

**Universidade Federal do Piauí**

**Avaliação tóxica e citogenotóxica de bioestimulantes  
vegetais em *Allium cepa* L. e *Artemia salina* L.**

**Tamires de Sousa Silva**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina  
2018**



**Tamires de Sousa Silva**  
**Licenciada em Ciências Biológicas**

**Avaliação tóxica e citogenotóxica de bioestimulantes  
vegetais em *Allium cepa* L. e *Artemia salina* L.**

Orientadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Paula Peron**

Coorientador:

**Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, área de concentração em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de “Mestre”.

**Teresina**  
**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**S586a** Silva, Tamires de Sousa  
Avaliação tóxica e citogenotóxica de bioestimulantes vegetais  
em *Allium cepa* L. e *Artemia salina* L. / Tamires de Sousa Silva  
- 2018.  
51 f. : il.

Dissertação ( Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pro-  
grama de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Teresina,  
2018.

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron  
Co-orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida

1. Toxicologia 2. Forth® 3. Aminon® 4. Ácido indolbutírico 5.  
Agricultura I. Título

**CDD 615.9**

Avaliação tóxica e citogenotóxica de bioestimulantes vegetais em *Allium cepa*  
L. e *Artemia salina* L.

Tamires de Sousa Silva

Licenciada em Ciências Biológicas

Aprovada em 30/08/2018

Comissão Julgadora:



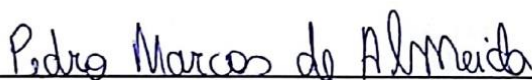
---

Profa. Dra. Francielle Aline Martins - UESPI



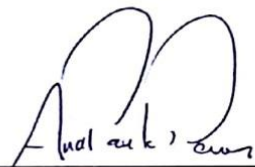
---

Profa. Dra. Verônica Brito da Silva - CCA/UFPI



---

Prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida - UESPI  
(Coorientador)



---

Profa. Dra. Ana Paula Peron - UTFPR  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por estar sempre presente na minha vida, me guiando e fortalecendo, tornando tudo possível.

Ao meu esposo, Elnathan da Silva Martins, pela compreensão nos momentos de ausência e sempre acreditar mais que todos em meu potencial para alcançar mais um degrau na minha formação.

Aos meus pais, Rita de Cássia Sousa Costa e José Luis de Sousa Silva, e aos meus queridos irmãos, Thais Sousa Silva e Thyago de Sousa Silva e toda minha família por todo apoio e confiança em mim depositada, o que tornou possível a realização deste projeto.

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup>: Ana Paula Peron, pela oportunidade, ensinamento e compreensão, auxiliando-me no desenvolvimento da pesquisa e elaboração da dissertação.

A meu Coorientador, Professor Dr. Pedro Marcos de Almeida, pela orientação e sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Professora Dr<sup>a</sup> Lidiane de Lima Feitoza, por ter me apoiado ao ceder espaço e tempo disponíveis para a realização de parte deste trabalho.

Ao Professor Dr. Raimundo Nonato Oliveira Silva, pelo auxílio e conhecimento prestado.

Aos membros da banca, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron, prof. Dr. Pedro Marcos de Almeida, prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Verônica Brito da Silva e prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Francielle Alline Martins que prontamente aceitaram o convite e também pelas valiosas contribuições.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e melhoramento da Universidade Federal do Piauí (UFPI), bem como ao corpo docente, por terem contribuído para minha formação.

À minha grande amiga mestranda, Ana Paula Soares e Silva, pela contribuição com seus conhecimentos, pelo companheirismo, pela grandiosa ajuda nos experimentos, madrugadas no laboratório e pela verdadeira amizade.

À agência de fomento CAPES pela bolsa de estudos durante boa parte do curso.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa 1 no campus de Picos (UFPI), Fabelina Karollyne Silva dos Santos, Maria Eduarda Sousa Silva, Clarice Moura Guedes e Michele Vieira da Silva Lima, pelos dias divertidos, pela grandiosa ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais no campus de Teresina (UFPI), Bruna Maria Prado da Silva e Thales Eduardo Galdino Andrade, pelo apoio e amizade.

Ao grupo de pesquisa e estudos do Laboratório de Genética (UESPI) pelas generosas contribuições e apoio no projeto de pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma forma, auxiliaram-me na concretização de mais um sonho...

Muito Obrigada!!!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE QUADROS.....</b>	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
2.1 Bioestimulantes vegetais .....	14
2.1.1 Bioestimulante com a mesma base do Forth® .....	16
2.1.2 Bioestimulantes com a mesma base do AIB.....	17
2.1.3 Bioestimulantes com a mesma base do Aminon®.....	18
2.2 Regulamentação técnica dos bioestimulantes .....	20
2.3 Bioensaios .....	22
2.3.1 Sistema teste <i>Artemia salina</i> L. ....	22
2.3.2 Sistema teste <i>Allium cepa</i> L.....	23
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 Compostos testados, local e período .....	27
3.2 Determinação das concentrações para <i>Artemia salina</i> .....	27
3.3 Bioensaio <i>Artemia salina</i> .....	28
3.4 Determinação das concentrações para <i>Allium cepa</i> .....	29
3.5 Bioensaio <i>Allium cepa</i> .....	30
3.6 Análise estatística .....	31
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>32</b>
4.1 <i>Artemia salina</i> .....	32
4.2 <i>Allium cepa</i> .....	35
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>



## RESUMO

SILVA, T. S. **Avaliação tóxica e citogenotóxica de bioestimulantes vegetais em *Allium cepa* L. e *Artemia salina* L.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2018.

Bioestimulantes vegetais são produtos comerciais ou não que quando aplicados em plantas estimulam os processos naturais para melhorar a absorção e a eficiência de nutrientes, a tolerância ao estresse abiótico e a qualidade das culturas. Apesar da eficiência que os bioestimulantes promovem na agricultura, não há estudos de avaliação de efeitos de toxicidade, citogenotoxicidade sobre os mesmos. Assim os produtos bioestimulantes Ácido indolbutírico (AIB), Forth® e Aminon® foram avaliados quanto aos potenciais tóxico, citogenotóxico em dois bioensaios padrão nos estudos toxicogenéticos, os sistemas testes *Allium cepa* e *Artemia salina*, em 24 e 48 horas de exposição. Foram avaliadas as concentrações 50; 100; 150 e 200 g/L do produto AIB, 0,5; 1; 2 e 4 mL/L do Forth®, e 0,5; 1; 5 e 10 mL/L do Aminon® em meristemas radiculares de *A. cepa*. Após a exposição as soluções bioestimulantes, as raízes foram fixadas, hidrolisadas, coradas e analisadas em microscópio óptico. O intervalo das concentrações 125.000 a 30,58 ppm de AIB; 15,625 a 0,061 ppm de Forth®; e 31,25 a 0,122 ppm de Aminon® foram usadas para avaliação tóxica em *A. salina*. Após a exposição foram contabilizadas as *A. salina* vivas e mortas. Para detectar diferenças estatísticas entre os tempos de exposição foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn, considerando significativo (\*  $p < 0,05$ ), no bioensaio *A. cepa*. Para a análise da toxicidade em *A. salina* o método de regressão linear foi usado, considerando significativo  $p < 0,05$ . Em *A. cepa* o produto Forth® reduziu significativamente o IM em todas as concentrações, diferentemente AIB induziu um aumento significativo do IM em todas as concentrações, assim como para Aminon® que na concentração 5 mL/L, em 48 horas, e para 10mL/L nos dois tempos de exposição também induziu aumento significativo em relação ao controle. Em relação à genotoxicidade, nesse estudo não foram encontrados alterações cromossômicas significativas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos três bioestimulantes. A análise em *A. salina* mostrou que os três bioestimulantes são tóxicos e causaram 100%, de mortalidade a partir das concentrações 125.000; 7,81 e 3,9 ppm em AIB, Forth® e Aminon®, respectivamente. Esses resultados demonstram os efeitos toxicogenéticos desses produtos, comumente usados em produções agrícolas, relatando dessa forma os riscos ao usar tais produtos nas concentrações testadas nesse estudo.

**Palavras-chave:** Forth®, Aminon®, ácido indolbutírico, agricultura, toxicologia.

## ABSTRACT

SILVA, T. S. **Toxic and cytogenotoxic evaluation of vegetable biostimulants in *Allium cepa* L. and *Artemia salina* L.** Dissertation (Master in Genetics and Improvement), UFPI, Teresina, 2018.

Plant biostimulants are commercial or non-commercial products that when applied to plants stimulate natural processes to improve nutrient uptake and efficiency, abiotic stress tolerance and crop quality. Despite the efficiency that biostimulants promote in agriculture, there aren't studies evaluating the effects of toxicity, cytogenotoxic on them. Thus, the biostimulating products Indolbutyric Acid (AIB), Forth® and Aminon® were evaluated for toxic, cytogenotoxic potentials in two standard bioassays in the toxicogenic studies, the *Allium cepa* and *Artemia salina* test systems, at 24 and 48 hours of exposure. The concentrations 50 were evaluated; 100; 150 and 200g / L of product AIB, 0.5; 1; 2 and 4 mL / L of Forth®, and 0.5; 1; 5 and 10mL / L of Aminon® in *A. cepa* root meristems. After exposure to biostimulant solutions, the roots were fixed, hydrolyzed, stained and analyzed under an optical microscope. The concentration range 125,000 to 30.58 ppm AIB; 15.625 to 0.061 ppm Forth®; and 31.25 to 0.122 ppm Aminon® were used for toxic evaluation in *A. salina*. After exposure, live and dead *A. salina* were counted. In order to detect statistical differences between exposure times, Kruskal-Wallis non-parametric test with Dunn post-test, using a significant (\* p <0.05) test, in the bioassay *A. cepa*. For the analysis of toxicity in *A. salina* the linear regression method was used, considering p <0.05. In *A. cepa* the Forth® product significantly reduced MI at all concentrations, differently AIB induced a significant increase in MI at all concentrations, as well as for Aminon® at 5 mL / L in 48 hours, and at 10 mL / L in both exposure times also induced a significant increase over the control. Regarding genotoxicity, in this study no significant chromosomal changes were found in meristematic cells of *A. cepa* exposed to the three biostimulants. The analysis in *A. salina* showed that the three biostimulants are toxic, and caused 100% mortality from the 125,000; 7.81 and 3.9 ppm concentrations in AIB, Forth® and Aminon®, respectively. These results demonstrate the toxicogenic effects of these products, commonly used in agricultural production, thus reporting the risks of using such products at the concentrations tested in that study.

**Key words:** Forth®, Aminon®, indolebutyric acid, agriculture, toxicology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Alterações celulares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A: interfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: interfase com broto nuclear; G: interfase com micronúcleo; H: prófase com broto nuclear (cabeça de seta) e micronúcleo (seta); I: prófase com micronúcleo; J: núcleo lobulado; K: célula binucleada; L: anáfase com ponte cromossômica; M: anáfase com quebra cromossômica; N: anáfase com quebra cromossômica; O: telófase com ponte e diferentes tamanhos de quebras (seta e ponta de flecha); P: telófase com cromossomo retardatário; Q: metáfase com aderência cromossômica; R: metáfase poliploide; S-T: C-metáfase. Fonte: ANACLETO, ROBERTO, MARIN-MORALES, 2017.....pag 25.

**Figura 2.** Toxicidade dos bioestimulantes Forth® (A e B), AIB (C e D) e Aminon® (E e F) em *A. salina*. TE: Tempo de exposição.....pag 33.

**Figura 3.** Percentuais de cada fase de divisão celular em relação aos tempos de exposição/concentrações avaliadas em *A. cepa* para os bioestimulante testados. TE0: tempo de exposição 0 horas, TE24: tempo de exposição 24 horas e TE48: tempo de exposição 48 horas.....pag 39.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos bioestimulantes Forth®, AIB e Aminon®.....pag 35.

**Tabela 2** – Índices de alterações cromossômicas observadas em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos bioestimulantes Forth®, AIB e Aminon®.....pag 41.

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1.** Diluições dos três bioestimulantes usadas no bioensaio com *A. salina*.....pag 28.

**Quadro 2.** Concentrações dos três bioestimulantes usadas no bioensaio com *A. cepa*.....pag 30.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção agrícola torna-se cada vez mais eficiente ao longo dos anos, para suprir a demanda alimentícia exigida pelo crescimento da população mundial frente a problemas ambientais, como empobrecimento de solos e escassez de água. Nesse contexto, o uso de bioestimulantes é enfatizado para minimizar os efeitos que o estresse ambiental causa nos vegetais. Entre os benefícios desses produtos estão a ausência de agrotóxicos e a promoção de alta produtividade das cultivares (CALVO; NELSON; KLOEPPER, 2014).

Os bioestimulantes são produtos definidas como substâncias, produtos microbianos vivos ou materiais com a capacidade de modificar de forma benéfica o crescimento das plantas (SAA et al., 2015). Esses produtos podem ser utilizados tanto no tratamento de sementes como no sulco de semeadura e/ou em pulverizações foliares, possuem ações similares às dos grupos de reguladores vegetais naturalmente produzidos pelas plantas que são as citocininas, giberelinas, auxina e etileno (VAN OOSTEN et al., 2017). Uma vez que uma planta detecta uma situação de adversidade ambiental, os bioestimulantes auxiliam nos mecanismos de tolerância ao estresse vegetal (PETROZZA et al., 2014).

Entre os bioestimulantes comerciais cita-se as formulações baseadas em algas marinhas como o produto Forth® (indicado para plantações em jardins, transplante, plantação de mudas, estaquias, e outros tratamentos culturais); os produtos de natureza fundamentalmente orgânica que destina-se à aplicação na parte aérea das plantas como o Aminon®; e a substância hormonal do tipo auxina, o ácido indolbutírico (AIB), indicado para auxiliar o processo de enraizamento de plantas. Porém, no Brasil não há legislação que regulamente os bioestimulantes, e esses produtos são comercializados como fertilizantes, amparados pelo Decreto número 8.384 de 2014. Por definição fertilizantes são produtos que contêm nutrientes para as plantas, como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K); já os bioestimulantes são formulações que estimulam os processos naturais para facilitar a absorção de nutrientes principalmente em situação de estresse abiótico (TANAKA et al., 2003; DU JARDIN, 2015).

Apesar dos bioestimulantes promoverem o desenvolvimento das plantas, não foram identificados estudos de avaliação toxicológica para esses produtos, o que

justifica a utilização de bioensaios que avaliam a toxicidade e citogenotoxicidade dos mesmos. A *Artemia salina* L. (camarão de salmoura), um microcrustáceo da ordem Anostraca utilizado como bioindicador de toxicidade, e tem como vantagem a simplicidade de manuseio, rapidez dos ensaios e baixo custo (ROSA et al., 2016; CANSIAN et al., 2017). Este ensaio permite a avaliação de efeitos tóxicos, sendo considerado essencial como bioensaio no estudo de compostos com potencial atividade biológica (PAREDES et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Outro organismo teste relevante em estudos toxicológicos é o *Allium cepa* L. (cebola) que é um importante organismo-teste em avaliações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de compostos químicos (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Este bioensaio é considerado eficiente principalmente por apresentar número cromossômico reduzido ( $2n=16$ ), o que permite a detecção de distúrbios no índice de proliferação celular, e de alterações celulares (NEVES et al., 2014; DORNELLES et al., 2017).

Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial tóxico e citogenotóxico de três bioestimulantes comerciais: Forth®, AIB e Aminon®, em náuplios de *A. salina* e em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Bioestimulantes vegetais

A manutenção dos sistemas produtivos, especialmente com o objetivo de diminuir custos e aumentar a viabilidade de cultivo em regiões com algum tipo de déficit ambiental, como o déficit hídrico, são essenciais. Entre as técnicas empregadas na produção vegetal, destacam-se: aplicação de nutrientes e reguladores vegetais, produção de novas cultivares, irrigação e plantio direto (OLIVEIRA et al., 2015).

O uso conjunto de produtos contendo reguladores vegetais como aqueles constituídos de compostos orgânicos e/ou inorgânicos representam uma alternativa viável quando se objetiva aumento na produtividade vegetal (BERNARDES; SILVEIRA; MESQUITA, 2010). Esses reguladores são eficientes quando aplicados em baixas doses. Alteram processos metabólicos e fisiológicos vegetais, ampliam a absorção e eficiência dos nutrientes e, conseqüentemente, a produtividade das culturas, além de diminuir perdas em condições ambientais limitantes (DU JARDIN, 2015), auxiliando a recuperação da planta de forma mais rápida após período de estresse hídrico, confere maior resistência a insetos, pragas e doenças e estimula o desenvolvimento radicular (LANA et al., 2009).

Assim, os reguladores de crescimento vegetal têm obtido atenção especial no agronegócio, conforme as técnicas de cultivo avançam. Dentre os reguladores de crescimento, os bioestimulantes de plantas são substâncias diversas que podem ser adicionadas ao ambiente de cultivo de uma planta obtendo efeitos positivos sobre o crescimento, a nutrição e a tolerância ao estresse abiótico e biótico das mesmas (BINSFELD et al., 2014; DU JARDIN, 2015; VAN OOSTEN et al., 2017). Os bioestimulantes são utilizados para que haja menor demanda de nutrientes, e a planta suportar funções relacionadas ao estresse e assim mais nutrientes possam ser usados no suporte de funções como crescimento da planta (BROWN; SAA, 2015). Os bioestimulantes também são indicados para estimular o crescimento de bactérias e fungos favoráveis ao desenvolvimento da planta (POLO; MATA, 2018).

Pesquisas tentaram identificar a forma de ação dos bioestimulantes, mas relataram dificuldade em elucidar todo o seu potencial sob condições ambientais



diferentes (KHAN et al., 2009; ROSE et al., 2014). Assim, o conhecimento sobre o modo de ação dos bioestimulantes nos processos metabólicos das plantas são incipientes até o momento.

Tal condição é uma consequência da diversidade de substâncias no produto final, o que na maioria dos casos conterà um número significativo de moléculas não caracterizadas pelo fabricante. Como os bioestimulantes são provenientes de uma soma diversificada de materiais biológicos e inorgânicos, abrangendo fermentações microbianas de matéria orgânica animal ou vegetal, culturas microbianas vivas, macro e microalga, hidrolisado de proteínas, substâncias húmicas e fulvas, estrumes, alimentos e resíduos industriais, utilizando processos diferentes de fabricação (CALVO; NELSON; KLOEPFER, 2014), é incoerente reconhecer que existe um único modo de ação dessa classe de produtos agrícolas.

Entre as formulações comerciais três bioestimulantes se destacam: Forth®, AIB e Aminon®. Tais produtos são utilizados para aumentar a produtividade de culturas, como Marmeleiros “Japonês e Portugal” (*Cydonia oblonga* e *Chaenomeles sinensis* L.) (CHALFUN et al., 2007), Araçazeiro vermelho (*Psidium cattleianum* Sabine L.) (HOSSEL et al., 2017), Eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) (LANA et al., 2008), Gabirobeiras (*Campomanesia adamantium* e *C. pubescens*) (PEREIRA et al., 2017), Tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) (TANAKA et al., 2003) e Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L. cultivar IAC- Carioca) (SILVA et al., 2009).

O bioestimulante AIB é um hormônio vegetal do tipo auxina, essa substância auxilia o enraizamento de plantas. O produto comercial Aminon®, composto de ureia, água, hidróxido de potássio, aditivo gelatina e matéria orgânica oriunda do processo de produção do glutamato monossódico e amido de cereais além da adição de nitrogênio, óxido de potássio, soma de N, K e carbono orgânico, esse produto estimula o metabolismo da planta, proporcionando uma nutrição mais equilibrada e tornando-a menos vulnerável ao ataque de pragas e doenças. E o bioestimulante Forth® constituído de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, boro, molibdênio, zinco, carbono orgânico, extrato de algas marinhas, *Ascophyllum nodosum*, e elementos derivados de nitratos, fosfatos, sulfatos e micro elementos, e sua função é favorecer a formação de raízes.

Essas formulações de bioestimulantes podem ser classificadas em quatro grupos a partir de sua composição: 1) extratos de algas; 2) carboidratos, proteínas,

aminoácidos e lipídios; 3) ácidos húmicos e fúlvicos; e 4) microrganismos que afetam a tolerância ao estresse (VAN OOSTEM et al., 2017).

### 2.1.1 Bioestimulante com a mesma base do Forth®

Os bioestimulantes contendo extratos de algas marinhas (EAM) são formulações comerciais como o Forth®, com o potencial de promover o crescimento das plantas e melhorar a tolerância à salinidade, ao calor e à seca. As algas marinhas usadas são macroalgas vermelhas, verdes e marrons que representam 10% da produtividade marinha (BATTACHARYYA et al., 2015). As macroalgas têm sido usadas como fertilizantes orgânicos há milhares de anos (CRAIGIE, 2011). Existem mais de 47 empresas produtoras e comercializadoras de diversos extratos de algas para uso agrícola; a maioria das formulações é da alga marrom, *Ascophyllum nodosum* (SHARMA et al., 2014), e *Durvillaea potatorum*, e de macroalgas vermelhas *Lithothamnium calcareum* (KHAN et al., 2009).

Apesar dos efeitos promotores de crescimento dos EAM em muitas espécies, os mecanismos que desencadeiam esses efeitos não são conhecidos até o momento (VERKLEIJ, 1992; BATTACHARYYA et al., 2015). A natureza heterogênea e complexa desses bioestimulantes dificulta a determinação real de quais substâncias desempenham um papel fundamental no desenvolvimento das plantas.

Goñi et al. (2016) avaliaram dois bioestimulantes de extratos comerciais de *A. nodosum* em um estudo transcriptômico utilizando plantas de *Arabidopsis thaliana*, mostraram que nem todos os extratos produzem os mesmos efeitos na planta. Um dos produtos resultou em desregulação de 4,47% do transcriptoma, e o outro extrato afetou apenas 0,87% do transcriptoma de *A. thaliana*. Uma vez que a iniciação transcricional é provavelmente um componente chave no aumento da tolerância ao estresse abiótico usando EAMs, essas diferenças implicam em uma variabilidade significativa nas respostas apresentadas. Os extratos diferiram, mostrando que a escolha do produto comercial pode ter um efeito significativo nas respostas da planta. Com isso, devem ser realizadas análises em componentes ativos desses produtos para identificar e caracterizar como esses EAMs afetam as plantas, bem como sua toxicidade.

Os efeitos desses tipos de bioestimulantes em plantas foram evidenciados

para diversas culturas, sendo destacada sua atividade direta sobre microrganismos fitopatogênicos, o seu potencial na indução de resistência de vegetais contra patógenos e na melhoria da qualidade fisiológica da planta tratada (COSOVEANU; AXINE; IACOMI, 2010; CRAIGIE, 2011; JAYARAMAN; NORRIE; PUNJA, 2011). Porém doses elevadas de EAM demonstraram efeito contrário causando toxidade ao meio e fazendo com que haja redução do crescimento radicular (SOUZA et al., 2017).

A toxidade de amostras de 19 espécies de algas marinhas foi avaliada em *A. salina*. E em quase todas houve toxidade significativa em pelo menos uma das 3 concentrações testadas, sendo o grupo de algas vermelhas (*Rhodophyta*) o mais tóxico nesse bioensaio (LHULLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006). Porém, nesse estudo não foram avaliadas as principais espécies usadas na composição dos bioestimulantes, como *A. nodosum* contida no Forth®.

#### 2.1.2 Bioestimulantes com a mesma base do AIB

Os hidrolisados de proteínas (HP) são misturas de polipeptídeos, oligopeptídeos e aminoácidos livres provenientes da hidrólise parcial de subprodutos agrícolas de origem animal e de planta (COLLA et al., 2014). Os efeitos dos aminoácidos no fluxo iônico em membranas celulares vegetais foram estabelecidos. A maioria tem um efeito positivo na redução do fluxo de potássio induzido por NaCl (CUIN; SHABALA, 2007), auxiliando a planta a se desenvolver melhor em casos de estresse salino.

Os bioestimulantes contendo hidrolisados proteicos são frequentemente vendidos como formulações que incluem reguladores de crescimento de plantas, como AIB (COLLA et al., 2014). Quando os bioestimulantes à base de hidrolisados de alfafa (*Medicago sativa* L.), contendo triacontanol e ácido indol-3-acético (IAA), foram aplicados em plantas de milho sob estresse salino, obteve-se uma resposta positiva das plantas em relação ao estresse promovido, pois as plantas tratadas apresentaram maior teor de flavonóides, prolina e potássio nas condições em relação aos controles não tratados (ERTANI et al., 2013). A alface (*Lactuca sativa* L.) sensível ao estresse salino, também melhorou a produção fresca, a biomassa seca e o peso seco das raízes, assim como aumentou as concentrações de osmoletos,

glicosinolatos e a composição de esteróis e terpenos promovidos pela adição de hidrolisados proteicos derivados de plantas (LUCINI et al., 2015).

Em *Lolium perenne* L., uma gramínea forrageira, cultivada com bioestimulantes a base de aminoácidos hidrolisados em situação de estresse, apresentou melhor eficiência fotossintética em relação às plantas controle (BOTTA, 2012). Posmyk e Szafrńska (2016) relataram que a melatonina, derivada do triptofano, pode tornar sementes tolerantes às condições ambientais adversas no estágio de germinação. Sementes de milho pré-tratadas com melatonina apresentam maior tolerância ao estresse pelo frio após a germinação, indicando um efeito protetor pela melatonina (KOŁODZIEJCZYK et al., 2016). A melatonina revela-se um bioestimulante eficaz para melhorar a tolerância ao estresse das plântulas. No entanto, apesar desses bioestimulantes aumentarem a produtividade vegetal, é escasso o número de estudos de avaliação da toxicidade sobre eles.

Uma avaliação citotóxica de hidrolisados proteicos do músculo e do resíduo do bijupirá (*Rachycentron canadum*) usados na alimentação apresentou resultados não citotóxicos às células de hepatócitos de zebrafish (*Danio rerio*) peixe-zebra (FONSECA, 2014). Porém avaliações citotóxicas de hidrolisados proteicos que fazem parte da composição de bioestimulante não são encontrados na literatura, dessa forma, verifica-se relevância na realização de estudos de avaliação de toxicidade dessa classe de produtos agrícolas.

### 2.1.3 Bioestimulantes com a mesma base do Aminon®

As substâncias húmicas e fúlvicas são os principais componentes orgânicos do solo. Os ácidos húmicos e fúlvicos são produzidos pela biodegradação da matéria orgânica resultando em uma mistura de ácidos contendo grupos fenolato e carboxila, a soma de ambos os ácidos formam o composto húmico. Os ácidos fúlvicos possuem maior teor de oxigênio e menor peso molecular (BULGARI et al., 2015). Aminon® também possui essas substâncias em sua composição através da presença de matéria orgânica.

O pré-tratamento da festuca (*Schrössus arundinaceae* Schreb) e do capim-crespo (*Agrostis palustris* Huds. A.) com bioestimulante a base de extrato de algas marinhas e ácido húmico aumentaram a hidratação foliar em solo seco, crescimento

de raízes, crescimento de brotos e capacidade antioxidante (ZHANG et al., 2002; ZHANG; ERVIN, 2008). Outros estudos com capim-bravo mostraram que esses extratos, ricos em citocininas, combinados com ácido húmico, aumentaram a tolerância à seca, bem como o conteúdo endógeno de citocinina (ZHANG; ERVIN, 2004).

Bioestimulantes a base de substâncias húmicas e fúlvicas podem ser benéficos também para as monocotiledôneas. Extratos de vermicomposto aplicados ao arroz (*Oryza sativa* L.) desempenharam um papel na ativação da função enzimática antioxidante e no aumento de enzimas de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas enzimas são necessárias para inativar os radicais livres de oxigênio tóxicos produzidos em plantas sob estresse hídrico e salino (GARCÍA et al., 2012). Um possível modo de ação do vermicomposto pode ser a regulação diferencial de prótons ATPases localizadas nas membranas vacuolar e plasmática (VAN OOSTEN et al., 2017).

Quando plantas de microtomates foram tratadas com esses bioestimulantes, a extrusão de prótons na membrana plasmática aumentou mais de 40%, o que facilitou o potencial de absorção de nutrientes, promovida pela ação bioestimulante. Porém, o mutante dessa planta insensível à auxina não apresentou aumento na extrusão de prótons, indicando que a substância húmica pode aumentar o crescimento radicular através da mediação da sinalização das auxinas (ZANDONADI et al., 2016).

No entanto, no estudo do acompanhamento químico da vermicompostagem de lodo de esgoto doméstico, muito usado como substrato bioestimulante, observou-se que minhocas contidas no solo apresentaram uma tendência a se atrofiar, isso devido à alteração no valor do pH nos primeiros dias, causando um processo de toxicidade crônica nesses organismos (DORES-SILVA; LANDGRAF; REZENDE, 2011).

Na literatura científica não há estudos que avaliam efeitos, como a toxicidade e a citogenotoxicidade nos sistema teste *A. cepa* e *A. salina* dos bioestimulantes, e a ausência desses estudos tem por consequência a falta de regulamentação técnica de produtos bioestimulantes.

## 2.2 Regulamentação técnica dos bioestimulantes

Para os quatro tipos de bioestimulantes tem-se a comprovação do potencial produtivo, ou seja, de desenvolvimento das plantas, principalmente sob condições de estresse ambiental. Mostrando assim que os bioestimulantes promovem um maior desenvolvimento radicular e da parte aérea das plantas.

Porém, como não há uma regulamentação específica para esses produtos mundialmente, os bioestimulantes são vendidos como fertilizantes. Há uma diferença entre esses dois produtos, por definição fertilizantes são produtos que contêm nutrientes para as plantas, como N, P e K; e bioestimulantes são formulações que estimulam os processos naturais para facilitar a absorção de nutrientes principalmente em situação de estresse abiótico (TANAKA et al, 2003). Alguns produtos são, portanto, inseridos no mercado sem a devida regulamentação técnica, ou seja, sem qualquer especificação que conste de um documento que defina as características de um produto. Com isso, no que diz respeito à segurança e à confiabilidade, o grupo de produtos bioestimulantes comercializados provocam preocupação quanto ao uso na agricultura orgânica (MATYJASZCZYK, 2018).

Na Europa esses produtos têm nomes diferentes e também não possuem regulamentação específica para bioestimulantes, sendo em alguns países vendidos como produtos fitofarmacêuticos, enquanto em outros países, como fertilizantes. Os processos regulamentares e os requisitos de dados para a comercialização desses produtos são altamente variáveis de um país para outro. Entre as determinações dos processos de regulamentação é exigido que produtos fitofarmacêuticos e fertilizantes não promovam quaisquer efeitos nocivos nos seres humanos, nos animais e no ambiente. A proposta é que esses produtos devem ocupar seu próprio espaço no mercado sendo denominadas "bioestimulantes de plantas" em toda Europa (LA TORRE; BATTAGLIA; CARADONIA, 2016).

O mesmo caso ocorre no Brasil, em que o Decreto número 8.384 de 2014 regulamenta a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura; em que não são mencionados os bioestimulantes, e os produtos com essa função também são vendidos no mercado brasileiro como fertilizantes.

Para que seja homologada uma regulamentação específica para bioestimulantes, dados sobre a eficácia comprovada e a segurança do produto nas condições prescritas para uso, identidade da substância, uso do produto, dados de toxicidade e rotulagem devem ser apresentados num dossiê à Agência Nacional de Saúde e Segurança dos países que se utilizam dos bioestimulantes (LA TORRE; BATTAGLIA; CARADONIA, 2016).

Há ainda uma série de composições não comerciais usadas como bioestimulantes na agricultura (JINDO et al., 2012; ERTANI et al., 2013; SANTOS; SANTOS; RODRÍGUEZ, 2017), com misturas de substâncias que podem ser adquiridas sem restrição por sites de empresas comerciais e matéria orgânica.

Portanto os bioestimulantes constituem um produto final heterogêneo, com potenciais atividades toxicogénicas não avaliadas em estudos até a presente data. Dessa forma, verifica-se relevância na realização de estudos de avaliações toxicogénicas, por meio de diferentes bioensaios, para a determinação do potencial tóxico, citogenotóxicos de produtos com ação bioestimulante em plantas.

## 2.3 Bioensaios

### 2.3.1 Sistema teste *Artemia salina* L.

No desenvolvimento de produtos comerciais em que possa haver contaminação do ambiente, a atividade de um composto deve ser comparada em vários sistemas testes para avaliar possíveis efeitos tóxicos. Os testes usados na avaliação, preferencialmente, devem ser simples, rápidos e específicos para o tipo de atividade biológica a investigar. Porém a comunidade científica exige a diminuição do número de vertebrados usados em testes de toxicologia e sua substituição parcial com animais invertebrados, plantas ou mesmo órgãos, tecidos ou culturas de células (DVORAK; BENOVA; VITEK, 2012).

O uso de invertebrados como bioindicadores ou bioacumuladores foi implementado em pesquisas antes do uso de testes mais específicos, porém sua aplicação é complementar e envolve, dentre os resultados primários, a avaliação da toxicidade dos compostos testados (KANWAR, 2007; ZHU et al., 2017). Avaliações toxicológicas são importantes ferramentas para o controle, regulamentação e classificação das substâncias tóxicas quanto ao seu potencial de risco ao ambiente.

A *Artemia salina* é um microcrustáceo que habita ecossistemas aquáticos salinos e marinhos desempenhando um papel fundamental no fluxo de energia da cadeia alimentar marinha (NUNES et al., 2006; ZHU et al., 2017).

Entre as principais vantagens do uso deste invertebrado em testes de toxicidade são: a sua distribuição mundial (LAVTIZAR et al., 2018), a rapidez (isto é, 28-72 h desde a eclosão até o final do experimento); o custo-benefício; a disponibilidade de larvas nascidas de cistos duradouros (ovos), não necessitando de cultura (NUNES et al., 2006; MANFRA et al., 2012); o bom conhecimento de sua biologia e ecologia; a fácil manipulação e manutenção sob condições de laboratório; e a alta adaptabilidade a várias condições de teste (NUNES et al., 2006; LIBRALATO et al., 2016). Assim esse organismo é muito utilizado como bioindicador e biomonitor da qualidade da água, como por exemplo, na determinação da toxicidade da água do riacho Cavouco em Pernambuco, Brasil (FREITAS et al., 2016).

Este bioensaio da letalidade sobre *A. salina* também é indicado em avaliações de toxicidade aguda em extratos de plantas, portanto, é considerado



relevante como bioensaio complementar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al, 2000). Silva et al. (2016) realizaram inicialmente a avaliação do extrato etanólico da casca do caule de *Parahancornia amapa* em larvas de *A. salina*, onde foi indicado a não toxicidade, corroborando com a análise posterior com ratos Wistar (machos e fêmeas). Parra et al. (2001) também indicam o teste da *A. salina* como sendo útil para predizer a toxicidade *in vivo*, já que os testes de 20 extratos de plantas cubanas apresentaram uma boa correlação entre o estudo em *A. salina* e em ratos.

Porém, o ensaio com invertebrados não é de uso exclusivo como pré-avaliação no estudo farmacêutico e toxicológico de extratos vegetais e substâncias puras naturais e sintéticas. Rajabi et al. (2015) objetivaram avaliar o teste de *A. salina* em comparação com o ensaio MTT (Ensaio de captação do corante Tetrazolium) na avaliação da citotoxicidade de nanoestruturas, em razão do primeiro método citado ser mais rápido, eficaz e menos dispendioso. Ainda, a *A. salina* foi utilizada por Svensson et al. (2005) para testar a toxicidade de águas de chorume de diferentes aterros municipais contendo altas concentrações de íons cloreto, uma vez que esse microcrustáceo é um organismo tolerante a concentrações salinas. Nesse estudo verificou-se que a maior parte da toxicidade emanou dos componentes de amônia e íons amônio e/ou íons metálicos.

O ensaio da *A. salina* é, portanto, uma ferramenta útil na avaliação toxicológica de diversos produtos naturais, industrializados e resíduos, minimizando o uso de ensaios antitumorais mais caros ou em animais, em alguns casos. Também é usado em avaliações complementares à estudos mais específicos como o teste *A. cepa*.

### 2.3.2 Sistema teste *Allium cepa* L.

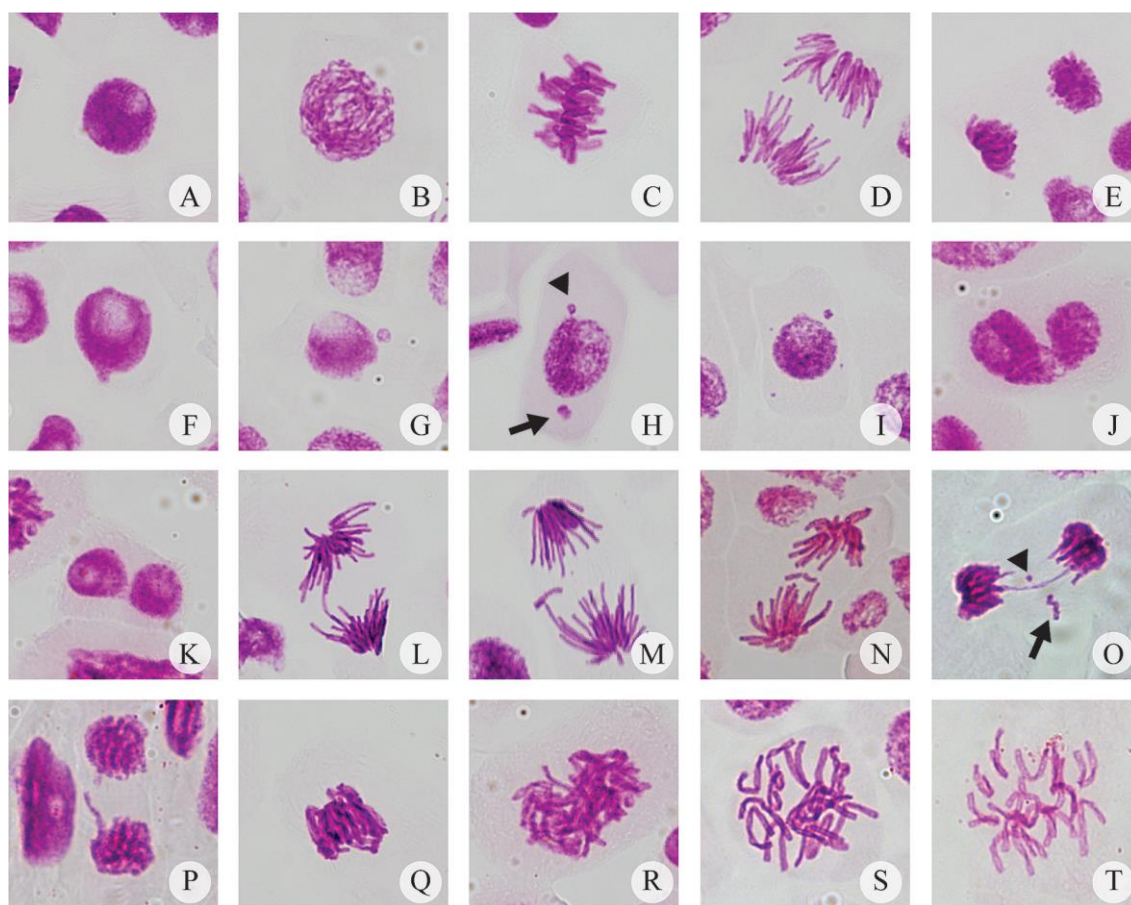
Testes de toxicidade utilizando o sistema-teste *Allium cepa* avaliam efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico indicando o seu uso como um teste para o monitoramento de compostos químicos (FACHINETTO et al., 2007).

*A. cepa* destaca-se em avaliações de toxicidade entre outras plantas por apresentar cromossomos maiores e em número reduzido ( $2n = 16$ ) o que favorece a detecção de alterações cromossômicas de origem clastogênica (quebras

cromossômicas) e/ou aneugênicas (alterações de fuso mitótico), e de distúrbios no índice proliferação celular (NEVES et al., 2014; BIANCHI; MANTOVANI; MARIN-MORALES, 2015) e elevada sensibilidade em detectar agentes químicos e ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). No sistema-teste os meristemas de raízes de *A. cepa*, são de fácil manuseio e apresenta-se como um bioindicador da genotoxicidade, tendo baixo custo, confiabilidade, auxiliando em estudos de prevenção de danos à saúde humana (BAGATINI et al., 2007).

Por ter sensibilidade precisa para análise de citogenotoxicidade da substância de interesse, este teste é internacionalmente aceito pelas agências de pesquisa como uma ferramenta de avaliação, uma vez que os resultados obtidos mostram uma similaridade satisfatória com aqueles obtidos por sistemas de testes em animais e culturas de células (VENTURA-CAMARGO; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2016; BEZERRA et al., 2016; SALES, et al., 2017).

O efeito citotóxico é avaliado através da verificação do índice mitótico, e tanto o aumento quanto a redução significativa revela potencial citotóxico. A genotoxicidade, por sua vez, é avaliada através da análise de células meristemáticas como alterações de fuso mitótico e cromossômicas (AC). Estas alterações podem ser resultantes de efeitos aneugênicos (C-metáfases, metáfase com aderências cromossômicas, perdas cromossômicas, anáfases multipolares, células binucleadas, metáfases poliploides, dentre outras) ou de efeitos clastogênicos (fragmentos cromossômicos e pontes cromossômicas) (LEME; MARIN-MORALES, 2009) (Figura 1).



**Figura 1.** Alterações celulares observadas pela análise de células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. A: interfase normal; B: prófase normal; C: metáfase normal; D: anáfase normal; E: telófase normal; F: interfase com broto nuclear; G: interfase com micronúcleo; H: prófase com broto nuclear (cabeça de seta) e micronúcleo (seta); I: prófase com micronúcleo; J: núcleo lobulado; K: célula binucleada; L: anáfase com ponte cromossômica; M: anáfase com quebra cromossômica; N: anáfase com quebra cromossômica; O: telófase com ponte e diferentes tamanhos de quebras (seta e ponta de flecha); P: telófase com cromossomo retardatório; Q: metáfase com aderência cromossômica; R: metáfase poliploide; S-T: C-metáfase. Fonte: ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017.

Ensaio com *A. cepa* têm sido utilizados nos estudos dos efeitos de extratos vegetais e infusões de plantas medicinais visando à detecção da citogenotoxicidade (AKINBORO et al., 2011; PING et al., 2012), assim como no monitoramento de contaminantes de água e do solo, os quais representam riscos diretos ou indiretos para a população humana (MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

Em avaliações de ambiente aquático usando os organismos *A. cepa* e *Oreochromis niloticus*, Barbosa et al. (2010) detectaram efeitos genotóxicos causados por metais pesados em ambos os testes. Ainda uma análise toxicogenética de rio apresentou efeitos citotóxicos, mutagênicos e genotóxicos em diferentes tempos de exposição e camadas de água (superfície e fundo), especialmente alterações nos defeitos do fuso mitótico, formações micronúcleos,

gemas nucleares e quebras da cadeia de DNA em células meristemáticas de *A. cepa* (MATOS et al., 2017).

Esse ensaio também foi eficiente na avaliação do leite integral UHT (*ultra-high temperature*) de seis empresas brasileiras, detectando o efeito significativo, frequência de alterações no fuso mitótico em células meristemáticas, caracterizando esses alimentos como genotóxicos e mutagênicos nas condições do estudo (CARVALHO; SALES; PERON, 2017).

O teste *A. cepa* mostrou-se eficiente na avaliação de pesticidas como carbamatos, onde o teste de toxicidade foi usado para determinar as concentrações do teste citogenotóxico (LIMAN et al., 2010); indicou efeitos citogenotóxicos de inseticida imidaclopride, herbicida sulfentrazone e sua mistura mesmo após período de recuperação (BIANCHI; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2016). Avaliou e identificou a redução dos efeitos toxicogenéticos de metais pesados contidos na torta de filtro de cana-de-açúcar, um resíduo rico em matéria orgânica e micronutrientes utilizado como fertilizante, após seis meses de biodegradação e associações com o solo e bagaço de cana-de-açúcar (ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017).

Assim o bioensaio em *A. cepa* é uma importante ferramenta para avaliações de diversos ambientes e composições de substâncias regulamentados e não regulamentados, porém, não há trabalhos com esse modelo em bioestimulantes, como AIB, Aminon® e Forth®.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Compostos testados, local e período

Os bioestimulantes vegetais, comercializados na forma líquida, Forth® e Aminon®, constituídos de um *mix* de substâncias; e o ácido indolbutírico (AIB) comercializado na forma em pó, foram obtidos de uma empresa especializada na venda nacional de produtos agrícolas localizada na cidade São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa 1, do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, localizado na cidade de Picos-PI. No período de Março a Setembro de 2017. Ainda uma parte final da leitura de lâminas ocorreu no Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais no campus Ministro Petrônio Portella em Teresina-PI, durante o mês de Outubro de 2017.

#### 3.2 Determinação das concentrações para *Artemia salina*

As diluições dos três bioestimulantes para *A. salina* foram selecionadas e definidas a partir de uma análise prévia de toxicidade nesse microcrustáceo, onde foram testadas concentrações recomendadas pelos fabricantes dos produtos, resultando em todos os microcrustáceos mortos. E a partir dessas, uma série de diluições foram realizadas com base no protocolo de Meyer et al., (1982) e testadas, selecionando para a análise a sequência a partir da diluição que foram observadas todas as *A. salina* mortas até a diluição onde identificou-se todas vivas (Quadro 1).

**Quadro 1.** Diluições dos três bioestimulantes usadas no bioensaio com *A. salina*.

<b>Bioestimulantes</b>	<b>Forth®</b>	<b>AIB*</b>	<b>Aminon®</b>
<b>Diluições (ppm)</b>	15,625	125.000	31,25
	7,81	62.500	15,625
	3,9	31.250	7,81
	1,95	15.625	3,9
	0,9766	7.812,50	1,95
	0,488	3.906,25	0,9766
	0,244	1.963,13	0,488
	0,122	976,56	0,244
	0,061	244,14	0,122
		122,07	
		61,04	
	30,58		

Fonte: Do autor. \*Ácido indolbutírico.

### 3.3 Bioensaio *Artemia salina*

Para a utilização do bioensaio em *A. salina*, utilizou-se a metodologia descrita por Meyer et al. (1982). A solução salina foi preparada utilizando-se sal marinho sintético e água deionizada (38 g de sal/litro de água), sendo esta dividida em duas partes, uma para a eclosão dos ovos e a outra para a preparação das diluições das substâncias-teste.

Em um litro de solução salina acondicionado em um aquário foi adicionado aproximadamente 80 mg de ovos de *A. salina*, submetidos a luz com lâmpada de 100 W, porém metade do aquário foi anteriormente envelopado com adesivo na cor preta (devido ao fototropismo positivo do microcrustáceo). O sistema foi mantido em temperatura ambiente por 48h, protegido de poeira e insetos e aerado com uso de aerador para aquário. O restante da solução salina foi acondicionado em outro recipiente e também submetido às mesmas condições de iluminação, temperatura e aeração.

Para cada diluição foram montadas triplicatas, sendo em cada tubo de ensaio adicionadas com auxílio de uma pipeta Pasteur e lupa, dez larvas de *A. salina* em sua fase náuplio e 3 mL da diluição a ser testada. O controle negativo foi realizado com 3 mL de solução salina. Os frascos foram distribuídos em uma bandeja e mantidos por 48h em temperatura e iluminação ambientes e protegidos de poeira e insetos.

Após 24h e 48h foi realizada a coleta de dados com auxílio de lupa, foco de luz e fundo escuro de contraste, identificando e quantificando os vivos e os mortos, considerando-se mortos aqueles microcrustáceos que não se movimentaram durante a observação e nem com a leve agitação do frasco após 10s.

### 3.4 Determinação das concentrações para *Allium cepa*

No rótulo do produto Forth®, sugere-se utilizar 5, 10 e 100 mL do produto para um litro de água nas respectivas situações: estaquia, alporquia e plantas recém plantadas. Portanto inicialmente as concentrações 1, 5, 25, e 100 mL/L foram definidas, porém as raízes de *A. cepa* não resistiram às três últimas concentrações, desintegrando-se. Com isso, novas concentrações foram determinadas: 0,5; 1; 2 e 4 mL/L.

Nas indicações de uso do AIB sugere-se utilizar puro ou por conveniência. Portanto, como esse produto é comercializado na forma em pó, para a avaliação foram determinadas as concentrações 50, 100, 150 e 200 g/L.

Em relação ao produto Aminon® a indicação no rótulo é de 0,5; 1 e 5 mL por litro de água. Assim essas três concentrações e também uma concentração maior, de 10 mL/L, foram definidas para análise (Quadro 2).

**Quadro 2.** Concentrações dos três bioestimulantes usadas no bioensaio com *A. cepa*.

<b>Bioestimulantes</b>	<b>Forth®</b> (mL/L)	<b>AIB*</b> (g/L)	<b>Aminon®</b> (mL/L)
<b>Concentrações</b>	0,5	50	0,5
	1,0	100	1,0
	2,0	150	5,0
	4,0	200	10,0

Fonte: Do autor. \*Ácido indolbutírico.

### 3.5 Bioensaio *Allium cepa*

Bulbos de *A. cepa* foram submetidos à germinação em água destilada à temperatura ambiente em laboratório até as radículas atingirem cerca de 2 cm de comprimento. Foram retiradas três raízes para servirem de controle do próprio bulbo (0h) e em seguida os mesmos foram colocados em contato com o material em estudo.

Para análise de cada concentração de bioestimulante foram utilizados cinco bulbos, e se considerou dois tempos de exposição, 24h e 48h, e para o controle positivo foi usado o Metil Metano Sulfonato (MMS  $4 \times 10^{-4}$  M) em 24h.

Após 24h e 48 h do tratamento, foram retiradas três raízes de cada bulbo e posteriormente o material foi fixado em metanol: ácido acético (3:1/ v:v) e estocadas a  $-4^{\circ}$  C, até o momento de confecção das lâminas.

Para a confecção das lâminas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada, de 5 min cada, e hidrolisadas a  $60^{\circ}$  C, por 10 min, em HCl 1N. Após a hidrólise, as raízes foram novamente lavadas em água destilada. Logo após as lâminas foram preparadas com auxílio de seringas e lupa para esmagamento das raízes e coradas com orceína acética 2%, cobertas com lamínulas e seladas com esmalte incolor.

A citotoxicidade e a genotoxicidade foram avaliadas pela contagem, em microscópio de luz (aumento de 400 x), de 5000 células meristemáticas (1000 células/por lâmina de um total de 05 lâminas analisadas, sendo uma lâmina por



bulbo). Foram avaliados: (1) o índice mitótico (citotoxicidade); (2) índice de alterações cromossômicas (genotoxicidade), incluindo C-metáfases, metáfases poliploides, metáfases com aderências, metáfases com perdas cromossômicas, perdas de cromossomos inteiros e pontes cromossômicas.

O potencial citotóxico foi determinado pelo índice mitótico (IM), na eq. ((1)):

$$(1) \quad IM = \frac{\text{Total de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

A avaliação do potencial genotóxico foi realizada por meio do índice de alteração cromossômica (IAC), pela eq. ((2)):

$$(2) \quad IAC = \frac{\text{Total de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Foram considerados citotóxicos e genotóxicos os valores de IM e IAC respectivamente, que diferiram significativamente do controle negativo.

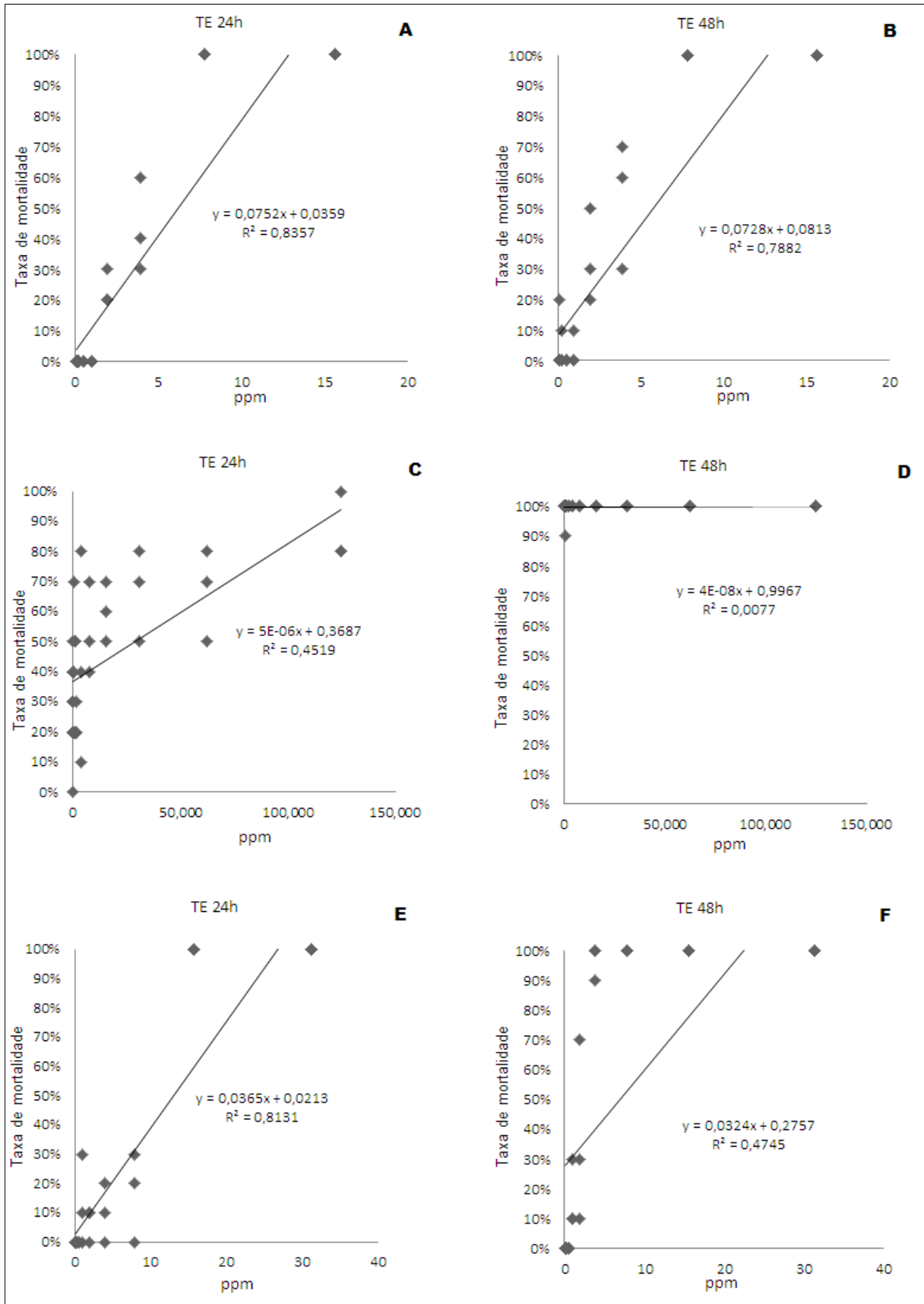
### 3.6 Análise estatística

Para a análise da toxicidade em *A. salina* o método de regressão linear foi usado. 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 foi analisada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn, considerando significativo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 *Artemia salina*

Os resultados para a toxicidade em *A. salina* mostram que os três bioestimulantes, em todas as concentrações analisadas, causaram mortalidades aos náuplios de *A. salina*, condição que se intensificou com o aumento do tempo de exposição (Figura 2). E, mesmo testado em *A. salina* concentrações mais baixas para os três bioestimulantes em relações ao bioensaio *A. cepa*, esses produtos apresentaram uma alta toxicidade. Assim, esses resultados corroboram aos resultados obtidos neste estudo para sistema-teste *A. cepa*.



**Figura 2.** Toxicidade dos bioestimulantes Forth® (A e B), AIB (C e D) e Aminon® (E e F) em *A. salina*. TE: Tempo de exposição.

Como observado no gráfico D da figura 3 os dados não se ajustaram ao modelo de regressão linear contribuindo para um baixo coeficiente de determinação ( $R^2=0,0077$ ), isso ocorreu porque a taxa de mortalidade das *A. salina* expostas ao AIB em 48 horas se manteve 100% em quase todas as amostras (com exceção de apenas uma) independentemente do aumento da concentração.

A toxicidade pode ser classificada relativamente ao período que se verificam os efeitos, isto é, toxicidade aguda ou crônica. Assim, os resultados demonstram que o percentual de mortalidade aumentou proporcionalmente ao aumento da concentração do bioestimulante avaliado, atingindo os valores máximos de 100%, de mortalidade a partir das concentrações 7,81ppm nos dois tempos de exposição do Forth®; e 30,58 e 3,9 ppm, respectivamente em AIB e Aminon® em 48h. Após a toxicidade aguda, como a observada em náuplios de *A. salina* expostos aos produtos Forth®, AIB e Aminon®, provoca uma resposta rápida num curto período de tempo (por convenção de poucas horas ou poucos dias), provocando geralmente uma elevada mortalidade. O teste de letalidade a partir deste bioensaio é um método simples na pesquisa de produtos naturais.

Munasinghe et al. (2017) estudando a produção de ácido indol-3-acético (IAA) por *Colletotrichum siamense*, um fungo endofítico de folhas de *Piper nigrum*, relatou a bioatividade do composto fúngico contendo IAA em *A. salina* com letalidade 50% na concentração 837ppm. O IAA é o hormônio vegetal de ocorrência natural mais comum da classe das auxinas, que promove o crescimento das plantas, o enraizamento de estacas e a formação de frutos sem fertilização (MUNASINGHE et al., 2017). AIB e IAA são hormônios do tipo auxina presentes nos vegetais, que expressão em situações adversas. A letalidade expressa em *A. salina* pelo composto fúngico contendo IAA, corrobora os resultados aqui apresentados (Figura 3). Dessa maneira, apesar de não terem sido encontrados estudos anteriores com o bioestimulante AIB, Forth® e Aminon® no bioensaio *A. salina*, os resultados observados com essa metodologia de estudo sobre os efeitos tóxicos do composto contendo IAA aliados aos resultados desta pesquisa, servem como um alerta quanto ao efeito tóxico dessas substâncias para ambiente, e conseqüentemente animais e plantas.

Portanto como na literatura científica não foram encontrados resultados sobre a toxicidade de bioestimulantes vegetais em *A. salina*, este estudo torna-se uma

referência para que mais análises sejam realizadas a fim de se elucidar todos os efeitos que esses produtos possam causar no ambiente e nas plantas cultivadas com os mesmos.

#### 4.2 *Allium cepa*

As quatro concentrações testadas do bioestimulante Forth® (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mL/L) causaram, em 24 e 48 horas de exposição, redução significativa da divisão celular aos meristemas de raízes analisados. E ainda, na concentração de 2 mL/L, comparando os dois tempos de exposição observa-se que houve uma redução do IM em 48 horas em relação ao IM em 24 horas, diferindo significativamente entre si (Tabela 1). A maioria das células durante esse período foi interrompida no estágio de interfase e não entrou na fase M do ciclo celular, com isso o índice mitótico durante apresentou-se baixo, prendendo a célula em intérfase (G1/S) temporariamente. Estes resultados demonstram que nas condições de análises realizadas, este estimulante vegetal foi citotóxico em todas as concentrações e nos dois tempos de exposição às células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

**Tabela 1** – Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos bioestimulantes Forth®, AIB e Aminon®.

Bioestimulante	TR	TE/IM(%)			MMS (4 x 10 <sup>-4</sup> M)
		0 h	24 h	48 h	
Forth® (mL/L)	0,5	44,10 <sup>a</sup>	24,88 <sup>b</sup>	21,76 <sup>b</sup>	7,68 <sup>d</sup>
	1	45,84 <sup>a</sup>	22,20 <sup>b</sup>	20,06 <sup>b</sup>	7,68 <sup>d</sup>
	2	46,88 <sup>a</sup>	30,32 <sup>b</sup>	12,32 <sup>c</sup>	7,68 <sup>d</sup>
	4	40,80 <sup>a</sup>	17,80 <sup>b</sup>	12,14 <sup>b</sup>	7,68 <sup>d</sup>
AIB (g/L)	50	44,74 <sup>b</sup>	88,32 <sup>c</sup>	91,94 <sup>c</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	100	51,74 <sup>b</sup>	72,94 <sup>c</sup>	81,00 <sup>c</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	150	54,22 <sup>b</sup>	77,72 <sup>c</sup>	75,24 <sup>c</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	200	53,04 <sup>b</sup>	87,92 <sup>c</sup>	97,68 <sup>c</sup>	7,68 <sup>a</sup>
Aminon® (mL/L)	0,5	51,62 <sup>b</sup>	53,76 <sup>b</sup>	42,56 <sup>b</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	1	50,60 <sup>b</sup>	52,88 <sup>b</sup>	68,16 <sup>b</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	5	43,74 <sup>b</sup>	43,82 <sup>b</sup>	72,02 <sup>c</sup>	7,68 <sup>a</sup>
	10	44,74 <sup>b</sup>	69,06 <sup>c</sup>	78,66 <sup>d</sup>	7,68 <sup>a</sup>

TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo) em 24h. Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori (p < 0,05; letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes em relação ao controle negativo). O parâmetro comparativo refere-se aos bioestimulantes individualmente, dentro de uma mesma concentração nos diferentes tempos de exposição.

De acordo com Caritá e Marin-Morales (2008) podem ocorrer danos significativos ao organismo quando há efeito antiproliferativo acentuado em tecidos de intensa proliferação com desempenho metabólico normal - tal como os tecidos meristemáticos de raízes utilizados no presente estudo para avaliação de toxicidade do bioestimulante Forth® - expostos a compostos químicos com potencial em causar instabilidade genética. Complementando as informações de Caritá e Marin-Morales, (2008), Gomes et al. (2013); Sales et al. (2016); Moura et al. (2016) e Carvalho et al. (2017) declaram que a inibição da proliferação celular desencadeada por compostos citotóxicos, em tecidos de intensa proliferação celular e de funcionamento normal e/ou sem alterações celular é significativamente prejudicial ao organismo por inibir ou limitar a reposição de células, alterar a produção de proteínas e, conseqüentemente, resultar no mal funcionamento do órgão ou tecido onde está localizado. Segundo Valavanidis et al. (2013) e Zilifdar et al. (2014), a inibição da proliferação celular pode comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetados.

Yildiz et al. (2009) indicaram que a inibição da síntese de DNA / proteína pode causar efeito antiproliferativo, impedindo que a célula entre na mitose. Os resultados de IM de Forth® sugerem que a inibição do processo de divisão celular podem estar associadas com os efeitos sinérgicos de um conjunto complexo de produtos químicos citotóxicos presentes na composição do bioestimulante Forth®.

O boro é um dos componentes do Forth® e tem sido relatado como essencial para o crescimento das plantas, porém em altas concentrações é considerado tóxico (CAMACHO-CRISTÓBAL; REXACH; GONZÁLEZ-FONTES, 2008; WIMMER; EICHERT, 2013). No estudo de Liu et al., (2000) os efeitos de ácido bórico no crescimento radicular e na divisão celular de *Vicia faba* L. indicaram um efeito antiproliferativo nas concentrações  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ M.

Na composição do Forth® também são encontrados os metais Molibdênio (Mo) e Zinco (Zn). Siddiqui et al., (2015) demonstraram a citotoxicidade e genotoxicidade de nanopartículas (NPs) de Mo em células de fibroblastos de pele de camundongo (L929) através da indução de apoptose em células expostas a Mo-NPs a partir da parada G2 / M e danos no DNA, verificou-se também que esta partícula induziu estresse oxidativo pela indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), nível de peroxidação lipídica (LPO), depleção do nível de glutathiona

(GSH) e atividade da catalase. Além disso, relatou prejuízos na atividade mitocondrial a partir da diminuição do potencial de membrana dessa organela.

O aumento das ROS pode estar relacionado com o efeito citotóxico causado por Forth®, pois essas moléculas em altas concentrações causam danos celulares que podem desencadear processos apoptóticos (VASCONCELOS et al., 2015), ocasionando a redução do índice mitótico observada.

Pandurangan e Kim (2015) em sua revisão sobre toxicidade in vitro de NPs de óxido de zinco (ZnO) observou que na maioria dos estudos o relato da citotoxicidade NPs - ZnO foi devido à dissolução da NPs - ZnO na região extracelular, porém há também relatos de que as NPs - ZnO foram absorvidas pela célula e sua dissolução ocorreu na região intracelular. A indução do estresse oxidativo é o principal mecanismo da citotoxicidade da NPs - ZnO, sendo que pode ocorrer devido ao aumento do nível de  $Zn^{2+}$  na região extracelular, seguido por um aumento do nível intracelular de  $Zn^{2+}$ , ou entrar diretamente nas células e aumentar o nível intracelular de  $Zn^{2+}$ , ou ainda, aumentar o nível de  $Zn^{2+}$  nos lisossomos, esse autor explica que o aumento dos níveis de  $Zn^{2+}$  pode afetar as enzimas dependentes de Zn e os fatores de transcrição.

Resultados semelhantes foram descritos por Kumari et al. (2011) onde encontrou efeitos citogenéticos e genotóxicos de NPs - ZnO sobre células de raízes de *A. cepa*. Explicou que o possível mecanismo, para a toxicidade intrínseca das NPs - ZnO a *A. cepa*, poderia ser a liberação de (ROS), que pode converter ácidos graxos em peróxidos lipídicos tóxicos, destruindo membranas biológicas.

Os metais pesados como Mo e Zn são essenciais e exercem funções bioquímicas e fisiológicas em plantas e animais, porém uma quantidade excessiva de tais metais produz danos celulares e nos tecidos levando a uma variedade de efeitos adversos e doenças humanas (TCHOUNWOU et al., 2012). A redução do IM em células meristemáticas de *A. cepa* caracteriza os metais pesados como agentes citotóxicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Portanto verifica-se que a citotoxicidade observada nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações avaliadas, e menores que às indicadas pelo fabricante do bioestimulante Forth®, pode ser devido

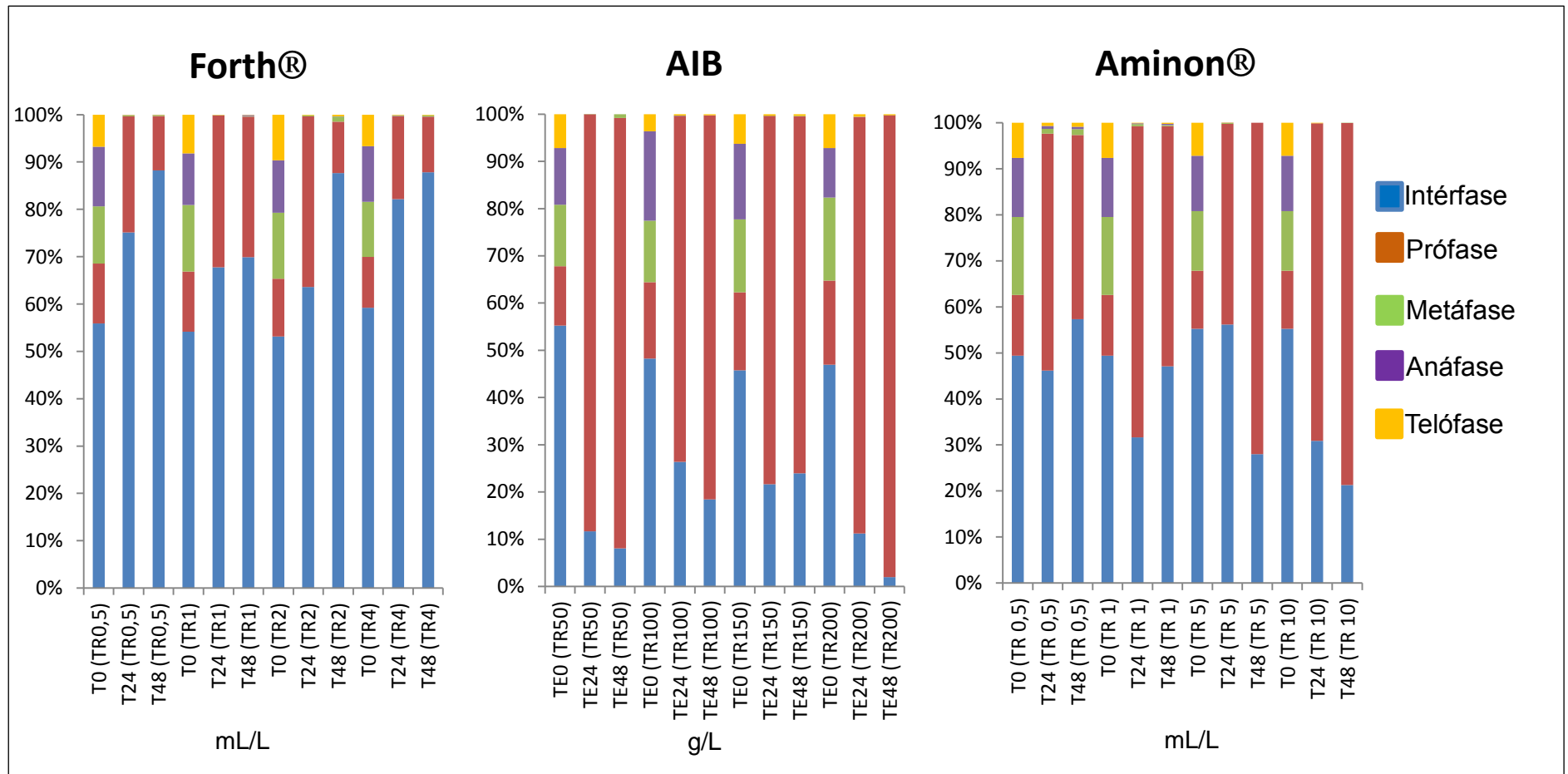
aos compostos contidos em sua formulação, ou ainda induzida pela ação sinérgica dos mesmos.

Ainda nessa pesquisa, a exposição dos meristemas de raízes ao bioestimulante AIB, em todas as concentrações e nos dois tempos de análises, observou-se um aumento significativo dos índices mitóticos em relação ao controle negativo. A mesma situação foi observada para Aminon®, na concentração 5 mL/L, em 48 horas, e para 10 mL/L nos dois tempos de exposição em relação ao controle, observando ainda nessa última concentração uma relação tempo-dependente com o aumento do IM, sendo que em 48 horas apresentou o maior aumento (Tabela 1). No entanto, diferentemente dos resultados obtidos para o produto Forth®, estes dois bioestimulantes nas concentrações citadas induziram aumento da divisão celular de forma significativa aos tecidos avaliados, mostrando-se também citotóxicos aos tecidos meristemáticos analisados, a qual pode ser considerada prejudicial às células, uma vez que pode levar ao aparecimento de tumorização nos seres vivos.

O decréscimo do índice mitótico bem como o aumento significativo é uma forma confiável de se determinar a presença de substâncias citotóxicas. Sendo que o aumento do índice mitótico indica indução da divisão celular, a qual pode ser prejudicial ao organismo por poder ocasionar aos tecidos divisão celular descontrolada (GRIPPA et al., 2010). Assim, resultados como estes são de grande relevância para o estabelecimento do potencial tóxico de um produto. Ainda, é importante mencionar que, mesmo que os metabolismos de plantas e animais sejam diferentes, há importantes similaridades entre eles, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, uma vez que seres humanos consomem plantas que sofrem ação de agentes químicos.

As concentrações dos três bioestimulantes também promoveram um grande número de células em prófase (Figura 3), resultado peculiar principalmente para AIB e Aminon® que aumentaram o IM. Isso demonstra que mesmo causando o aumento da divisão celular observado na tabela 1, causou na verdade um retardo na divisão com específica parada em prófase. De acordo com Fernandes (2005), agentes citotóxicos podem induzir efeitos sobre núcleos eucromáticos, condição que pode ser detectada citologicamente pela inibição e interrupção do progresso da divisão celular, conforme ação observada para as concentrações avaliadas dos produtos AIB e Aminon®.





**Figura 3.** Percentuais de cada fase de divisão celular em relação aos tempos de exposição/concentrações avaliadas em *A. cepa* para os bioestimulantes testados. TE0: tempo de exposição 0 horas, TE24: tempo de exposição 24 horas e TE48: tempo de exposição 48 horas.

AIB é um bioestimulante do tipo auxina, hormônios vegetais relacionados ao desenvolvimento da planta. O ácido indol-3-acético (IAA) é considerado a principal auxina de plantas derivadas do triptofano, controlando muitos processos fisiológicos importantes, incluindo aumento e divisão celular, diferenciação tecidual e respostas à luz e à gravidade (MUNASINGHE et al., 2017). Assim mesmo observando que nas fases da divisão celular houve aumento de prófase, posteriormente, a divisão pode ser retomada pela ação desses hormônios do tipo auxinas e outros fatores que são pré-requisitos para ativação da proliferação. Na literatura não foram encontrados relatos de toxicidade referente aos componentes do produto Aminon®.

Nas avaliações dos potenciais efeitos celulares e nucleares dos bioestimulantes, o bioensaio *A. cepa* pode demonstrar o efeito citotóxico total refletindo interações entre misturas complexas das substâncias que compõe esses produtos, assim como independentemente da composição física e química, como no produto Aminon®.

Portanto as perturbações no ciclo celular diferindo significativamente do controle, como aconteceu para os três bioestimulantes avaliados, podem acarretar sérios danos e até irreversíveis a célula. Esses resultados são preocupantes, uma vez que a fixação do dano na geração subsequente de células divididas por erros pode afetar o organismo como um todo e até mesmo o ambiente onde esses produtos são usados. Se o dano resultar em morte celular, o desenvolvimento do organismo pode ser afetado, o que também poderia levar à sua morte.

Na análise de alterações celulares verificou-se baixa frequência de células com alterações cromossômicas nos tecidos meristemáticos expostos aos três bioestimulantes (Tabela 2). Tais resultados indicam, nas condições de análises para este estudo, ausência de genotoxicidade. Para o bioestimulante Forth® a não genotoxicidade pode ser explicada pela ocorrência da inibição de divisão celular, devido a parada da divisão celular não permitindo que possíveis alterações cromossômicas fossem observadas, assim como nos resultados de Hurtado et al. (2015) que apresentaram efeito citotóxico mas não genotóxico. No entanto o efeito não genotóxico para AIB e Aminon®, que diferente do Forth® promoveram aumento da divisão celular não implica que esses produtos sejam genotóxicos, pois como foi observado na figura 3 a divisão teve um aumento em prófase sendo descontinuada para as demais fases, conseqüentemente o número de alterações cromossômicas

não foram significativos.

**Tabela 2** – Índice de alterações cromossômicas observadas em tecidos meristemáticos de raízes de *A. cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, à diferentes concentrações dos bioestimulantes Forth®, AIB e Aminon®.

Bioestimulante	TR	TE/IAC(%)			MMS (4 x 10 <sup>-4</sup> M)
		0 h	24 h	48 h	
Forth® (mL/L)	0,5	0,00 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	1	0,02 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	2	0,00 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	4	0,00 <sup>a</sup>	0,18 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
AIB (g/L)	50	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	100	0,00 <sup>a</sup>	0,92 <sup>a</sup>	0,66 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	150	0,00 <sup>a</sup>	0,78 <sup>a</sup>	1,02 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	200	0,00 <sup>a</sup>	0,94 <sup>a</sup>	1,60 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
Aminon® (mL/L)	0,5	0,00 <sup>a</sup>	0,14 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	1	0,00 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,04 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	5	0,02 <sup>a</sup>	0,10 <sup>a</sup>	0,00 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>
	10	0,02 <sup>a</sup>	0,08 <sup>a</sup>	0,30 <sup>a</sup>	2,95 <sup>b</sup>

TE: tempo de exposição; IAC: índice de alterações cromossômicas; TR: tratamento; h: hora. MMS: metil metano sulfonato (controle positivo) em 24h. Teste de Kruskal-Wallis com teste de Dunn a posteriori ( $p < 0,05$ ; letras diferentes referem-se a médias significativamente diferentes em relação ao controle negativo). O parâmetro comparativo refere-se aos bioestimulantes individualmente, dentro de uma mesma concentração nos diferentes tempos de exposição.

## 5 CONCLUSÕES

- Os bioestimulantes avaliados nesse estudo mostraram-se tóxicos nas concentrações testadas ao ensaio com *A. salina*.

- Na avaliação em *A. cepa* os produtos Forth®, AIB e Aminon® mostraram-se citotóxico nas concentrações testadas, apresentando redução do IM para o Forth® e aumento do IM AIB e Aminon®.

- Em relação à genotoxicidade, nesse estudo não foram encontrados alterações cromossômicas significativas em células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos três bioestimulantes.

- Os efeitos toxicogenéticos de Forth®, AIB e Aminon® apresentam riscos para os vegetais e o ambiente ao usar tais produtos nas concentrações testadas nesse estudo. Para garantir a segurança do uso desses produtos, é importante levar em consideração os efeitos biológicos da interação entre os compostos inorgânicos e orgânicos presentes nas misturas complexas, e quando entram em contato com as substâncias presentes no solo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINBORO, A. et al. Antioxidants in aqueous extract of *Myristica fragrans* (Houtt.) suppress mitosis and cyclophosphamide-induced chromosomal aberrations in *Allium cepa* L. cells. **Journal of Zhejiang University**, v. 12, n. 11, p. 915, 2011.
- ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
- BARBOSA, J. S. et al. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 3, p. 320-325, 2010.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39-48, 2015.
- BERNARDES, T. G.; SILVEIRA, P. M.; MESQUITA, M. A. M. Produtividade do feijoeiro irrigado devido a reguladores de crescimento e culturas antecessoras de cobertura. **Bragantia**, v. 69, n. 2, p. 371-375, 2010.
- BEZERRA, M. D. S. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 49-55, 2016.
- BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.
- BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathioin on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**, v. 36, n. 1, p. 102-111, 2015.
- BINSFELD, J. A. et al. Uso de bioativador, bioestimulante e complexo de nutrientes em sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 88-94, 2014.
- BOTTA, A. Enhancing plant tolerance to temperature stress with amino acids: an approach to their mode of action. In: **I World Congress on the Use of Biostimulants in Agriculture 1009**. p. 29-35, 2012.
- BRASIL. **Decreto n. 4.954**, de 14 de janeiro de 2004. Altera o Anexo ao Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004, que aprova o Regulamento da Lei no 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes, ou biofertilizantes, remineralizadores e substratos para plantas destinados à agricultura (Redação dada pelo Decreto nº 8.384, de 2014). Disponível em <

[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm) >  
Acesso em: 15 dez. 2017.

BROWN, P.; SAA, S. Biostimulants in agriculture. **Frontiers in plant science**, v. 6, n. 671, p. 1-3, 2015.

BULGARI, R. et al. Biostimulants and crop responses: a review. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2015.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and soil**, v. 383, n. 1-2, p. 3-41, 2014.

CAMACHO-CRISTÓBAL, J. J.; REXACH, J.; GONZÁLEZ-FONTES, A. Boron in plants: Deficiency and toxicity. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1247–1255, 2008.

CANSIAN, R. L. et al. Toxicity of clove essential oil and its ester eugenyl acetate against *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 77, n. 1, p. 155-161, 2017.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722–725, 2008.

CARVALHO, B. L.; SALES, I. M. S.; PERON, A. P. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of UHT whole milk. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 275-279, 2017.

CARVALHO, L. G. et al. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.

CAVALCANTE, M. F. et al. Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química nova**, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHALFUN, N. N. J. et al. Enraizamento de estacas dos marmeleiros 'japonês' e 'portugal' em diferentes substratos e concentrações de ácido indolbutírico. **Ceres**, v. 54, n. 311, p. 68-72, 2007.

COLLA, G. et al. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n.448, p. 1–6, 2014.

COSOVEANU, A.; AXINE, O.; IACOMI, B. Antifungal activity of macroalgae extracts. **Scientific Papers, UASVM Bucharest, Series A**, v. 53, p. 442–447, 2010.

CRAIGIE, J. S. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 371–393, 2011.

CUIN, T. A.; SHABALA, S. Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. **Planta**, v. 225, n. 3, p. 753–761, 2007.

DORES-SILVA, P. R.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Acompanhamento químico da vermicompostagem de lodo de esgoto doméstico. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 956–961, 2011.

DORNELLES, R. C. et al. Antiproliferative and genotoxic potential from extracts and fractions of *Richardia brasiliensis* Gomes (Rubiaceae) by the *Allium cepa* L. test system. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 72, n. 3, p. 424-431, 2017.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015.

DVORAK, P.; BENOVA, K.; VITEK, J.. Alternative biotest on *Artemia franciscana*. In: **Ecotoxicology**. Rijeka, Croatia: InTech, p. 51–74. 2012.

ERTANI, A. et al. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and Soil**, v. 364, n. 1–2, p. 145–158, 2013.

FACHINETTO, J. M. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 49-54, 2007.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, viii, 212 f, 2005.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FONSECA, R. A. S.. **Atividade antioxidante de peptídeos provenientes de hidrolisado proteico de bijupirá (*Rachycentron canadum*)**. Tese (Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio grande. p.131, 2014.

FREITAS, J. H. E. S. et al. Evaluation of using aluminum sulfate and water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin to reduce turbidity and toxicity of polluted stream water. **Chemosphere**, v. 163, p. 133-141, 2016.

GARCÍA, A. C. et al. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203-208, 2012.

GOMES, K. M. S. et al. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GOÑI, O. et al. Comparative transcriptome analysis of two *Ascophyllum nodosum* extract biostimulants: same seaweed but different. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 14, p. 2980-2989, 2016.

GOPALAKRISHNAN, S. et al. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 355-377, 2015.

GRIPPA, G. A. et al. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.

HALPERN, M. et al. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. In: **Advances in agronomy**. In Academic Press. p. 141-174, 2015.

HOSSEL, C. et al. Estratificação e ácido indolbutírico na germinação de sementes de Araçazeiro vermelho. **Revista Brasileira de Tecnologia Agropecuária**, v. 1, n. 1, p. 52–57, 2017.

HURTADO, F. B. et al. Avaliação das atividades genotóxica e antioxidante da periderme do caule de chichuá (*Maytenus guianensis* Klotzsch). **Scientia Plena**, v. 11, n. 7, p. 1-10, 2015.

JAYARAMAN, J.; NORRIE, J.; PUNJA, Z. K. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, n. 3, p. 353–361, 2011.

JIANG, C. et al. An Arabidopsis soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3535-3552, 2013.

JINDO, K. et al. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant and Soil**, v. 353, n. 1–2, p. 209–220, 2012.

KANWAR, A. S. Brine shrimp (*Artemia salina*) -a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**, v. 2, n. 4, p. 236–240, 2007.

KAUSHAL, M.; WANI, S. P. Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. **Annals of microbiology**, v. 66, n. 1, p. 35-42, 2016.

KHAN, W. et al. Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 28, n. 24, p. 386–399, 2009.

KOŁODZIEJCZYK, I. et al. Exogenous melatonin improves corn (*Zea mays* L.) embryo proteome in seeds subjected to chilling stress. **Journal of plant physiology**, v. 193, p. 47-56, 2016.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 190, n. 1–3, p. 613–621, 2011.

LA TORRE, A.; BATTAGLIA, V.; CARADONIA, F. An overview of the current plant biostimulant legislations in different European Member States. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 3, p. 727–734, 2016.

LANA, A. M. Q. et al. Aplicação de reguladores de crescimento na cultura do feijoeiro. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2009.

LANA, M. R. Q. et al. Doses do ácido indolbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). **Bioscience Journal**, v. 24, p. 13–18, 2008.



LAVTIZAR, V. et al. The influence of seawater properties on toxicity of copper pyrrithione and its degradation product to brine shrimp *Artemia salina*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 132–138, 2018.

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

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

LIBRALATO, G. et al. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia spp.* **Ecological indicators**, v. 69, p. 35-49, 2016.

LIMAN, R. et al. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/*Salmonella* and *Allium* test. **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1056-1061, 2010.

LIU, D. et al. Effects of Boron Ions on Root Growth and Cell Division of Broadbean (*Vicia Faba* L.). **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 48, n. 1, p. 47–51, 2000.

LUCINI, L. et al. The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions. **Scientia Horticulturae**, v. 182, p. 124–133, 2015.

MANFRA, L. et al. Long-term lethal toxicity test with the crustacean *Artemia franciscana*. **Journal of visualized experiments: JoVE**, v. 62, p. 1-5, 2012.

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.

MATYJASZCZYK, E. Plant protection means used in organic farming throughout the European Union. **Pest Management Science**, v. 74, n. 3, p. 505–510, 2018.

MAZZEO, D. E.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Celular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, p. 13-18, 2011.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982.

MOURA, A. G. et al. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allium cepa* L. root meristems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 439-443, 2016.

MUNASINGHE, M. V. K. et al. Indole-3-Acetic Acid Production by *Colletotrichum siamense*, An Endophytic Fungus from *Piper nigrum* Leaves. **Journal of Biologically Active Products from Nature**, v. 7, n. 6, p. 475–479, 2017.

NADEEM, S. M. et al. Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for

inducing salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 29, n. 6, p. 360-393, 2010.

NEVES, E. S. B. et al. Action of aqueous extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1131-1137, 2014.

NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.

OLIVEIRA, F. A. et al. Produção de feijão caupi em função da salinidade e regulador de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 11, p. 1049–1056, 2015.

PANDURANGAN, M.; KIM, D. H. In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 158, p. 1-8, 2015.

PAREDES, P. F. M. et al. Screening of Bioactivities and Toxicity of *Cnidioscolus quercifolius* Pohl. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAUL, D.; LADE, H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agronomy for sustainable development**, v. 34, n. 4, p. 737-752, 2014.

PEREIRA, L. D. et al. Propagação de gabirobeiras via estaquia associada ao ácido indolbutírico. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 7, n. 1, p. 19–25, 2017.

PETROZZA, A. et al. Physiological responses to Megafol® treatments in tomato plants under drought stress: A phenomic and molecular approach. **Scientia Horticulturae**, v. 174, n. 1, p. 185–192, 2014.

PING, K. Y. et al. Genotoxicity of *Euphorbia hirta*: an *Allium cepa* assay. **Molecules**, v. 17, n. 7, p. 7782-7791, 2012.

POLO, J.; MATA, P. Evaluation of a biostimulant (Pepton) based in enzymatic hydrolyzed animal protein in comparison to seaweed extracts on root development, vegetative growth, flowering, and yield of gold cherry tomatoes grown under low stress ambient field conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 2261, p. 1–8, 2018.

POSMYK, M. M.; SZAFRAŃSKA, K. Biostimulators: a new trend towards solving an old problem. **Frontiers in plant science**, v. 7, n. 748, p. 1-6, 2016.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena, Austria. 2015.

RAJABI, S. et al. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20, 2015.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 19–26, 2016.

ROSE, M. T. et al. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. In: **Advances in Agronomy**. 1. ed. Academic Press, v. 124p. 37–89, 2014.

SAA, S. et al. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] D. A. Webb). **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 87, p. 1–9, 2015.

SALES, I. M. S. et al. Toxicidade aguda em nível celular de aromatizantes de Biscoito e Tutti-fruti em associação. **Multitemas**, v. 22, n. 51, 2017.

SALES, I. M. S. et al. Toxicity at the cellular level of artificial synthetic flavorings. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 297, 2016.

SANDHYA, V. Z. A. S. et al. Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. **Biology and fertility of soils**, v. 46, n. 1, p. 17-26, 2009.

SANTOS, M.; SANTOS, R.; RODRÍGUEZ, A. Biotecnologia; em casa: obtenção de biogás e biofertilizante empregando esterco e resíduos de alimentos. **Marupiará Revista Científica do CESP/UEA**, n. 1, 2017.

SELVAKUMAR, G. et al. Mountain aspect influences the genetic clustering of psychrotolerant phosphate solubilizing *Pseudomonads* in the Uttarakhand Himalayas. **Current microbiology**, v. 59, n. 4, p. 432-438, 2009.

SHARMA, H. S. S. et al. Plant biostimulants: A review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 465–490, 2014.

SIDDIQUI, M. A. et al. Molybdenum nanoparticles-induced cytotoxicity, oxidative stress, G2/M arrest, and DNA damage in mouse skin fibroblast cells (L929). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 125, p. 73–81, 2015.

SILVA, J. A. G. et al. Phytochemical Screening and Evaluation of the Toxicity of *Croton heliotropiifolius* Kunth (Euphorbiaceae) on *Artemia salina* Leach. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 3, p. 934–941, 2017.

SILVA, J. I. C. DA et al. Uso de estimulantes de crescimento radicular associado a doses de fósforo na cultura do feijoeiro. **Agrarian**, v. 2, n. 5, p. 47–62, 2009.

SILVA, S. L. et al. Preclinical acute toxicological evaluation of the methanolic stem bark extract of *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73-80, 2016.

SOUZA, B. G. DE A. et al. Crescimento e desenvolvimento de mudas de tomate sob efeito de extrato *Ascophyllum nodosum*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 4, p. 712–716, 2017.

SVENSSON, B.-M. et al. *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from landfills. **Environmental monitoring and assessment**, v. 102, n. 1-3, p. 309-321, 2005.

TANAKA, M. T. et al. Efeito da aplicação foliar de biofertilizantes, bioestimulantes e micronutrientes na cultura do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 25, n. 2, p. 315–321, 2003.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy metal toxicity and the environment. **In: Molecular, clinical and environmental toxicology**. Springer, Basel, p. 133-164, 2012.

UPADHYAY, S. K.; SINGH, D. P.; SAIKIA, R. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. **Current Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 489-496, 2009.

VALAVANIDIS, A. et al. Pulmonary oxidative stress, inflammation and cancer: respirable particulate matter, fibrous dusts and ozone as major causes of lung carcinogenesis through reactive oxygen species mechanisms. **International journal of environmental research and public health**, v. 10, n. 9, p. 3886-3907, 2013.

VAN OOSTEN, M. J. et al. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 5, p. 1–12, 2017.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo?. **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2015.

VENTURA-CAMARGO, B. C.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.

VERKLEIJ, F. N. Seaweed extracts in agriculture and horticulture: A review. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 8, n. 4, p. 309–324, 1992.

WIMMER, M. A.; EICHERT, T. Mechanisms for boron deficiency-mediated changes in plant water relations. **Plant science**, v. 203, p. 25-32, 2013.

YILDIZ, Mustafa et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

ZAHRAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, n. 4, p. 968-989, 1999.

ZANDONADI, D. B. et al. Plant proton pumps as markers of biostimulant action. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 1, p. 24-28, 2016.

ZHANG, X. et al. Creeping bentgrass physiological responses to natural plant growth regulators and iron under two regimes. **HortScience**, v. 37, n. 6, p. 898-902, 2002.

ZHANG, X.; ERVIN, E. H. Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. **Crop science**, v. 44, n. 5, p. 1737-1745, 2004.

ZHANG, X.; ERVIN, E. H. Impact of seaweed extract-based cytokinins and zeatin riboside on creeping bentgrass heat tolerance. **Crop Science**, v. 48, n. 1, p. 364-370, 2008.

ZHU, S. et al. Toxicity evaluation of graphene oxide on cysts and three larval stages of *Artemia salina*. **Science of the Total Environment**, v. 595, p. 101-109, 2017.

ZILIFDAR, F. et al. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 23, n. 1, p. 480-486, 2014.