

UTILIZAÇÃO DO BIOENSAIO *Allium cepa* NA AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO FUNGICIDA RIDOMIL GOLD- MZ[®]

Débora Hayane Vidal Pereira, (PIBIC/PPSUS/FA/UEM) Renata Sano Lini, Simone Aparecida Galerani Mossini, Tânia Cristina Alexandrino Becker, Priscila de Laet Sant'Ana, Edilson Nobuyoshi Kaneshima, Alice Maria de Souza Kaneshima (Orientador) e-mail: amskaneshima@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá.

Área: 40300005 – Farmácia - Subárea: 40303004 – Análise Toxicológica

Palavras-chave: ridomil, *Allium cepa*, citogenotoxicidade

Resumo:

Os agrotóxicos vêm sendo amplamente utilizados para o controle de pragas em culturas no Brasil, com o intuito de aumentar a produção agrícola. Neste estudo, utilizou-se o bioensaio *Allium cepa*, para avaliação da citogenotoxicidade de cinco concentrações diferentes do fungicida Ridomil Gold- MZ[®]. Os resultados evidenciam que o ativo inibiu a divisão celular na maior concentração do teste (100g/L), na qual não foram encontradas células em divisão celular e em muitas células, observou-se a presença de imensos vacúolos nucleares e alterações compatíveis com morte celular. Nas demais concentrações, inclusive na concentração de uso recomendada na viticultura, foram observadas alterações citotóxicas e genotóxicas em todas as fases de divisão celular.

Introdução

A videira pode ser afetada por diversos patógenos fúngicos, mas a região geográfica também pode interferir no desenvolvimento ou limitação da viticultura, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil em que ocorre maior quantidade de precipitações. Esta condição favorece o desenvolvimento de doenças como o míldio (*Plasmopara viticola*) que quando severa, acarreta em perdas na produção. Os prejuízos causados por esta doença estão relacionados à destruição total ou parcial das inflorescências e/ou frutos, bem como da queda prematura das folhas (SÔNEGO et al., 2006).

Para o tratamento de míldio (*Plasmopara viticola*) é utilizado Ridomil Gold- MZ que é uma mistura de metalaxyl + mancozebe, apresentando como uma formulação de pó molhável que é aplicado na parte aérea de diferentes culturas, como batata, cebola, tomate e uva.

Para avaliar a toxicidade dos agrotóxicos, pode-se utilizar o bioensaio de *Allium cepa*. De acordo com Aydın e Liman (2020), este bioensaio é um teste amplamente recomendado para a avaliação de efeitos cito e genotóxicos, devido a facilidade e simplicidade de interpretação dos resultados. A cebola (*Allium cepa*), por ser um

organismo não-alvo para esses agroquímicos, é um bioindicador de toxicidade total, reconhecida pelo Programa Internacional de Segurança Química das Nações Unidas (OMS 1985) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA, 1996; FIORESI, VIEIRA, CAMPOS, 2020)

O objetivo deste estudo foi utilizar o bioensaio *Allium cepa* para avaliar a toxicidade de cinco diferentes concentrações do fungicida Ridomil Gold- MZ[®].

Materiais e Métodos

Para este estudo utilizou-se o fungicida Ridomil Gold- MZ[®] que foi doado por um viticultor da região de Marialva-PR. Como não foi possível encontrar artigos científicos relacionado com o bioensaio *Allium cepa* e o fungicida em estudo. As concentrações testadas foram definidas com base na concentração de uso na viticultura (25g/L), sendo testada esta concentração e mais 4 diferentes concentrações (6,25g/L; 12,5g/L; 50g/L e 100g/L), com o intuito de determinar a menor concentração, na qual foram observadas alterações citogenéticas relacionadas com o efeito citotóxico e genotóxico. Como controle negativo foi utilizada água. Neste bioensaio foram utilizados bulbos de *Allium cepa* adquiridos comercialmente de um mesmo fornecedor, com diâmetro de aproximadamente 3 cm. Inicialmente os bulbos foram colocados em água destilada durante 48 horas a temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram retirados da água destilada e imersos nas soluções-teste contendo 5 diferentes concentrações do fungicida Ridomil Gold- MZ[®], além do controle negativo. Os bulbos permaneceram imersos nestas soluções por um período de 72 horas. Após este período, realizou-se a medida do comprimento das raízes que entraram em contato com as soluções-teste e com o controle negativo. A ocorrência de citotoxicidade foi considerada nos casos em que houve uma diferença significativa no comprimento das raízes em contato com as soluções-teste em relação ao controle negativo.

Após a medida do comprimento das raízes, estas foram coletadas para a análise citogenética, sendo fixadas em etanol: ácido acético (3:1) durante 6 horas e armazenadas em etanol 70% em geladeira (4°C) para posterior preparação e observação de lâminas. Para a preparação das lâminas, o meristema apical de cada raiz foi submetido à hidrólise ácida com HCl (ácido clorídrico) 1N durante 8 minutos a 60°C e, coradas com Reativo de Schiff por 45 minutos no escuro. Por meio de esmagamento manual, o material para análise citogenética foi preparado em uma lâmina de citologia, sendo que a análise foi realizada em quadruplicata e analisadas 2.000 células para cada replicata. Além disso, foi analisado o número de anormalidades em 100 células em divisão celular.

Resultados e Discussão

Ao analisar os efeitos do fungicida Ridomil Gold- MZ[®] em quatro diferentes concentrações, foi possível observar a presença de alterações citogenéticas, principalmente de aberrações cromossômicas e a inibição do crescimento da raiz do

bulbo de acordo com o aumento da concentração utilizada. A Tabela 1 apresenta o número e tamanhos das raízes para cada concentração testada e o controle negativo, sendo que o tamanho está descrito em média \pm desvio padrão. Nesta tabela também mostra o percentual de aberrações cromossômicas encontradas para cada teste.

As alterações citogenéticas observadas foram: núcleo aumentado na relação núcleo citoplasma, vacúolo nuclear, poliploidia, c-metáfase, ponte cromossômica, aderência cromossômica, cromossomo fora do fuso mitótico, célula binucleada, micronúcleo e cariorrexe (Figura 1). Vale ressaltar que na maior concentração (100g/L) não foi observado divisão celular. Além disso, foi observada morte celular desde a concentração de 12,5g/L até a concentração de 100g/L.

Tabela 1: Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico do fungicida Ridomil Gold-MZ®, utilizando o bioensaio *Allium cepa*.

Grupos	Número de raízes	Tamanho (cm)	Valor p	Percentual de aberrações cromossômicas
Controle -	13,5	4,40 ($\pm 1,72$)	<0,05	1,77%
6,25g/L	6	1,85 ($\pm 0,93$)	<0,05	28,95%
12,5g/L	5,75	1,00 ($\pm 0,63$)	<0,05	32,45%
25g/L	6,5	1,09 ($\pm 0,52$)	<0,05	23,35%
50g/L	8,25	1,36 ($\pm 1,17$)	<0,05	78,60%
100g/L	6	1,44 ($\pm 0,73$)	<0,05	70,00%

C- = controle negativo. Para calcular o valor de P, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

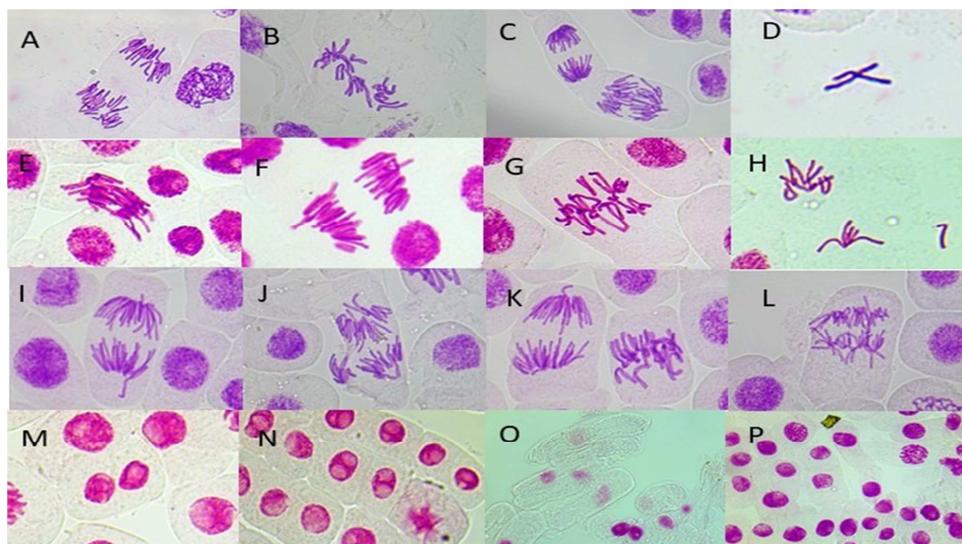


Figura 1 – Anormalidades cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao fungicida Ridomil Gold- MZ®.

A: anáfase com poliploidia B: c-metáfase C: anáfases com aderência e poliploidia, respectivamente D: cromossomo desorientado E: anáfase com poliploidia e aderência F: anáfase com poliploidia, aderência e cromossomos tardios G: c-metáfase H: cromossomos desorientados I: anáfase com poliploidia e cromossomos atrasados J: anáfase com poliploidia, conjunto de cromossomos fragmentados e cromossomos atrasados K: c-metáfase e anáfase com poliploidia L: anáfase multipolar com poliploidia e distribuição desigual de cromossomos M: célula binucleada N: vacúolos nucleares O: morte celular P: núcleos aumentados

A concentração de 25g/L é aquela normalmente utilizada na viticultura, portanto, é a concentração na qual seres humanos estão expostos de maneira ocupacional, ou em contato pelo fato de residir em regiões próximas ao cultivo da videira. Nesta concentração, inclusive também foram observados efeitos citotóxicos e genotóxicos por meio do bioensaio *Allium cepa*, estando presente alterações citogenéticas como morte celular, célula binucleada, c-metáfase, cariorrexe e poliploidia. Por isso, a necessidade da utilização correta do equipamento de proteção individual (EPI). No entanto, existem estudos que evidenciam a dificuldade dos trabalhadores rurais para a utilização correta e completa dos EPIs (LINI, et al., 2021), o que pode agravar o nível de exposição aos agrotóxicos com potencial citotóxico e genotóxico.

Conclusões

Os resultados desse estudo evidenciam que por meio do bioensaio *Allium cepa*, o uso do fungicida Ridomil Gold- MZ[®] apresentou efeito citotóxico e genotóxico nas concentrações testadas. O ativo foi capaz de inibir a divisão celular na maior concentração do teste (100g/L), e nas outras concentrações, dentre elas a concentração de uso recomendada para a cultura de uva, foram observadas alterações cromossômicas em todas as fases de divisão celular e em percentual maior do que observado no controle negativo.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa PPSUS e à Fundação Araucária pelo financiamento.

Referências

ALDIN, G., LIMAN, R. Cyto-genotoxic effects of Pinoxaden on *Allium cepa* L. roots. **J ApplGenetics**61, 349–357 (2020).

FIORESI, V.S., DE CÁSSIA, R.V.B., DE CAMPOS, J.M.S. *et al.* Cytogenotoxic activity of the pesticides imidacloprid and iprodione on *Allium cepa* root meristem. **EnvironSciPollut Res** 27, 28066–28076 (2020).

LINI, R. S.; OLIVEIRA, N. G. de.; NERY, B. G. et al. Occupational exposure to pesticides from fungicide class on a vineyard farm population. **Research, Society and Development**, [S. I.], v. 10, n. 3, p. e59410313796, 2021.

SÔNEGO, O.R.; GARRIDO, L. da R.; GRIGOLETTI J, A. Principais doenças fúngicas da videira no Sul do Brasil. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 2006. 34p. (Circular Técnica, 56)