

Avaliação da genotoxicidade de herbicidas através do ensaio com *Allium cepa*

Evaluation of genotoxic effects of herbicide by using the *Allium cepa* assay

RESUMO

O Brasil está entre os maiores produtores de milho, café e soja do mundo, devido ao clima favorável e a grande área agriculturável. A alta demanda de produtos para exportação e consumo é responsável pela utilização de produtos que auxiliam no combate a pragas e doenças de plantas. O glifosato e a atrazina são herbicidas, contaminantes emergentes, utilizados em larga escala na produção agrícola no combate de plantas daninhas. Suas aplicações são através de pulverização. Esse método mostra-se muitas vezes ineficiente, sendo necessária aplicações excessivas para que atinjam o alvo, conseqüentemente uma parcela considerável de herbicida é lançado no ambiente. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do glifosato e atrazina usando o ensaio com *Allium cepa* (cebola). Glifosato e Atrazina foram avaliados em concentrações ambientais e suas misturas (GF 65 $\mu\text{g L}^{-1}$, GF 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, ATZ 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, ATZ 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, MIX 2+65 e MIX 25+160). Ambas as moléculas e a mistura apresentaram potencial genotóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Contaminantes emergentes. Ecotoxicidade. DNA.

ABSTRACT

Brazil is among the largest producers of corn, coffee and soybeans in the world, due to the favorable climate and the large agricultural area. The high demand for products for export and consumption is responsible for the use of products that help in fighting pests and plant diseases. Glyphosate and atrazine are herbicides, emerging contaminants, used on a large scale in agricultural production to combat weeds. Its applications are through spraying. This method is often inefficient, requiring excessive applications to reach the target, consequently an important portion of herbicide is released into the environment. The aim of the study was to evaluate the genotoxic and mutagenic potential of glyphosate and atrazine using the *Allium cepa* (onion) assay. Glyphosate and Atrazine were adopted in environmental criteria and their mixtures (GF 65 $\mu\text{g L}^{-1}$, GF 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, ATZ 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, ATZ 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, MIX 2+65 e MIX 25+160).

KEYWORDS: Emerging contaminants. Ecotoxicity. DNA.

Fernanda dos Santos
s.fernandasantos21@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná,
Curitiba, Paraná, Brasil

Eduarda Roberta Bordin
eduardabordin@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Adriane Martins de Freitas
afreitas_27@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Wanessa Algarte Ramsdorf
wanessa6@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

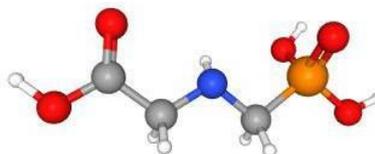
Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

De acordo com um artigo apresentado pela EMBRAPA sobre a visão de 2030 do futuro da agricultura brasileira, a exportação de milho do Brasil terá um aumento de 37,8%, de soja um aumento de 33% e café de 31%. Devido ao aumento de áreas cultiváveis e ao fato das plantações serem suscetíveis a interferência de plantas daninhas ocorre também o aumento na utilização de pesticidas. Dentre os pesticidas, os herbicidas são os mais utilizados no combate a plantas daninhas, existem dois tipos de herbicidas, os não seletivos e os seletivos, os não seletivos são aqueles que atingem toda a cultura de plantas. Já os seletivos atingem apenas a planta alvo. Eles são classificados de acordo com seu grupamento químico e mecanismo de ação. Dentre os herbicidas não seletivos o mais conhecido e mais utilizado mundialmente é o glifosato (GF), ele é facilmente encontrado e não possui restrições quanto a sua compra. É amplamente utilizado em fazendas, jardins e gramados domésticos. O glifosato compõe o grupo dos organofosforados e atua inibindo a enzima vegetal 5- enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase. É considerado por alguns autores como provável cancerígeno para humanos e diversos autores apresentam o potencial tóxico do glifosato em diferentes matrizes ambientais. Geralmente herbicidas formulados com glifosato possuem combinações com outras substâncias responsáveis por aumentar o potencial de absorção da planta, como as derivadas de triazinas, um exemplo é a atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s- triazina). A fórmula estrutural do glifosato encontra-se na Figura 1.

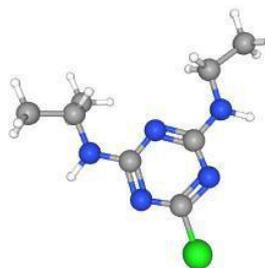
Figura 1 - Estrutura 3D do glifosato



Fonte: National Center for Biotechnology Information

A atrazina (ATZ) é um herbicida seletivo utilizado principalmente em plantações de milho, muito utilizado em fazendas, ferrovias e rodovias. É um sólido branco em temperatura ambiente, sua utilização é feita através do preparo de uma solução de atrazina que é pulverizada sob o solo. Apesar de ter sido banida em oito países, devido ao seu potencial tóxico e ter seu uso restringido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) apenas para pessoas treinadas a atrazina ocupa o segundo lugar tratando-se dos herbicidas mais utilizados. A fórmula estrutural da atrazina encontra-se na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura 3D da atrazina



Fonte: National Center for Biotechnology Information

É importante ressaltar que quando se trata de herbicidas, devido à pulverização, estima-se que uma parcela considerável de pesticida não atinja o alvo, sendo necessária uma aplicação excessiva dessas substâncias para obter o resultado esperado, como consequência são encontrados esses compostos e seus derivados com frequência em águas superficiais e subterrâneas. Devido a presença de atrazina e glifosato em matrizes ambientais, o objetivo do presente estudo foi avaliar seus efeitos genotóxicos e mutagênicos através do ensaio com *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os compostos utilizados foram os padrões analíticos de glifosato (GFPA, CAS nº 1071-83-6, PESTANAL®, Sigma Aldrich) e atrazina (ATZPA, CAS nº 1912-24-9, PESTANAL®, Sigma Aldrich). As soluções-estoque foram preparadas utilizando água processada por osmose reversa, nas concentrações de 20 e 500 mg L⁻¹, respectivamente. As concentrações utilizadas nos ensaios com *A. cepa* corresponderam a concentrações ambientais descritas na literatura ATZ 2 µg L⁻¹, ATZ 25 µg L⁻¹, GF 65 µg L⁻¹, GF 160 µg L⁻¹, MIX2+65 e MIX 25+160. Para o ensaio foi utilizada a metodologia descrita por Guerra e Souza (2002) e Grant (1982), com modificações. Foram utilizadas sementes comerciais da espécie Baia Periforme, da marca ISLA PAK, com índice de germinação de 94%, livre de defensivos. 18 sementes foram distribuídas em placas de Petri, sobre papel-filtro embebido com as soluções de glifosato, atrazina e mix (5 mL), com água processada por osmose reversa (controle negativo) e solução com 0,03% de DMSO (controle de solvente). As placas foram envolvidas com papel filme e incubadas em B.O.D a 25 °C até que as raízes atingissem aproximadamente 2 cm de comprimento. Após esse período as raízes foram coletadas com o auxílio de uma pinça e fixadas em Carnoy 3:1 recém preparado por 6 h em temperatura ambiente. Em seguida as raízes foram lavadas com água de osmose por 5 min em três repetições, e transferidos para frascos contendo HCl 1 N previamente estabilizados em banho-maria a 60 °C, a hidrólise foi interrompida após 9 min com o auxílio de água de osmose. Após a lavagem as raízes foram transferidas para frascos âmbar contendo reativo de Schiff por 2 horas em local escuro. Sobre uma lâmina limpa e identificada foi colocada uma raiz e com o auxílio de uma navalha cortou-se a região meristemática (extremidade da raiz), adicionou-se uma gota de carmim acético 2% sobre a região meristemática e cobriu-a com uma lamínula previamente limpa, foram confeccionadas 10 lâminas por tratamento. A fixação das lâminas foi realizada utilizando nitrogênio líquido, as lâminas foram mergulhadas por 15 segundos e com o auxílio de uma gilete retirou-se a lamínula. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente para secar, após a secagem foi colocado sobre a lâmina uma gota de bálsamo do Canadá, a lâmina foi recoberta com uma lamínula previamente limpa e deixou-se secar por 24 h. A análise das lâminas foi realizada utilizando microscópio de luz com a objetiva de 40x, foram analisadas 500 células por lâmina, resultando em 5000 células por tratamento. Inicialmente foi contabilizado o número total de células; em seguida foi identificado e contabilizado as células em intérfase e em processo de divisão celular mitótica e por fim foram identificadas e contabilizadas células portadoras de anomalias.

Para o cálculo da porcentagem do índice mitótico foram contabilizadas as células em divisão e foi feita uma relação entre o número de células em divisão (NCD) e o número de células observadas (NCO), como mostra a equação (1).

$$IM = \frac{NCD}{NCO} \times 100 \quad (1)$$

O mesmo foi feito para o cálculo do efeito clastogênico, efeito aneugênico e micronúcleo. Para o efeito clastogênico, descrito na equação (2), foram somados o número de células que apresentaram quebra e/ou ponte cromossômica e foi feita a relação de células que apresentaram dano por número de células observadas.

$$IC = \frac{\sum_{\text{quebra/ponte}}}{NCO} \times 100 \quad (2)$$

Para o efeito aneugênico, descrito na equação (3), foram somados o número de células que apresentaram dano aneugênico devido a perda, atraso, aderência ou broto e foi feita a relação de células que apresentaram dano por número de células observadas.

$$IA = \frac{\sum_{CDA}}{NCO} \times 100 \quad (3)$$

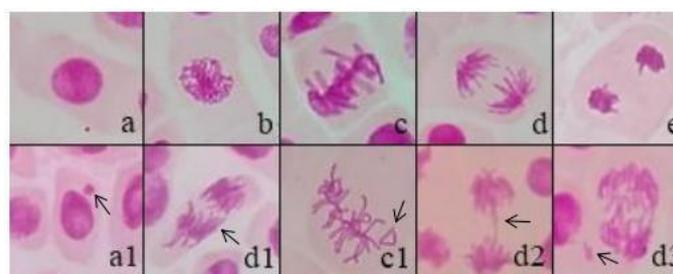
E para o cálculo do índice mutagênico foram contabilizadas as células com micronúcleos e feita a relação por número de células observadas, descrito na equação (4).

$$IMut = \frac{NMN}{NCO} \times 100 \quad (4)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio usando *A. cepa* mostra-se um padrão eficiente frente a outras plantas para avaliar a genotoxicidade devido ao tamanho da sua célula e número de cromossomos. A Figura 3 ilustra alguns danos encontrados durante a análise.

Figura 3 - Células meristemáticas da raiz de *Allium cepa*.



a. Interfase normal; a1. Interfase com micronúcleo; b. Prófase normal; c. Metáfase normal; c1. Metáfase com perda cromossômica; d. Anáfase normal; d1. Anáfase com atraso; d2. Anáfase com ponte cromossômica; d3. Anáfase com quebra cromossômica; e. Telófase normal. Fonte: Autoria própria (2019)

Os resultados encontrados após a avaliação da genotoxicidade de glifosato e atrazina encontram-se na Tabela 1. Os valores apresentados com asterisco (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos de acordo com a análise.

Tabela 1 – Dados do Índice mitótico (IM), Índice de aberrações cromossômicas (IAC) e Índice de mutagênico (IMut) de células meristemáticas da raiz de *Allium cepa* usando padrões analíticos de atrazina e glifosato.

AMOSTRA	IM(%)	IAC(%)	IMut(%)
Controle negativo	23.46 ± 3,17	0,12 ± 0,06	0,00 ± 0,06
Controle positivo	26.79 ± 8,80	0,62 ± 0,30*	0,83 ± 0,85*
Atrazina 2 µg L ⁻¹	9.40 ± 1,43*	0,73 ± 0,16*	0,00 ± 0,25
Atrazina 25 µg L ⁻¹	10.00 ± 1,41*	0,69 ± 0,15*	0,00 ± 0,00
Glifosato 65 µg L ⁻¹	8.52 ± 1,16*	0,62 ± 0,14*	0,27 ± 0,17
Glifosato 160 µg L ⁻¹	9.80 ± 1,14*	0,74 ± 0,14*	0,20 ± 0,62
MIX 2+65	7.19 ± 0,61*	0,64 ± 0,70*	0,59 ± 0,52*
MIX 25+160	10.76 ± 1,65*	0,85 ± 0,16*	0,20 ± 0,25

Fonte: Autoria própria (2020).

Para a análise estatística foi utilizado o teste de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, que compara o nível de significância dos grupos com relação ao controle. Através da Tabela 1 é possível observar que, com exceção ao controle positivo com MMS, todos os compostos apresentaram diminuição no índice mitótico, sendo possível comprovar a significância através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A diminuição no índice mitótico é responsável pelo mau desenvolvimento das células, a alteração no índice mitótico comprova o potencial citotóxico dos padrões analíticos de atrazina e glifosato. É possível observar que todos os compostos apresentaram alterações cromossômicas significativas, sendo possível comprovar a significância através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A maior alteração cromossômica foi observada no MIXPA 25+160, isso comprova o efeito sinérgico das substâncias. apenas o MIXPA2+65 apresentou índice de mutagenicidade significativo com relação ao controle sendo possível comprovar a significância através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os danos podem ser espontâneos e boa parte é reparada pelo organismo, o que não é reparado, é passado para células filhas e denominado efeito mutagênico. Os efeitos podem ser potencializados com agentes químicos e/ou físicos. Apesar do aumento de micronúcleos encontrados em células meristemáticas de *A. cepa* utilizando glifosato como agente teste, as médias não apresentaram variação significativa quando comparada ao controle negativo. Já a variação apresentada pelo MIX das substâncias apresentou significância quando comparado ao controle negativo, isso mostra que, quando glifosato é combinado a outros herbicidas, como a atrazina, seu potencial de toxicidade é aumentado.

CONCLUSÃO

Atrazina e glifosato apresentaram diminuição no índice mitótico para todas as concentrações avaliadas, também houve uma diminuição no índice mitótico para o MIX das substâncias de ambas as concentrações estudadas. Ambos os compostos apresentaram alterações cromossômicas significativas, também o MIX das substâncias. Com relação ao índice mutagênico, apenas o MIXPA 2+65 apresentou aumento significativo com relação ao controle, porém, sabe-se que o aumento de aberrações cromossômicas apresentado pode, posteriormente, ocasionar micronúcleos, aumentando o potencial mutagênico dos compostos, através das análises realizadas observou-se que, o MIX das substâncias apresentaram maiores índices de aberrações e mutagenicidade, comprovando que a mistura dessas substâncias, que é bastante utilizada principalmente em plantações de milho, é ainda mais prejudicial ao meio ambiente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UTFPR, pelo suporte financeiro, à CAPES (bolsa mestrado Bordin, E.) e à Fundação Araucária (bolsa IC Santos, F.).

REFERÊNCIAS

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA) - **Visão 2030 - O futuro da agricultura brasileira**. Disponível em:
<https://www.embrapa.br/visao/o-futuro-da-agricultura-brasileira>

GRANT, W.F, **Chromosome aberration assays in Allium**, Mutat. Res. 99 (1982) 273-291

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002

USEPA, Escritório de Programas de Pesticidas ; **Pesticide Ecotoxicity Database (2000) on N- (Phosphonomethyl) -glycine (1071-83-6)**. Disponível em
http://cfpub.epa.gov/ecotox/quick_query.htm, a partir de 9 de outubro de 2014

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 3496, Glyphosate**. Disponível em
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Compound Summary for CID 2256, Atrazine**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atrazine>