

UTILIZAÇÃO DO BIOENSAIO *Allium cepa* PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO AGROTÓXICO Domark 100 EC®, UTILIZADO NA AGRICULTURA FAMILIAR DA REGIÃO DE MARIALVA - PR

Mariana Yumi Date (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Tiemi Akamine Motomura, Renata Sano Lino, Simone Aparecida Galeriani Mossini, Tânia Cristina Alexandrino Becker, Edilson Nobuyoshi Kaneshima (Co-orientador), Alice Maria de Souza Kaneshima (Orientadora), e-mail: amskaneshima@uem.br
Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR (Paraná).

Área: 40300005 – Farmácia
Subárea: 40303004 – Análise Toxicológica

Palavras-chave: citotoxicidade, genotoxicidade, tetraconazol

Resumo:

Neste trabalho foi utilizado o agrotóxico Domark 100 EC®, tendo como princípio ativo o tetraconazol que atua impedindo a proliferação de insetos e fungos nos tecidos internos e externos da planta. Para a realização do bioensaio *Allium cepa* foram utilizadas soluções contendo duas concentrações diferentes desse agrotóxico, bem como dos controles positivo e negativo. As raízes de *Allium cepa* que estavam em contato com as soluções foram medidas para analisar o seu efeito citotóxico, e posteriormente foram confeccionadas lâminas, em quadruplicata, com o material da extremidade das raízes para avaliação do efeito genotóxico. Foram analisadas 2000 células de cada replicata, sendo identificada a fase da divisão celular, observando aspectos de normalidade ou de anormalidades citogenéticas. As anormalidades observadas foram: micronúcleo, vacúolo nuclear, aderência, broto nuclear, fragmento, poliploidia, cromossomo desorientado, c-metáfase, ponte cromossômica, polarização reversa, cromossomo atrasado, núcleo aumentado, núcleo diminuído e anáfase multipolar. Desse modo, por meio do bioensaio *Allium cepa* foi possível determinar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do tetraconazol bem como do índice mitótico e das anormalidades celulares.

Introdução

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos no mundo. No entanto, não há fiscalizações definidas e garantias trabalhistas que assegurem a utilização desses produtos pela agricultura familiar, aumentando o risco à saúde devido a exposição ocupacional desses agricultores. Certas moléculas ativas presentes nos agrotóxicos podem ter propriedades genotóxicas com possibilidade de interagir e danificar a estrutura da molécula de DNA (ácido desoxirribonucleico), podendo formar micronúcleos e outras alterações citogenéticas, por isso, é necessário fazer

uma avaliação dos riscos e efeitos causados pelo agrotóxico. Existem muitas lacunas no conhecimento dos riscos associados à utilização de agrotóxicos, tornando prioritário o desenvolvimento de pesquisas relacionadas com a exposição a agrotóxicos em todos os seus aspectos.

Os bioensaios que utilizam plantas são mais simples e sensíveis em relação aqueles que utilizam animais, demonstrando serem testes eficientes para o monitoramento das alterações provocadas pelos agrotóxicos, sendo importante na investigação da citotoxicidade e genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados nas culturas agrícolas. Dessa forma, o objetivo desse projeto foi utilizar o bioensaio com *Allium cepa* para avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade da formulação comercial do agrotóxico Domark 100 EC® (tetraconazol), em concentrações de uso, utilizadas por produtores rurais da região de Marialva – PR (Paraná).

Materiais e Métodos

Para este estudo, utilizou-se o agrotóxico Domark 100 EC® (tetraconazol) doado por um produtor rural da região de Marialva-PR. As concentrações testadas foram 0,5ml/L e 0,75ml/L que são aquelas normalmente utilizadas na viticultura, além dos controles positivo (3ml/L) e negativo (água destilada). Foram utilizados bulbos de *Allium cepa* adquiridos comercialmente de um mesmo fornecedor, com diâmetro de aproximadamente 3 cm. O experimento foi realizado em quadruplicata para cada concentração e controle. O bulbo da cebola foi imerso em água destilada por 48 horas até haver crescimento da raiz. Posteriormente, estas foram imersas nas soluções-testes com as concentrações definidas de tetraconazol por mais 72 horas, conforme descrito por RANK et al. (1997). A citotoxicidade foi determinada pela quantidade e comprimento das raízes nas diferentes soluções testes e controle negativo. As raízes foram mantidas em solução de etanol e ácido acético (3:1) por um período de 6 horas. Após esse período, foram armazenadas em frascos contendo etanol 70% a 4°C para posterior análise citogenética e avaliação do efeito genotóxico. Para a preparação das lâminas, as raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada, submetidas à hidrólise ácida com HCl (ácido clorídrico) 1N durante 8 minutos à 60°C, lavadas novamente em água destilada, coradas com Reativo de Schiff por 45 minutos no escuro. A lâmina foi preparada por meio de esmagamento manual, sendo contadas 2000 células do meristema apical das raízes que entraram em contato com cada concentração do agrotóxico para observar a presença de anormalidades citogenéticas e morte celular. Também foram analisadas 100 células em divisão celular, e as anormalidades encontradas possibilitaram o cálculo do índice mitótico para cada concentração testada.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 está demonstrado que o tetraconazol contribui para a diminuição do índice mitótico conforme há aumento da concentração do agrotóxico. Além disso, observa-se a ocorrência de efeito genotóxico expressivo, onde houve aumento do índice de anormalidades celulares de acordo com a elevação da dosagem do

tetraconazol. Também foram observadas a cariorexe e cariólise que estão relacionadas com o processo de morte celular.

Ainda na Tabela 1 está demonstrado que a maior inibição do índice mitótico junto com a indução de anormalidades celulares foi observada na dose mais alta de tetraconazol utilizada na viticultura. Nas raízes tratadas com tetraconazol, verificou-se aumento na taxa de anormalidades celulares, uma vez que o controle negativo apresentou índice de 5,25%, enquanto que o índice do controle positivo foi de 29,53%.

A aderência cromossômica pode causar morte celular (MACAR, 2021), o que pode explicar o aumento da taxa de morte celular (células em cariorexe e cariólise) de acordo com o aumento da concentração. Pode ser deduzido que a redução do índice mitótico (manifestação do efeito citotóxico) é a principal causa da desaceleração de parâmetros fisiológicos (MACAR, 2021), resultando na diminuição do tamanho e da quantidade de raízes. Isto pode ser observado na Tabela 2 em que há uma diminuição no tamanho das raízes que entraram em contato com o agrotóxico, isto quando comparado ao controle negativo. Situação semelhante também foi observada em relação à quantidade do número de raízes.

Várias anormalidades cromossômicas (Figura 1) foram encontradas nas raízes com uso de tetraconazol, como micronúcleo, vacúolo nuclear, aderência, broto nuclear, fragmento, poliploidia, cromossomo desorientado, c-metáfase, ponte em anáfase, ponte em telófase, polarização reversa, cromossomo atrasado, anáfase multipolar, núcleo aumentado, além de fases que caracterizam a morte celular como cariorexe e cariólise, o que comprova o efeito genotóxico do uso de tetraconazole.

Tabela 1 – Citotoxicidade e genotoxicidade do tetraconazole em *Allium cepa*.

Concentração	Índice mitótico	Índice de anormalidades celulares	Taxa de morte celular
Controle negativo	710 (35,5%)	105 (5,25%)	1,6 (0,08%)
0,5ml/L	609,2 (30,46%)	307,2 (15,36%)	33,4 (1,67%)
0,75ml/L	425,2 (21,26%)	552 (27,6%)	244 (12,2%)
Controle positivo	395,4 (19,77%)	590,6 (29,53%)	241,2 (12,06%)

Total de células analisadas: 2000. Análise feita em quadruplicata para cada concentração.

Tabela 2 – Tamanho e quantidade de raízes

Concentração	Tamanho (cm)	Quantidade	Valor p
Controle negativo	2,32 (\pm 1,02)	44 (\pm 15,7)	< 0,05
0,5ml/L	0,82 (\pm 0,16)	26,5 (\pm 10,2)	< 0,05
0,75ml/L	0,9 (\pm 0,32)	19 (\pm 8,6)	< 0,05
Controle positivo	1,57 (\pm 0,28)	22,5 (\pm 6,8)	< 0,05

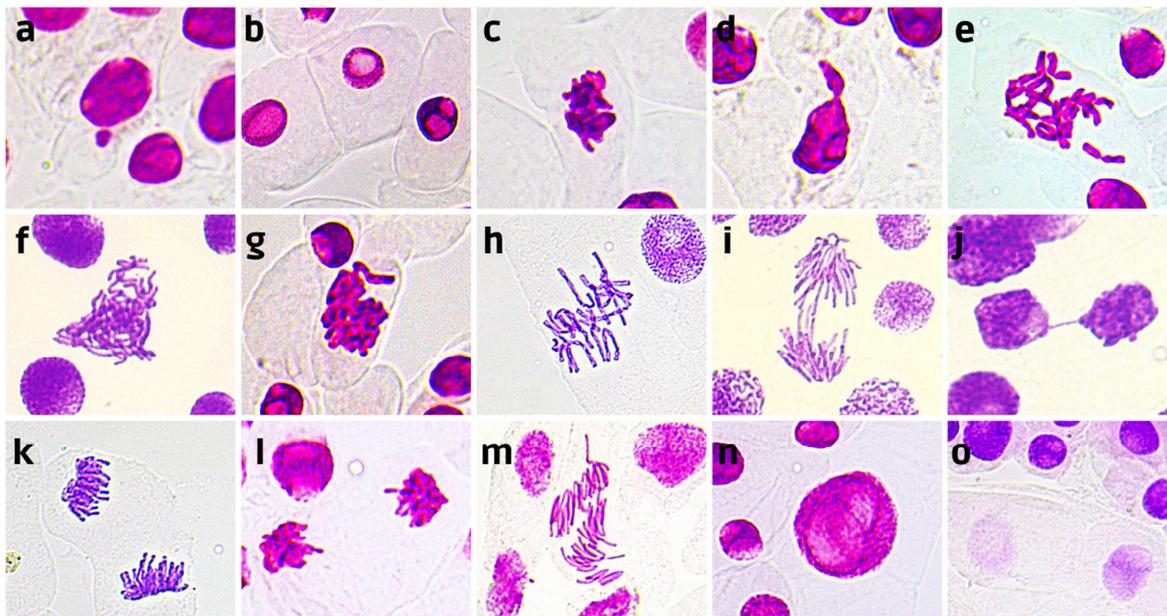


Figura 1 – Anormalidades cromossômicas. (a) micronúcleo, (b) vacúolo nuclear, (c) aderência, (d) broto nuclear, (e) fragmento, (f) poliploidia, (g) cromossomo desorientado, (h) c-metáfase, (i) ponte em anáfase, (j) ponte em telófase, (k) polarização reversa, (l) cromossomo atrasado, (m) anáfase multipolar com cromossomo perdido, (n) núcleo aumentado, (o) cariorexe e cariólise.

Conclusões

Este estudo investigou os múltiplos efeitos tóxicos do tetraconazol e revelou seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em *A. Cepa*, além de demonstrar que o bioensaio *A. cepa* é um modelo útil para esse tipo de estudo. A maior concentração utilizada pelos viticultores mostrou alterações semelhantes ao controle positivo. Podendo ter a interpretação de que o agrotóxico pode ser perigoso para muitos organismos, incluindo humanos. Dessa forma, esse estudo indica a necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos tóxicos do tetraconazol.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa e incentivo à pesquisa científica.

Referências

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

RANK, J. et al. Genotoxicity Testing of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient Glyphosate Isopropylamine Using the Mouse Bone Marrow Micronucleus Test, Salmonella Mutagenicity Test, and *Allium* Anaphase-Telophase Test. **Mutation Research**, Orlando, v. 300, n.5, p. 29-36, Oct. 1997.