < 0.05$). The statistical analysis was performed by comparing the results of the treatments with the negative control. The herbicide was toxic and cytotoxic to *A. cepa* and genotoxic to and *T. pallida*. According to results, it is suggested that there is little or no interaction between the active ingredient and other substances that compose the commercial formulation, since the effects reported here were similar to those described in the literature. This study demonstrated that the commercial formulation 2,4-D herbicide was able to induce abnormalities in test organisms utilized, suggesting caution in the use of similar compounds.

Keywords: Herbicide, chlorophenoxyacetic, synthetic auxin, plant bioindicators

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. A substância de estudo - ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D).....	11
2.2. Bioindicadores vegetais e biomarcadores genéticos.....	11
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Composto testado.....	37
4.2. Soluções de Tratamento.....	37
4.3. Materiais biológicos.....	37
4.3.1. <i>Allium cepa</i>	37
4.3.2. <i>Tradescantia pallida</i>	37
4.4. Bioensaios.....	38
4.4.1. Bioensaio com <i>A. cepa</i>	38
4.4.2. Bioensaio com <i>T. pallida</i>	39
4.5. Análises Estatísticas.....	40
5. RESULTADOS	42
5.1. Bioensaio com <i>A. cepa</i>	42
5.1.1. Morfologia e índice de germinação.....	42
5.1.2. Análises citogenéticas	43
5.2. Bioensaio Trad-MCN	45
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXO 1.....	56

1. INTRODUÇÃO

A "Revolução Verde" da década de 1950 ocasionou várias mudanças na agricultura, a mais notável delas foi ampliação na produção agrícola, em especial cereais básicos trigo, arroz e milho. O aumento da produtividade neste período está relacionado aos avanços tecnológicos como, por exemplo, o melhoramento genético e, ainda, a intensificação no uso de máquinas, irrigação e agrotóxicos (FRANKEMA, 2014).

Durante várias décadas, os agrotóxicos têm sido amplamente utilizados a fim de melhorar a produtividade e obter produtos agrícolas de boa qualidade. Apesar dos riscos de toxicidade em potencial de organismos benéficos e até mesmo à saúde humana, a utilização dos agrotóxicos é necessária e indispensável para manter os padrões de rendimento de produção atuais (DELCOUR; SPANOGHE; UYTTENDAELE, 2015).

O desenvolvimento do ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) e dos outros herbicidas fenoxiacéticos transformou a agricultura em grande parte do mundo e deve ser classificado como uma grande contribuição da ciência (ZIMDAHL, 2010). Com a aplicação dos herbicidas auxínicos começou uma nova fase na produção agrícola devido a sua mobilidade sistêmica na planta e sua ação seletiva, principalmente contra ervas daninhas dicotiledôneas (GROSSMANN, 2003). O herbicida 2,4-D foi introduzido na década de 1940 e após mais de 50 anos de uso, ele ainda é muito utilizado em todo o mundo. É aplicado principalmente nas culturas de trigo, sorgo, milho, arroz, cana-de-açúcar, soja e pastagens (MIČIĆ; BIHARI; MLINARIČ-RAŠČAN, 2004)

Os agrotóxicos são diferentes de outras substâncias químicas porque são aplicados no ambiente com o objetivo de controlar as espécies vivas indesejáveis, portanto, precisam ser biologicamente ativos e por este motivo são caracterizados por diferentes graus de toxicidade. Uma vez que esta toxicidade nem sempre é específica aos organismos alvo, a utilização dos agrotóxicos pode apresentar riscos para a saúde humana, à sobrevivência de espécies não alvo e ao meio ambiente (COLOSIO; MORETTO, 2008). Diante do uso destas substâncias em larga escala, a investigação de sua toxicidade nos vários ambientes é necessária e prudente uma vez que pode afetar diferentes organismos.

Neste sentido, vale a pena salientar que diferentes tipos de organismos são atualmente utilizados como bioindicadores, ou seja, espécies sentinelas que são usadas como indicadores para avaliação da qualidade ambiental dos possíveis efeitos de riscos naturais ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, por exemplo, os moluscos (DAVID; FONTANETTI, 2009; NOGAROL; BROSSI-GARCIA; FONTANETTI, 2012) e os peixes (MARINHO et al.,

2014; MARCATO; YABUKI; FONTANETTI, 2014) têm sido amplamente utilizados como bioindicadores de toxicidade de poluentes (FONTANETTI; SOUZA; CHRISTOFOLETTI, 2012). As plantas atualmente têm uma vantagem de utilização quanto à abordagem ética. Segundo Ma et al. (1995), os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de poluentes, constituem um importante material para testes genéticos e de monitoramento ambiental. *Allium cepa*, *Tradescantia* spp e *Vicia faba* (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009; RODRÍGUEZ et al., 2015) são as plantas mais utilizadas na avaliação de toxicidade de diferentes compostos e também no biomonitoramento. Além disso, estes bioindicadores auxiliam na investigação de poluentes presentes nos diversos ecossistemas.

Os biomarcadores mais empregados no teste de *A. cepa* são o índice mitótico (IM), para avaliação dos diferentes níveis de citotoxicidade de diversos agentes (GOUJON et al., 2014), as aberrações cromossômicas (AC) de uma maneira geral são divididas em clastogênicas, que de uma forma simples significa lesões nos cromossomos, e aneugênicas, que são distúrbios na segregação dos cromossomos durante o processo de divisão celular (SHARMA; PANNEERSELVAM, 1990), sendo este um parâmetro indicador de genotoxicidade; por fim, os micronúcleos (MN) que podem ser de origem clastogênica e/ou aneugênica, ou ainda, resultantes de amplificação do material genético (SHARMA; PANNEERSELVAM, 1990; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007), são biomarcadores de eventos genotóxicos e de instabilidade cromossômica (FENECH et al., 2011), que se não forem reparados pelas células podem gerar futuras mutações.

Dois testes de maior destaque são realizados com plantas do gênero *Tradescantia*, o teste do micronúcleo (Trad-MCN), biomarcador de genotoxicidade (MISIK et al., 2011) e o teste do pelo estaminal (Trad-SHM), indicador de mutagenicidade (RODRIGUES, 1999). O ensaio Trad-MCN consiste basicamente na exposição de botões florais jovens aos tratamentos e posterior recuperação em água destilada, necessária para a divisão das células mãe do grão de pólen (MA et al., 1994a; GERAS'KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011). O teste Trad-SHM é baseado na contagem de "eventos rosas" dos pelos estaminais expostos aos tratamentos e ao controle negativo (solução de Hoagland), evidenciados pela expressão do caráter recessivo cor rosa do pelo estaminal, causado por mutação pontual mitótica (MA et al. 1994b; RODRIGUES et al., 1997).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou investigar a toxicidade do herbicida 2,4-D comercial, produto muito utilizado na pré-emergência e pós-emergência na cultura de cana-de-açúcar, muito empregado no estado de São Paulo.

Consideramos a avaliação da toxicidade do 2,4-D comercial de extrema importância por três motivos principais: (1) avaliar os efeitos de uma formulação amplamente empregada; (2) a investigação do produto comercial fornecerá resultados mais realistas e aplicáveis; (3) como já existem estudos prévios com o ingrediente ativo, fazer uma comparação entre este e sua formulação para verificar possíveis interações aditivas e/ou sinérgicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A substância de estudo - ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

A classe de herbicidas fenoxi está disponível comercialmente há mais de 60 anos e é a família de herbicidas mais empregada no mundo todo. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) é o mais comum e o mais bem estudado desta classe de agroquímicos (KENNEPOHL; MUNRO; BUS, 2010). O 2,4-D e o 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) têm sido utilizados para controlar dicotiledôneas desde a década de 1940 (ITOH et al., 2013). Por meio da combinação destes dois herbicidas, na mesma proporção, foi formulado o "Agente Laranja" aplicado para desfolhar as florestas e plantações dos inimigos pelos Estados Unidos durante a Guerra do Vietnã (1961-1971) (STELLMAN et al., 2003).

Os herbicidas auxínicos incluem os ácidos fenoxicarboxílicos tais como o ácido 2-metil-4-clorofenolxiacético (MCPA) e o 2,4-D, que foram os primeiros herbicidas utilizados na agricultura. Este grupo de herbicidas tem efeito semelhante a auxina natural, ácido indolacético (AIA), na maioria das plantas; no entanto, eles têm longa duração devido a sua elevada estabilidade na planta, por isso são mais eficazes que o AIA; em pequenas doses estimulam vários processos de crescimento e desenvolvimento nos locais celulares de ação, mas com o aumento da concentração estimula-se uma maior atividade no tecido, o crescimento é perturbado e a planta morre (GROSSMANN, 2003).

Uma revisão sobre herbicida 2,4-D foi realizada em parceria com outro membro do grupo de pesquisa no formato de um artigo, o qual se encontra no final desta dissertação (Anexo 1).

2.2. Bioindicadores vegetais e biomarcadores genéticos

A revisão referente a estes itens também foi compilada na forma de um artigo de revisão, apresentado a seguir.

AÇÃO DOS HERBICIDAS SOBRE BIOINDICADORES VEGETAIS: AVALIAÇÃO POR BIOMARCADORES GENÉTICOS

Cleiton Pereira de Souza^a, Thays de Andrade Guedes^a, Carmem Silvia Fontanetti^{*a}

^aUNESP, Av.24-A, nº1515, Rio Claro, São Paulo, Brasil

*autora correspondente: fontanet@rc.unesp.br

Tel: +55 (19) 3526-4139, Fax: +55 (19) 3526-4135

RESUMO

O emprego de agrotóxicos tem se ampliado mundialmente em decorrência da necessidade de produtos de boa qualidade e alto rendimento, com o intuito de suprir a demanda alimentar de uma população em crescimento. Dentre as classes de agrotóxicos mais empregadas estão os herbicidas, que representam quase metade da quantidade total. A utilização destes agrotóxicos é importante para reduzir custos e aumentar a produtividade, mas o uso indiscriminado destes, e de todos os outros biocidas tem sido uma problemática de caráter global, pois podem afetar o meio ambiente e conseqüentemente, os organismos não alvos ali existentes. Para a avaliação dos danos causados pelos herbicidas presentes no ambiente, muitos organismos vêm sendo utilizados como bioindicadores, em especial plantas superiores; estas têm sido indicadas devido à inúmeras vantagens. Diante de tal problemática, este estudo tem por objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre ação dos herbicidas em bioindicadores vegetais, avaliada por biomarcadores genéticos. Esta revisão objetiva também descrever e caracterizar os principais organismos que são utilizados (*Allium cepa*, *Vicia faba* e *Tradescantia* spp) e os parâmetros de análises mais empregados (índice mitótico, aberrações cromossômicas, micronúcleo, troca de cromátides irmãs e mutações). Ao final desta revisão concluiu-se que os herbicidas induziram citotoxicidade e genotoxicidade nos bioindicadores revisados; estes dados corroboram o alerta já existente sobre os riscos que o uso indiscriminado e crescente de pesticidas oferece ao meio ambiente e sua biodiversidade.

Palavras-chave: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Tradescantia*, toxicidade.

1. INTRODUÇÃO

Há 10.000 anos atrás na Crescente Fértil da Mesopotâmia (atualmente onde se localiza parte do Iraque, Turquia, Síria e Jordânia), sementes comestíveis foram inicialmente reunidas por caçadores, para o cultivo de trigo, cevada, ervilha, lentilha, grão de bico e ervilha amarga; logo em seguida, a população se tornou mais estável e a agricultura se tornou uma prática rotineira. De maneira semelhante, a China domesticou o arroz, e há registros de cultivo de arroz e sorgo na África, 7.500 anos atrás (KISLEV; WEISS; HARTMANN, 2004; IUPAC, 2010).

O primeiro registro de uso de inseticidas é de aproximadamente 4.500 anos pelos sumérios, que usavam compostos de enxofre para controlar insetos e ácaros; há cerca de 3.200 anos, os chineses empregavam compostos de mercúrio e arsenicais para o controle de piolhos (IUPAC, 2010). Escritos da Grécia e Roma antigas mostram que religião, magia e a utilização de métodos considerados químicos foram empregados para controlar doenças em plantas e pragas. Não havia indústria química, logo, quaisquer produtos utilizados tinham origem animal, vegetal, ou mineral de fácil obtenção. A utilização de tabaco foi descrita contra mofo e pragas; também foram empregados como métodos químicos, o uso de sal e água do mar (SMITH; SECOY, 1975). Dentre os primeiros compostos de origem vegetal utilizados destacam-se os piretróides, compostos extraídos de flores do gênero *Chrysanthemum*; estes têm sido utilizados como inseticidas há mais de 2000 anos (IUPAC, 2010).

Historicamente, segundo Zhang, Jiang e Ou (2011), o uso dos pesticidas pode ser dividido em três etapas: (1) anterior à 1870, quando os produtos químicos naturais como o enxofre foram usados como pesticidas. (2) Período que compreende o intervalo de 1870-1945, que é caracterizado pela utilização de compostos sintéticos inorgânicos e substâncias naturais extraídas de plantas. (3) o último período, após 1945, compreende tanto a utilização de pesticidas orgânicos sintéticos como o diclorodifeniltricloroetano (DDT), 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), hexaclorociclohexano (HCH) e Dieldrin, como também o emprego posterior de pesticidas inorgânicos e naturais que substituíram os orgânicos. A utilização de herbicidas orgânicos sintéticos revolucionou a agricultura, pois facilitou o controle de pragas e aumentou a produtividade.

Os termos pesticida, praguicida, biocida, fitossanitário, agrotóxico, defensivo agrícola e veneno expressam as várias denominações dadas a um mesmo grupo de substâncias químicas (DAMS, 2006). Pesticidas são agentes que causam morte e que evitam ou reduzem o crescimento de organismos que são considerados indesejáveis a agricultura, por exemplo,

herbicidas, inseticidas, fungicidas, utilizados no controle de ervas daninhas, insetos e fungos, respectivamente (MAHMOOD; BILAL; JAN, 2014; USEPA, 2014). Os pesticidas podem ainda ser classificados de acordo com sua toxicidade para os humanos, seu grupo químico, ou seu modo de ação (CUBO, 2010).

Mundialmente, 4,6 milhões de toneladas de agrotóxicos são pulverizados anualmente no meio ambiente. Aproximadamente 500 pesticidas estão em ampla utilização; entre esses, estão compostos organoclorados, biocidas em geral que possuem em sua composição mercúrio, chumbo e arsênio que são altamente tóxicos ao ambiente. Em geral 1% dos praguicidas pulverizados são eficazes e 99% atingem os organismos não-alvos, ao atingirem corpos d'água, solo, fauna, flora e atmosfera (ZHANG; JIANG; OU, 2011). Os herbicidas representaram a maior parte, seguidos pelos inseticidas e fungicidas. A resistência das pragas pode ser devido à ampla aplicação de herbicidas em culturas tolerantes a herbicidas (HT crops), e esta maior resistência leva os agricultores ao aumento do emprego destes agroquímicos para controlar ervas daninhas e aumentar a produtividade. Na realidade, o uso constante de herbicidas tem causado danos ao meio ambiente (MAHMOOD; BILAL; JAN, 2014).

Diante da problemática do uso indiscriminado e crescente de agrotóxicos, que oferece riscos ao meio ambiente e à biodiversidade, o presente trabalho visa oferecer uma revisão bibliográfica sobre a ação dos herbicidas em bioindicadores vegetais, avaliada por meio de biomarcadores genéticos, assim como descrever e caracterizar os principais organismos e biomarcadores utilizados.

2. HERBICIDAS

Herbicidas são produtos químicos fitotóxicos utilizados para combater ervas daninhas e inibir seu crescimento. Eles possuem graus de especificidade, alguns como o paraquat, mata todas as plantas verdes, enquanto os fenóxidos são específicos para determinados grupos de plantas. O consumo mundial de herbicidas é quase 48% do uso total de agrotóxicos. As diferenças bioquímicas em plantas permitem o desenvolvimento de herbicidas com grau de toxicidade seletivo. Nas duas últimas décadas, a classe dos herbicidas foi a que mais se destacou na indústria de agroquímicos, por dois motivos: (1) ampliação das práticas de monocultura e (2) mecanização das práticas agrícolas devido ao aumento dos custos da mão de obra (GUPTA, 2012). Atualmente, existem mais de 130 compostos químicos que são

empregados mundialmente como seletivos e outros 30 como não seletivos (BURKE; BELL, 2014).

A introdução dos herbicidas seletivos na década de 40, no período histórico da Segunda Guerra Mundial, e o aumento na produção de novos herbicidas nas décadas seguintes, forneceram aos agricultores novas ferramentas para o controle de ervas daninhas (KUDSK; STREIBIG, 2003). Em continuação ao processo de modernização da agricultura, na década de 1960, o uso de novas variedades consideradas mais produtivas, porém mais dependentes do emprego de agroquímicos, de fato aumentou a produtividade, mas por outro lado, essa ampliação na utilização de agrotóxicos trouxe consequências adversas, uma vez que muitas dessas substâncias são nocivas ao homem e ao meio ambiente (UETA et al., 1999).

Atividades antrópicas podem carrear aos rios altas concentrações de herbicidas, seja de maneira direta, pelo despejo de efluentes gerados no processo de fabricação destes ou ainda indiretamente, devido ao modo e quantidades aplicadas, podendo atingir aquíferos, por meio da percolação e os rios, através do carreamento destes compostos e de seus subprodutos pelas águas das chuvas e da irrigação. O aumento desses agrotóxicos nos corpos d'água podem causar efeitos adversos à fauna e a flora, interagindo em diversos mecanismos, tais como, redução das taxas de crescimento e de reprodução, aumento da mortalidade e mudanças comportamentais (USEPA, 2012).

3. BIOINDICADORES VEGETAIS, BIOMARCADORES GENÉTICOS, E AÇÃO DOS HERBICIDAS SOBRE ESTES

Bioindicador é um organismo (ou partes de um organismo ou comunidades de organismos) que refletem os níveis bióticos e abióticos de uma contaminação ambiental, apresentando modificações que possibilitam fazer inferências sobre a qualidade ambiental (MARKERT; BREURE; ZECHMEISTER, 2003; HODKINSON; JACKSON, 2005), por exemplo, acumulando substâncias em concentrações maiores do que as normais ao metabolismo do seu corpo ou apresentando alterações no número de organismos (FONTANETTI et al., 2011).

Desde o século XVI observava-se que as plantas apresentavam respostas à poluição do meio ambiente. No século XIX, em cidades industrializadas da Europa, a escassez de musgos e líquens foi relacionada à poluição do ar, e gradativamente, investigações possibilitaram tal correlação. Porém, foi somente na década de 1960 que resultados de pesquisas indicaram que plantas poderiam ser usadas para mensurar de forma quantificável concentrações de poluentes

em seu habitat e, portanto, serem usadas como bioindicadores (BURTON, 2003). Atualmente, bioensaios com plantas estão bem estabelecidos e são amplamente utilizados para avaliação de qualidade ambiental (GERAS’KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011).

Existem inúmeras vantagens de se utilizar plantas superiores como bioindicadores: (1) por serem organismos eucariotos, ou seja, que possuem organização cromossômica similar ao de humanos, é possível estabelecer comparações; (2) pode-se avaliar genotoxicidade de substâncias isoladas ou em mistura (GRANT, 1994); (3) são componentes essenciais de um ecossistema; (4) estão constantemente expostas à poluição, podendo assim melhor caracterizar o ambiente; (5) estão na base da cadeia alimentar e, por isso, podem responder mais rapidamente a substâncias tóxicas do que outros organismos que estão em níveis tróficos superiores; (6) permitem o monitoramento *in situ*; (7) apresentam ampla variedade de biomarcadores que podem ser avaliados; (8) plantas são fáceis e baratas de se cultivar, em sua maioria, (9) os bioensaios são considerados simples, quando comparados a outros de avaliação ambiental (GERAS’KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011); (10) os ensaios podem ser realizados sob diferentes condições ambientais, como pH e temperatura e (GRANT, 1994; GERAS’KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011).

Após a exposição de organismos a xenobióticos, estes podem exibir mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos de resposta. Nesse sentido, o uso de marcadores possibilita obter informações sobre efeitos biológicos de poluentes sobre animais e vegetais (FONTANETTI et al., 2011). Segundo Depledge et al. (1993), biomarcadores são respostas biológicas adaptativas a estressores, evidenciadas celular, fisiológica e histologicamente, ou ainda por meio de mudanças comportamentais.

O uso de tecidos vegetais (principalmente pontas de raízes) e células mães de grão de pólen para o estudo de distúrbios citogenéticos são métodos de avaliação simples, confiáveis e de baixo custo. Essas análises permitem reconhecer e caracterizar aberrações cromossômicas e mutações no genoma. Nos testes de mutação gênica, em particular, o gametófito proporciona inúmeras vantagens como biomarcador para avaliação de mutações, pois suas células são grandes, haplóides e altamente sensíveis a mutações que afetem o desenvolvimento do grão de pólen (GERAS’KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011). Os organismos mais utilizados nessas técnicas estão listados na Tabela 1.

3.1. *Allium cepa* e *Vicia faba*

Meristemas radiculares de *A. cepa* (cebola) e *V. faba* (fava) são materiais citogenéticos precursores para estudos de clastogenicidade de agentes físicos e químicos, desde o início da década de 1930 (MA et al., 1995). *Allium cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo teste de citotoxicidade, genotoxicidade e instabilidade cromossômica devido às características que possui, facilidade de cultivo e manuseio, disponibilidade ao longo do ano, bem como por possuir cromossomos grandes e em pequeno número ($2n=16$), o que facilita a observação de danos cromossômicos e distúrbios do ciclo mitótico (FISKESJO, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

V. faba apresenta seis pares de cromossomos relativamente grandes ($2n=12$); devido a esta característica, foi utilizada em estudos que investigaram a indução de quebras e aberrações cromossômicas por meio de radiação desde o início da década de 1950, e já no início da década seguinte (1960) passou a ser empregada também em pesquisas sobre danos cromossômicos causados por agentes químicos (MA, 1982).

3.1.1. Biomarcadores em *A. cepa* e *V. faba*

Dentre as principais respostas, consideradas excelentes biomarcadores, utilizadas na avaliação da qualidade ambiental empregando cebola e fava, estão o índice mitótico, alterações na estrutura e número cromossômico, micronúcleos e troca de cromátides irmãs.

O índice mitótico (IM) é caracterizado pelo número total de células em divisão no ciclo celular e tem sido usado na avaliação da citotoxicidade de inúmeros agentes (SRIVASTAVA; MISHRA, 2009; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; CHRISTOFOLETTI; PEDRO-ESCHER; FONTANETTI, 2013).

Alterações nas estruturas cromossômicas podem ter diversas origens: (1) quebras no DNA, (2) inibição da síntese de DNA e erros no mecanismo de replicação e (3) segregação anormal dos cromossomos. Todos estes processos podem ocorrer espontaneamente ou pela ação de xenobióticos (ALBERTINI et al., 2000). Para avaliação dessas aberrações, muitos tipos de aberrações cromossômicas (AC) são consideradas nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase). No entanto, estas análises não são simples, e exigem conhecimento sobre as fases de divisão e possíveis anormalidades. De uma maneira simples as AC, tais como pontes e quebras indicam ação clastogênica, enquanto perdas, atrasos, aderências, multipolaridade e C-metáfases são resultantes de efeitos aneugênicos

(LEME; MARIN-MORALES, 2009). As AC são utilizadas como indicador de genotoxicidade de diversos agentes (NATARAJAN, 2002; OBE et al., 2002).

A troca de cromátides irmãs (SCE) pode ser resultado de alterações afetadas pela expressão de genes por meio da perda de heterozigose. Experimentos de SCE são tradicionalmente feitos e bem estudados em células de mamíferos. Para plantas, os protocolos tem sido desenvolvidos com experimentos em células radiculares de *Vicia faba* (GOMÉZ ARROYO; HERNANDÉZ-GARCIA; VILLALOBOS-PIETRINI, 1988; FLORES-MAYA et al., 2005).

Cromátides irmãs são visualizadas por meio de métodos de incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU) no DNA cromossomal e pela coloração diferencial de cromátides contendo DNA com BrdU e cromátides sem BrdU (GERAS’KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011). O teste de SCE é capaz de detectar efeitos de pequenas doses, desta forma é adequado para teste iniciais de avaliação de genotoxicidade (EASTMOND, 2005)

Micronúcleos (MN) são encontrados como pequenos corpos extracelulares resultantes de quebra cromossômica (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros que não atingiram os polos do fuso durante a divisão celular (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Além disso, MN podem ser resultantes do processo de poliploidização, originando estes corpúsculos a partir da eliminação do excesso de DNA do núcleo principal na tentativa de restaurar as condições normais de ploidia, são induzidos espontaneamente ou por ação de xenobióticos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Os resultados significativos com este teste fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

3.1.2. Ação dos herbicidas em *A. cepa* e *V. faba*

Vários autores utilizaram os vegetais *A. cepa* e *V. faba* como organismos testes na avaliação do potencial tóxico de diversos herbicidas. Os autores empregaram os biomarcadores mais utilizados nestes vegetais descritos no item anterior. De modo geral, foi observada a diminuição do índice mitótico tanto em *A. cepa* como *V. faba*, bem como a indução de aberrações cromossômicas.

Dentre os trabalhos revisados destacam-se os estudos que investigaram a ação das formulações comerciais e de seus respectivos princípios ativos em *A. cepa*; Rank et al. (1993) avaliaram o Roundup® e o seu ingrediente ativo isopropilamina de glifosato e Grisolia, Bilich e Formigli (2004) estudaram os efeitos do Arsenal® e seu princípio ativo imazapyr. Estudos

como estes são importantes porque em geral os efeitos dos ingredientes ativos dos diferentes agrotóxicos e seus mecanismos agrônômicos de ação já estão bem determinados, no entanto os efeitos ecotoxicológicos das formulações comerciais não (GRISOLIA, 2005); no produto comercial pode haver interação aditiva e/ou sinérgica entre o ingrediente ativo e os inertes e os resultados destas interações são imprevisíveis.

A relação dos estudos realizados com os diversos herbicidas, as concentrações testadas e os principais efeitos observados estão sumarizados na Tabela 2.

3.2. *Tradescantia* spp

Estudos citogenéticos da *Tradescantia* iniciaram-se com Sax e Edmonds (1933), observaram que cromossomos meióticos eram mais suscetíveis à quebra que cromossomos mitóticos; ressaltaram ainda que cromossomos em divisão são ao menos dez vezes mais suscetíveis que aqueles em intérfase. Desde esta época, várias espécies e clones do gênero têm sido utilizados como organismos bioindicadores, devido a uma série de características favoráveis. As principais espécies de *Tradescantia* utilizadas apresentam apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis e células de quase todas as partes da planta, da ponta da raiz ao tubo polínico em desenvolvimento, fornecendo excelente material para estudos citogenéticos (RODRIGUES, 1999b; MA; GRANT, 1982).

Duas técnicas de biomarcadores de maior destaque são realizadas com plantas deste gênero, o teste do micronúcleo (Trad-MCN) (MISIK et al. 2011) e o teste do pelo estaminal (Trad-SHM) (MA et al., 1994a).

3.2.1. Biomarcadores em espécies de *Tradescantia*

O ensaio Trad-MCN consiste basicamente na exposição de botões florais jovens de *Tradescantia* aos tratamentos e posterior recuperação em água, necessária para a divisão das células mãe do grão de pólen (GERAS'KIN; EVSEEVA; OUDALOVA, 2011).

O clone mais utilizado em estudos de genotoxicidade é o #4430, que é um híbrido entre *T. hirsutiflora* e *T. subacaulis* e foi estabelecido por Sparrow e colaboradores na década de 1960. Este clone também pode ser utilizado no ensaio de mutação em pelo estaminal (MA et al., 1994a; 1994b).

No Brasil muitos grupos utilizam a espécie *Tradescantia pallida* para este teste (PEREIRA; CAMPOS JÚNIOR; MORELLI, 2013; PEDRO-ESCHER; MAZIVIEIRO; FONTANETTI, 2014; RODRÍGUEZ et al., 2015).

O teste Trad-SHM, baseia-se em mutação pontual (mitótica) na qual é suprimida a expressão do caráter azul dominante em flores heterozigotas, resultando no aparecimento da cor rosa recessiva (RODRIGUES et al., 1997). A alta sensibilidade do ensaio Trad-SHM a agentes mutagênicos químicos foi primeiramente observada após exposição acidental das plantas (clone 02) a vapores que contaminavam o suprimento de ar no Laboratório Nacional de Brookhaven (ou BNL, de Brookhaven National Laboratory), situado em Nova Iorque, Estados Unidos. Um aumento súbito na frequência espontânea de mutações levou a suspeita e à descoberta da contaminação (SPARROW; SCHAIRER, 1971).

3.2.2. Ação dos herbicidas em *Tradescantia*

Rodrigues, Pimentel e Weinstein (1998) avaliaram a genotoxicidade de dois herbicidas, cianazina e metolaclor por meio do teste de micronúcleo (Trad-MCN). Os dois agentes testados evidenciaram aumento significativo na frequência de micronúcleos. O metolaclor apresentou clara relação dose-resposta. Em conclusão, os dois pesticidas um certo grau de clastogenicidade no ensaio nas doses entre 10-50 ppm, doses estas que estão bem abaixo daquelas aplicadas em sprays formulados.

Kong e Ma (1999) utilizaram os testes Trad-MCN e Trad-SHM para investigar diferentes amostras de solos e água de poços. Por meio do teste de micronúcleo os autores detectaram efeitos clastogênicos das amostras de solo da fazenda dos Monroe, nas amostras com 100% de solo e nos solubilizados destes solo nas concentrações 50% e 100% diluído em dimetil sulfóxido. Esta fazenda empregou vários pesticidas anteriormente, tais como, metolaclor, atrazina, extrazina e 2,4-D. Os resultados do Trad-MCN para o solo de Viena, Áustria, contaminado por três concentrações diferentes de pesticidas mostrou que os tratamentos induziram a formação de micronúcleos significativamente em comparação ao controle negativo. Pelo teste Trad-SHM foram avaliadas as águas das áreas Bushnell e Fountain Green, o teste evidenciou que a observação de eventos de mutação rosa foram elevadas aos observadas nas amostras do controle negativo, sabia-se que as águas destes poços estavam contaminadas pela infiltração de pesticidas empregados nas fazendas. O estado de Illinois já havia condenado o uso destas águas como não apropriadas ao consumo humano e em alguns casos nem adequada para o gado.

Mohammed e Ma (1999) investigaram a genotoxicidade das formas líquidas e gasosas dos herbicidas atrazina, simazina, dicamba e picloram, usando os ensaios do pelo estaminal (Trad-SHM) e do micronúcleo (Trad-MCN). O teste de Trad-SHM com picloram revelou

respostas positivas com concentrações 5-10 ppm. Atrazina líquida induziu micronúcleos com concentrações em níveis de 10-50 ppm, porém em doses menores e maiores as respostas foram negativas. Nos testes de Trad-MCN com simazina, as concentrações entre 5-200 ppm geraram resultados positivos em todas as doses. O dicamba teve efeito positivo em todas as dosagens e o picloram induziu respostas nas doses 50-100 ppm, mas na dose de 200 ppm, a resposta foi negativa. A concentração de 200 ppm de dicamba e picloram causou toxicidade fisiológica e morte de tétrades.

Alvarez-Moya et al. (2011) avaliaram o dano genético induzido pela isopropilamina de glifosato usando o teste do pelo estaminal e ensaio cometa em *Tradescantia*. No SHM todas as concentrações testadas induziram a descoloração parcial ou total das células estaminais, desta forma, o teste tornou-se inadequado. Já o ensaio cometa exibiu resultados muito diferentes, apresentando diferença significativa entre todos os grupos tratados e o controle.

4. Considerações finais

Diante dos trabalhos descritos e analisados nesta revisão bibliográfica conclui-se que muitos herbicidas são citotóxicos e genotóxicos para os bioindicadores vegetais, o que reforça o alerta já existente sobre os riscos que o uso indiscriminado de agrotóxicos oferece ao meio ambiente. Outra constatação foi que plantas superiores são de fato organismos adequados para estudos de avaliação de toxicidade, pois são altamente sensíveis. Contudo, as espécies mais empregadas nestes estudos são *A. cepa* e *V. faba*.

5. Referências Bibliográficas

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.G.; TICE, R.; WATERS, M. D.; AITIO, A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, v. 463, p. 111–172, 2000.

ALVAREZ-MOYA, C.; SILVA, M. R.; ARÁMBULA, A. R. V.; SANDOVAL A. I.; VASQUEZ, H. C.; MONTES, R. M. G. Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, p. 127-130, 2011.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, WASEEM. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.

BADR, A.; ELKINGTON, T. T. Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 22, p. 265-270, 1982.

- BADR, A.; IBRAHIM, A. G. Effect of herbicide glean on mitosis, chromosomes and nucleic acids in *Allium cepa* and *Vicia faba* root meristems. **Cytologia**, v. 52, p. 293-302, 1987.
- 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.
- BURKE, I.C.; BELL, J. L. Plant health management: herbicides. In: ALFEN, N. K. V. **Encyclopedia of agriculture and food systems**. Second edition. San Diego, CA, USA: Elsevier, 2014, p. 425-440.
- BURTON, M. A. S. Plants as pollution monitors. In: THOMAS, B.; MURPHY, D.J.; MURRAY, B. G. **Encyclopedia of applied plant sciences**. First edition. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2003, p. 765-772.
- CALDERON-SEGURA, M. E.; GOMEZ-ARROYO, S.; VILLALOBOS-PIETRINI, RAFAEL.; ESPINOSA-RAMÍREZ, M. In vivo and in vitro promutagen activation by *Vicia faba* of thiocarbamate herbicides molinate and butylate to products inducing sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 438, p. 81-88, 1999.
- CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; SUNDARARAMAN, V.; GUPTA, S. K. Diuron induced cytological and ultrastructural alterations in the root meristem cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 62, p. 152-163, 1998.
- CHAUHAN, L. K. S.; SUNDARARAMAN, V. Effect of substituted ureas on plant cells I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 55, p. 91-98, 1990.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. . Assessment of the Genotoxicity of Two Agricultural Residues After Processing by Diplopods Using the *Allium cepa* Assay. **Water, Air and Soil Pollution** (Dordrecht. Online), v. 224, p. 1523, 2013.
- CORTÉS, F.; RODRIGUEZ-HIGUERAS, J. M.; ESCALZA, P. Different cytotoxic effects induced by maleic hydrazide in root meristem cells. **Environmental and Experimental Botany**, v. 25, p. 183-188, 1985.
- CROKER, B.H. Effects of 2,4-D Dichlorophenoacetic acid and 2,4,5- Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. **Botanical Gazete**, v. 114, p. 274-283, 1953.
- CUBO, E. Pesticides. In: KOMPOLITI, K.; METMAN, L. V. **Encyclopedia of movement disorders**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2010, p. 450-452.
- DAMS, R. I. Pesticidas: usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal**, v. 7, p. 37-44, 2006.
- DEKERGOMMEAUX, D. J.; GRANT, W. F.; SANDHU, S. S. Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. **Mutation Research**, v. 124, p. 69-84, 1983.
- DE MARCO, A.; BOCCARDI, P.; DE SIMONE, C.; PICCOLO, A.; RAGLIONE, M.; TESTA, A.; TRINCA, S. Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. **Mutation Research** v. 241, p. 1-6, 1990.

- DE MARCO, A.; DE 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.
- DE SIMONE, C.; PICCOLO, A.; DE MARCO, A. Genotoxic effect induced by herbicides atrazine glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soils. **The Science of the Total Environment**, v. 123/124, p. 233-240, 1992.
- DEPLEDGE, M.H.; AMARAL-MENDES, J.J.; DANIEL, B.; HALBROOK, R.S.; KLOEPPERSAMS, P.; MOORE, M.N.; PEAKALL, D.B. The conceptual basis of the biomarker approach, In: PEAKALL, D. B.; SHUGART, L. R. **Biomarker: Research and application in the assessment of environmental health**. First edition. Netherlands: NATO ASI Series, 1993, p.15-29.
- DIZDARI, A. M.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**, v. 8, p. 19-26, 2013.
- EASTMOND, D. A. Sister Chromatid Exchanges. In: WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**, Second edition. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2005, p. 19- 20.
- EL-ABIDIN SALAM A. Z.; HUSSEIN, E. H. A.; EL-ITRIBY, H. A.; ANWAR, W. A.; MANSOUR, S. A. The mutagenicity of Gramoxone (paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research**, v. 319, p. 89-101, 1993.
- EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. Cytological effect of the herbicide Garlon-4 on root mitosis of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 54, p. 465-472, 1989.
- EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. Effects of the herbicide Tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 55, p. 209-215, 1990.
- FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, 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.
- FILKOWSKI, J.; BESPLUG, J.; BURKE, P.; KOVALCHUK, I.; KOVALCHUK, O. Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. **Mutation Research**, v. 542, p. 23-32, 2003.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FISKESJÖ, C. G.; LASSEM, C; RENBERG, L. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols In the modified *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, v. 34, p. 333-344, 1981.

FLORES-MAYA, S.; GÓMEZ-ARROYO, S.; CALDERÓN-SEGURA, M. E.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; WALISZEWSKI, S. M.; CRUZ, L. G. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro and in *V. faba* root tip meristems. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 243–251, 2005.

FONTANETTI, C.S.; NOGAROL, L. R.; SOUZA, R. B.; PEREZ, D. G.; MAZIVIERO, G. Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: Simone Pascucci. (Org.). **Soil Contamination**. Rijeka, Croácia: InTech, 2011, p. 143-168.

GERAS'KIN, S.; EVSEEVA, T.; OUDALOVA, A. Plants as a tool for the environmental health assessment. In: NRIAGU, J.O. **Encyclopedia of Environmental Health**. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, 2011, p. 571-579.

GERAS'KIN, S. A.; KIM, J. K.; DIKAREV, V. G.; OUDALOVA, A. A.; DIKAREVA, N. S.; SPIRIN Y. V. Cytogenetic effects of combined radioactive (¹³⁷Cs) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. **Mutation Research**, v. 586, p. 147–159, 2005.

GÓMEZ-ARROYO, S.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R. Induction of sister-chromatid exchanges in *Vicia faba* by arsenic-contaminated drinking water. **Mutation Research**, v. 208, p. 219-224, 1988.

GOMEZ-ARROYO, S.; RODRIGUEZ-MADRID, L.; VILLALOBOS-PIETRINI, R. Chromosomal alterations induced by the thiocarbamate herbicide molinate (ordram) in *Vicia faba*. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 8, p. 77-80, 1992.

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 47–54, 2014.

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

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392 p.

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

GUPTA, P.K. Herbicides and fungicides. In: GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology**. Second edition. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2012, p. 631-652.

HODKINSON, I. D.; JACKSON, J. K. Terrestrial and aquatic invertebrates as bioindicators for environmental monitoring, with particular reference to mountain ecosystems. **Environmental Management**, v. 35, p. 649–666, 2005.

IUPAC- Internacional Union of Pure And Applied Chemistry. **History of pesticide use**. [2010]. Disponível em:

<http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31>. Acesso em: 10 ago. 2014.

- KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, G.; ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, p. 873–899, 2011.
- KISLEV, M. E.; WEISS, E.; HARTMANN, A. Impetus for sowing and the beginning of agriculture: Ground collecting of wild cereals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 2692-2695, 2004.
- KONG, M.S.; MA, T.H.. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 221- 228, 1999.
- KUDSK, P.; STREIBIG, J. C. Herbicides - a two - edged sword. **Weed Research**, v, 43, p. 90–102, 2003.
- LEHNEN JR, L. P.; VAUGHN, K. C. The herbicide sindone b disrupts spindle microtubule organizing centers. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 50-59, 1992.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71–81, 2009.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v.650, p. 80–86, 2008.
- MA, T.H. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 259-271, 1982.
- MA, T, H.; GRANT, W. F. The Tradescantias- adventurous plants. **The Herbarist**, v. 48, p. 36-44, 1982.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; CHEN, R.; LOARCA, F.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 211-220, 1994a.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B.S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 221-230, 1994b.
- MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; Mc CONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.
- MAHMOOD, Q.; BILAL, M.; JAN, S. Herbicides, pesticides, and plant tolerance: An overview. In: AHMAD, P.; RASOOL, S. **Emerging technologies and management of crop stress tolerance**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2014, p. 423-448.
- MARCANO, L.; CARRUYO, I.; CAMPO, A. D.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, p. 221–226, 2004.

- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and biomonitors: Principles, concepts and applications (Trace metals and other contaminants in the environment)**. San Diego, CA, USA: Elsevier, 2003, p. 3-39.
- MISIK, M.; MA, T-H., NERSESYAN, A.; MONARCA, S.; KIM, J.K.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. **Mutagenesis** vol. 26 no. 1 pp. 215–221, 2011.
- 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.
- NATARAJAN, A.T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, v. 504, p. 3- 16, 2002.
- OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, p. 17–36, 2002.
- 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.
- PEDRO-ESCHER, J.; MAZIVIERO, G. T.; FONTANETTI, C. S. Mutagenic action of sugarcane vinasse in the *Tradescantia pallida* test system. **Ecosystem & Ecography**, v. 4, p. 145, 2014.
- PEREIRA, B. B.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; MORELLI, SANDRA. *In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 87, p. 17–22, 2013.
- 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.; JENSEN, A. G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, p. 29-36, 1993.
- RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 355 p.
- RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis - a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 325-359, 1997.
- RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores Tradescantia (MCN e SHM), milho e soja**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999a. 30 p. (Embrapa Meio Ambiente. Circular Técnica, 02).

- RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999b. 56 p.
- RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 412, p. 235–244, 1998.
- RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.
- SAX, K.; EDMONDS, H. W. Development of male gametophyte in *Tradescantia*. **Botanical Gazette**, v. 95, p. 156-163, 1933.
- SILVA, D. T.; MEIRELLES, S. T.; MORAES, R. M. Relationship between ozone, meteorological conditions, gas exchange and leaf injury in *Nicotiana tabacum* Bel-W3 in a sub-tropical region. **Atmospheric Environment**, v. 60, p. 211- 216, 2012.
- SMITH, A. E.; SECOY, D. M. Pesticide forerunners in classical Greece and Rome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p.1050-1055, 1975.
- SOLIMAN, M. I.; GHONEAM, G. T. The mutagenic potentialities of some herbicides using *Vicia faba* as a biological system. **Biotechnology**, v. 3, p. 140-154, 2004.
- SPARROW, A. H.; SCHAIRER, L. A. Mutational response in *Tradescantia* after accidental exposure to a chemical mutagen. **Environmental Mutagen Society Newsletter**, v. 5, p. 16-19, 1971.
- 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.
- STA, C.; LEDOIGT, G.; FERJANI, E.; GOUPIL, P. Exposure of *Vicia faba* to sulcotrione pesticide induced genotoxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, p. 9-14, 2012.
- UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biociência**, v. 10, p. 10-13, 1999.
- USEPA- United States Environmental Protection Agency. **About Pesticides**. [2014]. Disponível em <<http://www.epa.gov/opp00001/about/>>. Acesso em 10 ago. 2014.
- USEPA- United States Environmental Protection Agency. **Herbicides**. [2012]. Disponível em <http://www.epa.gov/caddis/ssr_herb_int.html>. Acesso em 12 ago. 2014.
- WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, p. 952-956, 2010.
- YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v. 383, p. 232-236, 2007.

YILDIZ M.; ARIKAN, E. S. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Caryologia**, v. 61, p. 45-52, 2008.

YÜZBAŞIOĞLU, D.; ÜNAL, F.; SANCAK, C.; KASAP, R. Cytological effects of the herbicide racer “flurochloridone” on *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 56, p. 97-105, 2003.

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

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences**, v.1, p. 125-144, 2011.

Tabela 1 Principais espécies vegetais empregadas em estudos da qualidade ambiental

Espécie	Nome popular	Número cromossômico	Referências
<i>Allium cepa</i>	Cebola	2n=16	CORTÉS; RODRIGUEZ-HIGUERAS; ESCALZA (1985), RODRÍGUEZ et al. (2015)
<i>Vicia faba</i>	Fava	2n=12	FLORES-MAYA et al. (2005), SRIVASTAVA; MISHRA (2009), STA et al. (2012)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mostarda	2n=10	FILKOWSKI et al. (2003)
<i>Tradescantia</i> spp	_	2n=12*	ALVAREZ-MOYA et al. (2011), PEREIRA; CAMPOS JÚNIOR; MORELLI (2013)
<i>Nicotiana tabacum</i>	Tabaco	2n=48	SILVA; MEIRELLES; MORAES (2012)
<i>Glycine max</i>	Soja	2n=40	RODRIGUES (1999a)
<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada	2n=14	GERAS'KIN et al. (2005)
<i>Zea Mays</i>	Milho	2n=20	RODRIGUES (1999a)

* a maioria das espécies do gênero *Tradescantia* apresentam 2n=12.

Tabela 2 Ação dos herbicidas sobre *Allium cepa* e *Vicia faba*

Herbicida	Concentrações	Bioindicador	Principais efeitos	Referências
Isoproturon	100, 500, 1.000, 2.500 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM e aumento das AC	BARD E ELKINGTON (1982) CHAUHAN E SUNDARARAMAN (1990)
Glean®	0.2×10^{-3} g mol mL ⁻¹ - 7.0×10^{-3} g mol mL ⁻¹	<i>A. cepa</i> e <i>V. faba</i>	Inibição da divisão celular, danos cromossômicos	BARD E IBRAHIM (1987)
Diuron®	25-427 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição atividade mitótica, indução de AC	CHAUHAN et al. (1998)
Atrazina	175, 350, 700, 1.750, 3.500, 5.250, 7.000 µg g ⁻¹ 700, 3.500, 7.000 µg g ⁻¹	<i>V. faba</i>	Mostrou correlação direta para formação de MN apenas no solo pobre em matéria orgânica	De MARCO et al. (1992) DE SIMONE; PICCOLO; DE MARCO (1992)
	0.1, 0.5, 1 e 5 µg L ⁻¹ 0.5, 1.0, 5, 10, 15, 25, 30, 35, 40 mg L ⁻¹	<i>A. cepa</i> <i>A. cepa</i> e <i>V. faba</i> .	Inibição do IM, aumento significativo das AC a partir das dosagens 5 µg L ⁻¹ e 30 mg L ⁻¹	BOLLE et al. (2004) SRIVASTAVA; MISHRA (2009)

Sulcotriona®	$10^{-5} - 2 \times 10^4 \text{M}$	<i>V. faba</i>	Diminuição IM, aumento de MN	STA et al. (2012)
	$5 \times 10^9 - 5 \times 10^5 \text{ M}$	<i>A. cepa</i>	Diminuição IM, indução de AC	GOUJON et al. (2014)
Hidrazida Maleica	$10^{-3} - 3 \times 10^{-4} \text{M}$ $\frac{1, 5, 10 \text{ mgL}^{-1}}{10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}, 10^{-3} \text{ M}}$	<i>A. cepa</i>	Aumento da SCE Diminuição do IM	CORTÉS, RODRIGUEZ- HIGUERAS E ESCALZA (1985) RANK; NILSEN (1997) MARCANO et al. (2004)
	2.8, 5.6, 8.4, 11.2 $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>V. faba</i>	Relação dose-resposta para indução de MN nos dois tipos de solo, efeito mais notado no solo pobre em matéria orgânica	De MARCO et al. (1992)
Garlon-4®	28 - 38.400 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM	EL-KHODARY; HABIB;
Tribunil ®	10 - 10.000 ppm	<i>A. cepa</i>	Aumento de AC Efeito semelhante a colchicina	HALIEM (1989, 1990)
Racer®	20, 40, 80 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM Indução de anormalidades mitóticas	YUZBASIOGLU et al. (2003)
Sindone b	$10^{-4} - 10^{-6} \text{ M}$	<i>A. cepa</i>	O IM não foi sofreu leve diminuição	LEHNEN JR; VAUGHN (1992)
Trifluralina®	0.42, 0.84, 1.67, 3.34 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM, presença de MN, minicélulas, núcleos irregulares e alterações cromossômicas. Efeitos persistentes	FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES (2007, 2009)

Gramoxone®	3.7, 7.5, 15 mL L ⁻¹	<i>A. cepa</i>	Redução IM, indução de diferentes tipos de anormalidades, presença de células binucleadas	EL-ABIDIN SALAM et al. (1993)
	25, 125, 250, 350, 500, 1.000, 2.500, 3.500, 5.000, 10.000, 20.000 ppm		Alterações estruturais (quebras) e fisiológicas (aderência, atraso na formação do fuso)	CROKER (1953)
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm	<i>A. cepa</i>	C-tumores, alterações no ciclo mitótico e indução de AC	FISKEŠJÖ; LASSEN; RENBERG (1981)
	45 e 450 µM		45 µM reduziu o IM 450 µM estimulou a divisão celular e aumentou o número de AC Forte efeito sobre o fuso mitótico	PAVLICA; PAPEŠ; NAGY (1991)
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 ppm		Nas doses entre 25-100 ppm houve alta toxicidade e IM próximo a zero	
			Retardou crescimento de raiz mesmo em doses baixas.	
Pentaclorofenol (PCP)	0.5, 1, 2, 3 ppm	<i>A. cepa</i>	Nas maiores doses induziu degeneração das raízes. Reduziu o IM. Induziu danos cromossômicos.	ATEEQ et al. (2002)
Butaclor	5, 10, 15, 20 ppm		Crescimento de raiz dose-dependente Só houve diferença significativa no IM na dose de 20 ppm Observação de células binucleadas	

Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T)	25, 125, 250, 350, 500, 1.000, 2.500, 3.500, 5.000, 10.000, 20.000 ppm	<i>A. cepa</i>	Alterações estruturais (quebras) e fisiológicas (aderência, atraso na formação do fuso)	CROKER (1953)
	0.001, 0.01, 0.1, 1 ppm		C-tumores, alterações no ciclo mitótico e indução de AC	FISKEŠJÖ; LASSEN; RENBERG (1981)
Ácido 4-cloro-2-metilfenoxiacético (MCPA)	0.01, 0.1, 1, 10 ppm	<i>A. cepa</i>	C-tumores, alterações no ciclo mitótico e indução de AC	FISKEŠJÖ; LASSEN; RENBERG (1981)
Quizalofop-P-etil (QPE)	1-3, 1-10, 5-50 ppm	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM, indução de de AC e MN	YILDIZ; ARIKAN (2008)
Iloxan® (Diclofop-Metil)	10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 300 mg L ⁻¹ EC50, 1/2 EC50, 1/4 EC50	<i>A. cepa</i>	Diminuição do IM, indução de de AC	YUZBASIOGLU; UNAL; SANCAK (2009)
	0.2, 0.3, 0.5, 1 ppm	<i>V. faba</i>	Aumento da frequência de SCE	DIZDARI; KOPLIKU (2013)
Arsênio	10 mg L ⁻¹ 0.3-30 mg L ⁻¹	<i>A. cepa</i> <i>V. faba</i>	Diminuição do IM, indução de de MN	GOMÉZ ARROYO; HERNANDEZ-GARCIA; VILLALOBOS-PIETRINI (1988) YI; WU; JIANG (2007) WU; YI; YI (2010)

Glifosato	35, 70, 105, 140, 350, 700, 1.050 e 1.400 $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>V. faba</i>	Não aumentou o número de MN	De MARCO et al. (1992) DE SIMONE; PICCOLO; DE MARCO (1992)
Roundup®	720, 1440, 2880 $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>A. cepa</i>	Concentrações 1440 e 2880 de Roundup® aumentaram significativamente as AC	RANK et al. (1993)
Isopropilamina de glifosato				
Arsenal®	0.25, 0.50, 1, 100 $\mu\text{L L}^{-1}$	<i>A. cepa</i>	As três maiores concentrações de Arsenal® reduziram o IM significativamente Não induziram AC Possível alteração no fuso mitótico	GRISOLIA; BILICH; FORMIGLI, (2004)
Imazapyr	500, 1.000, 2.000, 6.000 $\mu\text{L L}^{-1}$	<i>A. cepa</i>		
Bromacil	0.1, 10, 1.000 ppm	<i>V. faba</i>	Diminuiu o IM, a concentração de 1.000 ppm levou a maioria das células à morte, induziu aberrações e MN Pouco efeito, mas foram observadas algumas C- metáfases, aderências e brotos	DEKERGOMMEAUX; GRANT; SANDHU(1983)
Simazina				
Alacloro	2.25, 13.5, 45, 90 $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>V. faba</i>	Correlação entre dose e células micronucleadas, aumento do número de pontes e atrasos cromossômicos na maior concentração, efeitos observados apenas no solo pobre em matéria orgânica	De MARCO et al. (1990)

Molinato (Ordram®)	25, 50, 100, 200, 300, 400 ppm	<i>V. faba</i>	Anormalidades do tipo cromatídicas Efeito S-dependente	GOMEZ-ARROYO; RODRIGUEZ-MADRID; VILLALOBOS-PIETRINI (1992)
Molinato	25, 50, 75, 100 ppm			
Butilato	25, 50, 75, 100, 200, 300 ppm	<i>V. faba</i>	Os dois herbicidas aumentaram significativamente o número de SCE, com relação dose-resposta.	CALDERÓN-SEGURA et al. (1999)
Clorimuron-etil Brominal®	5 x 10 ⁻⁸ M 10 ⁻⁴ M	<i>V. faba</i>	Reduziu o IM, aumentou AC	SOLIMAN; GHONEAM (2004)
Metribuzin	0.75, 1, 2.5, 3, 5, 6, 7, 8, 12, 15, 20, 480 mg L ⁻¹ x 10 ³	<i>V. faba</i>	Aumento nos valores de SCE	FLORES-MAYA et al. (2005)
Ametrina	2.5 x 10 ⁻⁸ M 0.75, 2.5, 6, 8, 30, 50, 480 mg L ⁻¹ x 10 ³	<i>V. faba</i>	Induziu aberrações em células em divisão e anormalidades em interfase. Aumento nos valores de SCE	SOLIMAN; GHONEAM (2004) FLORES-MAYA et al. (2005)

IM: índice mitótico; AC: aberrações cromossômicas; MN: micronúcleo; SCE: troca de cromátides irmãs.

3. OBJETIVOS

Esta dissertação teve por finalidade investigar o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico do composto 2,4-D comercial DMA 806 BR[®], utilizando os organismos teste *A. cepa* e *T. pallida*. As análises foram realizadas por meio dos índices de germinação, mitótico, de aberrações cromossômicas, anormalidades nucleares e micronúcleos em *A. cepa* e por meio do teste Trad-MCN em *T. pallida*.

Foi intuito ainda comparar os resultados aqui obtidos investigando a formulação comercial com os dados já constantes na literatura, que investigaram o princípio ativo do ácido 2,4-diclofenoxiacético, para verificar se há interação aditiva e/ou sinérgica entre o ingrediente e as demais substâncias que compõem o produto comercial.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Composto testado

Neste estudo foi utilizado o herbicida DMA 806 BR[®] (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), da empresa Dow AgroSciences, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob nº 02108604.

4.2. Soluções de Tratamento

Foram testadas três concentrações do 2,4-D comercial diluídas em água. A concentração indicada pelo fabricante para aplicação pré-emergente em cultura de cana-de-açúcar (C1 = 0,548 $\mu\text{L mL}^{-1}$), a metade desta concentração (C2 = 0,274 $\mu\text{L mL}^{-1}$) e um quarto (C3 = 0,137 $\mu\text{L mL}^{-1}$), simulando a dose residual.

4.3. Materiais biológicos

4.3.1. *Allium cepa*

O bioensaio foi realizado com sementes de *A. cepa* (Amaryllidaceae) da variedade Baia Periforme, da marca Isla[®], germinação: 90%, lote 32443-S2.

4.3.2. *Tradescantia pallida*

Inflorescências jovens de *T. pallida* foram obtidas de canteiros padronizados (Figura 1) mantidos no Jardim Experimental do Instituto de Biociências, UNESP, Câmpus de Rio Claro, São Paulo, Brasil.



Figura 1- Canteiro de *Tradescantia pallida*. Foto: C.P. SOUZA

4.4. Bioensaios

4.4.1. Bioensaio com *A. cepa*

Para avaliar a toxicidade, a citotoxicidade e a genotoxicidade das três diferentes concentrações de 2,4-D comercial testadas, cem sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em estufa BOD de forma contínua em placas de Petri com papel de filtro, com temperatura controlada de 22°C. O controle positivo foi feito com 0.95 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do herbicida trifluralina® (CAS N°1582-09-8), de ação aneugênica (FERNANDES et al., 2007). O controle negativo foi feito com sementes submetidas à germinação com água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata. A exposição foi feita durante 7 dias. As sementes que não germinaram foram quantificadas. As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes álcool etílico PA:1 parte de ácido acético glacial PA) por 6 h, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas em geladeira, até sua utilização.

Para realizar as análises citogenéticas, as raízes foram submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978) com uma hidrólise ácida em HCl 1N a 60° C, durante 10 minutos, seguida de uma lavagem em água destilada. Logo após, foram colocadas em reativo de Schiff, por duas horas. Na confecção das lâminas, utilizou-se carmim acético 2%. Todas as lâminas foram obtidas, submetendo os meristemas radiculares a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas foram montadas em Entellan®, para serem posteriormente observadas.

Foram analisadas 15 lâminas por tratamento, contabilizando 300 células meristemáticas de *A. cepa* por lâmina, totalizando 4.500 células para cada tratamento para se determinar e comparar as frequências de células interfásicas, mitóticas e em processo de morte celular.

A toxicidade foi avaliada pelo índice de germinação dessas sementes. O índice de germinação foi obtido pela razão entre o número de sementes germinadas e o total de sementes expostas à germinação.

A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico e índice de células em processo de morte celular, pelo aumento do volume celular, núcleo periférico e vacuolização do citoplasma. Para a obtenção dos índices mitóticos (IM) foram consideradas as porcentagens das células em divisão, seguindo a aplicação da fórmula a seguir:

$$\text{IM} = \text{Número de células em divisão} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

Para a obtenção dos índices de células em processo de morte celular (IMC) foram consideradas as porcentagens das células em processo de morte de celular, seguindo a aplicação da fórmula abaixo:

$$\text{IMC} = \text{Número de células em morte celular} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

A genotoxicidade foi avaliada pela obtenção do índice (IAC) de células portadoras de aberrações cromossômicas (AC) e anormalidades nucleares (AN), segundo a fórmula:

$$\text{IAC} = \text{Número de células com AC e AN} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

A ocorrência de células portadoras de micronúcleos (MN) e quebras cromossômicas (QC) foi registrada para avaliar genotoxicidade e instabilidade cromossômica. Estes eventos se não forem reparados pelas células podem gerar futuras mutações e por isso o índice destas anormalidades foi chamado de índice de mutagenicidade. O índice (IMt) foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{IMt} = \text{Número total de células com MN e QC} / \text{Total de células observadas} \times 100$$

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk. Os dados das análises do índice de germinação, apresentaram distribuição normal, por isso resultados dos tratamentos foram comparados com o controle negativo por meio do teste paramétrico Anova com teste post hoc de Tukey.

Já os dados do índice mitótico, índice de aberrações, micronúcleos e células em processo de morte não apresentaram distribuição normal, portanto foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis com teste post hoc de Dunn comparando também os resultados dos tratamentos com o controle negativo.

4.4.2. Bioensaio com *T. pallida*

O teste de micronúcleo em *T. pallida* (Trad-MCN) foi adaptado do protocolo originalmente desenvolvido por Ma et al. (1994a). Para avaliar genotoxicidade, 10 inflorescências jovens (todas com os botões florais fechados) com aproximadamente 6-8 centímetros de comprimento foram coletadas de canteiros padronizados e expostas as três diferentes concentrações do herbicida 2,4-D comercial por 8 horas, seguidas de 24 horas de recuperação, sob constante aeração (Figura 2). O mesmo protocolo foi seguido para o controle negativo (exposição das inflorescências em água destilada) e positivo (exposição das inflorescências a $7.7 \times 10^{-3} \mu\text{L mL}^{-1}$ de metil metano sulfonato). Após a recuperação, as inflorescências foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 por 48 horas. Decorrido este período cada botão de tamanho intermediário foi colocado sobre uma lâmina, as anteras retiradas do interior do botão e maceradas suavemente com o auxílio de uma agulha, para a liberação das

células; para facilitar o processo e posterior observação adicionou-se uma gota de carmim acético 2%, o excesso foi retirado, o material foi coberto por lamínula e a lâmina foi passada rapidamente sobre uma chama. As lâminas que continham células em estágio de tetrade foram imediatamente analisadas.

As lâminas foram analisadas sob microscopia de luz com ampliação de 400 vezes para detecção de possíveis micronúcleos; foram analisadas 300 tétrades por lâmina e 10 lâminas por tratamento, totalizando 3000 células por tratamento. O ensaio foi realizado em duplicata.

A normalidade dos dados foi testada por meio do teste Shapiro-Wilk; após o teste de normalidade, os resultados dos tratamentos foram comparados com o controle negativo por meio do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com teste post hoc de Dunn, significância de $p < 0,05$.



Figura 2- Bioensaio realizado com *T. pallida* (Trad-MCN). Foto: Y. A. RODRÍGUEZ

4.5. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa SPSS versão 22. O Teste Shapiro-Wilk foi utilizado para testar a normalidade dos dados. O teste Anova com post hoc de Tukey foi a alternativa paramétrica empregada. O teste Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn foi a escolha não paramétrica. A significância de todos os testes foi $p < 0,05$.

A escolha do teste paramétrico ou não paramétrico foi de acordo com a distribuição dos dados, testada com o teste Shapiro-Wilk, ou seja, foi aplicado o teste paramétrico aos

dados apresentaram distribuição normal e o não paramétrico aos que não seguiram distribuição normal (MARÔCO, 2014).

Os dois testes, paramétricos e não paramétricos, não foram empregados juntos para avaliar um mesmo parâmetro.

5. RESULTADOS

5.1. Bioensaio com *A. cepa*

5.1.1. Morfologia e índice de germinação

O comprimento das raízes não foi mensurado, mas a exposição teve que ser prolongada até o 7º dia para que as raízes expostas aos tratamentos atingissem um comprimento razoável para as análises citogenéticas. A maior concentração ($0,548 \mu\text{L mL}^{-1}$) foi a que mais inibiu o crescimento.

A maioria das raízes das sementes expostas aos três tratamentos do herbicida 2,4-D comercial apresentaram um inchaço (tumor) logo acima da região meristemática (Figura 3), efeito não observado nos controles.

A análise do índice de germinação evidenciou que quando comparada ao controle negativo, a concentração de campo (C1) diminuiu significativamente a taxa de germinação das sementes de cebola (Figura 4).

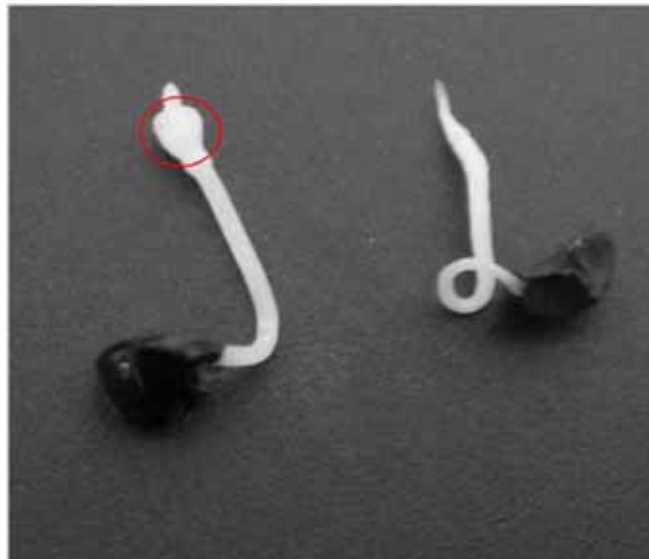


Figura 3. Inchaço (destacado pelo círculo vermelho) logo acima da região meristemática, em semente exposta a (C3), a direita exposição em água destilada (CN).

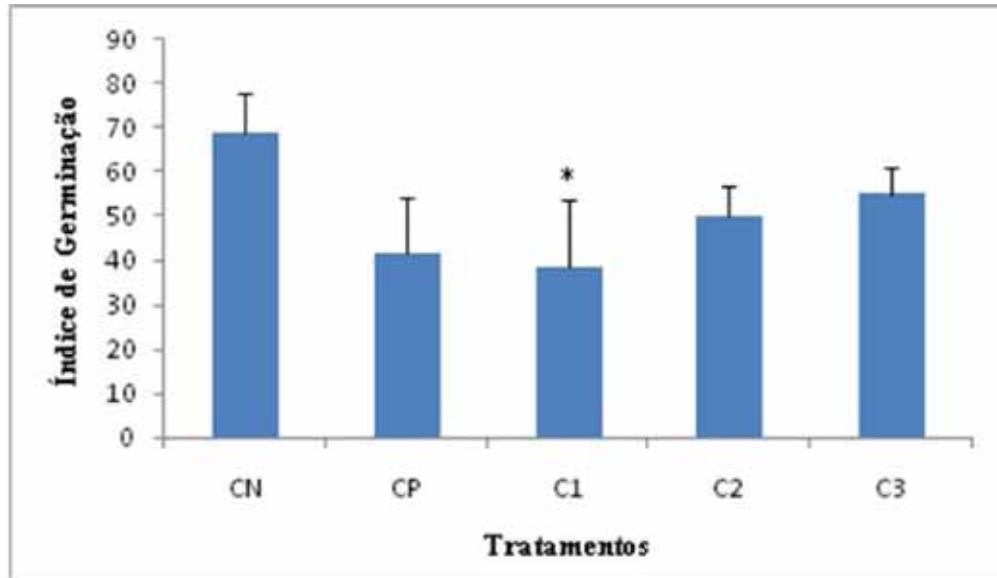


Figura 4. Índice de germinação por tratamento (média e desvio padrão). CN (Controle negativo, água destilada); CP (Controle Positivo, trifluralina® 0,95 $\mu\text{L mL}^{-1}$); C1 (2,4-D comercial 0,548 $\mu\text{L mL}^{-1}$); C2 (2,4-D comercial 0,274 $\mu\text{L mL}^{-1}$); C3 (2,4-D comercial 0,137 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

* Diferença significativa em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste Anova/ Tukey.

5.1.2. Análises citogenéticas

Por meio das análises citogenéticas foi possível avaliar os efeitos da formulação comercial do herbicida 2,4-D no material genético do organismo teste empregado.

O índice mitótico, caracterizado pelo total de células em divisão, diminuiu nas três concentrações testadas em relação ao controle negativo. As duas menores concentrações induziram aumento significativo no número de células binucleadas e de células com características morfológicas em processo de morte celular (Tabela 1), como citoplasma vacuolizado, núcleos periféricos e células com aumento de volume (Figura 5). Poucas aberrações cromossômicas foram observadas, uma vez que a taxa de divisão celular foi pequena nos tratamentos. Nenhum dos tratamentos aumentou de forma significativa a quantidade de micronúcleos em relação ao controle negativo (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão dos índices mitótico de aberrações cromossômicas e nucleares, de micronúcleos e de células em processo de morte, observados em *A. cepa* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Parâmetros analisados			
	IM	IAC	IMt	IMC
CN	9.76 ± 3.61	0.06 ± 0.15	0.09 ± 0.2	0
CP (0.95 µL mL ⁻¹)	6.61 ± 3.39	1.8 ± 1.79*	1.13 ± 0.97*	0
C1 (0.548 µL mL ⁻¹)	0.68 ± 1.53*	0.07 ± 0.16	0.02 ± 0.07	1.3 ± 3.3
C2 (0.274 µL mL ⁻¹)	0.81 ± 1.29*	0.34 ± 0.45*	0.08 ± 0.24	7.2 ± 7.9*
C3 (0.137 µL mL ⁻¹)	0.59 ± 1.26*	1.04 ± 1.6*	0.12 ± 0.37	7.33 ± 8.44*

CN (Controle negativo); CP (Controle Positivo, Trifluralina®); C1, C2 e C3 (2,4-D comercial); IM: índice mitótico; IAC: índice aberrações cromossômicas e nucleares; IMt: índice de mutagenicidade; IMC: índice de células em processo de morte celular.

* Diferença significativa em comparação ao controle negativo (p<0,05), por meio do teste Kruskal-Wallis/Dunn.

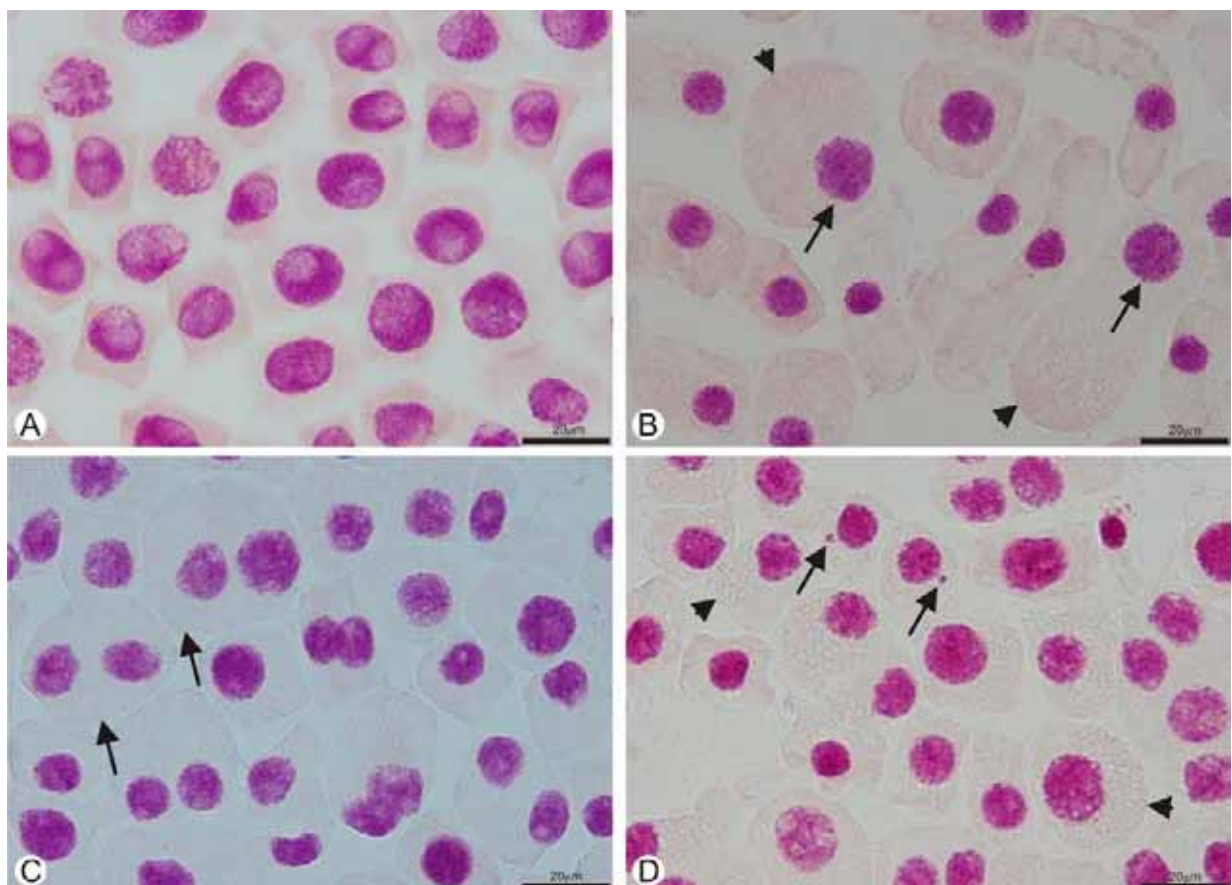


Figura 5. Região meristemática de *A. cepa*. A. Células normais (controle negativo); B-D. Células exposição (C3); B. Células com aumento do citoplasma (cabeça de seta) e núcleo periférico (seta); C. Células binucleadas (setas). D. Células com citoplasma vacuolizado (cabeça de seta), micronúcleos (setas).

5.2. Bioensaio Trad-MCN

No teste com *T. pallida* observou-se que as três concentrações testadas do herbicida 2,4-D comercial induziram a formação de micronúcleos (Figura 6). Quando comparadas ao controle negativo, as duas maiores concentrações (C1 e C2) tiveram resultados estatisticamente significativos, tendo a C1 efeito parecido ao obtido no controle positivo (MMS), conforme mostra a Figura 7.

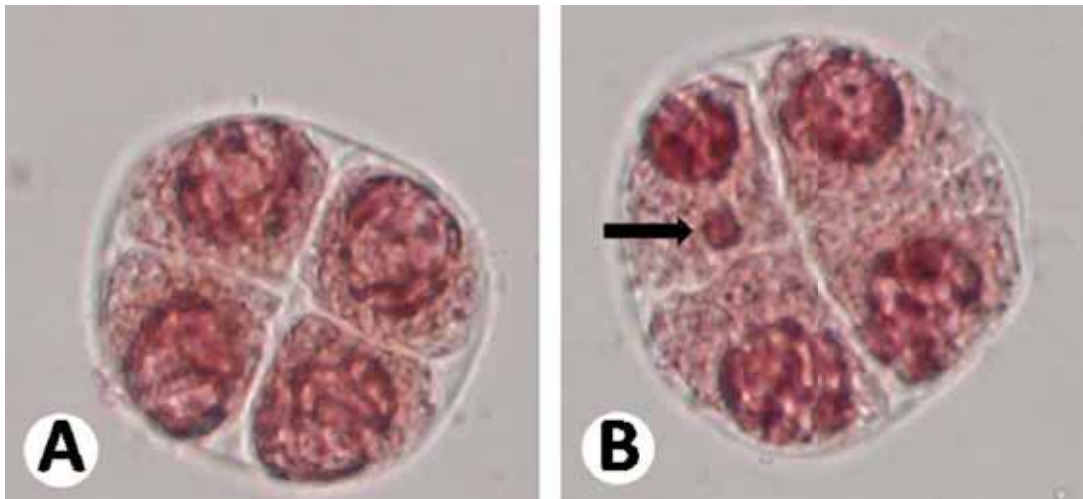


Figura 6. Tétrades de *T. pallida*. **A.** Sem micronúcleo; **B.** Com micronúcleo (seta). Ampliação 400 X

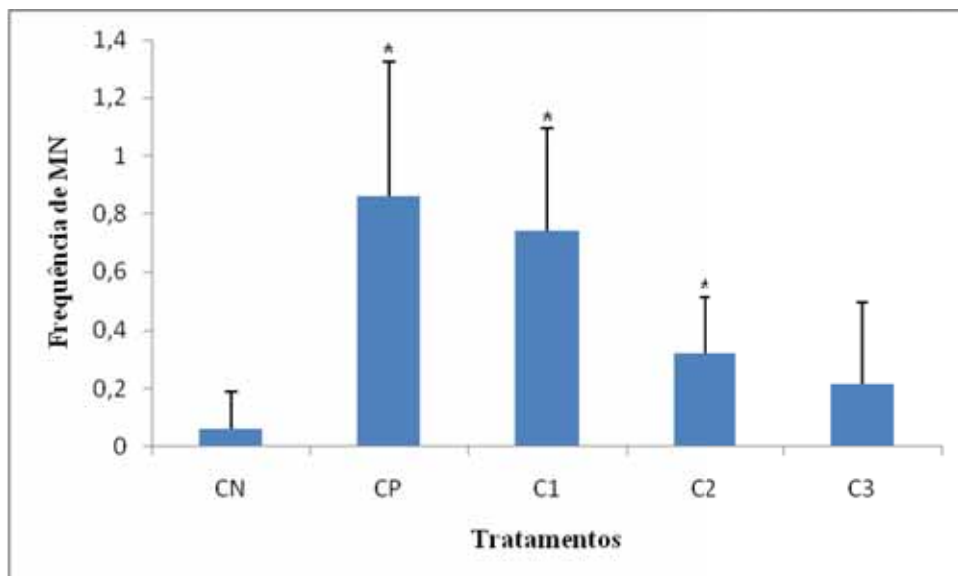


Figura 7. Frequência de MN em *T. pallida* por tratamento (média e desvio padrão). CN (Controle negativo, água destilada); CP (Controle Positivo, metil metano sulfanato (MMS), $7,7 \times 10^{-3} \mu\text{L mL}^{-1}$); C1 (2,4-D comercial $0,548 \mu\text{L mL}^{-1}$); C2 (2,4-D comercial $0,274 \mu\text{L mL}^{-1}$); C3 (2,4-D comercial $0,137 \mu\text{L mL}^{-1}$).

* Diferença significativa em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), por meio do teste Kruskal- Wallis/Dunn.

6. DISCUSSÃO

A utilização do 2,4-D começou há mais de 60 anos e até hoje ele é um dos herbicidas mais utilizados por conta da sua eficiência e relação custo-benefício. Na agricultura, o 2,4-D é o princípio ativo de diferentes formulações comerciais. Desta forma, os trabalhadores e o meio ambiente estão expostos a ação simultânea do 2,4-D associado à outras substâncias que compõem a formulação (SOLONESKI et al., 2007). Outros estudos já investigaram a ação do 2,4-D em *A. cepa* (RILAND, 1948; CROKER, 1953; PAVLICA; PAPEŠ; NAGY, 1991; ATEEQ et al., 2002), porém apenas avaliaram os efeitos do ingrediente ativo; por este motivo o presente trabalho objetivou avaliar uma formulação comercial.

A característica geral dos herbicidas auxínicos é que eles reproduzem a ação principal da auxina natural ácido indolacético (AIA) (GROSSMANN, 2003). Baixos níveis de auxina são necessários para o alongamento da raiz, mas em altas concentrações atuam inibindo o crescimento desse órgão por meio da produção de etileno, hormônio vegetal inibidor do crescimento de raiz (TAIZ; ZEIGER, 2004). o presente estudo revelou inibição de crescimento de raiz, principalmente na maior concentração. Resultados semelhantes foram observados por Ateeq et al. (2002) com 1-4 ppm de 2,4-D; segundo os autores o comprimento das raízes não pode ser mensurado com exatidão pois estas eram muito pequenas (3-5 mm).

A germinação das sementes é uma fase importante no ciclo de desenvolvimento vegetativo (RAHOUI; CHAOUI; EL FARJANI, 2008), portanto, avaliar a inibição da germinação de sementes expostas à contaminantes neste estágio é a melhor maneira de entender os mecanismos tóxicos dos contaminantes ambientais para as plantas (LIU et al., 2012). As sementes de *A. cepa* expostas a maior concentração testada do herbicida teve a taxa do índice de germinação significativamente reduzida em relação ao controle negativo. Sugere-se que a redução da germinação esteja relacionada a biosíntese do hormônio ácido abscísico (ABA) desencadeada pelo etileno. A dormência e a germinação da semente são controladas pela razão entre ABA e giberelina (GA), sendo que embriões deficientes em ABA podem apresentar germinação precoce (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo Grossman (2003), os herbicidas auxínicos sintetizam o etileno pela via ACC (ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano) e o etileno por sua vez estimula a produção do ABA.

A maioria das raízes que germinaram das sementes expostas aos tratamentos deste estudo apresentaram um inchaço logo acima da região meristemática, esse inchaço já foi relatado em outros estudos com os herbicidas clorofenoxiacéticos 2,4-D, 2,4,5-T e MCPA (CROKER, 1953; FISKESJÖ; LASSEN; RENBERG, 1981; ATEEQ et al., 2002), os autores

dos dois últimos estudos denominaram esta malformação de C-tumor. Grossmann (2003) afirmou que o estímulo constante do metabolismo da planta causado por altas doses de herbicidas auxínicos inibem o crescimento apical das raízes e induzem o crescimento anormal em posições inadequadas, resultando em inchaço e deformações.

O índice mitótico (IM) tem sido utilizado para avaliar a citotoxicidade de diversos agentes (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A avaliação do índice mitótico neste estudo mostrou valores muito baixos, este decréscimo também foi observado por Atteq et al. (2002) testando 2,4-D e por Fiskesjö, Lassen, Renberg (1981) com três diferentes herbicidas clorofenóxiácéticos (2,4-D, 2,4,5-T e MCPA), 2,4,5- butoxietil, 2,4-diclorofenol e 2,4,5-triclorofenol; estes últimos autores observaram redução do IM mesmo quando as raízes não haviam apresentado notável retardamento no crescimento, situação semelhante ocorreu na presente investigação.

A anormalidade nuclear mais frequentemente observada neste estudo foram as células binucleadas; estas anormalidades também foram induzidas pelos herbicidas pentaclofenol, 2,4-D e butaclor, porém o butaclor foi o que mais induziu (ATEEQ et al., 2002). A ocorrência de células binucleadas é resultado da inibição da formação da placa celular entre as células filhas que é dependente do bom funcionamento dos microtúbulos (TÜRKOĞLU, 2008); os microtúbulos juntamente com o retículo endoplasmático formam o fragmoplasto que é responsável por agregar e organizar as vesículas que darão origem a placa celular (TAIZ; ZEIGER, 2004;). Fernandes, Mazzeo e Marin-Morales (2009), avaliaram o herbicida Trifluralina® que tem efeito aneugênico e também relacionaram falhas na formação do fuso e interrupção no processo de citocinese, por restrições na formação de fragmoplastos. Pavlica, Papeš e Nagy (1991) em estudo com 2,4-D relataram forte efeito do herbicida sobre o fuso mitótico, evidenciado pelos principais tipos de aberrações encontrados, C-metáfases e aderências.

Algumas drogas podem alterar a polimerização de filamentos do citoesqueleto. A colchicina, por exemplo, liga-se à tubulina livre estabilizando-a e provocando a despolimerização dos microtúbulos (ALBERTS et al., 2010, p. 987). A aberração do tipo C-metáfase tem esse nome por estar diretamente relacionada ao efeito principal da colchicina. Trabalhos com 2,4-D frequentemente descrevem a indução deste tipo de aberração. Croker (1953) quando descreveu C-metáfase, porém não com esta denominação, relatou que havia um atraso na formação do fuso, na divisão do centrômero e o aparecimento de pares de cromossomos, onde as cromátides estavam visivelmente separadas, mas ainda ligadas por um

centrômero; o autor concluiu que eram os mesmos efeitos induzidos após tratamento com colchicina. Portanto, baseado nas informações acima sugere-se no presente estudo que o 2,4-D tenha um efeito semelhante ao da colchicina sobre os microtúbulos, ou seja, o herbicida causa a despolimerização destes ao se ligar à tubulina livre e por consequência afeta a citocinese.

Os vacúolos são organelas que ocupam mais de 80% do volume celular em plantas. o vacúolo central acumula uma grande quantidade de metabólitos primários, secundários e xenobióticos. A maioria dos metabólitos secundários e xenobióticos são sequestrados no vacúolo para detoxificação (SHITAN; YAZAKI, 2013). No presente estudo foram observados muitos núcleos periféricos e células com aumento de volume; baseado na afirmação dos autores citados anteriormente, sugere-se que tais efeitos aqui encontrados são resultantes do aumento do volume do vacúolo que acumulou grande quantidade do herbicida 2,4-D comercial com o objetivo de detoxificar. Ao aumentar seu volume o vacúolo acabou aumentando o volume celular e também deslocou os núcleos para a periferia. Células com aumento de volume do citoplasma também foram observadas nos estudos com os clorofenoxiacéticos 2,4-D, 2,4,5-T e MCPA (CROKER, 1953; FISKESJÖ; LASSEN; RENBERG, 1981).

No presente estudo a presença de vacúolos preenchendo todo citoplasma celular foi muito frequente; acredita-se que estes vacúolos estão relacionados com o processo de morte celular, no entanto, não foram realizados testes específicos para identificar células em processo de morte celular. Vacuolização nas células também foi observada por Croker (1953) e Ateeq et al. (2002) em estudos realizados com 2,4-D. Células vacuolizadas, condensação nuclear e citoplasmática e núcleo periférico também foram observadas em estudo morfológico com raízes de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de cádmio (BEHBOODI; SAMADI, 2002), os autores observaram que havia mais morte celular vacuolar do que necrótica e sugeriram que a morte vacuolar precede a necrótica.

Van Door et al. (2011) reconhecem duas classes principais de morte celular que podem ocorrer na biologia das plantas: (1) morte celular vacuolar e (2) morte celular necrótica. Andrade-Vieira et al. (2011) relacionaram a indução de danos no DNA e alterações nucleares em *A. cepa* com o processo de morte celular. Segundo os autores, as células vegetais não fagocitam as células mortas e por isso tem sido sugerido que elas realizam a digestão intracelular por meio de vacúolos líticos. Nas análises ultraestruturais realizadas pelos mesmos autores, eles observaram que as células que foram expostas ao resíduo sólido

de uma indústria de alumínio, tiveram um aumento de pequenos vacúolos no citoplasma, deixando este todo vacuolizado, para eles estes vacúolos podem ajudar no processo de digestão celular.

Todos os efeitos observados no presente estudo, investigando a formulação comercial do herbicida 2,4-D em *A. cepa*, já haviam sido descritos anteriormente em estudos com o princípio ativo (CROKER, 1953; FISKESJÖ; LASSEN; RENBERG, 1981 PAVLICA; PAPEŠ; NAGY, 1991; ATEEQ et al., 2002). As formulações comerciais dos diferentes agrotóxicos são compostas basicamente pelos seus princípios ativos e pelos chamados ingredientes inertes. Segundo a lei brasileira 7.802/89 "ingrediente inerte ou outro ingrediente é a substância ou produto não ativo em relação à eficácia dos agrotóxicos e afins, usado apenas como veículo, diluente ou para conferir características próprias às formulações" (BRASIL, 2015). No entanto, segundo Grisolia (2005), de fato muitas dessas substâncias ditas inertes possuem elevada atividade química e toxicológica, muitos compostos são solventes orgânicos, como xilenos, toluenos, alcoóis, cetonas, formaldeídos, benzenos, alcanos, amonias, ácidos, etc., além de outros grupos químicos tais como compostos acrílicos, óleos minerais e vegetais, compostos clorados, cloreto de vinila, entre outros; assim, os compostos inertes podem interagir de forma aditiva e/ou sinérgica com o princípio ativo intensificando a toxicidade dos produtos.

Outro organismo teste empregado neste estudo foi a *T. pallida*, espécie que começou a ser utilizada para o teste de micronúcleo (Trad-MCN) no Brasil nos últimos anos (PEREIRA; CAMPOS JÚNIOR; MORELLI, 2013; RODRÍGUEZ et al., 2015). O Trad-MCN é utilizado para avaliar genotoxicidade (MISIK et al., 2011). No presente estudo as duas maiores doses do herbicida comercial 2,4-D induziram formação de micronúcleos de modo significativo. Estudos prévios com outros herbicidas tais como cianazina e metolaclor (RODRIGUES; PIMENTEL; WEINSTEIN, 1998), com solos contaminados por resíduos de herbicidas (KONG; MA, 1999) também evidenciaram aumento significativo na frequência de micronúcleos.

Na presente investigação, a espécie *T. pallida* mostrou-se mais sensível à indução de micronúcleo pelo herbicida 2,4-D comercial, quando comparada ao organismo teste *A. cepa*, uma vez que esta não apresentou resultados significativos neste parâmetro. Esta constatação pode ser fundamentada na afirmação de que os cromossomos meióticos são mais sensíveis à quebra que os cromossomos mitóticos (SAX; EDMONDS, 1933). No teste Trad-MCN, a

análise de presença de micronúcleo é feita nas células mães do grão de pólen em estágio de tétrade, ou seja, última fase da divisão meiótica.

7. CONCLUSÕES

Por meio do presente estudo pode-se concluir que:

- ✓ O herbicida 2,4-D comercial apresentou toxicidade em *A. cepa* na dose de campo, diminuindo a taxa de germinação, retardando o crescimento das raízes e também citotoxicidade, pois todas as concentrações testadas reduziram o índice mitótico e as duas menores induziram células com características de morte celular.
- ✓ O herbicida também foi genotóxico para os dois organismos testes, pois induziu aberrações nucleares em *A. cepa* e micronúcleos em *T. pallida*.
- ✓ Comparando os resultados aqui obtidos com os constantes na literatura pode-se sugerir que há pouca ou nenhuma interação aditiva entre o princípio ativo (ácido 2,4-diclofenoxiacético) e as demais substâncias que compõem a formulação comercial, tendo em vista, que os efeitos encontrados no presente estudo com o produto comercial já haviam sido descritos anteriormente com o ingrediente ativo; no entanto, uma investigação com os ingredientes inertes específicos desta formulação é indicada para uma comparação mais efetiva.
- ✓ O presente estudo demonstrou que a formulação comercial do herbicida 2,4-D testada foi capaz de induzir anormalidades nos organismos testes empregados; tendo em vista que este herbicida vem sendo empregado há várias décadas, os resultados aqui obtidos reforçam a advertência de que estes compostos e os demais agrotóxicos embora importantes para a agricultura precisam ser utilizados com cautela; estes devem ser aplicados apenas nas quantidades indicadas e sempre que possível, é recomendável sua substituição por métodos menos prejudiciais ao meio ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. **ArtMed**. 5ª ed. 2010. **Porto Alegre**. 1054p.

ANDRADE-VIEIRA, L.F.; GEDRAITE, L.S.; CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 882- 888, 2011.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, WASEEM. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105–113, 2002.

BEHBOODI, B. S.; SAMADI, L. Morphological Study of Cadmium-Induced Changes on Root Apex of *Allium cepa*. **Iranian International Journal of Science**, v. 3, p.11-22, 2002.

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.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/D4074.htm>. Acesso em: 09 mar. 2015.

COLOSIO, C.; MORETTO, A. Pesticides. In: HEGGENHOUGEN, K.; QUAH, S. R. **International Encyclopedia of Public Health**, San Diego, CA, USA: Academic Press, 2008, p. 59- 66.

CROKER, B.H. Effects of 2,4-D Dichlorophenoacetic acid and 2,4,5- Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. **Botanical Gazete**, v. 114, p. 274-283, 1953.

DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C. S. The Role of Mucus in *Mytella falcata* (Orbigny 1842) Gills from Polluted Environments. **Water Air Soil Pollut.** v. 203, p. 261– 266, 2009.

DELCOUR, I.; SPANOGHE, P.; UYTENDAELE, M. Literature review: Impact of climate change on pesticide use. **Food Research International**, v. 68, 7-15, 2015.

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, p. 125- 132, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, 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.

- FISKESJÖ, C. G.; LASSEN, C.; RENBERG, L. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols In the modified *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, v. 34, p. 333-344, 1981.
- FONTANETTI, C.S.; SOUZA, T.S.; CHRISTOFOLETTI, C.A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio, C.; Hensel, O.; Selbach, J. (Org.). **Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil**. Brasil/Alemanha: UNIPAMPA/UNIKASSEL, 2012, v. 3, p. 975-1005.
- FRANKEMA, E. Africa and the Green Revolution A Global Historical Perspective. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 70–71, p. 17- 24, 2014.
- GERAS'KIN, S.; EVSEEVA, T.; OUDALOVA, A. Plants as a tool for the environmental health assessment. In: NRIAGU, J.O. **Encyclopedia of Environmental Health**. San Diego, CA, USA: Elsevier Science, 2011, p. 571-579.
- GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 47–54, 2014.
- GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392 p.
- GROSSMANN, K. Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 22, 109- 122, 2003.
- ITOH, K.; KINOSHITA, M.; MORISHITA S.; CHIDA M.; SUYAMA K. Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 84, p. 124–132, 2013.
- KENNEPOHL, E.; MUNRO, I. C.; BUS, J. S. Phenoxy Herbicides (2,4-D). In: KRIEGER, R. **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology**, Third edition. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2010, p. 1829- 1847.
- KONG, M.S.; MA, T.H.. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p. 221- 228, 1999.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71- 81, 2009.
- LIU, S.; YANG, C.; XIE, W.; XIA, C; FAN, P. The effects of cadmium on germination and seedling growth of *Suaeda salsa*. **Procedia Environmental Sciences**, v. 16 p. 293-298, 2012.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; CHEN, R.; LOARCA, F.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 211- 220, 1994b.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B.S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L.; SALAMONE, M. F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**, v. 310, p. 221-230, 1994a.

- MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; Mc CONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam. v.334, p.185-195, 1995.
- MARCATO, A. C. C.; YABUKI, A. T.; FONTANETTI, C. S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environmental Science Pollution Research**, v. 21, p. 13095-13102, 2014.
- MARINHO, J. F. U.; CORREIA, J. E.; MARCATO, A. C. C.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Sugar cane vinasse in water bodies: Impact assessed by liver histopathology in tilapia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 110, p. 239-245, 2014.
- MARÔCO, J. **Análise Estatística com o SPSS Statistics**. ReportNumber. 6.^a ed. 2014. 990 p.
- MELLO, M. S.; VIDAL, B. C. **A reação de Fulgen**. Ciência e Cultura, São Paulo. v.30, p. 665-676, 1978.
- MIČIĆ, M.; BIHARI, N.; MLINARIČ-RAŠČAN, I. Influence of herbicide, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, on haemocyte DNA of in vivo treated mussel. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.311, p. 157-169, 2004.
- MISIK, M.; MA, T-H., NERSESYAN, A.; MONARCA, S.; KIM, J.K.; KNASMUELLER, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update. **Mutagenesis**, v. 26, p. 215- 221, 2011.
- NOGAROL, L. R.; BROSSI-GARCIA, A. L.; FONTANETTI, C. S. Surface Morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) Gill Filaments After Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine Herbicide. **Microscopy Research and Technique**, v. 75 p. 807- 813, 2012.
- 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.
- PEREIRA, B. B.; CAMPOS JÚNIOR, E. O.; MORELLI, SANDRA. *In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 87, p. 17–22, 2013.
- RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; EL FERJANI, E. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, 451-456, 2008.
- RODRIGUES, G. S. **Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia***. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1999. 56 p.
- RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis - a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 16, p. 325-359, 1997.

- RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H. In situ assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I-*Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 412, p. 235–244, 1998.
- RODRÍGUEZ, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; FERREIRA, R. A. C.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. **Chemosphere**, v. 120, p. 438–442, 2015.
- RYLAND, A. G. A cytological study of the effects of colchicine, indole-3-acetic acid, potassium cyanide, and 2,4-D on plant cells. **Journal of The Mitchell Society**, p.117-125, 1948.
- SAX, K.; EDMONDS, H. W. Development of male gametophyte in *Tradescantia*. **Botanical Gazette**, v. 95, p. 156-163, 1933.
- SHARMA, C.B.S.R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 9, p. 409-442, 1990.
- SHITAN, N; YAZAKI, K. New Insights into the Transport Mechanisms in Plant Vacuoles. In: JEON, K. W. **International Review of Cell and Molecular Biology**. San Diego, CA, USA: Academic Press, 2013, p. 383-433.
- SOLONESKI, S.; GONZÁLEZ, N. V.; REIGOSA, M. A.; LARRAMENDY, M. L. Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes. **Cell Biology International**, v. 31, p. 1316-1322, 2007.
- 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.
- STELLMAN, J. M.; STELLMAN, S. D.; CHRISTIAN, R.; CHRISTIAN, T.; TOMASALLO, C. The extent and patterns of usage of Agent Orange and other herbicides in Vietnam. **Nature**, v. 422, p. 681- 687, 2003.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed. 3^a. ed. 2004. 719 p.
- TÜRKOĞLU, S. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2035-2041, 2008.
- Van DOORN, W.G.; BEERS, E. P.; DANGL, J. L.; FRANKLIN-TONG, V.E.; GALLOIS, P.; HARA-NISHIMURA, I.; JONES, A. M.; KAWAI-YAMADA, M.; E LAM.; MUNDY, J.; MUR, L.A. J.; PETERSEN, M.; SMERTENKO, A.; TALIANSKY, M.; BREUSEGEM, F. V.; WOLPERT, T.; WOLTERING, E. W.; ZHIVOTOVSKY, B.; BOZHKO, P. V. Morphological classification of plant cell deaths. **Cell Death and Differentiation**, v. 18,1241-1246, 2011.
- ZIMDAHL, R. L. Chapter 6 – Development of herbicides after 1945. In: ZIMDAHL, R. L. **A History of Weed Science in the United States**. USA: Elsevier, 2010, p. 79-113.

ANEXO 1

Submetido para publicação na Environmental Science Pollution Research

Herbicide 2,4-D and its mode of action on non-target organisms

Ana Claudia de Castro Marcato^a, Cleiton Pereira de Souza^a, Carmem Silvia Fontanetti*^a

^aUNESP, Av.24-A, nº1515, Rio Claro, São Paulo, Brazil

*corresponding author: fontanet@rc.unesp.br

Tel: +55 (19) 3526-4139, Fax: +55 (19) 3526-4135

Abstract

The intensive use of pesticides has increased exponentially in Brazil and worldwide, due to the need to meet the food demands of a growing population. The management/monitoring of the use of these compounds is a complex and expensive activity that if inadequately performed, can compromise the expected benefits and have negative effects on the environment as a whole. In order to examine the information available on herbicide use in Brazil and worldwide, this study was aimed at presenting a historical background and review on the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), its chemical properties, mechanism of action, and toxicity to non-target organisms.

Keywords: review, pesticides, toxicity, mutagenesis, synthetic auxin, Agent Orange

1. Introduction

Pollution can be classified as point or nonpoint sources of pollution (Holt 2000). Point source pollution include treatment plants of industrial effluents, domestic sewage, accidental spills, and mining. The emissions of point sources of pollution, usually as direct discharge of contaminants into water bodies, are more easily detected and controlled. On the other hand, nonpoint emissions are difficult to be controlled, vary in time and space and can involve pathways that result in partial accumulation of contaminants before reaching water bodies. A typical example of nonpoint source pollution is the use of pesticides in the soil (Costa et al. 2008).

Emissions of contaminants in the air, soil, and mainly water are associated with natural processes and mainly human activities. World population growth and the increasing food demands has led to higher pesticide use in crops to prevent or control pests, in order to

increase yields (Caldas and Souza 2000). The first compounds to be used to manage pests or diseases were sulfur, lime, and some arsenic salts (Sanchez et al. 2003).

The intensification of pesticide use in the last decades and their adverse effects on humans and the environment has led to the regulation of their use and production in several countries to minimize negative impacts to ecosystems. Each country created multidisciplinary committees and agencies with legal and managerial aspects to assess the level of danger and the risks that these products have to humans and the environment (Zagatto and Bertolotti 2006).

Pesticides are biocidal products used in agriculture to exterminate a pest. In this very diversified group of chemical compounds are fungicides, insecticides, and herbicides considered extremely aggressive to the environment and to human health (Grisolia 2005).

After the Second World War, the number of new compounds and their extensive use in agriculture increased dramatically. With the rise of intensive mono-crop systems and decrease in diversity, several pests have evolved, which are then controlled with chemicals (Amarante Jr. 2002). Given that pesticides, such as herbicides, have contaminated the environment due to widespread use, the assessment of the toxicity of these compounds is essential (Marin-Morales et al. 2013). These compounds have contaminated aquatic systems, and therefore monitoring groundwater, particularly near agricultural areas and sources of primary drinking water is especially important (Sanchez et al. 2003).

Despite the increase in crop yields, herbicide use can have serious ecological effects, contaminating receiving waters with toxic compounds and inhibiting biological treatment systems even at low concentrations (MarrónMontiel et al. 2006).

Considering the problem of indiscriminate and increasing use of pesticides, which offers serious risks to the environment and biodiversity, this paper aims to provide an overview of the mechanism of action and toxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D) in bioindicators animals and higher plants, evaluated by histological, histochemical and genetic biomarkers.

2. Chemical properties and mechanism of action of the herbicide 2,4-D

The basic formulation of 2,4-D is an acid, but 2,4-D is produced as inorganic salt, amine or ester through various production processes, and is used in many commercial products. The molecular formula of 2,4-D is $C_8H_6Cl_2O_3$ (Figure 1), with molecular weight of

221.04, melting point of 140.5°C, boiling point of 130°C, and water solubility of 900 mg/liter at 25°C (acid) (Kennepohl and Munro 2001).

2,4-D contains subproducts of the manufacturing process, such as dioxins (2,3,7,8-tetrachlorodioxins), which are extremely toxic compounds present in many lists of carcinogens. The group of dioxins comprises more than 75 compounds resulted from different industrial processes (Grisolia 2005).

Many derivatives of chlorinated phenoxyacetic acids are classified as plant growth regulators or hormones that act as synthetic auxins. These derivatives are widely used as herbicides and include 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (Filkowski et al. 2003; Kumari and Vaidyanath 1989). These herbicides have similar effect natural auxin indoleacetic acid (IAA) in most plants; however, they have long duration due to their high stability in the plant, so they are more effective than the IAA. The auxinic herbicides has direct and indirect action, to induce stem curling and why synthesize ethylene via ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid). The ethylene stimulates production of abiscísico acid (ABA). ABA inhibits cell division and expansion and, with the ethylene promotes leaf senescence. The inhibition of growth, tissue damage and cell and plant death are the consequences (GROSSMANN 2003).

Synthetic auxins, such as 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, persist for long periods in the plant and consequently are effective and lethal. The mode of action of auxinic herbicides is dose-dependent, and its effect also depend on the sensitivity of tissues and species (Pazmiño et al. 2012). While the concentration of natural auxins and their effects are strictly controlled, auxinic herbicides bypass the natural regulatory mechanisms of susceptible plants and cause an uncontrolled response to auxin. In low doses, auxinic herbicides have hormone properties similar to those of natural auxins. However, higher concentrations cause several growth abnormalities in sensitive dicotyledons (Kelley and Riechers 2007). The mode of action of 2,4-D is characterized by an increase in plasticity of the cell wall and abnormal increase of the synthesis of proteins, ethylene, resulting in uncontrolled cell division and damage to vascular tissue of plants (USEPA 2005). Therefore, because of its chemical resemblance to auxins, 2,4-D overstimulates growth, culminating in the death of the target plant (Oruç et al. 2004; Benliet al. 2007).

Chlorophenoxy acid pesticides comprise an important class of herbicides, usually with a long residual activity in the soil and water, because suffer low degradation microbiological (Sanchez-Bruneteet al., 1994). As a member of this class, 2,4-D is a highly selective pre or post-emergent systemic herbicide (Tomlin 1994).

Therefore, 2,4-D is not easily biodegradable, and is frequently detected in water bodies (Chingombe et al. 2006). It is commonly used for the post-emergence control of annual and perennial broad-leaved weeds in crops of grains, corn, pastures, rice, forests, and non-agricultural lands. This compound, when it reaches the environment, mainly from anthropogenic sources, is highly toxic, persistent, and a great capacity of bioaccumulation (Michalowicz 2005; Michalowicz and Duda 2007; Aydin et al. 2005).

According to the United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2,4-D was classified as Group D herbicide (non-classifiable as human carcinogen), due to the inadequate evidences found. Therefore the carcinogenic effect of this herbicide has not been demonstrated (Kennepohl and Munro 2001).

3. Use of the herbicide 2,4-D in Brazil and worldwide

The development of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and other phenoxyacetic herbicides transformed agriculture in much of the world and should be classified as a major contribution of science (Zimdahl 2010). With the application of herbicides auxinic began a new phase in agricultural production due to its systemic mobility in the plant and its selective action, mainly against dicotyledonous weeds (Grossmann 2003). The 2,4-D has been widely used worldwide (WHO 1984) and along with 2,4,5-T (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid) are used in large scale in the control of broad-leaved weeds since the beginning of the 1940s (Itoh et al. 2013; Grisolia 2005).

In the past, 2,4-D mixed with 2,4,5-T was used for weed control (Wolfe 1984). More than 10 million of gallons of this mixture known as Agent Orange, in a 1:1 ratio (Mortelmans et al. 1984), were used in the Vietnam war to defoliate trees (Wolfe 1984).

Although 2,4-D is one of the most successfully widely used herbicides, its intensive use has resulted in resistant weeds and many contamination issues, when present in concentrations higher than those recommended (Teixeira et al. 2007). The herbicide 2,4-D was introduced in the 1940s and after more than 50 years of use, it is still the most widely used throughout the world. It is mainly applied in wheat, sorghum, corn, rice, sugarcane, soybeans and pastures (Mičić et al. 2004).

The concentrations of 2,4-D recommended for the control of weeds predominant in Brazilian agricultural cultivars are presented in Table 1.

4. Toxicity of 2,4-D to different organisms

Pesticides have been the focus of ecotoxicological studies, as they contaminate the atmosphere, water, and soil, persist in the environment, enter ecological chains and have adverse toxic effects on organisms from bacteria to humans. The evaluation of the impact of pesticide use on non-target organisms is conducted with different tests. Small mammals, birds, soil microorganisms, pollinator insects (bees and wasps), aquatic organisms (fish, zooplankton, phytoplankton, and microcrustaceans) are considered representative organisms for these different tests (Grisolia 2005).

The use of herbicides in agricultural crops can cause health problems due to their persistence in the environment and accumulation throughout the food chain. Food is the main route for exposure of humans to these chemicals and fish and shellfish have been recognized as major vectors for contaminant transfer to humans (Ateeq et al. 2006). 2,4-D can cause several metabolic alterations, tissue necrosis in non-target organisms, including important members of the food chain (Gallagher and Di Giulio 1991).

2,4-D is quickly absorbed in the gastrointestinal tract after oral exposure, the agrochemical residues can be observed in plasma levels in 10 minutes to 24 hours after exposure, depending on the dose and the chemical form of 2,4-D (Knopp and Schiller 1992). The absorption of 2,4-D ester has been reported to be slower than 2,4-D acid and salt (Erne 1966); but their excretion rates are similar (Knopp and Schiller 1992).

According to Bécaert et al. (2006), 2,4-D has a negative effect on the soil, by directly inhibiting or removing a source of enzyme production (bacteria). This inhibiting effect results in loss of functional stability of urease, β -glycosidase, and sulphatase, affecting soil stability due to changes in the functional mechanisms of resistance and recovery.

In laboratory tests with *Eisenia fetida* (Annelidae) 2,4-D had serious effects on development and reproduction. The toxic effects observed after exposure of animals to 2,4-D contaminated soils were more severe than those observed for animals exposed to the herbicide glyphosate in the same concentration (Correia and Moreira 2010).

Hoy (1985) exposed *Scytonotus simplex* (millipede) to three different doses of 2,4-D in three different ways in the soil (applied evenly in the substrate, in half of the substrate, and added to half of the food provided) and compared to a control group. In the control group, mortality was not observed until the 10th day, while in treatment groups, mortality was observed within two days of experiment and progressively increased during the first 10 days. Comparisons among the three methods of application of 2,4-D suggest that this species of

millipede avoid surfaces treated with 2,4-D, and that the spatial distribution of 2,4-D residues in the field can influence the effect of the herbicide on the animal. A uniform distribution, contaminating a wide portion of the soil seems more harmful than an irregular one.

According to Gallagher and Di Giulio (1991), this herbicide is usually considered not toxic to fish in low concentrations. However, Fonseca et al. (2008) reported that 2,4-D affects the brain and the activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE) in the muscles and some metabolic parameters of the blood and tissues of *Leporinus obtusidens*, possibly due to the stress caused by the toxicity of this herbicide. Sarikaya and Yılmaz (2003) also described 2,4-D as highly toxic to fish, with serious effects to humans and animals, since it accumulates in tissues and causes acute poisoning (WHO 1984).

Ateeq et al. (2006) conducted a histological analysis of the gonads and liver of fish of specie *Clarias batrachus* to examine DNA fragmentation and confirmed the genotoxic effect of 2,4-D. In the histological analysis of the gonads, in the ovaries, this herbicide induced apoptosis, indicated by the presence of atretic oocytes, nuclear blebbing, karyolysis, hypertrophy and vacuolation, in addition to mitochondrial deformities, electron dense cytoplasm, damage to the plasma membrane, vacuolation, and heterochromatinization. In the testicular tissue, the tubules were relatively smaller in size and contained mainly spermatids. Some cells in the seminiferous tubules had signs of necrosis characterized by dissolution of the nucleus and nuclear membrane. Leydig cells were slightly hypertrophied, which may be a response to an increase in the functional demand, confirming the genotoxic effect of 2,4-D.

Cattaneo et al. (2008) reported that fish of specie *Rhamdia quelen* exposed to 2,4-D exhibited some behavioral alterations, such as lethargy and erratic swimming. The histological analysis of the liver revealed alterations after exposure, such as abnormal arrangement of hepatic cords, rupture of the cell membrane, and vacuolation in hepatocytes.

The fish species *Geophagus brasiliensis* subjected to concentrations of 1, 5, 10, 20, 40 and 80 mg/l 2,4-D for 96 hours presented changes in mortality rates, oxygen consumption and ammonia excretion. Mortality rates were directly proportional to the concentrations of the herbicide, reaching 100% at a concentration of 80 mg/l. Oxygen consumption rates change significantly in higher concentrations, which may result in changes in energy metabolism. The ammonia excretion rates were inversely proportional to the concentrations exposed, revealing changes in the animal's metabolism that may result in the excretion of toxic substances absorbed. The mean neutral red retention time was significantly lower, in comparison with

the control, the decrease of the dye retention team was directly related to the increase of the 2,4-D concentration (Barbieri 2008).

Tayeb et al. (2010) assessed the toxicity of 2,4-D administered to rats via oral gavage and observed prominent alterations in the liver tissue. After four weeks, animals treated with 15 mg/kg of 2,4-D exhibited ruptured hepatic cords in several areas. Focal necrosis was also observed, as well as vacuolation in hepatocytes and vessel dilation. These alterations were more prominent after treatment with the dose of 75 mg/kg. Necrosis was more frequently observed in the group treated with this concentration, in addition to increase in glycogen charge. The treatment with 150 mg/kg of 2,4-D induced other histopathological alterations such as pyknotic nuclei, congestion of hepatocytes, significant increase of cells undergoing necrosis, vacuolated hepatocytes, and loss of the typical polyhedral shape. Ruptured hepatic cords were also observed in several areas, demonstrating subacute toxicity to the liver caused by 2,4-D.

In order to investigate the effects of 2,4-D on the testicular morphology and function, dwarf goats received three different treatments with the herbicide. The results revealed alterations in the seminiferous tubules, such as hyperemia and stromal edema, and detachment of the basal membrane from the surrounding fibromuscular layer. A reduction in the number of Sertoli cells, with vascular alterations of the interbulular stroma were present in all treated groups, characterizing lower reproduction rates. Thus, exposure to 2,4-D negatively affected sperm counts of individuals, might cause a possible sperm dysfunction in humans and other species exposed to this toxic compound when applied to agricultural crops (Obidike et al. 2012).

In addition, other studies reported that 2,4-D induced chromosome aberrations, also confirming its genotoxic/mutagenic effect (Kale et al. 1995; Tukula and Jalal, 1985; Mustonem et al. 1986).

Bioassays with plants have been considered adequate for the assessment of genotoxicity and mutagenicity, mainly due to ethical reasons. Many upper plants are frequently used to monitor environmental pollutants (Leme and Marin-Morales 2009; Fontanetti et al. 2011, 2012). According to Ma et al. (1995), because plants are direct biological receptors of pollutants, they constitute an important tool for genetic tests and environmental monitoring.

Crocker (1953) reported that 2,4-D caused alterations during mitosis in *Allium cepa*. Alterations were dose-dependent, and classified as structural or physiological. The later, such

as adherence, chromosome condensation, and delay in the formation of the mitotic fuse were observed after two hours of treatment. Structural alterations include chromatid breaks, observed after two to four hours of exposure to higher concentrations. Chromosome breaks were observed in groups exposed to all concentrations. Therefore, 2,4-D affects the nucleic acid cycle, suggesting that its effect on the chromosome structure is analogous to that of radiations.

Fiskesjö et al. (1981) studied the effects of 2,4-D by *Allium* test, and found that the mitotic index decreased in all concentrations tested, and also appeared a swelling in the roots (C-tumor) at a concentration of 1 ppm. Polyploid cells and giant cells were also seen.

Pavlica et al. (1991) also examined the effects of 2,4-D on *Allium cepa* and observed a threefold decreased in mitotic activity in the group exposed to a concentration of 45 μM compared to the control group. The concentration 450 μM stimulated cell division and increased the frequency of chromosome aberrations. 2,4-D had a prominent effect on the mitotic fuse, most of the abnormalities found were C-mitosis, disturbances in the anaphase and problems in the reconstitution of the nucleus. The herbicide caused chromosome alterations during metaphase, anaphase, and telophase, except for micronuclei that were observed mainly in interphase. Chromosome bridges during anaphase and telophase were found after 2 and 24 hours of treatment with 450 μM , laggards were also observed, although in low frequency. The most frequently observed alteration were micronuclei in the groups exposed to the two concentrations. Chromosome adherence was also frequently observed and accompanied by instability of the mitotic fuse and chromosome. Fragmentation of the chromatin in interphase nuclei were observed in the group exposed to the highest concentration, as chromatin bodies.

According to Ateeq et al. (2002), onion bulbs exposed to different concentrations of 2,4-D, especially 25-100 ppm, exhibited prominent alterations associated with general growth and cell shape, in addition to mitotic index near zero. In doses ranging from 5 to 20 ppm, "Crochet hook", C-tumors, and swelling were observed in roots. In the group exposed to 1-4 ppm used for the chromosome aberration test, this parameter could not be calculated effectively, since roots were short (3-5mm).

Assessment of the genotoxic effects of Avenoxan®, commercial formula of 2,4-D in *A. cepa* and *Allium sativum*, revealed that the decrease in mitotic index in the two species had dose-response effect. All concentrations induced abnormalities during mitotic division, compared to the negative control in both species. Abnormalities were: C-mitosis, adherences,

anaphases and telophases with bridge, lost chromosomes, multipolar anaphase, micronucleus and breaks, the most common of them, were the C-mitosis (Gul et al. 2006).

Genotoxicity studies on 2,4-D in transgenic plants (*Arabidopsis thaliana*) demonstrated that the increase in the concentration of the herbicide from 0-3 and 0-30 $\mu\text{g/l}$ increase the frequency of reversions A \rightarrow G when compared with the control group. The increase from 100 and 300 $\mu\text{g/l}$ in the concentration of 2,4-D resulted in a decrease in the frequency of recombination. Interestingly, no effects of 2,4-D were observed on the frequency of mutations T \rightarrow G. The increase in the frequency of recombination in low concentrations was associated with the increase of the levels of point mutations A \rightarrow G. Thus, in general, 2,4-D in lower concentrations had a strong effect on recombination. However, this trend was not observed in higher concentrations (Filkowski et al. 2003).

A study by Grabinska-Sota et al. (2003) on the toxicity of derivatives of synthetic auxins to broad-leaved plants and grains demonstrated that phenoxyacetic herbicides inhibited root growth. However, grasses in general were less sensitive to 2,4-D derivatives, and therefore the toxicity of herbicide derivatives was higher for broad-leaved plants than for grasses.

In a study on the cytogenetic effects of 2,4-D in 50% water (1-2 L/ha) on *Hordeum vulgare* (barley), Geras'kin et al. (2005) reported that the minimum dose increased nearly fourfold the occurrence of cytogenetic aberrations. Although significant, this effect was not dose-dependent, as the frequency of cells with aberrations did not change significantly when the herbicide dose was doubled.

Kumar et al. (2010) reported that 2,4-D reduced the mitotic index of wheat plants, with a dose-dependent response. The variety HUW 468 exhibited the highest frequency of abnormal cells at the concentration of 1200 ppm of the herbicide. The induction of chromosome abnormalities was also dose-dependent in all treatments. The most common aberrations observed were adherence and bridges, but also multipolarity, in addition to laggards in response to the maximum dose of the herbicide in all varieties.

A study evaluated the genotoxicity of 2,4-D in bean seedlings using the comet assay and RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) reported that GTS (Genomic Template Stability) and root growth were reduced in the treatments compared with the negative control. An increase in total soluble proteins was observed in seedlings exposed to 2,4-D, contrary to the decrease observed in the positive control group. Damage to DNA assessed with the comet assay was substantially higher than that of the negative control in all treatment groups.

Patterns of RADP also exhibited significant differences between the negative control and the treatment groups, with disappearance of a normal band and/or appearance of an additional band. Thus, the number of bands increased with the increase in the concentration of the auxinic herbicide, demonstrating a dose-dependent effect (Cenkci et al. 2010).

The studies presented above are summarized in table 2 for better visualization and comparison of data.

The pesticides are different from other chemicals because they are applied in the environment in order to control the unwanted living species, therefore, have to be biologically active, and for this reason are characterized by different degrees of toxicity. Since this toxicity is not always specific to the target organisms, the use of pesticides can present risks to human health, to survival of non-target species and the environment (Colosio and Moretto 2008). In view of the use of these substances on a large scale, the investigation of toxicity in various environments is necessary and prudent, since it can affect different organisms.

In this way, it is worth noting that different types of organisms are currently used as biomarkers, in other words, sentinel species that are used as indicators to evaluate the environmental quality of the possible effects of natural risks or anthropogenic origin. Thus, the studies reviewed, using different animal and higher plant to investigate the effects of 2,4-D and analysis of the results showed that although the herbicide be effective when used in broad-leaved plants, it can endanger the different ecosystems. Therefore, even in low concentrations, this pesticide may have cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects on plants, and histological, physiological, and behavioral alterations on animals.

5. Final considerations

Finally, this should alert about the indiscriminate use of pesticides, the 2,4-D is used for several decades and is still widely used. The studies presented here reinforce the warning that pesticides although important for agriculture, need to be used more cautiously, being applied only in the indicated amounts and as far as possible make replacement by other methods less harmful to the environment and its biodiversity.

6. References

- Amarante Jr OP (2002) Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas: determinação do 2,4-D e do seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. Dissertation, Universidade Federal do Maranhão
- Ateeq B, Farah MA, Ali MN, Ahmad W (2002). Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutat Res* 514:105–113
- Ateeq B, Farah MA, Ahmad W (2006) Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clariasbatrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sci* 78:977–986
- Aydin H, Özdemir N, Uzunören N (2005) Investigation of the accumulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rat kidneys. *Forensic Sci Int* 153:53–57
- Barbieri E (2009) Effect of 2,4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). *Ecotoxicology* 18:55-60
- Bécaert V, Samson R, Deschênes L (2006) Effect of 2,4-D contamination on soil functional stability evaluated using the relative soil stability index (RSSI). *Chemosphere* 64:1713–1721
- Benli AÇK, Sarakaya R, Sepici-Dincel A, Selvi M, Sahin D, Erkoç F (2007) Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astaculeptodactylus* Esch. 1823). *Pestic Biochem Phys* 88:296–299
- Caldas E, Souza LC (2000) Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Revista Saúde Pública* 34:529-537
- Cattaneo R, Loro VL, Spanevello R, Silveira FA, Luz L, Miron DS, Fonseca MB, Moraes BS, Clasen B (2008) Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdiaquelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pestic Biochem Phys* 92:133–137
- Çenkci S, Yildiz M, Cigerci IH, Bozdog A, Terzi H, Terzi ESA (2010) Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:1558–1564
- Chingombe P, Saha B, Wakeman RJ (2006) Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. *J Colloid Interface Sci* 297:434-442

Colosio C, Moretto A (2008) Pesticides. In: Heggenhougen K, Quah SR (eds) International Encyclopedia of Public Health. Academic Press, San Diego, pp 59- 66

Correia FV, Moreira JC (2010) Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia fetida*) in Laboratory Tests. Bull Environ Contam Toxicol 85:264–268

Costa CR, Olivi P (2008) A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova 31:1820-1830

Crocker BH (1953) Effects of 2,4-D Dichlorophenoacetic acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid on mitosis in *Allium cepa*. Bot Gaz 114:274-283

Dierickx PJ (1985) Hepatic glutathione-S-transferases in rainbow trout and their interaction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1,4-benzoquinone. Comp Biochem Physiol C 82:495-500

Erne K (1966) Distribution and elimination of chlorinatedphenoxyacetic acids in animals. Acta Vet Scand 7:240-256

Filkowski J, Besplug J, Burke P, Kovalchuk I, Kovalchuk O (2003) Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers Mutat Res 542:23–32

Fiskesjö CG, Lassef C, Renberg L (1981) Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols In the modified *Allium* test. Chemic Biol Interact 34:333-344

Fonseca MB, Gluszczak L, Moraes BS, Menezes CC, Pretto A, Tierno MA, Zanella R, Gonçalves FF, Loro VL (2008) The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). Ecotoxicol Environ Saf 69:416-420

Fontanetti CS, Nogarol LR, Souza RB, Perez DG, Maziviero G (2011) Bioindicators and Biomarkers in the Assessment of Soil Toxicity. In: Pascucci S (ed) Soil Contamination, InTech, Croácia, pp 143-168

Fontanetti CS, Souza TS, Christofolletti CA (2012) The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio C, Hensel O, Selbach J (eds) Sustainable water management in the tropics and subtropics - and cases study in Brazil, UNIPAMPA/UNIKASSEL, Brazil/Germany, pp 975-1005

Gallagher E, Di Giulio R (1991) Effects of 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid and picloran on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Toxicol Lett 57:65–72

- Geras'kin SA, Kim JK, Dikarev VG, Oudalova AA, Dikareva NS, Spirin YV (2005) Cytogenetic effects of combined radioactive (^{137}Cs) and chemical (Cd, Pb, and 2,4-D herbicide) contamination on spring barley intercalary meristem cells. *Mutat. Res.* 586:147–159
- Grabinska-Sotaa, E, Wisniowska E, Kalka J (2003) Toxicity of selected synthetic auxines-2,4-D and MCPA derivatives to broad-leaved and cereal plants. *Crop Prot* 22:355–360
- Grisolia CK (2005) Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução. Editora Universidade de Brasília, Brasília.
- Grossmann K (2003) Mediation of Herbicide Effects by Hormone Interactions. *J Plant Growth Regul* 22:109-122
- Gul T, Kaymak F, Muranli FDG (2006) Genotoxic Effects of Avenoxan on *Allium cepa* L. and *Allium sativum* L. *Caryologia* 59:241-247
- Holt M S (2000) Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. *Food Chem Toxicol* 38:S21-S27
- Hoy JB (1985) Toxicity of 2,4-D to Millipeds (Polydesmidae: Diplopoda): Food Contamination and Residue Distribution as Factors. *J Econ Entomol* 78:302-304
- Itoh K, Kinoshita M, Morishita S, Chida M, Suyama K (2013) Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils *Fems Microbiol Ecol* 84:124–132
- Kale PG, Petty BT, Walker S, Ford JB, Dehkordi N, Tarasia S, Tasie BO, Kale R, Sohni YR (1995) Mutagenicity testing of nine herbicides and pesticides currently used in agriculture. *Environ Mol Mutagen* 25:148-153
- Kelley KB, Riechers DE (2007) Recent developments in auxin biology and new opportunities for auxinic herbicide research. *Pestic Biochem Phys* 89:1-11
- Kennepohl E, Munro IC (2001) Phenoxy Herbicides (2,4-D). In: Krieger R I, Krieger W C (eds) *Handbook of Pesticide Toxicology*, Academic Press, San Diego, CA, pp 1623-1638
- Knopp D, Schiller F (1992) Oral and dermal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid sodium and dimethylamine salts to male rats: Investigations on absorption and excretion as well as induction of hepatic mixed-function oxidase activities. *Arch Toxicol* 66:170-174

- Kumar S, Arya SK, Roy BK, Singh AK (2010) The effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and isoproturon herbicides on the mitotic activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) root tips. *Turk J Biol* 34:55-66
- Kumari TS, Vaidyanath K (1989) Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. *Mutat Res* 226:235-238
- Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat Res* 682:71-81
- Ma TH, Xu Z, Xu C, Mc Connell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang H (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res* 334:185-195
- Marin-Morales M, Ventura-Camargo BC, Hoshina MM (2013) Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health. In: Price, A J, Kelton J A (eds) *Herbicides - Current Research and Case Studies in Use*. In Tech, Rijeka, pp 399-443
- MarrónMontiel E, Ruiz-Ordaz N, Rubio-Granados C, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer CJ (2006) 2,4-D Degrading bacterial consortium. Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmentating an activated sludge microbial community. *Process Biochem* 41:1521-1528
- Michałowicz, J (2005) The occurrence of chlorophenols, chlorocatechols and chlorinated methoxyphenols in drinking water of the largest cities in Poland. *Pol J Environ Stud* 14:327-333
- Michałowicz J, Duda W (2007) Phenols – the sources and toxicity. *Pol J Environ Stud* 16:78–92
- Mičić M, Bihari N, Mlinarič-Raščan I (2004) Influence of herbicide, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, on haemocyte DNA of *in vivo* treated mussel. *J Exp Mar Biol Ecol* 311:157-169
- Mortelmans K, Haworth S, Speck W, Zeiger E (1984) Mutagenicity testing of agent orange components and related chemicals. *Toxicol Appl Pharm* 75:137-146
- Mustonem R, Kangas J, Vuojolahti P, Linnainmme K (1986) Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis* 16: 37-48
- Obidike IR, Aka LO, Omoja VU, Shoyinka SVO, Kamalu T, Nanika SM (2012) Testicular morphology and antispermatogenic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in male West African Dwarf (WAD) goats. *Comp Clin Path* 21 1457-1462.

- Oruç EO, Sevgiler Y, Uner N (2004) Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp Biochem Phys C* 137:43-51
- Pavlica M, Papes D, Nagy B (1991) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. *Mutat Res* 263:77-81
- Pazmiño DM, Romero-Puertas MC, Sandalio LM (2012) Insights into the toxicity mechanism of and cell response to the herbicide 2,4-D in plants. *Plant Signal Behav* 7: 425-427
- Sanches SM, Silva CHTP, Campos SX, Vieira EM (2003) Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13:53-58
- Sanchez-Brunete C, Garcia-Valcarcel AI, Tadeo JL (1994) Determination of residues of phenoxy acid herbicides in soil and cereals by gas chromatography-ion trap detection. *J Chromatogr* 675:213-218
- Sarikaya R, Yilmaz M (2003) Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere* 52:195-201
- Tayeb W, Nakbi A, Trabelsi M, Attia N, Miled A, Hammami M (2010) Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid based herbicide “Désormonelourde”. *J Hazard Mater* 180:225-233
- Teixeira MC, Duque P, Sá-Correia I (2007) Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2,4-D. *Trends Biotechnol* 25: 363-370
- Tomlin C (1994) *The pesticide manual: incorporating the agrochemicals handbook*. British Crop Protection Council, Cambridge.
- Tukula TE, Jalal SM (1985) Increase rates of sister chromatid exchanges induced by the herbicide 2,4-D. *J Hered* 76:213-214
- Usepa, 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Who, 1984. Environmental Health Criteria 29: 2,4- Dichlorophenoxyacetic acid (2,4- D). World Health Organization, Switzerland.
- Wolfe WH (1984) The Epidemiology and Toxicology of Agent Orange. In Proceedings of the 14^o Conference on Environmental Toxicology, Dayton, OH.

Zagatto PA, Bertoletti E (2006) *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2.ed. Rima Artes e Textos, São Carlos.

Zimdahl RL (2010) Chapter 6 – Development of herbicides after 1945. In: Zimdahl RL (ed) *A History of Weed Science in the United States*. Elsevier, USA, pp 79-113

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and FAPESP (São Paulo Research Foundation) process n.2011/14881-3. The authors would like to thank Cintya Aparecida Christofolletti by collaboration.

Table 1- Dosage of 2,4-D used in Brazilian crops for weed control

Crop	Dose of 2,4-D (Kg/ha)	Target plant
Wheat	0.67 – 1.005	<i>Bidenspilosa</i> <i>Raphanusraphanistrum</i> <i>Euphorbia heterophylla</i> <i>Galinsongaparviflora</i>
Corn	1.005	<i>B. pilosa</i> <i>E. heterophylla</i> <i>Sidarhombifolia</i> <i>Commelinabenghalensis</i> <i>Ipomoea grandifolia</i> <i>Alternantheratenella</i> <i>Amaranthusdeflexus</i>
Soy	0.67 – 1.005	<i>B. pilosa</i> <i>E.heterophylla</i> <i>S. rhombifolia</i> <i>C. benghalensis</i> <i>Ipomoea purpúrea</i> <i>Richardibrasiliensis</i>
Rice	0.67 – 1.005	<i>S. rhombifolia</i> <i>B. pilosa</i> <i>C. benghalensis</i> <i>E. heterophylla</i>
Irrigated rice	0.201	<i>Areschynomenerudis</i> <i>Ipomoea aristolochiaefolia</i> <i>Aeschynomenedenticulata</i>
Sugarcane	0.67 – 2.345	<i>B. pilosa</i> <i>S. rhombifolia</i> <i>Amaranthusviridis</i> <i>Portulacaoleracea</i> <i>G. parviflora</i> <i>Emilia sonchifolia</i> <i>R. brasiliensis</i> <i>E. heterophylla</i> <i>I. grandifolia</i> <i>Commeliabengalensis</i>
Pasture	0.97 – 1.34	<i>Cyperusrotundus</i> <i>Sidacordifolia</i> <i>S. rhombifolia</i> <i>A. deflexus</i> <i>P. oleracea</i>

Table adapted from the guidelines of manufacturer of the DMA 806 BR, Dow AgroSciences.

Table 2- Summary of studies of the toxicity of 2,4 -D to different organisms

Organism	Dosage of 2,4-D	Author	Effects in Organisms
Bacteria	36 mg/kg of soil	Bécaert et al. (2006)	Negative effect on soil, maybe for right inhibition or remotion of bacteria
<i>Eisenia foetida</i>	1, 10, 100, 500, 1000 mg/kg of soil	Correia and Moreira (2010)	High mortality rate, severe effect on the development and the reproduction
<i>Scytonotus simplex</i>	Four doses and diferentes forms of application of 2,4-D	Hoy (1985)	High mortality rate and influence of spatial distribution of 2,4-D residues in the field
<i>Leporinus obtusidens</i>	1, 10 mg/l	Fonseca et al. (2008)	Effect in the brain and in the activity of the muscle enzyme acetylcholinesterase (AChE) and some metabolic parameters of blood and tissue
<i>Cyprinus carpio</i>	Varied doses of 2,4-D	Sarikaya and Yılmaz (2003)	High toxicity to fish
<i>Clarias batrachus</i>	75 ppm	Ateeq et al. (2006)	Genotoxic effect and histopathological alterations in male and female gonads
<i>Rhamdia quelen</i>	1 to 780 mg/l	Cattaneo et al. (2008)	Behavior alterations and histopathological alterations
Mouse	Oral treatment at a doses level of 15, 75, 150 mg/kg	Tayeb et al. (2010)	Marked alterations of hepatic tissue
West African Dwarf (WAD) goats (male)	75, 100 and 125 mg/kg body weight	Obidike et al. (2012)	Histopathological alterations in testicular tissue and loss of effectivity of animal reproduction
<i>Allium cepa</i>	25, 125, 250, 500, 1000, 2500, 5000 p.p.m	Croker (1953)	Structural and physiological alterations in mitosis
<i>Allium cepa</i>	4, 5, 450 µM	Pavlica et al. (1991)	Strong effect on the mitotic fuse
<i>Allium cepa</i>	1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75,100 p.p.m	Ateeq et al. (2002)	Alterations in general growth and in cell shape, C-tumors and swelling in roots
<i>Arabidopsis thaliana</i>	0, 5, 10, 30, 100, 200, 300 µg/l	Filkowski et al. (2003)	Strong effect on the recombination in minor concentrations tested
<i>Sinapis alba</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Triticum aestivum</i>	0.3, 1.5, 3, 30, 150, 300, 3000, 0.072, 0.72, 7.2, 36, 72, 7200 mg/l	Grabinska-Sota et al. (2003)	Inhibition of roots growth
<i>Hordeum vulgare</i>	1 or 2 l/ha	Geras'kin et al. (2005)	Cytogenetic aberrations
<i>Triticum aestivum</i>	50, 100, 200, 400, 800,1200 ppm	Kumar et al. (2010)	Reduction the mitotic index and induction of chromosomal abnormalities
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0.1, 0.2, 0.3 ppm	Cenkci et al. (2010)	Reduction in root growth, increased of soluble protein and of the number of bands in RAPD tests