

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

SILVIO JOSÉ DE SOUZA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM
ALFACE (*LACTUCA SATIVA L.*)**

DISSERTAÇÃO

**CAMPO MOURÃO
2019**

SILVIO JOSÉ DE SOUZA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE IMIDACLOPRIDO EM
ALFACE (*LACTUCA SATIVA L.*)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Março

Coorientador: Profa. Dra. Ailey Aparecida Coelho Tanamati

CAMPO MOURÃO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação



S729e

Souza, Silvio José de

Estudo da influência da utilização de imidacloprido em alface (lactuca sativa L.) / Silvio José de Souza – 2019.

59 f.: il.; 30 cm.

Orientador: Paulo Henrique Março

Coorientadora: Ailey Aparecida Coelho Tanamati

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2019.

Inclui bibliografias.

1. Quimiometria. 2. Fluorescência. 3. Fontes de infravermelho. 4. Alimentos – Dissertações. I. Março, Paulo Henrique, orient. II. Tanamati, Ailey Aparecida Coelho, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. IV. Título.

CDD: 664

Biblioteca Câmpus Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn CRB 9/1219





Ministério da Educação

Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos

PPGTA UTFPR
Programa de Pós-Graduação
em Tecnologia de Alimentos

TERMO DE APROVAÇÃO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA UTILIZAÇÃO DE IMIDACLOPRIDA NO DESENVOLVIMENTO DA ALFACE (*Latuca sativa*)

Por

SILVIO JOSÉ DE SOUZA

Essa dissertação foi apresentada às treze horas e trinta minutos, do dia dezoito de fevereiro de dois mil e dezoito, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Ciência e Tecnologia de Produtos Alimentícios, no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - PPGTA, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Paulo Henrique Março (Orientador – PPGTA)

Profa. Dra. Marcilene Ferrari Barriquelo Consolin (Membro Externo – UTFPR)

Prof. Dr. Leonardo Pim Petean (Membro Externo – Faculdade Integrada de Campo Mourão)

Nota: O documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no Departamento de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR Campus Medianeira

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço à Deus porque acredito que tudo aquilo que conquistei foi proporcionado por Ele, colocando-me no lugar certo, no momento certo e com as pessoas certas, dando-me força, paciência e sabedoria para dar cada passo rumo às conquistas.

Agradeço ao imenso apoio da minha família, meus pais Claiton José Silveira de Souza e Júlia Marilu de Souza e meu irmão Rafael Silveira de Souza que foram os pilares de sustentação em toda esta caminhada, nunca deixaram de acreditar em mim, sempre dando palavras de conforto, amor e carinho, ajudando diretamente na minha formação.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos que fizeram parte deste trabalho sempre contribuindo de alguma maneira para o meu conhecimento, se apresentando sempre disponíveis para ajudar, em especial agradeço aos professores (as) Dr. Paulo Henrique Março, Dra. Ailey Aparecida Tanamati, Dra. Ana Paula Peron e Dr. Nelson Consolin Filho, por terem contribuído valorosamente no desenvolvimento deste projeto de dissertação. Também agradeço pelo auxílio e parceria de pesquisa a professora Dra. Patricia Carla Giloni de Lima da Universidade Estadual do centro-oeste do Paraná, professor Dr. Leonardo Pim Petean do Centro Universitário Integrado, Professor Dr. Eduardo Jorge Pilau da Universidade Estadual de Maringá.

Agradeço a todos os amigos e colegas do programa que junto a mim enfrentaram todas as etapas necessárias para a obtenção desta conquista, em especial ao aluno de iniciação científica Bruno Vinicius Dall Molin por ter auxiliado de forma direta na obtenção dos resultados. Agradeço também aos amigos conquistados ao longa da vida, que fizeram parte de mais esta vitória estando sempre presente desde os momentos mais simples até os mais complexos e de extrema necessidade.

Agradeço a todos os funcionários e técnicos de laboratório da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, no qual grande parte deste projeto foi desenvolvido.

Por fim agradeço ao órgão de fomento Capes, pelo financiamento da pesquisa por meio de auxílio financeiro tornando possível o desenvolvimento deste projeto para a obtenção deste título profissional

RESUMO

SOUZA, S. J. **Estudo da influência da utilização de Imidacloprido em alface (*Lactuca sativa* L.)** 2019. 60 f. Projeto (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

A agricultura é altamente dependente da utilização de substâncias que possam inibir a ação de insetos nocivos aos cultivares. No entanto, apesar de apresentarem alta eficiência no controle de uma diversificada variedade de insetos, estudos têm mostrado efeitos letais para insetos não alvo, tais como abelhas polinizadoras e insetos aquáticos, além de efeitos colaterais em aves, peixes e até mesmo em humanos. Existem poucas informações disponíveis sobre alterações moleculares e sobre o efeito na absorção de minerais causadas por influência de pesticidas em hortaliças, sendo que estes alimentos fazem parte do dia a dia da população em geral. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento de culturas de alface ausência e na presença de duas concentrações do inseticida imidacloprido (IMD) a partir de análises por vibrações moleculares obtidas por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), infravermelho médio (MIR), análise por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) e análise de estresse por fluorescência de clorofila *a* (FChl), além de avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do IMD em meristemas de raízes de *Allium cepa* nos tempos 0, 24 e 48 h de exposição. Os espectros NIR e MIR foram medidos no caule e na superfície das folhas das alfaces, sendo tratados por análise de componentes principais (PCA). Os teores de Ca, K, Fe, Cu, Al e Pb foram obtidos por FAAS, e os resultados de fluorescência foram obtidos por meio de um Fluorímetro de Pulso de Amplitude Modulada (PAM). Os dados de PAM e FAAS foram tratados estatisticamente utilizando-se ANOVA e teste de Tukey, enquanto os resultados de citotoxicidade e genotoxicidade foram obtidos pelos testes de Shapiro-Wilk e homogeneidade de Hartley, Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Não foram encontradas diferenças estatísticas nas análises dos minerais entre os grupos (com e sem inseticida). Os resultados mostraram que existe diferença entre as medidas de espectros NIR quando obtidas do caule e na superfície externa das folhas, de modo que o ponto de medida pode influenciar nos resultados. No entanto, considerando-se apenas a folha, não foi possível diferenciar os grupos (controle, tratamento 1 e tratamento 2) pela aplicação de PCA nos dados de espectroscopia NIR, MIR, tão pouco nos dados de FAAS. Os parâmetros obtidos por PAM, F_0 , F_V , F_V/F_M e F_V/F_0 , tal como os resultados de NIR e MIR, não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos (com e sem inseticida). As duas concentrações avaliadas causaram inibição significativa na divisão celular principalmente após 48 horas de exposição, onde o índice mitótico foi de aproximadamente 1,76 e 0,56 para concentração 1 e 2, respectivamente. O inseticida induziu a formação de um número significativo de micronúcleos além do número de células em apoptose, indicando que o IMD apresenta genotoxicidade e citotoxicidade. Desta forma, sugere-se que o uso de IMD deve ser rigorosamente monitorado pois, além de não serem facilmente diferenciadas, cultivares produzidas com uso de IMD podem promover toxicidade.

Palavras-chave: Neonicotinoides. genotoxicidade. quimiometria. FAAS. Fluorescência. Infravermelho.

ABSTRACT

SOUZA, S. J. **Study of the influence of the use of Imidacloprid on lettuce (*Lactuca sativa* L.)** 2019. 60 f. Projeto (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2018.

Agriculture is highly dependent on the use of substances that may inhibit the action of pests harmful to cultivars. However, although they are highly effective in controlling a variety of insects, studies have shown lethal effects for non-target insects such as pollinating bees and aquatic insects, as well as side effects on birds, fish, and even humans. There is little information available on molecular changes and on the effect on the absorption of minerals caused by the influence of pesticides on vegetables, being these foods part of the day-to-day population. Thus, the objective of this work was to evaluate the development of lettuce in the absence and presence of two different imidacloprid (IMD) insecticide concentrations, using molecular vibration analyzes obtained by near-infrared (NIR), mid-infrared (MIR) spectroscopy, flame atomic absorption spectrometry (FAAS) and a-chlorophyll fluorescence stress analysis (FChl) through a pulse of modulated amplitude fluorimeter (PAM), as well as to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential of IMD in *Allium cepa* root meristems at the exposure times of 0, 24 and 48 hours. The NIR and MIR spectra were measured on the stem and leaf surface of the lettuces and treated by Principal Component Analysis (PCA). The Ca, K, Fe, Cu, Al and Pb contents were obtained by FAAS. The PAM and FAAS data were statistically treated using ANOVA and Tukey's test, while the results of cytotoxicity and genotoxicity were obtained by the Shapiro-Wilk tests and homogeneity of Hartley, Kruskal-Wallis, and post-Dunn test. No statistical differences were found in the mineral analyzes between the groups (with and without insecticide). The results showed that there is a difference between the measurements of NIR when the spectra are obtained from the stem and on the outer surface of the leaves so that the measurement point can influence the results. However, considering only the leaf, it was not possible to differentiate the groups (control, treatment 1 and treatment 2) by using PCA in the NIR, MIR spectroscopy data, as happens in FAAS data. The parameters obtained by F_0 , F_V , F_V/F_M and F_V/F_0 , as well as the NIR and MIR results, did not present significant statistical differences between the groups (with and without pesticide). The two concentrations evaluated caused significant inhibition in cell division mainly after 48 hours of exposure, where the mitotic index was approximately 1.76 and 0.56 for concentration 1 and 2, respectively. The pesticide did induce the formation of a significant number of micronuclei in addition to the number of cells in apoptosis, indicating that IMD has genotoxicity and cytotoxicity. Therefore, it is suggested that the use of IMD should be strictly monitored because, in addition to not being easily differentiated, cultivars produced using IMD may promote toxicity.

Keywords: Neonicotinoids. genotoxicity. chemometrics. FAAS. Fluorescence. Infrared.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química neonicotinoides	16
Figura 2 - Scores das amostras de alfaces cruas primeiro cultivo (A) e segundo cultivo (B)	38
Figura 3 - Scores NIR alfaces liofilizadas 1 ^a colheita	39
Figura 4 - Scores das amostras de alfaces liofilizadas 2 ^a colheita	40
Figura 5 - Scores da Contraposição das leituras de caule x parte superior	41
Figura 6 - Loadings dos scores da contraposição caule x parte superior	42
Figura 7 - Scores das amostras de alface cruas primeiro cultivo (A) e segundo cultivo (B)	44
Figura 8 - Score das amostras de Alface liofilizadas; A - PCA das leituras das alfaces liofilizadas do primeiro cultivo; B – PCA das leituras das alfaces liofilizadas do segundo cultivo.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros para análise por Espectroscopia de Absorção Atômica, Campo Mourão 2018	31
Tabela 2. Médias dos resultados de teores de cinzas totais e composição mineral das alfaces, Campo Mourão 2018.....	35
Tabela 3. Parâmetros de indução da fluorescência lenta e coeficientes de dissipação de energia obtidos após repetidos pulsos de saturação em folhas de Alface. Campo Mourão, 2018.	46
Tabela 4. Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de A. cepa expostos a diferentes concentrações do inseticida em 24 e 48 horas exposição. Campo Mourão, 2018.....	48
Tabela 5. Índices de alterações celulares observados em meristemas de raízes de A. cepa expostos a duas concentrações do inseticida (0,35 e 1,2 g/L), em 24 e 48 horas exposição. Campo Mourão, 2018.....	49

LISTA DE SIGLAS

FChI- Análise de estresse por indução de fluorescência de clorofila *a*;

Al – Alumínio;

Ca – Cálcio;

Cu – Cobre;

ArCH - vibrações de CH de grupos aromáticos;

ArOH – vibrações de OH ligados a grupos aromáticos;

FAAS - Espectroscopia de absorção atômica por chama;

Fe – Ferro;

F_o – Fluorescência basal;

F_M – Fluorescência máxima;

F_V – Diferença entre fluorescência máxima e basal;

F_V/F_M - Rendimento quântico máximo do fotossistema II;

F_V/F_o – Rendimento quântico máximo do fotossistema II;

IAC: índice de alterações cromossômicas

IM - Índice mitótico

IMD – Imidacloprido;

K – Potássio;

NIR – Espectroscopia de infravermelho próximo;

MIR - Espectroscopia de infravermelho médio;

MMS - Metil metanossulfonato

PAM - Fluorômetro de Pulso de Amplitude Modulada;

Pb – Chumbo;

PC – Componente Principal;

PCA – Análise de Componentes Principais;

PSII – Fotossistema II;

ROH – Vibrações de OH ligados a carbonos;

TE: Tempo de exposição.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	24
3.1 GERAL	24
3.2 ESPECÍFICOS	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DAS CULTURAS ..	25
As etapas para o desenvolvimento dos cultivares estão descritas nos itens abaixo.	25
4.1.1 Primeiro Cultivo	25
4.1.2 Segundo cultivo	26
4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	27
4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS	28
4.4 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MINERAL	29
4.4.1 Cinzas totais e digestão das amostras	29
4.4.2 Espectroscopia de absorção atômica	30
4.5 ANÁLISE DE ESTRESSE POR INDUÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA <i>a</i> (FChI)	31
4.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE <i>ALLIUM CEPA</i>	32
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 COMPOSIÇÃO MINERAL	35
5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)	37
5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR)	43
5.4 ANÁLISE DE ESTRESS POR INDUÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA <i>a</i>	45
5.5 RESULTADOS DA ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE <i>ALLIUM CEPA</i>	48
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é altamente dependente da utilização de substâncias, como os pesticidas, com a finalidade de inibir a ação de pragas nocivas aos cultivares como fungos, bactérias, vírus, vermes, ácaros, ervas daninhas e inseticidas. Dentre os pesticidas, os inseticidas são componentes químicos frequentemente utilizados na agricultura com o objetivo de defender as culturas do ataque de insetos nocivos para o desenvolvimento de diversos cultivares. Devido ao rápido mecanismo de ação e inibição do ataque de pragas e versatilidade de aplicação, um grupo químico de inseticidas destacável é o dos neonicotinoides. Este grupo é dividido em sete classes de inseticidas, sendo elas imidacloprido, tiacloprido, clotianidina, tiametoxam, acetamiprido, nitempiram e dinotefurano (do inglês *imidacloprid*, *thiacloprid*, *clothianidin*, *thiamethoxam*, *acetamiprido*, *nitenpyram* e *dinotefuran*) (HAN, TIAN e SHEN, 2017; JESCHKE et al., 2011).

O primeiro neonicotinoide foi lançado em 1991, sendo denominado de imidacloprido (IMD). Nos anos seguintes, houve um desenvolvimento notável de derivados tais como nitempiram e acetamiprida, desenvolvidos em 1995, e as demais classes como tiametoxam, clotianidina, dinotefurano e tiaclopride, que foram desenvolvidos de 1998 até 2002. Este pesticida oferece ações que vão desde a aplicações em sementes, aplicações folhares, em solos, pomares e culturas hidropônicas, e essa diversidade de possibilidades de aplicações contribui significativamente para sua disseminação comercial. Em 2010 os neonicotinoides representaram cerca 27% das vendas mundiais de inseticidas, sendo que nos Estados Unidos a renda com a venda destes pesticidas foi de aproximadamente \$2.63 bilhões, dos quais o IMD representou 41,5% das vendas (BONMATIN et al., 2015). Em 2014, mais uma vez este grupo químico disparou com mais de 25% das vendas mundiais, onde as classes tiametoxam, IMD e clotianidina representaram 85% das vendas. As principais regiões consumidoras deste inseticida são a América Latina, Ásia e América do Norte (BASS et al., 2015).

Este grupo químico de inseticidas é considerada sistêmica, ou seja, penetra na planta e percorre os vasos do vegetal, e por conta de seu baixo peso molecular e sua alta solubilidade em água, proporcionam aos neonicotinoides a propriedade de serem facilmente absorvidos pelas raízes ou até mesmo penetrar os tecidos das

plantas, e assim permanecer em seu sistema por um longo período (HAN, TIAN E SHEN, 2017), garantindo uma boa ação contra uma grande variedade de insetos por um tempo relativamente prolongado (JESCHKE et al., 2011). Além disso, aplicações contínuas mostraram que o agente ativo possui um longo tempo de vida, no qual fatores como repetibilidade de aplicação e a concentração utilizada influenciam diretamente na concentração acumulada no solo, se tornando disponível por mais tempo (GOULSON, 2013).

Os neonicotinoides possuem um mecanismo de ação considerado seletivo, uma vez que seu componente ativo é responsável por uma ação agonista (se ligam a receptores inativando-os biologicamente) e tem afinidade com as ligações de receptores de acetilcolina em vertebrados, levando a paralisias e por fim a morte (BONMATIN et al., 2015; SIMON-DELSO et al., 2015).

Estas propriedades podem garantir uma boa atividade inseticida, porém, ao contrário do que se acreditava, estudos recentes tem mostrado que, principalmente os efeitos cumulativos, tem levado a exposição e também a problemas no sistema nervoso central, problemas de fertilidade e até mesmo a morte de espécies não-alvos como abelhas (CALATAYUD-VERNICH et al., 2016), insetos aquáticos (RICO et al., 2018), peixes (ITURBURU et al., 2018) e aves (HALLMANN et al., 2014). Até mesmo em humanos taxas de exposição já foram mensuradas (UEYAMA et al., 2015), sendo grande parte de seus efeitos em mamíferos testados em ratos, mostrando também problemas relacionados a redução de fertilidade (BAL et al., 2012; KAPOOR et al., 2014), problemas no fígado (GU et al., 2013; LONARE et al., 2014) e efeitos de genotoxicidade (HAN, TIAN E SHEN, 2017; STIVAKTAKIS et al., 2016).

Mesmo sendo um inseticida sistêmico, estudos que mostram seus efeitos físicos e químicos na planta são escassos. Efeitos secundários associados ao uso do imidacloprido já foram relatados, suportando a ideia de que sua utilização resultou em maior rendimento na produção e melhor desenvolvimento da planta, conferindo principalmente um fenômeno denominado como "*Stress Shield*", onde a planta desenvolveu-se melhor apresentando certa resistência a estresses sofridos devido a temperaturas elevadas, falta ou até mesmo excesso de água (THIELERT, METZLAFF e BLOCK, 2009). No entanto efeitos da adição de inseticida com relação a composição ou modificações na matriz molecular das plantas ainda não foram relatados.

Por este motivo, este trabalho teve como objetivo estudar a influência da utilização de IMD em alface (*Lactuca sativa L.*), no qual avaliou-se as alterações moleculares por espectroscopia de infravermelho, perfil mineral por espectroscopia de absorção atômica em chama, análises de estresse por avaliação de fluorescência de clorofila, além de testes toxicológicos. Com isso, pode-se inferir sobre a influência, detectabilidade e toxicidade deste inseticida, de modo a prover esclarecimentos sobre a aplicação e consumo indireto deste pesticida aos consumidores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os pesticidas são substâncias químicas ou agentes biológicos que possui a finalidade de impedir, repelir ou eliminar qualquer tipo de praga. Usados frequentemente para combater diversas formas de seres vivos, tais como, insetos, ervas daninhas, ácaros, vermes, micróbios, fungos entre outros seres que são nocivos, principalmente, em culturas agrícolas. Deste modo dependendo do foco para o qual o pesticida é utilizado este recebe uma denominação, sendo que, dentro do grupo dos pesticidas estes podem ser classificados como acaricidas, bactericidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, nematicidas, rodenticidas ou moluscicidas (ECOBICHON, 2001; KUMAR et al., 2018).

Dentre os pesticidas, estão os inseticidas, que são componentes químicos utilizados na agricultura com o objetivo de defender as culturas do ataque de insetos nocivos para o desenvolvimento desta atividade econômica e alimentícia. Dentre os inseticidas, o grupo químico conhecida como neonicotinoides se destaca pelo mecanismo de ação rápido e inibição de proliferação de pragas, aplicabilidade diversificada, seletividade para insetos e estável para aplicações em campo. Existem sete classes de inseticidas deste grupo químico, conhecidas como imidacloprido, tiacloprido, clotianidina, tiametoxam, acetamiprido, nitempiram e dinotefurano, (HAN, TIAN E SHEN, 2017; JESCHKE et al., 2011).

Os neonicotinoides apresentam um método de aplicação diversificado podendo ser utilizado como *spray* foliar, tratamento de sementes, aplicações no solo, aplicações em pomares e aplicações em culturas hidropônicas, por meios de aplicações extremamente práticos, como na água de irrigação, sistemas de gotejamento ou sistemas de caixas flutuantes ou pulverização. Além disso, possuem uma excelente performance no controle de pragas, sendo utilizados para o combate de uma ampla gama insetos como pragas sugadoras, pulgões, mosca branca, gorgulhos, cigarrinhas, gafanhotos e besouros. Devido a isso, este pesticida tem uso diversificado, sendo passível de aplicação em vegetais, beterraba sacarina, algodão, pomares, cereais, tabaco, citros, milho, diversos tipos de frutos, tubérculos, cana-de-açúcar e eucalipto (JESCHKE et al., 2011; SIMON-DELSO et al., 2015).

A estrutura molecular dos sete neonicotinoides disponíveis no mercado estão apresentadas na Figura 1. Destes, três são considerados componentes cíclicos

(imidacloprido, tiametoxam e Tiacloprido) e quatro não cíclicos (acetamiprido, clotianidina, dinotefurano e nitenpiram). De forma geral os compostos considerados cíclicos são aqueles que apresentam segundo anel aromático fechado, enquanto que os não cíclicos apresentam o segundo anel aromático aberto. Mesmo sendo diferentes, sua ação inseticida não é comprometida. Além disso, tais estruturas proporcionam fotoestabilidade aos neonicotinoides, fator este extremamente significativo para aplicações em campo (JESCHKE et al., 2011).

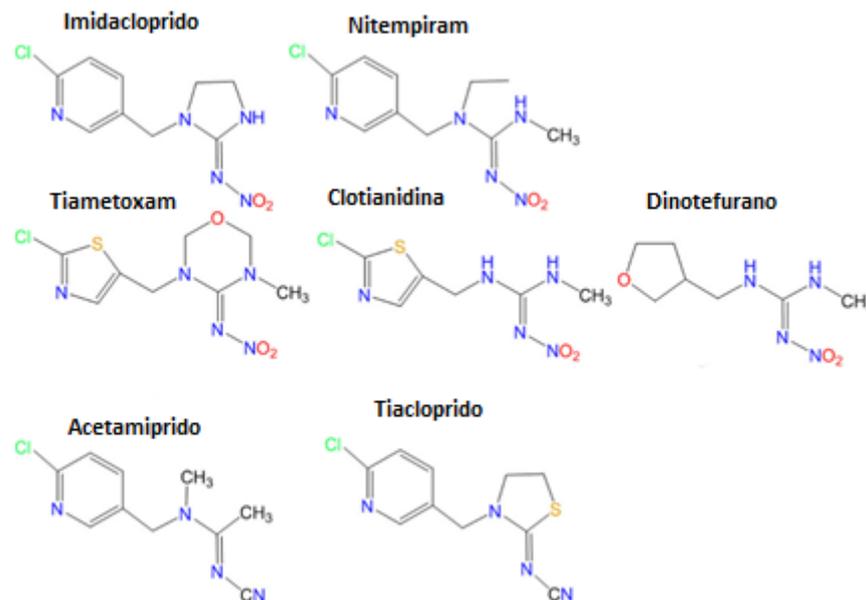


Figura 1 - Estrutura química neonicotinoides
Fonte: Adaptado de Simon-Delso et al., (2015)

As técnicas de aplicação em campo e a estrutura molecular tornam os neonicotinoides excelentes agentes sistêmicos, e a estabilidade relativamente alta permite que o inseticida permaneça no solo por um tempo prolongado. Assim, estes se tornam disponíveis por um maior período de tempo, favorecendo a absorção pelas raízes das plantas (GOULSON, 2013). Neonicotinoides apresentam alta pressão de vapor, o que confere baixa volatilidade ao inseticida, fazendo com que o agente permaneça no estado vapor por menos tempo quando utilizado em forma de spray. Além disso, sua alta solubilidade em água, baixo peso molecular e estrutura não ionizável facilitam os mecanismos de absorção pelas raízes, permitindo assim sua translocação pelos canais de transporte xilema ou floema (CUTLER, BOTHA E STEVENSON, 2008), ou até mesmo para penetrar as membranas dos tecidos externos da planta, o que as faz permanecerem ativas por um período prolongado

contra as pragas. (BONMATIN et al., 2015; JESCHKE et al., 2011; SIMON-DELISO et al., 2015).

Quando aplicado, o pesticida pode ser absorvido tanto pelas folhas quanto pelas raízes e então são carregados para diferentes sítios da planta, como flores, pólen, néctar e até mesmo frutos. No caso de aplicação foliar, os agentes ativos não absorvidos podem ficar retidos nas ceras epicuticulares e, devido a solubilidade, podem ser redissolvidos em água de chuva, orvalho ou água de gutação e se tornarem disponíveis novamente. Por isso, não importa onde a praga irá atacar, pois a probabilidade de entrar em contato com o agente é elevada (BONMATIN et al., 2015). A capacidade da raiz de absorver o agente ativo e as taxas de transpiração diária estão diretamente relacionados com as concentrações que a planta pode absorver e a distribuição em que as concentrações deste agente ativo se encontram em seus tecidos. Estes índices podem variar de cultura para cultura de acordo com o seu estágio de crescimento, onde em estágios mais avançados de desenvolvimento as concentrações encontradas são maiores (LI et al., 2018).

Uma vez circulando pelo sistema da planta os neonicotinoides se tornam disponíveis para sua ação inseticida. O IMD, por exemplo, contém grupos de 6-cloro-3-piridil (Figura 1), o que a torna semelhante a nicotina e epibatidina, ambos potentes agonistas de receptores de acetilcolina nicotínico. Uma vez interagindo com estes receptores, tais agonistas promovem a abertura e o desregulamento dos canais catiônicos da acetilcolina (CASIDA e DURKIN, 2013; JEPSON, BROWN e SATTELLE, 2006; MATSUDA et al., 2001; SIMON-DELISO et al., 2015). Nos insetos os receptores da n-acetilcolina (nAChRs) estão concentrados em sua grande maioria no sistema nervoso central (MATSUDA et al., 2001), e como os neonicotinoides apresentam elevada eficiência de ligação às membranas cerebrais a atividade inseticida é bastante efetiva. Como resultado da ligação do neonicotinoide aos receptores nAChRs, as excitações das membranas neuronais se tornam mais intensas produzindo descargas que levam a paralisia no inseto devido à exaustão de energia celular, resultando em óbito (SIMON-DELISO et al., 2015).

O fato de os neonicotinoides serem seletivos para insetos e não para mamíferos pode ser explicado por pequenas diferenças encontradas entre as subunidades de nAChRs (CASIDA e DURKIN, 2013; MATSUDA et al., 2001; SIMON-DELISO et al., 2015). Segundo estudos, os neonicotinoides não são protonados ou ionizáveis, mas possuem uma parte considerada eletronegativa,

proveniente de um grupo ciano ou nitro que confere a potência seletiva para insetos. Deste modo uma única ligação dominante de alta afinidade é atribuída para nAChR de insetos, enquanto que para vertebrados os neonicotinoides podem se ligar no nAChR em conformações diferentes, contribuindo para a formação de ligações fracas. Desta forma, o efeito seletivo é mais intenso em insetos do que em mamíferos (TOMIZAWA e CASIDA, 2005; TOMIZAWA, CASIDA e MU, 2009).

Mesmo que a ação inseticida dos neonicotinoides seja seletiva para insetos, organismos que não são alvos podem ser expostos por ingestão não intencional de partes da planta tratadas com o inseticida. Dependendo do método de aplicação, o risco potencial de consumo de folhas contaminadas pode perdurar por longos períodos após a colheita (BONMATIN et al., 2015). Recentemente estudos tem mostrado que os neonicotinoides são responsáveis (como cofator) na redução das colônias de abelhas, pois por se tratar de um inseticida sistêmico, quando absorvido pela planta, tanto o agente ativo quanto os metabólitos podem ser conduzidos para outros sítios como pólen, néctar, frutos e folhas, se tornando potenciais riscos para esta classe de polinizadores que representam cerca de 85% de efetivo de polinização em áreas agrícolas (JIANG et al., 2018).

Estudos conduzidos por Jiang et al. (2018) mostraram que o inseticida tiametoxam foi encontrado em mais de 90% das amostras de pólen e em aproximadamente 54% de amostras de néctar e folhas de colheitas de algodão, enquanto que o IMD foi encontrado em todas as amostras de pólen e de folhas e em 88,9% das amostras de néctar, sendo que para ambos os casos as concentrações estiveram acima de 3 ng/g de amostra (folha, néctar ou pólen), o que é considerado tóxico para as abelhas. Em consequência disso, os riscos de exposições crônicas para as abelhas são aumentados, principalmente quando expostas por longos períodos de tempo (REED et al., 2010)

De acordo com Spatz et al. (2014), mesmo em doses não letais o sistema de voo e o senso de orientação das abelhas pode ser afetado. Isto acontece porque o inseticida bloqueia o sistema de memória remota adquirida pelas abelhas durante voos de exploração. Desta forma, a memória de navegação acaba sendo comprometida, causando consequências frente ao senso de direção do inseto, tornando o retorno para as colmeias mais complexos e demorados, comprometendo todo o sistema de sobrevivência das colmeias (SPATZ et al., 2014).

A exposição das abelhas em suas atividades polinizantes acabam por se tornar um problema para toda a colmeia, abelhas forrageiras expostas durante a polinização acabam contaminando de forma cruzada toda a comunidade da colmeia (CALATAYUD-VERNICH et al., 2016; WOODCOCK et al., 2016). A contaminação da colmeia leva as larvas a exposição que por sua vez sofrem modificações genéticas na qual quando atingem a fase adulta se tornam inférteis reduzindo o número de abelhas da colônia (WU et al., 2017) .

Alguns relatos têm levantado dúvidas, hipóteses e preocupações a respeito de sua utilização destes pesticidas, uma vez que existem suspeitas de que agentes como o IMD podem estar envolvidos na redução da população de aves que possuem dieta baseada no consumo de insetos (HALLMANN et al., 2014). Na França, dados coletados desde 1995 até 2014 sugerem que a possível morte de pombos e perdizes-cinzentas podem estar relacionadas com o uso de IMD para tratamento de sementes, principalmente em época de plantios de cereais de inverno (MILLOT et al., 2017).

Addy-orduna, Brodeur e Mateo (2019), avaliaram a toxicidade oral aguda em pombos, onde concentrações de IMD menores do que 40 mg.Kg^{-1} de ração não foram letais, mas provocaram sintomas de intoxicação neural, tais como, forma de andar lenta e descoordenada, asas caídas e diminuição da resposta para fugir de ameaça. No entanto, em concentrações maiores que 40 mg.Kg^{-1} os sintomas foram mais fortes e foram registradas mortes. Para os neonicotinoides clotianidina e tiametoxam, concentrações menores que 1000 mg.Kg^{-1} não causaram mortalidades, mas provocaram sintomas parecidos aos encontrados para IMD. E em concentrações maiores que 1000 mg.Kg^{-1} foram registradas mortes. De forma geral, o IMD causa intoxicações mais intensas em doses muito mais baixas quando comparadas aos outros dois neonicotinoides, além de levarem as aves ao falecimento mais rápido.

Devido a boa solubilidade dos neonicotinoides em água, a probabilidade de lixiviação e escoamento para cursos hídricos é grande, aumentando assim a probabilidade de exposição a sistemas ecológicos de invertebrados aquáticos frente ao uso de neonicotinoides (SÁNCHEZ-BAYO, GOKA e HAYASAKA, 2016), exposições podem afetar desde as larvas até o desenvolvimento para a fase adulta dos insetos causando efeitos como paralisia (RABY et al., 2018), sendo que a temperatura tem relação com os níveis de exposição e desenvolvimento de

sintomas, podendo os resultados serem diferentes para as mais variadas regiões do mundo (RICO et al., 2018).

Efeitos similares também foram registrados para IMD para concentrações entre 45 ou 60 μM em peixes zebra, sendo esta exposição responsável pela diminuição significativa da atividade de nado das larvas. Já na fase adulta o inseticida promoveu uma diminuição na capacidade de exploração em novos ambientes, assim como o aumento na reação de sobressalto (CROSBY et al., 2015). Além disso, exposições a concentrações acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ podem produzir níveis significativos de estresse oxidativo provenientes de atividade SOD (enzima superóxido dismutase) e H_2O_2 , causando danos a tecidos do cérebro, fígado e brânquias (ITURBURU et al., 2018), assim como o aumento de LPO (oxidação lipídica) e PCC (conteúdo de proteína carbonilada) em diversos tecidos, além de possíveis danos causados ao DNA (Vieira et al., 2018). De qualquer forma, para o caso de altas concentrações do IMD na água foram relatados somente casos de subletalidade.

O efeito cumulativo dos neonicotinoides em solo, água, plantas, frutos e rações animais podem se tornar meios para exposição humana. Estudos realizados em amostras de urina coletadas desde 1994 até 2011 mostraram um acréscimo significativo nas taxas de neonicotinoides entre mulheres japonesas, sugerindo que a exposição a esta classe de pesticidas aumentou com passar do tempo, devido principalmente ao crescimento exponencial de sua utilização em campo (UEYAMA et al., 2015). Em outro estudo realizado em áreas suburbanas de Aichi, região central do Japão, mostraram que a análise de creatinina urinária de 223 crianças estudadas, aproximadamente 58% apresentavam níveis médios de $4,7 \text{ nmol.g}^{-1}$ de creatinina, sendo que no verão as concentrações eram maiores do que aquelas medidas no inverno, independente do sexo avaliado (OSAKA et al., 2016). Um estudo na Grécia comparou concentrações de IMD em amostras de cabelo de 26 moradores da área urbana e 32 moradores de zona rural, na qual cerca de 65,6% dos moradores estavam envolvidos em práticas agrícolas. Observaram-se níveis médios de IMD que variaram de $0,03 \text{ ng.mg}^{-1}$ até $0,27 \text{ ng.mg}^{-1}$ de cabelo (KAVVALAKIS et al., 2013).

Marfo et al. (2015), sugerem que resíduos de N-desmetil-acetomiprida podem estar relacionados a 85 sintomas clínicos de indivíduos da população japonesa, tais como tremor postural, perda de memória recente, cefaleia, fadiga geral, sintomas

torácicos, dor abdominal e sintomas musculares, sendo que estes sintomas permaneceram após vários dias ou meses depois de terem sido proibidos de consumir produtos cultivados localmente.

Estudos em ratos, mostraram que ingestões agudas de concentrações 20 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de IMD foram responsáveis por problemas em ovários de fêmeas, perda de peso e alterações hormonais significativas (KAPOOR et al., 2014). Em ratos machos, concentrações de 0,5, 2,0 e 8,0 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ levaram a redução de parâmetros espermáticos, níveis de testosterona e a fragmentação do DNA seminal, com tais fenômenos ocorrendo nas duas doses mais altas (BAL et al., 2012). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que concentrações de 500 µM ou 50 mM, não modificaram a motilidade e a integridade do DNA. No entanto, as habilidades de fertilização e o desenvolvimento embrionário foram adversamente afetados (GU et al., 2013).

Com relação a hepatotoxicidade e carcinogenicidade hepática, foram relatadas alterações em ratos fêmeas e machos quanto a atividade enzimática do fígado, degeneração dos hepatócitos, dilatação da veia central e um aumento nas enzimas produzidas pelo fígado. Ambos os casos foram observados somente para concentrações acima de 20 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ (GU et al., 2013; HAN, TIAN e SHEN, 2017). Estudos tem mostrado que a exposição oral a IMD (45 e 90 mg.kg⁻¹ peso corpóreo) pode causar decréscimos em limiar de dor e atividade locomotora espontânea (LONARE et al., 2014). IMD também apresentou influencias excitatórias para liberação de Ca²⁺ em ratos recém nascidos, sendo este um indicador de atividade fisiológica neural baixa, indicando que o IMD pode afetar adversamente o desenvolvimento cerebral (KIMURA-KURODA et al., 2012).

Análises de sangue de ratos tratados com IMD (40 e 80 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) por 4 meses, apresentaram a partir do segundo mês efeitos genotóxicos em testes realizados no sangue para ambos os grupos (STIVAKTAKIS et al., 2016). Diferentes doses de IMD administradas de forma oral (100, 200 e 300 mg.kg⁻¹ por 24 h) mostraram um acréscimo nas frequências de micronúcleos em eritrócitos policromáticos indicando danos aos cromossomos quando o agente foi ministrado em doses mais altas (HAN, TIAN e SHEN, 2017). No entanto, estudos em linfócitos humanos indicaram que a frequência de micronúcleos foi observada em concentrações menores (0,1 e 0,5 mg.L⁻¹), e danos no DNA também foram reportados em todos os grupos tratados com IMD (0,05, 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹) em relação

aos grupos controle (FENG et al., 2005). Em contrapartida os mesmos danos causados em linfócitos foram observados apenas para concentrações maiores do que 5 mg.L^{-1} (HAN, TIAN e SHEN, 2017).

Neste contexto, neonicotinoides e seus metabólitos foram encontrados em diversas amostras biológicas na população mundial, nas mais variadas faixas etárias e sexos. Sendo que muitas dessas pessoas podem estar expostas há mais de 20 anos, incluindo crianças, mostrando a necessidade do monitoramento dos níveis de exposição e principalmente avaliar seus possíveis efeitos na saúde a longos tempos de exposição. Efeitos toxicológicos foram previamente estudados em ratos, e raramente estudados em humanos, mas de certa forma os resultados apresentados mostram que mesmo em concentrações relativamente altas, certos efeitos nocivos foram evidenciados, sendo eles no sistema reprodutivo, hepático, neurológicos sanguíneo e citológico (HAN, TIAN e SHEN, 2017). Assim, devem ser conduzidos pesquisas mais aprofundadas sobre tais mecanismo de ação principalmente para exposições de longo prazo em humanos.

Mesmo sem saber os reais efeitos a longo prazo de exposição aos neonicotinoides o limite máximo de resíduos (LMR) que pode ser encontrado em produtos para consumo pode variar de país para país e para o tipo de cultura no qual é utilizado. No Brasil por exemplo, o LMR permitido para culturas de alface é de $0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$, ou até mesmo $2,0 \text{ mg.Kg}^{-1}$ para couve e mamão (ANVISA “RE-Nº 165”, 2003), sendo estes considerados produtos de alto consumo no país, mostrando como a exposição a tais pesticidas tem se tornado rotineiros. Por outro lado, poucos estudos relacionam sua aplicação quanto ao desenvolvimento da planta, não apenas em seu controle contra pestes, mas também agindo diretamente e fisicamente na planta, sendo que, em alguns casos, verificou-se tolerância e resistência contra patógenos microbianos, e fúngicos. Além disso, este efeito secundário chamado de *Stress Shield* foi atribuído ao IMD devido a melhoras quanto ao vigor das culturas em condições de estresse causadas por seca, calor excessivo, umidades extremas, sendo isto associado a um melhor desenvolvimento da planta comparada com aquelas que não recebem o tratamento. Alguns autores relatam que estes efeitos podem estar correlacionados principalmente com o metabólito ácido 6-cloricotínico (6-CNA) proveniente da degradação do IMD (SENN et al., 2004; THIELERT, METZLAFF e BLOCK, 2009).

Mesmo sabendo de sua capacidade sistêmica, a literatura foi escassa de resultados sobre os efeitos que o inseticida tem sobre o desenvolvimento dos cultivares, principalmente com o que diz respeito às suas características físicas, moleculares e minerais. Por este motivo, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do IMD no desenvolvimento de alfaces seguindo as recomendações de uso estabelecidas pelo fornecedor do produto (600 g.hect⁻¹).

3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

3.1 GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar o cultivar de Alface (*Lactuca Sativa*) na presença do inseticida Imidacloprido em duas concentrações diferentes, para certificar sobre a influência deste agente em modificações moleculares, minerais, estruturas de clorofila e outras células.

3.2 ESPECÍFICOS

Para se atingir o objetivo proposto fez-se necessário:

- Cultivar alfaces em ambiente controlado na presença e ausência de inseticida em duas diferentes concentrações;
- Avaliar a influência de se medir os espectros em diferentes pontos das amostras;
- Avaliar a influência de água a partir de espectroscopia NIR e MIR medindo-se as amostras cruas e, em seguida, liofilizadas;
- Avaliar a influência do IMD na absorção de minerais pela planta utilizando-se FAAS;
- Avaliar a influência do IMD nas condições de estresse da planta utilizando-se PAM;
- Avaliar a toxicidade do pesticida a partir da divisão celular.

4. MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de alface mônica crespa (Feltrin SF 31), Terra vegetal (Humusfertil), terra orgânica (Fertilzare), húmus de minhoca (Fertilzare) e inseticida Imidacloprido foram adquiridos no comércio local de Campo Mourão. Utilizou-se ainda HNO₃ (65% Sigma-Aldrich) e HCl (37% Sigma-Aldrich) de fornecimento do próprio orientador do projeto.

As análises de espectroscopia de infravermelho próximo, espectroscopia de infravermelho médio, espectroscopia de absorção atômica em chama e análise de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados nos laboratórios das instalações da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) campus Campo Mourão.

Análises de fluorescência foram realizadas nas instalações da Universidade Estadual do centro-oeste do Paraná campus Guarapuava – PR.

4.1 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E DESENVOLVIMENTO DAS CULTURAS

As etapas para o desenvolvimento dos cultivares estão descritas nos itens abaixo, sendo que o cultivo das alfaces foi realizado dentro das instalações da UTFPR.

4.1.1 Primeiro Cultivo

O primeiro cultivo foi realizado nos meses de julho a setembro de 2018. As sementes das culturas de alface (Feltrin) foram cultivadas em bandejas para mudas para a germinação da semente e formação da muda por um período de aproximadamente 15 dias, em húmus de minhoca. Após a formação da muda, caixas de madeira (49 x 21 x 32 cm) foram vedadas com filme plástico para evitar qualquer tipo de contaminação cruzada entre os grupos, e então foram preenchidas com terra em uma proporção de aproximadamente 1,5 kg de terra para cada planta

de forma a garantir espaço e quantidade de solo suficiente para o desenvolvimento das alfaces. Por fim as mudas foram transferidas cuidadosamente para suas respectivas caixas para crescimento.

O solo, água e quantidade de luz direta e indireta foram controladas de forma igualitária para que a diferença significativa encontrada estivesse relacionada a presença/ausência do inseticida, com a temperatura variando de 18-26 °C, de acordo com as temperaturas no período de crescimento. A quantidade de água utilizada foi a necessária para manter o solo úmido o suficiente para o crescimento da planta, mas não a ponto de favorecer o crescimento de fungos. Cerca de 25 mL de água eram depositados sobre cada planta singularmente com o auxílio de uma proveta. A água foi adicionada ao solo sempre que o solo se apresentava seco.

A preparação do solo obedeceu a proporção de 1:1 de solo vegetal e substrato orgânico seguindo a recomendação do fornecedor. Após a mistura, o solo foi totalmente homogeneizado para garantir a máxima dispersão de ambas às partes. As plantas ficaram acondicionadas lado a lado durante todo o dia de forma a garantir o recebimento de luz necessário para o desenvolvimento.

O inseticida IMD foi pulverizado duas vezes durante todo o desenvolvimento da planta, sendo a primeira pulverização realizada logo após a transferência da muda para as caixas e a segunda pulverização 30 dias depois. No tratamento, para cada planta foi utilizado uma quantidade de 15 mL de calda (0,35 g.L⁻¹ de componente ativo) seguindo a especificação do fornecedor (600 g.hect⁻¹). Para as plantas controle se fez necessária a adição de 15 mL de água para manter os tratamentos igualitários. A pulverização foi feita de forma que aproximadamente 1/3 da solução fosse utilizada nas folhas e o restante aplicado no solo/raízes.

No experimento relatado até aqui, 6 amostras foram utilizadas como controles (AC) e 24 tratadas (AT), que foram recolhidas em aproximadamente 65 dias (tempo de colheita ideal) para as análises posteriores.

4.1.2 Segundo cultivo

O segundo cultivo foi utilizado o solo do remanescente do primeiro cultivo, sendo que esta análise foi realizada nos meses de outubro a dezembro de 2018. As

mesmas condições foram adotadas para a maioria dos parâmetros, variando-se apenas as concentrações do IMD utilizadas, sendo o tratamento 1 composto por $0,35 \text{ g.L}^{-1}$ de componente ativo e, tratamento 2, a quantidade de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$, considerada overdose do componente ativo. Diferentemente do primeiro cultivo, foram pulverizados 50 mL da calda em cada planta, sendo aproximadamente 1/3 da solução utilizada nas folhagens e o restante aplicado no solo/raízes. As pulverizações foram realizadas a cada 15 dias, onde a primeira aplicação foi realizada no dia posterior ao transplante das mudas para as caixas, totalizando 4 aplicações. As amostras controle (10 unidades), tratamento 1 (20 unidades) e tratamento 2 (20 unidades) foram recolhidas após 70 dias e acondicionadas para as análises posteriores.

4.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Para as análises na região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) o equipamento utilizado foi um espectrofotômetro portátil (MicroNIR™ 1700 JDSU) com resolução de 6 nm. As medidas foram realizadas em triplicata e sem a necessidade de qualquer tipo de preparo de amostras. A calibração do equipamento foi realizada utilizando-se uma esfera de reflectância de 99% com o equipamento a uma temperatura de 50°C. Os espectros para a região do infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near Infrared*) das amostras foram adquiridos focalizando-se o feixe de radiação do equipamento na parte externa das folhas periféricas e no caule.

A espectroscopia traz informações de fenômenos decorrentes da interação entre a radiação incidida e a matéria a ser analisada. A radiação emitida na região do infravermelho próximo está compreendida entre os comprimentos de onda de 750 e 2500 nm. Nestas técnicas considera-se que a radiação incidida gera um estímulo na matéria causando vibrações específicas para as diferentes ligações químicas entre as moléculas, as quais devem ser passíveis de sofrer variações no momento dipolar (BURNS e CIURCZAK, 2009; POREP, JAN U, KAMMERER e CARLE, 2015).

Deste modo, devido a maior energia oferecida pela região do infravermelho próximo em comparação com o infravermelho médio, um diversificado grupo de

moléculas pode sofrer estímulos resultando em espectros de bandas como resposta. A intensidade das vibrações observadas depende do momento dipolar, conseqüentemente do peso molecular e o tipo de ligação entre as moléculas. Desta forma, a intensidade das bandas espectrais está relacionada com a eficiência (do modo vibracional) em absorver a radiação eletromagnética emitida. Por este motivo, vibrações detectadas nesta região são provenientes principalmente de grupos C-H, N-H, S-H e O-H, por possuírem um forte potencial de vibração (BOKOBZA, 1995). Observando tal potencial, esta ferramenta pode ser útil para avaliar os efeitos da aplicação do imidacloprido no desenvolvimento molecular da planta, pois, caso haja diferenças vibracionais impostas pela adição do pesticida, é possível que se faça distinção pela aplicação de espectroscopia NIR desde que os resultados sejam avaliados por métodos multivariados de análise.

Foram realizadas operações para correções de linhas de base (segunda derivada), de forma a manter a intensidade da banda e a localização dos pico em suas posições originais (BURNS e CIURCZAK, 2009). Os dados foram avaliados a partir do *software* Matlab 2017 (licença 40662928) e então submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*), pelo algoritmo de Decomposição em Valores Singulares (SVD, do inglês *Singular Value Decomposition*), do pacote de ferramentas computacionais PLS-Toolbox®, fornecido pela EMBRAPA Solos, do Rio de Janeiro.

4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO E ANÁLISES QUIMIOMÉTRICAS

Para as análises por espectroscopia de infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid Infrared*) utilizou-se um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (SHIMADZU IRAffinity-1 serial Nº A213747) com suporte para sólidos por Reflectância Total Atenuada (ATR). As amostras foram acopladas adequadamente no suporte e as leituras das folhas foram realizadas na parte externa e no caule das amostras, calibrando-se o equipamento entre cada leitura.

Tal como para o infravermelho próximo, a espectroscopia no infravermelho médio traz informações decorrentes da interação entre a radiação incidida e a

matéria a ser analisada. A radiação emitida nesta região está compreendida entre os comprimentos de onda de 2500 a 5000 nm. Os espectros provenientes de espectroscopia de infravermelho médio são produzidos a partir de transições ditas fundamentais, produzindo sinais específicos para grupos funcionais que podem permitir a caracterização por modificações químicas (Burns e Ciurczak, 2009). Por este motivo, tal técnica foi utilizada com o objetivo de identificar a presença de imidacloprido nos tecidos da planta ou a formação de grupos químicos devido a possíveis interações.

Os resultados obtidos por espectroscopia de infravermelho médio foram devidamente pré-processados para correções de linhas de base e suavização. Os dados foram avaliados a partir do *software* Matlab 2017 (licença 40662928) e então submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Components Analysis*), pelo algoritmo de Decomposição em Valores Singulares (SVD, do inglês *Singular Value Decomposition*), do pacote de ferramentas computacionais PLS-Toolbox®, fornecido pela EMBRAPA Solos, do Rio de Janeiro.

4.4 ANÁLISE DE COMPOSIÇÃO MINERAL

As etapas para a obtenção das cinzas e das respectivas composições minerais das amostras de alface estão descritas nos itens subsequentes. Estas análises foram realizadas nos laboratórios do departamento de química e de Engenharia de Alimentos da UTFPR campus Campo Mourão.

4.4.1 Cinzas totais e digestão das amostras

Para a digestão das amostras seguiu-se a metodologia descrita por Cumont et al. (2000) com algumas modificações. Primeiramente, limpou-se cuidadosamente todos os frascos de vidro e de plástico a serem utilizados nas análises com HNO₃ ou HCl para livrar a contaminação de minerais residuais. Para a solução de limpeza foi preparada uma solução ácida com 500 mL de HNO₃+ 4500 mL de água deionizada e

após o enxague ácido, passou-se de 4 a 5 vezes o volume do cadinho de água deionizada e então os cadinhos foram colocados na mufla a 550°C por 24h.

Após secagem dos cadinhos na mufla, foram pesados 5g das amostras AC e AT em balança analítica de 4 casas e, com auxílio de um pistilo, as amostras já nos cadinhos foram previamente maceradas. Em seguida, os cadinhos foram colocados novamente na mufla a uma temperatura inicial de 50°C acrescentando-se uma taxa de aumento de temperatura de 50°C a cada hora, até que se atingisse a temperatura de incineração de 450°C, onde ficaram por 8 horas até que as cinzas ficassem brancas.

Após a obtenção das cinzas, os cadinhos foram retirados da mufla e acondicionados em dessecadores contendo sílica em gel até atingirem temperatura ambiente e então pesados novamente para a realização dos cálculos a fim de se estimar o teor de cinzas totais. Após o arrefecimento, acrescentou-se 5 mL de HCl 6M para garantir que todas as cinzas fossem embebidas em ácido. Depois evaporou-se o ácido lentamente em chapa de aquecimento, e por fim dissolveu-se o resíduo em 25 mL de HNO₃ 0,1 M. Esta solução mãe ficou armazenada em refrigeração até a análise de Absorção Atômica.

4.4.2 Espectroscopia de absorção atômica

Os teores dos íons compostos por cálcio (Ca) e potássio (K), compostos por cobre (Cu) e ferro (Fe), chumbo (Pb) e alumínio (Al) foram determinados nas hortaliças controle e tratadas (solução mãe proveniente da digestão), de modo a se verificar a influência do inseticida na composição mineral da planta.

As análises foram realizadas através de um espectrômetro de absorção atômica (AnalytikJena, modelo NOVAA300) com lâmpadas de cátodo oco. Para as medidas, seguiu-se a combinação apresentada na Tabela 1 com as respectivas diluições necessárias para cada mineral.

Tabela 1. Parâmetros para análise por Espectroscopia de Absorção Atômica, Campo Mourão 2018

Parâmetros			
Minerais	Combustível/Oxidante	Linhas Espectrais	Diluições solução mãe:água
Cálcio	C ₂ H ₂ /N ₂ O	422,7 nm	1:500
Cobre	C ₂ H ₂ /Ar sintético	324,8 nm	1:10
Ferro	C ₂ H ₂ /Ar sintético	248,3 nm	1:100
Potássio	C ₂ H ₂ /Ar sintético	766,5 nm	1:100
Chumbo	C ₂ H ₂ /Ar sintético	283,3 nm	1:10
Alumínio	C ₂ H ₂ /N ₂ O	309,3 nm	1:10

Fonte: Autoria própria

As curvas de calibração foram construídas utilizando-se soluções padrões puras de cada ion, no qual concentrações crescentes (0.1, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 mg/L) foram investigadas para determinar o alcance linear.

4.5 ANÁLISE DE ESTRESSE POR INDUÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA *a* (FChI)

A fotossíntese é o principal meio de biossíntese de carboidratos nas plantas, podendo a energia luminosa absorvida pelos pigmentos cloroplastídicos da folha sofrer três transformações. Grande parte é utilizada para os processos fotossintéticos em que o excesso de energia absorvida pode ser dissipado em forma de calor ou reemitida como fluorescência pela clorofila *a*. Estes três processos competem em questões de ocorrência, de modo que o decréscimo de um destes fatores implica no acréscimo da eficiência dos outros dois. O sinal de fluorescência possui níveis característicos que refletem as condições fisiológicas da planta naquele momento, com relação ao seu próprio metabolismo e com o ambiente em que se encontra, podendo indicar o nível de tensão devido ao estresse causado pelas condições impostas que possam danificar o aparelho fotossintético (DEMMIG-ADAMS et al., 2012; MAXWELL e JOHNSON, 2000)

A FChI é um método não invasivo, altamente sensível e simples, em que o uso de variáveis da fluorescência da clorofila *a* permite ampliar os estudos dos

processos fotoquímicos e não fotoquímicos, além de possibilitar o conhecimento de características relacionadas à capacidade de absorção e transferência da energia luminosa na cadeia transportadora de elétrons (BRESTIC e ZIVCAK, 2013).

A eficiência fotoquímica foi analisada apenas para as alfaces do segundo cultivo (realizado entre outubro e dezembro de 2018). Folhas completamente expandidas situadas no meio da “cabeça” da alface foi selecionada para que desta forma folhas com tempo de vida intermediário fossem selecionadas. Para as leituras 3 amostras do grupo controle (aquele que não recebeu tratamento com o IMD), 3 amostras no grupo do tratamento 1 e 3 amostras no grupo do tratamento 2.

As folhas foram adaptadas ao escuro por meio de uma presilha foliar por um período de 15 minutos (para que todos os centros de reação ficassem abertos com capacidade de receber elétrons). Após este período foram retiradas as medições de fluorescência lenta utilizando um fluorímetro de Pulso de Amplitude Modulada (PAM-2500, Heinz Walz GmbH, Germany).

As avaliações foram realizadas no período das 07h00 às 11h00 da manhã, com intensidade luminosa de $400 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$. Foram avaliados os parâmetros: F_0 (fluorescência basal) e F_M (fluorescência máxima), e então calculados F_v (diferença entre a fluorescência máxima e basal), F_v/F_M (rendimento quântico máximo fotossistema II (PSII)) e F_v/F_0 .

4.6 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE *ALLIUM CEPA*

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade do inseticida IMD, foram realizados testes com os meristemas de raízes de *A. cepa*, pois estes são internacionalmente aceitos para a realização de testes citogenotóxicos de águas superficiais e subterrâneas. Os biomarcadores empregados nesse ensaio são o índice mitótico (índice de divisão celular), para avaliação dos diferentes níveis de citotoxicidade, e a frequência de alterações cromossômicas e de fuso mitótico, para a avaliação de genotoxicidade (MATOS et al., 2017; TABREZ et al., 2011). Os resultados obtidos por meio do bioensaio *A. cepa* apresentam boa correlação com

os resultados observados em testes genéticos realizados em outros bioensaios, como aqueles com mamíferos (HERRERO et al., 2012; SALES et al., 2017)

Para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade, cada concentração (0,35 e 1,2 g/L) do inseticida IMD foi investigada. Previamente, bulbos de cebolas (da variedade beta cristal, obtidos de uma horta orgânica) foram colocados em frascos com água deionizada, aerados constantemente, até a obtenção de raízes de aproximadamente 2,0 cm de comprimento. Para análise da água de cada concentração (tratamento), foi estabelecido um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com a seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo, o que se identificou como tempo de análise 0 hora ou controle do próprio bulbo.

Em seguida, as raízes restantes foram postas em seus respectivos tratamentos por 24 e 48 horas, procedimentos denominados de tempos de exposição 24 e 48 horas, onde se realizou coleta de raízes a cada 24 horas. Preparou-se um controle positivo com metil metanossulfonato (MMS), substância conhecida citotóxica e genotóxica ao sistema teste, *A. cepa*, na concentração 4×10^{-4} mol.L⁻¹. Todas as raízes coletadas durante o experimento foram fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol:ácido acético) por até 24 horas.

As lâminas foram confeccionadas segundo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para todo bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada grupo controle (0 h), cada grupo tempo de exposição 24 h e cada grupo tempo de exposição 48 h, somando-se 15.000 células analisadas para cada concentração do inseticida em questão. O mesmo procedimento foi realizado para os bulbos do controle com MMS, e da mesma forma que para os outros tratamentos, analisou-se um total de 15.000 células para o controle positivo.

Contabilizou-se as células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase, e definiu-se o índice mitótico, determinando-se o potencial citotóxico. O índice mitótico ou o índice de divisão celular foi calculado da seguinte forma: (Número total de células em divisão/Número total de células analisadas) x 100. Avaliou-se o potencial genotóxico por meio da frequência de alterações celulares, como micronúcleos, metáfases colchínicas, pontes anáfasicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares, anáfases

multipolares e pela presença de células apoptóticas.

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Os resultados das análises dos teores de cinzas totais e composição mineral foram processados através do teste de variância ANOVA e teste de hipóteses de Tukey ($p < 0,05$) por meio da plataforma STATISTICA 7.0 (Statsoft Inc. 2325 East 13th Street, Tulsa, Ok, 74104, USA).

A análise estatística da citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa* foi executada na plataforma estatística R (R CORE TEAM, 2015) pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homogeneidade de Hartley. Uma vez constatada a heterogeneidade das variâncias dos tratamentos, as diferenças estatísticas entre os tempos de exposição foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn, considerando-se significativo $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 COMPOSIÇÃO MINERAL

As alfaces dos dois grupos, controle e tratadas, foram analisadas quanto aos seus respectivos teores de cinzas totais e composição mineral, dos quais os resultados médios estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Médias dos resultados de teores de cinzas totais e composição mineral das alfaces, Campo Mourão 2018

1ª cultivo (média das amostras)			
Minerais	Alface controle (mg/100g)	Alface Tratada (mg/100g)	
Cinzas totais	6548,0 ± 71,11 ^a	7138,9 ± 104,33 ^a	
Fe	25,63 ± 5,49 ^a	24,03 ± 5,17 ^a	
K	321,58 ± 150,38 ^a	318,43 ± 203,09 ^a	
Ca	729,18 ± 336,81 ^a	629,16 ± 333,78 ^a	
Pb	1,09 ± 0,16 ^a	1,04 ± 0,44 ^a	
Al	22,391 ± 4,19 ^a	24,84 ± 7,50 ^a	
Cu	0	0	
2ª cultivo (média das amostras)			
Minerais	Alface controle (mg/100g)	Alface Tratada 1 (mg/100g)	Alface Tratada 2 (mg/100g)
Cinzas totais	3127 ± 118,76 ^a	3174,2 ± 208,07 ^a	2957,0 ± 618,80 ^a
Fe	36,327 ± 7,53 ^a	47,520 ± 14,01 ^a	33,9423 ± 9,07 ^a
K	1594,140 ± 144,46 ^a	1559,310 ± 234,45 ^a	1396,530 ± 244,60 ^a
Ca	603,937 ± 35,92 ^a	787,784 ± 154,69 ^a	662,898 ± 64,45 ^a
Pb	2,524 ± 0,12 ^a	2,907 ± 0,19 ^a	2,867 ± 0,29 ^a
Al	32,499 ± 15,19 ^a	22,170 ± 6,96 ^a	25,512 ± 11,27 ^a
Cu	0	0	0

Dados médios das concentrações ± desvio padrão, valores com as mesmas letras comparando as colunas não possuem diferença significativa com $P < 0,05$, por teste de Tukey.

Fonte: Autoria Própria

Os teores de cinzas totais não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os grupos para nenhum dos cultivos, sendo que na primeira colheita os teores de cinzas foram maiores do que os encontrados na segunda colheita. Para o primeiro cultivo, tanto nas amostras do grupo controle quanto nas tratadas a composição mineral apresentou maiores concentrações de Ca (aproximadamente 679,17 mg/100 de alface), seguidas de $K > Fe > Al > Pb$ (320,

24.83, 23.61 e 1.06 mg/100 g de alface, respectivamente). No segundo cultivo, o K foi o mineral mais evidente para ambos os grupos (aproximadamente 1516,38 mg/100g de alface), seguido de Ca > Fe > Al > Pb, em que não foi possível detectar concentração conhecida para o cobre em nenhuma das colheitas.

As concentrações de K para ambos os grupos controle e tratado no primeiro cultivo apresentaram teores próximos aos encontrados por Araújo et al., (2015) em alfaces convencionais e orgânicas obtidas comercialmente. Favaro et al. (2011) encontraram concentrações de Fe (26,07 mg.100g⁻¹) próximas as encontradas no neste trabalho (Tabela 2) para ambos os cultivos. No entanto, as concentrações de Ca encontradas pelos autores foram maiores (aproximadamente 1600 mg/100g para as amostras controles e 1396,9 mg.100g⁻¹ para as amostras tratadas com deltametrina). De qualquer forma, sabe-se que o teor depende de diversos fatores ligados a qualidade e disponibilidade de nutrientes no solo. Ao contrário do que as análises dos resultados até aqui sugerem, Favaro et al. (2011) observaram que o deltametrina foi responsável pelo acréscimo das concentrações de Fe e diminuição nas concentrações de Ca.

Os teores dos metais Chumbo e Alumínio encontrados para ambos os cultivos foram relativamente altos considerando-se os valores permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA “RDC N° 23”, 2013), que estipula valores seguros de 3 mg/100g para chumbo e alumínio. Além de ser um elemento extremamente abundante no solo, estudos realizados por Chen et al., (2013), sugerem que quando os vegetais são cultivados em estufas, ou seja, em ambientes fechados, o acúmulo de metais pesados é maior a longos prazos, o que está de acordo com os resultados aqui obtidos.

O cobre, para ambos os casos, não foi determinado nas condições de análise. Uma das possibilidades para isso é o fato de não terem sido utilizados fertilizantes ou fungicidas a base de cobre que pudessem fornecer este mineral as plantas, o que pode indicar que o solo obtido comercialmente era pobre em teores de cobre. Sugere-se ainda que este mineral deva ser mais facilmente obtido por meio de práticas agrícolas.

A concentração de componentes inorgânicos em cultivares variam de acordo com a maturidade, temperatura, manejo, pH e composição (PINTO et al., 2014; SOFO et al., 2016; XIAO et al., 2016). Portanto, a composição mineral pode ser utilizada como um parâmetro indicativo de que ambos os tratamentos de controle

das variáveis quantidade água, luz, temperatura, estágio de maturação e composição do solo foram iguais, sugerindo concomitantemente a ideia de que o IMD não é influente na absorção de minerais, uma vez que não houveram diferenças estatísticas com uma significância de 5% entre as composições minerais e cinzas dos grupos controle e grupos tratados em ambas os cultivos de alfaces realizadas nas presentes condições do trabalho.

5.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Os dados obtidos pela técnica NIR foram avaliados utilizando-se PCA (SKOOG et al., 2014; WOLD, ESBENSEN e GELADI, 1987). Os resultados obtidos para as amostras de alfaces cruas (para o caule e folhas externas) estão apresentados na Figura 2. Observa-se que para a primeira colheita (Figura 2 A) não foi possível separar entre grupos controle (amostras de 1 a 6) e grupos tratados (amostras de 7 a 30), mesmo considerando diversas contraposições entre as componentes principais.

Observou-se o mesmo para a segundo cultivo (figura 2 B), de modo que as amostras controle (amostras de 1 a 7) não se separaram das tratadas 1 (amostras de 8 a 29) e nem das amostras tratadas 2 (amostras de 30 a 51). Além disso, não foi observada separação entre os tratamentos 1 e 2, mesmo considerando diversas contraposições entre as componentes principais. Deste modo, ainda que com aumento do volume de inseticida utilizado ou utilizando-se de uma overdose na concentração (tratamento 2), não foi possível distinguir entre os grupos que receberam o tratamento com o inseticida daquele que não recebeu.

Em geral o limite de detecção do NIR é de 0,1% da concentração do analito em relação a composição total da matriz analisada (BURNS e CIURCZAK, 2009; PASQUINI, 2003). Por este motivo, mesmo que o IMD seja um inseticida sistêmico, as concentrações contidas nos tecidos da planta são variáveis e muitas vezes encontradas em baixas concentrações (em torno de nanogramas) (CALATAYUD-VERNICH et al., 2016; JIANG et al., 2018), o que pode não ser suficiente para atingir 0,1% da composição da amostra. Além disso, salienta-se que a alface possui concentração majoritária de 96% de água (TBCA, 2018), o que dificulta a análise

dos resultados, uma vez que a água produz bandas extremamente intensas, devido aos grupamentos O-H, que apresentam uma elevada eficiência em absorver a radiação na região do infravermelho, produzindo bandas intensas em vegetais (COZZOLINO, 2009; POREP, KAMMERER e CARLE, 2015), ocultando informações relevantes que podem ser responsáveis por uma separação ou identificação de uma alteração molecular.

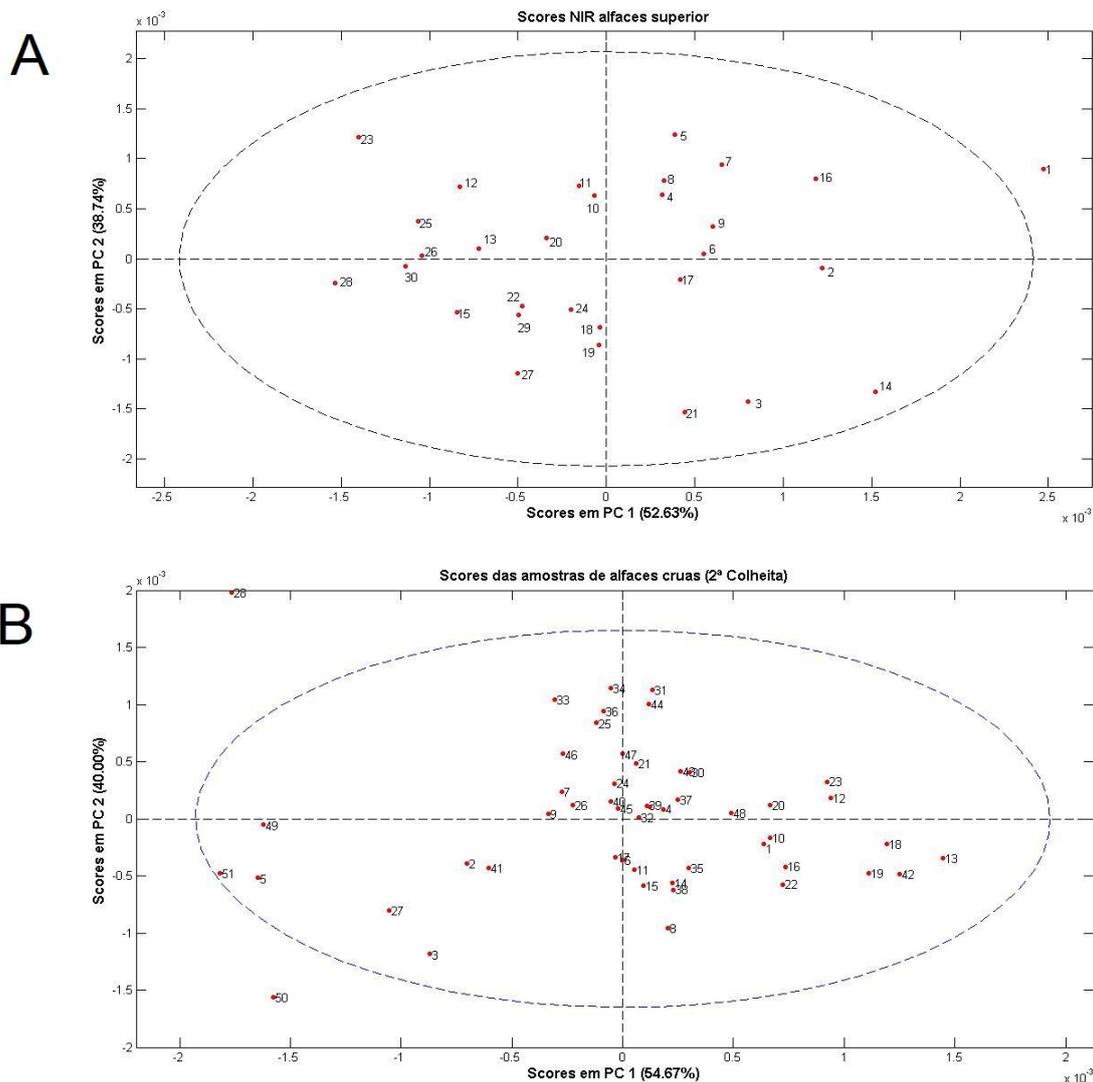


Figura 2 - Scores das amostras de alfaces cruas primeiro cultivo (A) e segundo cultivo (B)
Fonte: Autoria própria

Com o objetivo de diminuir a influência da água, as amostras foram liofilizadas e então analisadas. Avaliando-se os espectros NIR das amostras de alface liofilizadas do primeiro cultivo, foi observado que as amostras do grupo controle (1 e 2 circuladas em vermelho) enquadradas no primeiro quadrante (PC1 negativa e PC2

positiva) foram separadas das amostras tratadas (3 a 12 circuladas em azul) (Figura 3). No entanto, poucas amostras foram levadas em conta nesta etapa, surgindo a necessidade de acrescentar mais amostras para uma melhor robustez desta separação.

Após a liofilização das amostras do segundo cultivo, aplicou-se novamente a PCA, e os resultados (PC1xPC2) estão dispostos na Figura 4. Não houve separação entre os grupos controle (amostras de 1 a 7), tratamento 1 (8 a 27) e tratamento 2 (28 a 49). Assim, sugere-se que o IMD possa não causar alterações na estrutura molecular da planta.

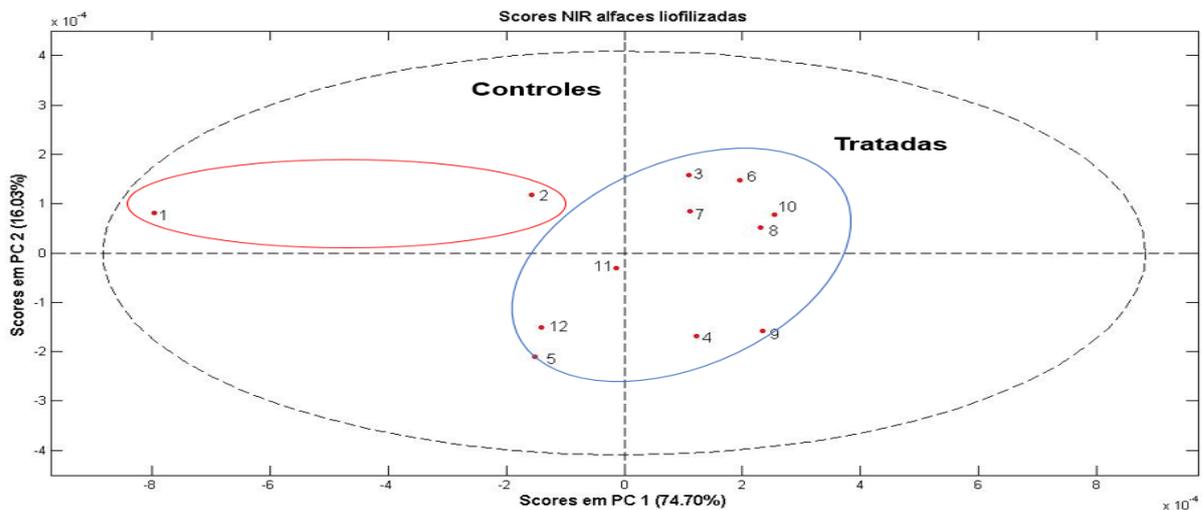


Figura 3 - Scores NIR alfaces liofilizadas 1^a colheita
Fonte: Autoria Própria

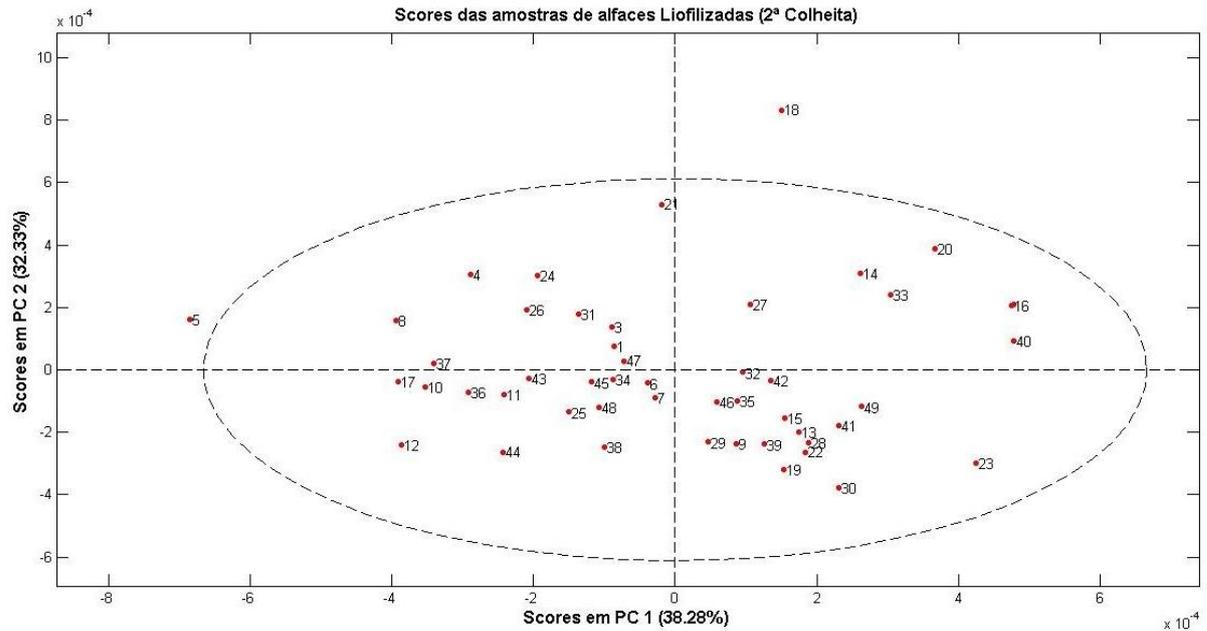


Figura 4 - Scores das amostras de alfaces liofilizadas 2ª colheita
Fonte: Autoria própria

Observou-se ainda que medidas realizadas no caule produzem sinais diferentes de medidas realizadas na parte externa da folha. Como pode ser observado na Figura 5, a contraposição entre PC1 (66,24% da variância explicada) e PC2 (26,56% da variância explicada) mostram uma separação entre as leituras realizadas no caule (amostras de 1 a 30 circuladas em azul - grupo de amostras posicionadas em PC2 negativo), e as leituras realizadas na parte externa superior (amostras de 30 a 60 circuladas em vermelho - grupo de amostras posicionadas em PC2 positivo).

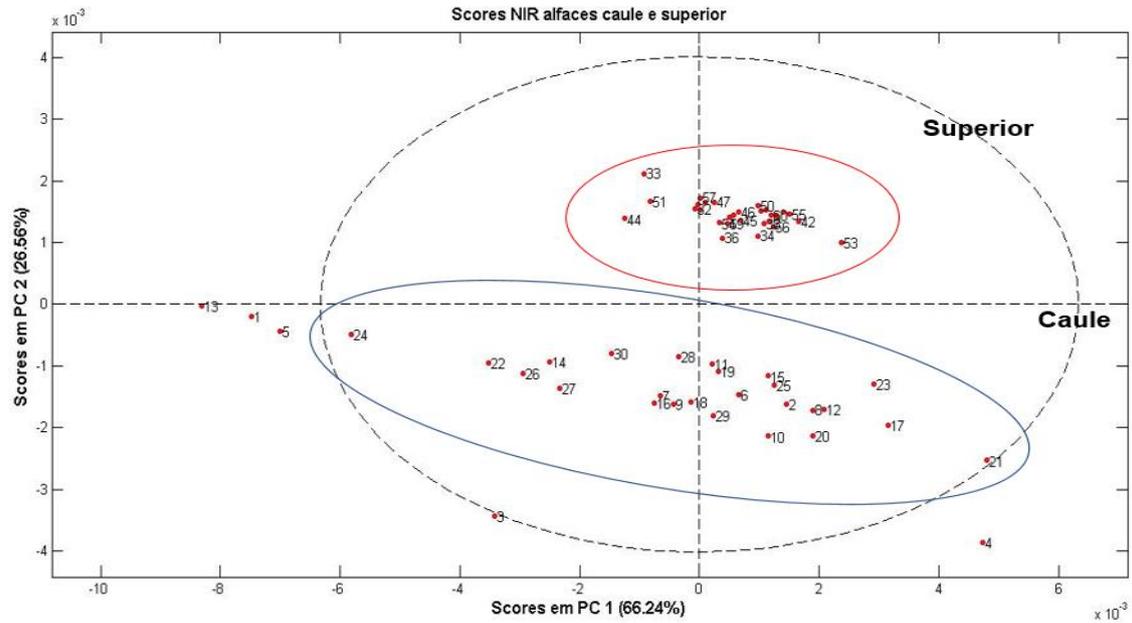


Figura 5 - Scores da Contraposição das leituras de caule x parte superior
Fonte: Autoria Própria

Os loadings (Figura 6) sugerem que a separação evidenciada nos scores da comparação entre as leituras de caule e leituras da parte externa superior (Figura 5), são causadas pelas fortes influências das bandas de vibrações encontradas entre as regiões 980 – 1120, 1200 – 1290 e 1330-1360 nm para as leituras do caule (preenchidas em azul) e 1120-1200, 1290-1330 e 1360-1490 nm para as leituras da parte externa superior (preenchidas em vermelho).

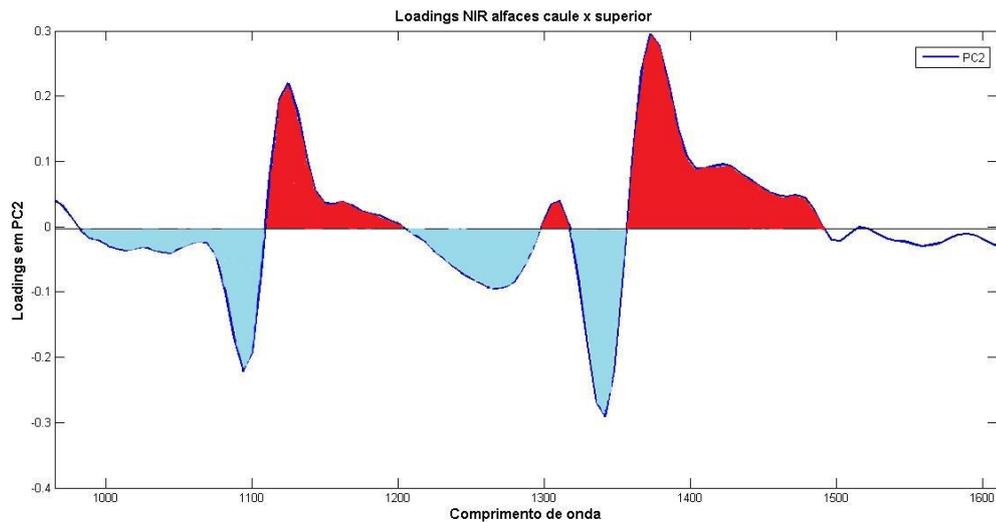


Figura 6 - Loadings dos scores da contraposição caule x parte superior
Fonte: Autoria Própria

Estas bandas de vibração são características de moléculas como lignina, celulose, grupos NH, segundo sobretom de CH e CH₂, e bandas de combinação de CH₃. Para as leituras realizadas na parte superior externa das folhas de alface, as bandas de vibrações são características de moléculas do segundo sobretom de grupos C-H de aromáticos (ArCH), C-H de insaturações (HC=CH) e CH₃, estiramentos de quarto sobretom de C=O, combinações de vibrações para CH₃ e combinações de vibrações para CH₂, primeiro sobretom de OH (ROH), primeiro sobretom de OH de aromáticos (ArOH), primeiro sobretom de CONH₂, CONHR, ArNH₂ e OH de celulose (BURNS e CIURCZAK, 2009).

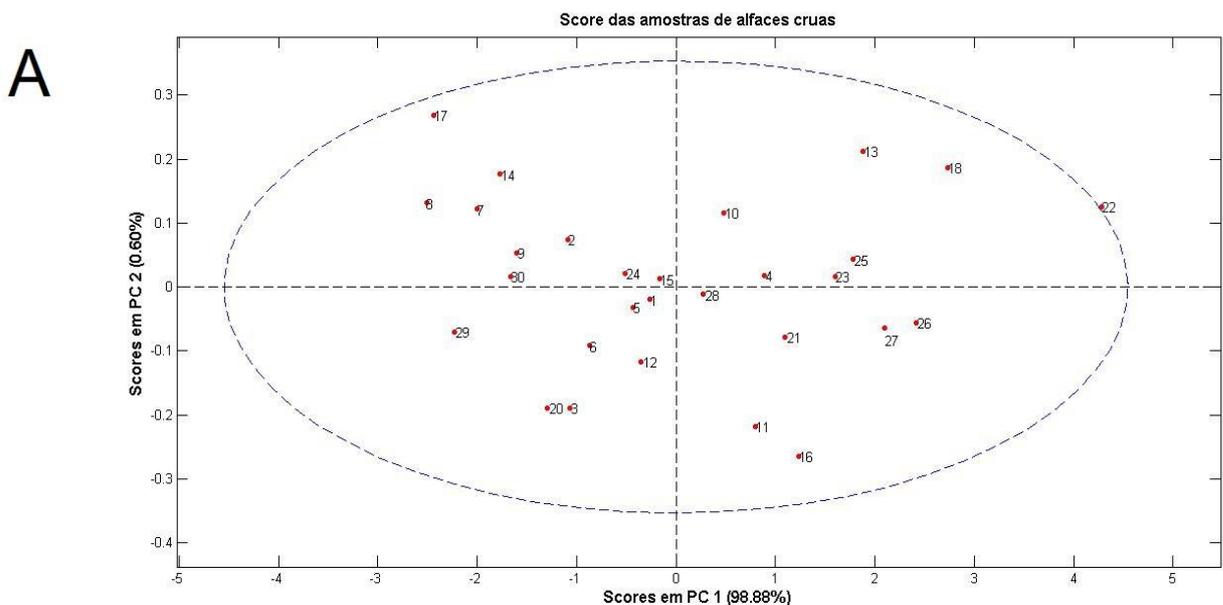
Nos caules, estruturas mais rígidas constituídas por moléculas estruturais como celulose, ligninas, pectinas, hemicelulose e proteínas são encontradas, além de uma maior concentração de tecidos vegetais vasculares como xilema e floema. Já as folhas, além destes tecidos encontrados no caule, possuem também pigmentos fotossintéticos, tecidos de reservas, moléculas de clorofila, carotenoides, ceras, estruturas para armazenamento de água, proteínas, pectinas e minerais (CHITARRA e CHITARRA, 2005; CUTLER, BOTHA e STEVENSON, 2008). Tais diferenças nas estruturas sugerem que as vibrações aqui relatadas, podem estar relacionadas com as vibrações de grupos aromáticos, proteicos, OH e de C=O que estão presentes nas folhas, mas que possam não estar presentes nos caules.

Deste modo esta separação provavelmente ocorreu pela diferença na distribuição existente entre os grupamentos químicos envolvidos nestas duas

estruturas, sugerindo assim que para o caso do NIR, a localização das medidas pode influenciar na resposta obtida pelo equipamento.

5.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO MÉDIO (MIR)

Os dados obtidos por MIR foram submetidos à PCA na tentativa de discriminar as amostras tratadas com o IMD daquelas que não foram tratadas. Os resultados da PCA das alfaces cruas estão apresentados na Figura 7 (A primeiro cultivo e B segundo cultivo). No primeiro cultivo (Figura 7 A) não foram evidenciadas separações entre o grupo das amostras controle (amostras de 1 a 6) das amostras tratadas (amostras de 7 a 30). Para o segundo cultivo (Figura 7 B) igualmente não foram evidenciadas separações entre as amostras do grupo controle (amostras de 1 a 7), grupo tratado 1 (amostras de 8 a 27) e o grupo tratado 2 (amostras de 28 a 48), além de não ser observada separação entre os tratamentos 1 e tratamentos 2. Deste modo, mesmo aumentando-se o volume de inseticida utilizado para uma overdose na concentração (tratamento 2), não foi possível distinguir entre os grupos que receberam o tratamento com o inseticida daquele que não recebeu.



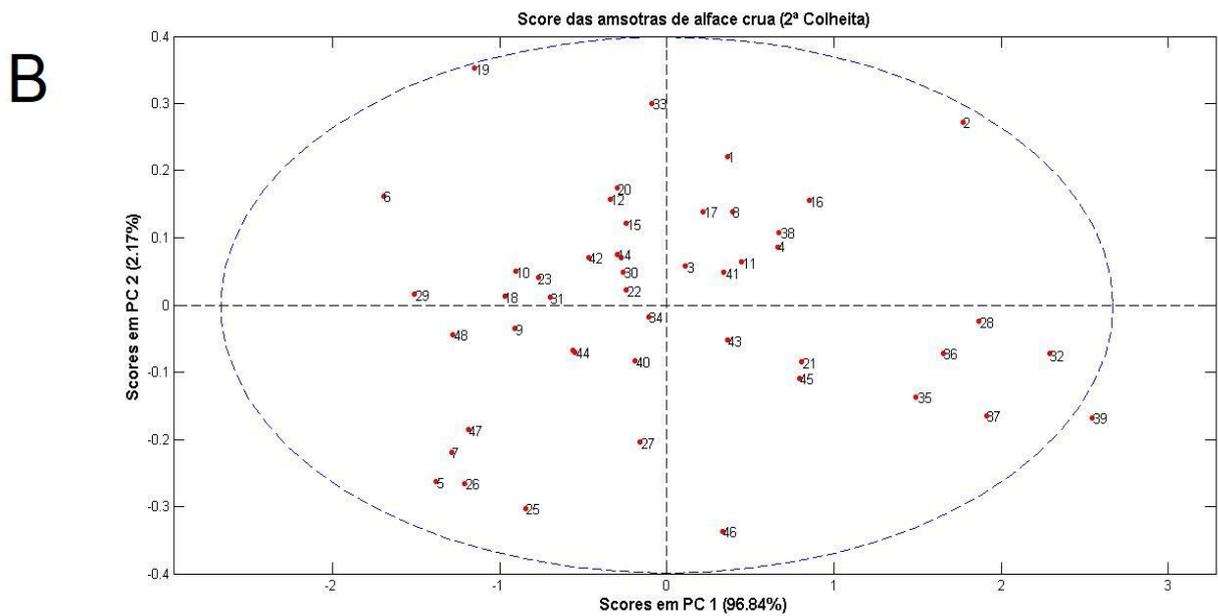


Figura 7 - Scores das amostras de alface cruas primeiro cultivo (A) e segundo cultivo (B)
Fonte: Autoria Própria

Para este caso, a espectroscopia MIR foi utilizada para analisar a influência da água por comparação das amostras medidas de forma crua e após a liofilização. No entanto, nenhuma separação foi evidenciada entre as amostras controle (amostras de 1 a 2) e as tratadas (amostras de 3 a 12), como pode se observar na Figura 8 A. As análises das amostras liofilizadas do segundo cultivo (Figura 8 B) não permitiram observar separações evidentes entre o grupo controle (amostras de 1 a 7), tratamento 1 (8 a 27) e tratamento 2 (amostras de 28 a 47). Deste modo, com os resultados de infravermelho próximo e os resultados de infravermelho médio, podemos afirmar que para as condições utilizadas no estudo, o IMD não é capaz de promover alterações moleculares na matriz estrutural da alface, mesmo que esteja em concentrações de overdose. Aparentemente o período de acumulação desde as aplicações do primeiro cultivo até o fim do segundo cultivo não são influentes para os resultados.

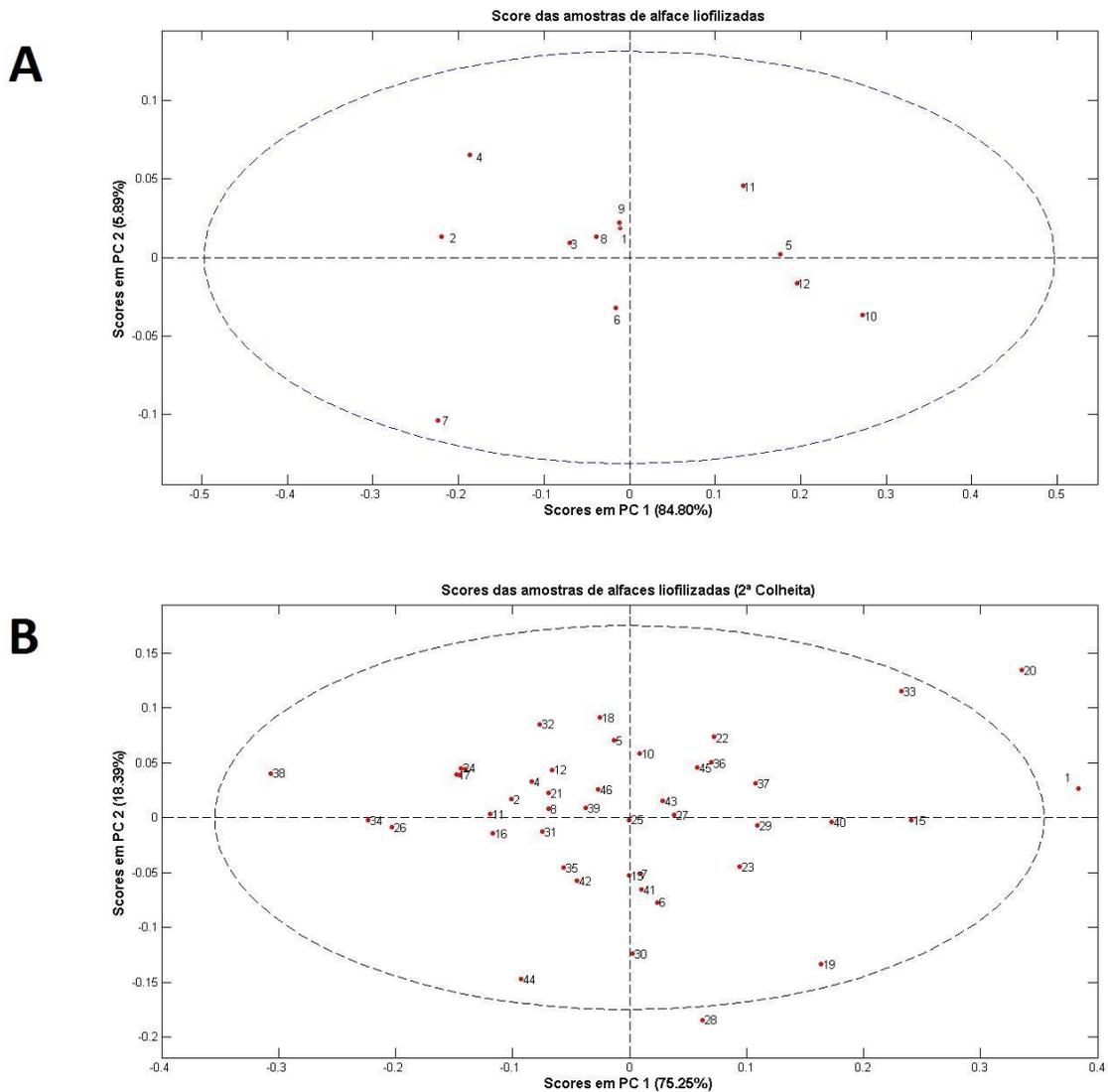


Figura 8 - Score das amostras de Alface liofilizadas; A - PCA das leituras das alfaces liofilizadas do primeiro cultivo; B – PCA das leituras das alfaces liofilizadas do segundo cultivo.

Fonte: Autoria própria

5.4 ANÁLISE DE ESTRESS POR INDUÇÃO DE FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA *a* (FChI)

Os resultados obtidos a partir das avaliações FChI pela curva lenta da fluorescência da clorofila em relação as folhas de alface foram realizadas apenas para o segundo cultivo, e os resultados médios estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros de indução da fluorescência lenta e coeficientes de dissipação de energia obtidos após repetidos pulsos de saturação em folhas de Alface. Campo Mourão, 2018.

Amostras	F_0	F_M	F_V/F_M	F_V/F_0
Controle	0,825±0,077 ^a	3,802±0,230 ^a	0,781±0,011 ^a	3,571±0,219 ^a
Tratamento 1	0,910±0,025 ^a	4,300±0,223 ^a	0,787±0,006 ^a	3,684±0,146 ^a
Tratamento 2	0,908±0,053 ^a	4,065±0,262 ^a	0,781±0,011 ^a	3,571±0,225 ^a

Dados médios (N=3) ± desvio padrão, valores com as mesmas letras comparando as linhas não possuem diferença significativa com $P < 0,05$, por teste de Tukey.

Fonte: Autoria Própria

Nota-se que não houveram diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados por PAM. O parâmetro F_0 indica a fluorescência inicial quando adaptada ao escuro. Este parâmetro se altera por conta das influências das mudanças nas estruturas dos pigmentos fotossintéticos do PSII, causadas por conta da influência do estresse sofrido pela planta. Desta forma, pressupõem-se que F_0 representa a energia liberada pelas moléculas de clorofila *a* do complexo antena (complexos de absorção de energia luminosa auxiliares aos centros de reações receptores de elétrons) do PSII, antes dos elétrons migrarem para o centro de reação (BOLHAR-NORDENKAMPF et al., 1989). Já o parâmetro F_M é proporcional a quantidade de clorofila *a*, contida nos tecidos (MIRANDA, BAKER e LONG, 1981).

A relação F_V/F_M representa o rendimento quântico máximo fotoquímico do PSII representando um indicador extremamente sensível para o desempenho fotossintético da planta (MAXWELL e JOHNSON, 2000). Estudos revelam que para plantas saudáveis pode-se esperar um valor médio entre 0,830 (BJÖRKMAN e DEMMIG, 1987). Maxwell e Johnson (2000) destacam também que a relação F_V/F_0 tem o mesmo significado da relação F_V/F_M . No entanto, em muitos casos se mostrou mais sensível na avaliação do rendimento fotoquímico máximo do PSII.

Análises de FChl para determinação de parâmetros de estresse já foram utilizadas em alfaces. Wang et al (2019) utilizaram parâmetros de fluorescência para avaliar o nível de estresse causado em alfaces devido a presença de metais pesados como o cádmio e mensurar a inibição do estresse quando utilizando ácido fúlvico, conseguindo relatar e relacionar efeitos de redução do crescimento, capacidade fotossintética, espécies de oxigênio reativos e inibição de absorção de minerais com o estresse da planta.

Kowalczyk et al (2018) avaliaram a utilização dos parâmetros de fluorescência para prever parâmetros de qualidade de alfaces frescas e de seu comportamento durante o armazenamento. Foram utilizadas duas variedades de alfaces; a alface

manteiga e alface batávia, que cresceram em três sistemas de hidroponia diferentes, sendo eles lajes de lâ mineral, fibra de coco e NFT (técnica de filme nutriente). Os autores observaram modificações significativas onde as alfaces batávias sofreram menos transformações em relação as alfaces manteigas em diversos parâmetros da fluorescência principalmente após 3 dias de armazenamento. Sendo passível de utilização até mesmo para monitoramento de folhas de arroz durante o desenvolvimento no campo para evitar perdas ou baixo rendimento (ZHANG et al., 2011).

Alguns estudos que visam avaliar os efeitos tóxicos/estresse causado por pesticidas também foram realizados, como no caso de Frankart, Eullaffroy e Vernet, (2003), que investigaram quatro herbicidas (paraquat, norflurazon, flazasulfuron and atrazine) ,geralmente encontrados em amostras ao ar livre. Foram avaliados quanto as mudanças que podem causar no rendimento da clorofila *a* em amostras de *Lemna minor in vivo*. Os resultados mostram que os herbicidas afetaram as vias de fotossíntese de diferentes maneiras, inibições nos aceptores de elétrons no PSI, inibição da biossíntese de carotenoides e proteínas, além de bloquear o transporte de elétrons PSII. Parâmetros fotossintéticos foram alterados conforme aumentou-se a concentração dos herbicidas, principalmente a relação F_V/F_M .

O neonicotinoide acetamiprida foi analisado em *Synechocystis in vivo* por Li et al. (2010), os resultados mostraram que o aumento da exposição ao acetamiprida elevou a proporção de centros reativos PSII inativados, reduziu o fluxo de transporte de elétrons e por consequência diminuiu o rendimento da atividade PSII. No entanto, teve pouco efeito sobre o fluxo de energia e rendimento quântico F_V/F_M . Os autores relatam que o inseticida reduz o transporte de elétrons, mas tem pouco efeito na absorção de energia e energia retida, o que justifica o baixo efeito sobre F_V/F_M .

Observando os parâmetros F_0 e F_M em separado, é possível afirmar que a aplicação do IMD não foi influente a ponto de gerar estresse no desenvolvimento das culturas de alface e de seus tecidos fotossintéticos. Neste sentido observou-se que para ambos os casos o valor da relação F_V/F_M estava um pouco abaixo do valor considerado ideal para plantas saudáveis mas próximo de 0,830, apontando que para ambos os casos as plantas estavam saudáveis. Porém, como não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratamento 1 e tratamento 2, sugere-se que não houve estresse proveniente da aplicação do IMD, reforça-se a ideia de que o controle realizado para os experimentos como, por

exemplo, quantidade de água, luz, temperatura, estágio de maturação e composição do solo foram homogêneos em questão de condições de estresse.

Apesar de existirem estudos relacionados a metodologia e sua eficiência em avaliar os efeitos na planta, causados por condições de estresse, relatos que relacionam a utilização de neonicotinoides e suas influências no desenvolvimento de culturas como a alface são escassos. Portanto, este pode ser considerado o primeiro relato sobre como este inseticida influencia no desenvolvimento do cultivar, contrariando o efeito *Stress Shield* atribuído ao IMD.

5.5 RESULTADOS DA ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM MERISTEMAS DE RAÍZES DE *ALLIUM CEPA*

Com bases nos resultados obtidos para o inseticida IMD na Tabela 4, as duas concentrações avaliadas (0,35 e 1,2 g.L⁻¹) causaram inibição significativa da divisão celular nos tempos de exposição 24 e 48 horas, em relação aos índices mitóticos observados para os seus respectivos controles. Os índices de divisão observados para o tempo de análise 48 horas foram significativamente inferiores aos índices observados para os específicos tempos de exposição 24 horas.

Tabela 4. Índices mitóticos (%) observados em meristemas de raízes de *A. cepa* expostos a diferentes concentrações do inseticida em 24 e 48 horas exposição. Campo Mourão, 2018.

Controle positivo		IM (%)/DP	
MMS (4x10 ⁻⁴ mol/L)		7,56±0,34	
Inseticida		IM (%)/DP	
	Co (0 h)	24 h	48 h
Concentração 1	44,10 ±0,32 ^a	5,88 ±0,20 ^b	1,76 ±0,7 ^c
Concentração 2	31,62 ±0,21 ^a	5,76 ±0,29 ^b	0,56 ±0,22 ^c

TE: tempo de exposição; Co: controle; IM: índice mitótico; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo). Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori ($p < 0,05$). Letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24 h e 48 h) dentro de uma mesma concentração. DP: Desvios padrão informados para cada tempo de análise avaliado de cada concentração.

Fonte: Autoria Própria.

Os valores de índices mitóticos obtidos para os tempos de análise das duas concentrações analisadas do praguicida em questão foram menores que os índices mitóticos verificados para o controle MMS, uma droga sabidamente citotóxica ao ensaio em meristemas de raízes de *A. cepa*. Portanto, nas condições de análises estabelecidas, as duas concentrações do inseticida foram substancialmente

citotóxicas aos meristemas de raízes.

Em relação, aos resultados de alterações celulares, as duas concentrações do praguicida avaliado induziram um número significativo de micronúcleos nas células meristemáticas de raízes nos tempos de análise 24 e 48 horas (Tabela 5). A presença de micronúcleos indica que o praguicida, nas concentrações avaliadas, foram genotóxicos aos meristemas de raízes, provocando quebra cromossômicas. Ademais, observou-se número significativo de células em apoptose.

Tabela 5. Índices de alterações celulares observados em meristemas de raízes de *A. cepa* expostos a duas concentrações do inseticida (0,35 e 1,2 g/L), em 24 e 48 horas exposição. Campo Mourão, 2018.

Controle positivo		IAC (%)	
MMS (4×10^{-4} mol/L)		14,95 \pm 0,50	
Inseticida		TE/IAC (%)	
	Co (0 h)	24 h	48 h
Concentração 1	0,00 ^a	30,0 \pm 0,21 ^b	22,0 \pm 0,10 ^b
Concentração 2	0,00 ^a	33,1 \pm 0,31 ^b	26,0 \pm 0,44 ^b

TE: tempo de exposição; IAC: índice de alterações cromossômicas; Co: controle; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo) em 24h. Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori ($p < 0,05$); O parâmetro comparativo refere-se as concentrações do inseticida... individualmente, dentro de uma mesma concentração nos diferentes tempos de exposição). Letras iguais referem-se a médias estatisticamente iguais entre os tempos de exposição considerados (Co-0h, 24 h e 48 h) dentro de uma mesma concentração. DP: Desvios padrão informados para cada tempo de análise avaliado de cada concentração *Índice de alteração celular estatisticamente igual ao índice de alteração observado para o controle positivo.

Fonte: Aatoria Própria.

A apoptose define uma situação em que uma célula em processo de morte perde sua aderência com as células vizinhas ou com a matriz extracelular. Além disso, a cromatina fragmenta-se no núcleo, formando pequenas massas rodeadas pela membrana nuclear, enquanto que o citoplasma fica com um aspecto diferenciado característico. Essa aparência característica do citoplasma e do núcleo é resultante da ativação de caspases, proteases de restrição, que podem clivar componentes importantes do citoesqueleto e da matriz nuclear (VENTURA-CAMARGO e MARIN-MORALES, 2016). Esses eventos ocorrem quando as células se encontram envelhecidas ou quando as células, presentes em um tecido de funcionamento metabólico normal e de intensa divisão celular, sofre considerável ação de uma droga/composto/substância genotóxica causando danos irreversíveis nas células.

Estes resultados estão de acordo com os estudos realizados por Stivaktakis et al. (2016), os quais identificaram que a ingestão via oral do IMD (40 a 80 mg.Kg⁻¹

¹.dia⁻¹) em água, durante quatro meses, levou a formação de micronúcleos nas análises de sangue de ratos, denotando efeitos citotóxicos e genotóxicos do inseticida mesmo quando consumido oralmente. Sendo que em linfócitos humanos Feng et al. (2005) concluíram que a frequência de micronúcleos foi observada em concentrações (0,1 e 0,5 mg.L⁻¹), e danos no DNA também foram reportados. No caso deste estudo, as concentrações representam as permitidas por legislação para o uso em campo, na qual mostram efeitos extremamente danosos às células. Atentando-se ao fato do inseticida ser sistêmico, não se pode descartar hipóteses de contaminação via consumo direto como no caso das hortaliças, ou contaminação por lixiviação como, por exemplo, de cursos hídricos. Para explorar melhor estes resultados, análises futuras serão realizadas em extratos obtidos das alfaces que receberam o tratamento com o IMD nas mesmas concentrações.

6. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a composição mineral para ambos os grupos, controle e tratados, não apresentaram diferenças significativas. As maiores concentrações encontradas se referem ao mineral Ca, seguido de $K > Fe > Al > Pb$ para o primeiro cultivo. Na segundo cultivo as maiores concentrações encontradas se referem ao K seguido de $Ca > Fe > Al > Pb$, sendo que o cobre não foi detectado em nenhum dos casos. Os resultados sugerem, que a utilização do IMD não influenciou na absorção de minerais por parte da planta.

Os resultados das análises por NIR e MIR mostraram que existe uma forte influência da água em nas medidas, sendo que as regiões onde as leituras foram realizadas (somente para o NIR), caule ou parte externa, são influentes nos resultados obtido devido suas características estruturais. Ainda, após a liofilização das amostras, nenhuma diferença foi evidenciada na PCA de NIR e/ou MIR para ambas as colheitas realizadas. No entanto, não se pode descartar a hipótese de que a presença deste inseticida possa promover alterações moleculares devido a interações entre seus grupos químicos e a matriz molecular. Porém, tal afirmação demanda outros estudos.

Os resultados obtidos pela fluorescência da clorofila *a* no que se refere aos parâmetros F_o , F_M , F_V , F_V/F_M , F_V/F_o , não foi possível determinar diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratamento 1 e tratamento 2, indicando que o inseticida não é passível de promover estresse na alface durante seu desenvolvimento, tal como, não promove deformações nas estruturas da clorofila e conseqüentemente não alteram o rendimento quântico da fotossíntese. No entanto, para melhor entendimento, mais parâmetros devem ser avaliados para se ter uma ideia mais precisa sobre a eficiência do sistema PSII.

Com relação a toxicologia, o IMD teve influência na divisão celular dos meristemas de *A. cepa*, em que o índice de inibição para o tempo de 48 h ((1,76 e 0,56) concentrações 1 (0,35 g/L) e concentração 2 (1,2g/L), respectivamente) foi muito mais baixo do que o tempo de 24 h (5.88 e 5.76) concentração 1 e concentração 2 respectivamente, além de que, as inibições foram maiores do que as encontradas para o controle de referência MSS mostrando grande citotoxicidade do IMD. Os índices de alterações moleculares foram encontrados em um grande

numero de formação de micronúcleos e células em apoptose, indicando um grande nível de genotoxicidade do IMD.

REFERENCIAS

ADDY-ORDUNA, L. M.; BRODEUR, J. C.; MATEO, R. **Science of the Total Environment Oral acute toxicity of imidacloprid , thiamethoxam and clothianidin in eared doves : A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds.** Science of the Total Environment, v. 650, p. 1216–1223, 2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, **RESOLUÇÃO - RDC Nº23**, Ministério da Saúde, 24 de abril de 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, **RESOLUÇÃO-RE Nº 165**, Ministério da Saúde - MS, 29 de agosto de 2003.

ARAÚJO, G. K. P.; SOUZA, S. J.; SILVA, M. V; YAMASHITA, F.; GONÇALVES, O. H.; LEIMANN, F. V; SHIRAI, M. A. **Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract.** International Journal of Food Science & Technology, v. 50, n. 9, p. 2080–2087, 2015.

BAL, R.; NAZIROĞLU, M.; TÜRK, G.; YILMAZ, Ö.; KULOĞLU, T.; ETEM, E.; BAYDAS, G. **Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats.** CELL BIOCHEMISTRY & FUNCTION, n. March, 2012.

BASS, C.; DENHOLM, I.; WILLIAMSON, M. S.; NAUEN, R. **The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides.** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 121, p. 78–87, 2015.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. **Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins*.** Planta, v. 170, p. 489–504, 1987.

BOKOBZA, L. **Near infrared spectroscopy.** Laboratoire de Physico-chimie Structurale et Macromoléculaire, v. 154, n. 8 Suppl 3, p. S19-21, 1995.

BOLHAR-NORDENKAMPF, H. R.; LONG, S. P.; BAKER, N. R.; ÖQUIST, G.; SCHREIBER, U.; LECHNER, E. G. **Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field : a review of current instrumentation.** Functional Ecology, v. 3, p. 497–514, 1989.

BONMATIN, J. M.; Giorio, C.; Girolami, V.; Goulson, D.; Kreutzweiser, D. P.; Krupke,

C.; Liess, M.; Long, E.; Marzaro, M.; Mitchell, E. A.; Noome, D. A.; Simon-Delso, N.; Tapparo, A.; **Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil.** Environmental Science and Pollution Research, v. 22, n. 1, p. 35–67, 2015.

BRESTIC, M.; ZIVCAK, M. **PSII Fluorescence Techniques for Measurement of Drought and High Temperature Stress Signal in Crop Plants : Protocols and Applications.** Molecular Stress Physiology of Plants, n. February, p. 87–133, 2013.

BURNS, D. A.; CIURCZAK, E. W. **Handbook of near-infrared analysis, 3rd ed. Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2009. Disponível em: <<http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=XkALgZVXxQQC&pgis=1%5Cnhttp://uotechnology.edu.iq/eretc/books/Handbook of Near-Infrared Analysis 084937393X.pdf%5Cnhttp://link.springer.com/10.1007/s00216-008-2580-0>>

CALATAYUD-VERNICH, P.; CALATAYUD, F.; SIMÓ, E.; SUAREZ-VARELA, M. M.; PICÓ, Y. **Science of the Total Environment Influence of pesticide use in fruit orchards during blooming on honeybee mortality in 4 experimental apiaries.** Science of the Total Environment, The, v. 541, p. 33–41, 2016.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. **Neuroactive Insecticides : Targets , Selectivity , Resistance , and Secondary Effects.** Annual Review of Entomology, v. 58, p. 99–117, 2013.

CHEN, Y.; HU, W.; HUANG, B.; WEINDORF, D. C.; RAJAN, N.; LIU, X.; NIEDERMANN, S. **Accumulation and health risk of heavy metals in vegetables from harmless and organic vegetable production systems of China.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 98, p. 324–330, 2013.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças fisiologia e manuseio.** Lavras - MG, editora UFLA 2.ed. rev. e ampl., 2005

COZZOLINO, D. **Near infrared spectroscopy in natural products analysis.** Planta Medica, v. 75, n. 7, p. 746–756, 2009.

CROSBY, E. B.; BAILEY, J. M.; OLIVERI, A. N.; LEVIN, E. D. **Neurotoxicology and Teratology Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebra fish.** Neurotoxicology and Teratology, v. 49, p. 81–90, 2015.

CUMONT, G.; Dypdahl, H. P.; Gadd, K.; Havre, G. N.; Julshamn, K.; Lind, B.; Loimaranta, J.; Merseburg, M.; Olsson, A.; Piepponen, S.; Uppstad, B. J.; Waaler, T.;

Winnerstam, L.; **Spectrometry after Dry Ashing : NMKL Collaborative Study.** Journal of AOAC International, v. 83, n. 5, p. 1204–1211, 2000.

CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia Vegetal uma abordagem aplicada.** São Paulo - SP, Artmed Editora S.A., 2011.

DEMMIG-ADAMS, B.; COHU, C. M.; MULLER, O.; ADAMS III, W. W. **Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature : from seconds to seasons.** A signature Photosynthesis, v. 113, p. 75–88, 2012.

ECOBICHON, D. J. **Pesticide use in developing countries.** Toxicology, v. 160, p. 27–33, 2001.

FAVARO, S. P.; ALBA, Y. C.; SOUZA, A. D. V. DE; VIANNA, A. C. A.; ROEL, A. R. **Characterization of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown with biopesticides and deltamethrin.** Scientia Horticulturae, v. 130, n. 3, p. 498–502, 2011.

FENG, S.; KONG, Z.; WANG, X.; PENG, P.; ZENG, E. Y. **Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 61, p. 239–246, 2005.

FRANKART, C.; EULLAFFROY, P.; VERNET, G. **Comparati v e effects of four herbicides on non-photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*.** Environmental and Experimental Botany, v. 49, p. 159–168, 2003.

GOULSON, D. **An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides.** Journal of Applied Ecology, v. 50, p. 977–987, 2013.

GU, Y.; LI, Y.; HUANG, X.; ZHENG, J.; YANG, J.; DIAO, H.; YUAN, Y.; XU, Y.; LIU, M.; SHI, H.; XU, W. **Reproductive Effects of Two Neonicotinoid Insecticides on Mouse Sperm Function and Early Embryonic Development In Vitro.** PloS one, v. 8, n. 7, 2013.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto, SP, FUNPEC. 304p. 2002.

HALLMANN, C. A.; FOPPEN, R. P. B.; TURNHOUT, C. A. M. VAN; KROON, H. DE; JONGEJANS, E. **Declines in insectivorous birds are associated with high**

neonicotinoid concentrations. Nature, v. 9100, 2014.

HAN, W.; TIAN, Y.; SHEN, X. **Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: an overview.** Chemosphere, 2017.

HERRERO, O.; MARTÍN, J. M. P.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test.** Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 743, n. 1–2, p. 20–24, 2012.

ITURBURU, F. G.; BERTRAND, L.; MENDIETA, J. R.; AMÉ, M. V. **An integrated biomarker response study explains more than the sum of the parts : Oxidative stress in the fish *Australoheros facetus* exposed to imidacloprid.** Ecological Indicators, v. 93, n. March, p. 351–357, 2018.

JEPSON, J. E. C.; BROWN, Æ. L. A.; SATTELLE, D. B. **The actions of the neonicotinoid imidacloprid on cholinergic neurons of *Drosophila melanogaster*.** Invertebrate Neuroscience, p. 33–40, 2006.

JESCHKE, P.; NAUEN, R.; SCHINDLER, M.; X, A. E. **Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids.** JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY p. 2897–2908, 2011.

JIANG, J.; MA, D.; ZOU, N.; YU, X.; ZHANG, Z. Q.; LIU, F.; MU, W. **Concentrations of imidacloprid and thiamethoxam in pollen, nectar and leaves from seed-dressed cotton crops and their potential risk to honeybees (*Apis mellifera* L.).** Chemosphere, 2018.

KAPOOR, U.; SRIVASTAVA, M. K.; TRIVEDI, P.; GARG, V.; SRIVASTAVA, L. P. **Disposition and acute toxicity of imidacloprid in female rats after single exposure.** FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY, v. 68, p. 190–195, 2014.

KAVVALAKIS, M. P.; TZATZARAKIS, M. N.; THEODOROPOULOU, E. P.; BARBOUNIS, E. G.; TSAKALOF, A. K.; TSATSAKIS, A. M. **Development and application of LC – APCI – MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid.** Chemosphere, v. 93, n. 10, p. 2612–2620, 2013.

KIMURA-KURODA, J.; KOMUTA, Y.; KURODA, Y.; HAYASHI, M.; KAWANO, H. **Nicotine-Like Effects of the Neonicotinoid Insecticides Acetamiprid and Imidacloprid on Cerebellar Neurons from Neonatal Rats.** PloS one, v. 7, n. 2,

2012.

KOWALCZYK, K.; SIECZKO, L.; GOLTSEV, V.; KALAJI, H. M.; GAJC-WOLSKA, J.; GAJEWSKI, M.; GONTAR, L.; ORLIŃSKI, P.; NIEDZIŃSKA, M.; CETNER, M. D. **Relationship between chlorophyll fluorescence parameters and quality of the fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa* L.).** Scientia Horticulturae, v. 235, n. July 2017, p. 70–77, 2018.

KUMAR, S.; NEHRA, M.; DILBAGHI, N.; HASSAN, A. A.; KIM, K. **Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture.** Journal of Controlled Release, 2018.

LI, L.; CHEN, X.; ZHANG, D.; PAN, X. **Effects of insecticide acetamiprid on photosystem II (PSII) activity of *Synechocystis*.** Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 98, p. 300–304, 2010.

LI, Y.; YANG, L.; YAN, H.; ZHANG, M.; GE, J.; YU, X. **Ecotoxicology and Environmental Safety Uptake , translocation and accumulation of imidacloprid in six leafy vegetables at three growth stages.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 164, n. August, p. 690–695, 2018.

LONARE, M.; KUMAR, M.; RAUT, S.; BADGUJAR, P.; DOLTADE, S.; TELANG, A. **Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin.** Neurochemistry International, 2014.

MARFO, J. T.; FUJIOKA, K.; IKENAKA, Y.; SHOUTA, M.; NAKAYAMA, M.; MIZUKAWA, H.; AOYAMA, Y.; ISHIZUKA, M.; TAIRA, K. **Relationship between Urinary N -Desmethyl- Acetamiprid and Typical Symptoms including Neurological Findings : A Prevalence Case- Control Study.** PloS one, p. 1–19, 2015.

MATOS, L. A. *et al.* **The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river.** Chemosphere, v. 185, p. 852–859, 2017.

MATSUDA, K.; BUCKINGHAM, S. D.; KLEIER, D.; RAUH, J. J.; GRAUSO, M.; SATTELLE, D. B.; BUCKINGHAM, S. D. **Neonicotinoids : insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors.** TRENDS in Pharmacological Science v. 22, n. 11, p. 573–580, 2001.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. **Chlorophyll fluorescence — a practical guide.** Journal of Experimental Botany, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.

MILLOT, F.; DECORS, A.; MASTAIN, O.; QUINTAINE, T.; BERNY, P.; VEY, D.; LASSEUR, R.; BRO, E. **Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds : a review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014.** *Environmental Science and Pollution Research* p. 5469–5485, 2017.

MIRANDA, V.; BAKER, N. R.; LONG, S. P. **Limitations of Photosynthesis in Different Regions of the Zea mays Leaf.** *The New Phytologist*, v. 89, n. 2, p. 179–190, 1981.

OSAKA, A. *et al.* Exposure characterization of three major insecticide lines in urine of young children in Japan — neonicotinoids , organophosphates , and pyrethroids. **Environmental Research**, v. 147, p. 89–96, 2016.

PASQUINI, C. **Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, n. 2, p. 198–219, 2003.

PINTO, E.; ALMEIDA, A. A.; AGUIAR, A. A. R. M.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. **Changes in macrominerals, trace elements and pigments content during lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth: Influence of soil composition.** *Food Chemistry*, v. 152, p. 603–611, 2014.

POREP, J. U.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R. **On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 46, n. 2, p. 211–230, 2015.

RABY, M.; NOWIERSKI, M.; PERLOV, D.; ZHAO, X.; HAO, C.; POIRIER, D. G.; SIBLEY, P. K. **Acute Toxicity of Six Neonicotinoid Insecticides to Freshwater Invertebrates.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018. RE-N^o 165. v. 2003, 2003.

REED, M. J.; MARION, D. E.; CHRISTOPHER, A. M.; MARYANN, F. **Review article Pesticides and honey bee toxicity – USA ***. *Apidologie* v. 41, p. 312–331, 2010.

RICO, A.; ARENAS-SÁNCHEZ, A.; PASQUALINI, J.; GARCÍA-ASTILLERO, A.; CHERTA, L.; NOZAL, L.; VIGHI, M. **Effects of imidacloprid and a neonicotinoid mixture on aquatic invertebrate communities under Mediterranean conditions.** *Aquatic Toxicology*, 2018.

SALES, I. M. S.; BARBOSA, J. S.; SANTOS, F. K. S.; SILVA, F. C. C.; FERREIRA, P. M. P.; SOUSA, J. M. DE C.; PERON, A. P. **Assessment of Grape , Plum and Orange Synthetic Food Flavourings Using in vivo Acute Toxicity Tests.** Food Technology and Biotechnology, v. 55, n. 1, p. 131–137, 2017.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K.; HAYASAKA, D. **Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and its Implication for Ecosystems.** Frontiers in Environmental Science, v. 4, n. November, p. 1–14, 2016.

SENN, R.; HOFER, D.; THIEME, T.; ZANG, L. **METHOD FOR IMPROVING PLANT GROWTH.** United States Patent (10) No.: US 2004/6,753,296 B1, v. 30, n. 5, p. 997–999, 2004.

SIMON-DELISO, N.; AMARAL-ROGERS, V.; BELZUNCES, L. P.; BONMATIN, J. M.; CHAGNON, M.; DOWNS, C.; FURLAN, L.; GIBBONS, D. W.; GLORIO, C.; GIROLAMI, V.; GOULSON, D.; KREUTZWEISER, D. P.; KRUPKE, C. H.; LIESS, M.; LONG, E.; MCFIELD, M.; MINEAU, P.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; MITCHELL, E. A. D.; MORRISSEY, C. A.; MORRISSEY, C. A.; NOOME, D. A.; PISA, L.; SETTELE, J.; STARK, J. D.; TAPPARO, A.; VAN DYCK, H.; VAN PRAAGH, J.; VAN DER SLUIJS, J. P.; WHITEHORN, P. R.; WIEMERS, M.; **Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends , uses , mode of action and metabolites.** Environmental Science and Pollution Research p. 5–34, 2015.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentals of analytical chemistry.** São Paulo - SP, Thomson Learning 8.ed., c2006.

SOFO, A.; LUNDEGÅRDH, B.; MÅRTENSSON, A.; MANFRA, M.; PEPE, G.; SOMMELLA, E.; NISCO, M. DE; TENORE, G. C.; CAMPIGLIA, P.; SCOPA, A. **Different agronomic and fertilization systems affect polyphenolic profile, antioxidant capacity and mineral composition of lettuce.** Scientia Horticulturae, v. 204, p. 106–115, 2016.

SPATZ, A.; GREGGERS, U.; GRU, B.; FISCHER, J.; MU, T.; MENZEL, R. **Neonicotinoids Interfere with Specific Components of Navigation in Honeybees.** PloS one v. 9, n. 3, p. 1–10, 2014.

STIVAKTAKIS, P. D.; KAVVALAKIS, M. P.; TZATZARAKIS, M. N.; ALEGAKIS, A. K.; PANAGIOTAKIS, M. N.; FRAGKIADAKI, P.; VAKONAKI, E.; OZCAGLI, E.; HAYES, W. A.; RAKITSKII, V. N.; TSATSAKIS, A. M. **Long-term exposure of rabbits to imidacloprid as quantified in blood induces genotoxic effect.** Chemosphere, v. 149, p. 108–113, 2016.

TABREZ, S.; SHAKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHOURI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; AHMAD, M. **Genotoxicity Testing and Biomarker Studies on Surface Waters : An Overview of the Techniques and Their Efficacies.** Journal of environmental science and health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews, n. August 2013, p. 37–41, 2011.

THIELERT, W.; METZLAFF, M.; BLOCK, M. **INCREASE OF STRESS TOLERANCE BY APPLICATION OF NEONICOTINOIDS ON PLANTS ENGINEERED TO BE STRESS TOLERANT.** Patent Application Publication (10) Pub . No .: US 2009 / 0270254 A1, v. 1, n. 19, 2009.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. **NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY : Mechanisms of Selective Action.** Annual Review of Pharmacology and Toxicology 2005.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E.; MU, P. **Molecular Recognition of Neonicotinoid Insecticides : The Determinants of Life or Death.** v. 42, n. 2, 2009.

UEYAMA, J.; HARADA, K. H.; KOIZUMI, A.; SUGIURA, Y.; KONDO, T.; SAITO, I.; KAMIJIMA, M. **Concentrations in Japanese Women Between 1994 and 2011.** Environmental Science & Technology, 2015.

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

VIEIRA, C. E. D.; PÉREZ, M. R.; ACAYABA, R. D.; RAIMUNDO, C. C. M.; MARTINEZ, C. B. DOS R. **DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish Prochilodus lineatus.** Chemosphere, v. 195, p. 125–134, 2018.

WANG, Y.; YANG, R.; ZHENG, J.; SHEN, Z.; XU, X. **Exogenous foliar application of fulvic acid alleviate cadmium toxicity in lettuce (Lactuca sativa L).** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 167, n. August 2018, p. 10–19, 2019.

WOLD, S.; ESBENSEN, K. I. M.; GELADI, P. **Principal Component Analysis.** v. 2, p. 37–52, 1987.

WOODCOCK, B. A.; ISAAC, N. J. B.; BULLOCK, J. M.; ROY, D. B.; GARTHWAITE, D. G.; CROWE, A.; PYWELL, R. F. **population changes in wild bees in England.** Nature Communications, v. 7, p. 1–8, 2016.

WU, M.; CHANG, Y.; LU, K.; YANG, E. **Gene expression changes in honey bees induced by sublethal imidacloprid exposure during the larval stage.** Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 88, p. 12–20, 2017.

XIAO, Z.; CODLING, E. E.; LUO, Y.; NOU, X.; LESTER, G. E.; WANG, Q. **Microgreens of Brassicaceae: Mineral composition and content of 30 varieties.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 49, p. 87–93, 2016.

ZHANG, H.; ZHU, L.; HU, H.; ZHENG, K.; JIN, Q. **Monitoring Leaf Chlorophyll Fluorescence with Spectral Reflectance in Rice (*Oryza sativa* L .).** Procedia Engineering, v. 15, p. 4403–4408, 2011.