

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE OCTANOATO DE IOXINILA EM BIOENSAIOS COM *Allium cepa*

Gabriela Ezequiel Costa Martins<sup>1</sup>

Jade Del Nero Oliveira<sup>2</sup>

Luciene de Oliveira Ribeiro Trindade<sup>3</sup>

Sandro Barbosa<sup>4</sup>

## Saúde Ambiental

### RESUMO

A cebola (*Allium cepa* L.), hortaliça de importante valor econômico para o Brasil e para o mundo, além de ser um importante modelo biológico para análises ecotoxicológicas. Seu cultivo frequentemente envolve a utilização de herbicidas para combater as diversas plantas daninhas que podem se desenvolver e estabelecer uma competição no solo prejudicando o desenvolvimento dessa cultura. A utilização de defensivos requer conhecimento acerca de seu modo de ação a fim de evitar o uso intensivo e indiscriminado. Além disso, outra preocupação é o destino desses produtos, que podem interagir com o material genético dos organismos não alvo. O octanoato de ioxinila, pertencente ao grupo das benzonitrilas, está entre as substâncias comumente utilizadas como herbicida na cultura da cebola. Nesse contexto, este trabalho objetivou compreender a ação do octanoato de ioxinila, abordando aspectos citogenéticos utilizando como sistema teste *Allium cepa*. Foram utilizadas 5 diferentes concentrações (0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e 2,5  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do herbicida, água como controle negativo e metil metano sulfonato (MMS) 10ppm como controle positivo. Sementes de *Allium cepa* cv. Baia Periforme foram utilizadas para os ensaios de citogenotoxicidade, determinada pela verificação da presença de anormalidades no ciclo celular e alterações do complemento cromossômico. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste Scott-Knott à 5% de significância utilizando software Sisvar versão 5.6. A análise dos dados revelou que o herbicida provoca redução do índice mitótico e aumento na frequência de anormalidades cromossômicas, demonstrando, assim, seu potencial citogenotóxico.

**Palavras-chave:** Herbicida; toxicidade; índice mitótico; citogenética

---

<sup>1</sup> Mestranda em Ciências Ambientais da UNIFAL-MG – Campus Alfenas. [martins.gec@gmail.com](mailto:martins.gec@gmail.com)

<sup>2</sup> Graduada em Biotecnologia da UNIFAL-MG – Campus Alfenas. [jade.delnero@hotmail.com](mailto:jade.delnero@hotmail.com)

<sup>3</sup> Pós doutoranda PNPd da UNIFAL-MG – Campus Alfenas. [ludeoliveira\\_1@yahoo.com.br](mailto:ludeoliveira_1@yahoo.com.br)

<sup>4</sup> Prof. Dr. do PPG em Ciências Ambientais UNIFAL-MG – Campus Alfenas. [sandrobiogen@gmail.com](mailto:sandrobiogen@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

*Allium cepa* L., a cebola, é uma hortaliça de elevada importância econômica para o Brasil sendo frequentemente cultivada nas regiões sul e sudeste (DE RESENDE; COSTA, 2007). Por apresentar desenvolvimento lento, a cebola é bastante susceptível ao desenvolvimento de diversas plantas daninhas. Por esse motivo, e pela dificuldade

em se fazer um controle mecânico de tais pragas, o uso de diferentes herbicidas se tornou frequente em culturas de cebola (RESENDE; COSTA, 2007b). Os herbicidas são compostos bioativos com capacidade de impedir o desenvolvimento vegetal por provocar diferentes efeitos nas plantas. Podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, a classe química da substância ativa, forma de aplicação e sua seletividade (MARCHI; MARCHI; GUIMARÃES, 2008; OLIVEIRA JÚNIOR, 2011).

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, recomenda vários herbicidas para utilização em cultura da cebola no Brasil, muitos dos quais seu princípio ativo é o octanoato de ioxinila (CAVALIERI, 2011).

De acordo com Marchi, Marchi e Guimarães (2008), é extremamente importante conhecer a forma de atuação de um herbicida a fim de evitar o uso de herbicidas similares em uma mesma cultura e a fim de evitar o uso exagerado do defensivo, uma vez que esse quadro pode levar à seleção plantas resistentes. Dessa forma, torna-se bastante interessante investigar o modo de ação de diferentes herbicidas de forma a prover informações acerca dos efeitos que os mesmos podem gerar nas plantas alvos e na planta de interesse na cultura.

Bioensaios vegetais são utilizados em investigações de toxicidade de diversas substâncias ambientais e sintéticas, podendo fornecer informações sobre alterações cromossômicas estruturais e numéricas (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Testes de citogenotoxicidade são realizados para determinar alterações em diferentes etapas do ciclo celular, no conteúdo cromossômico e no DNA (LIMAN; CIĞERCI; ÖZTÜRK, 2015).

*Allium cepa* é um dos sistemas teste mais recomendados para realização de tais avaliações por possuir características como fácil manuseio, raízes com bons parâmetros morfológicos (AMARAL et al., 2007), características citogenéticas estáveis e bem definidas (CHANDRA et al., 2005), alta sensibilidade e baixo custo de utilização (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Nesse cenário, torna-se importante investigar o efeito de herbicidas utilizados para o combate a plantas daninhas em cultivo de cebola, utilizando a própria *Allium cepa* a fim de verificar os efeitos do herbicida neste organismo, averiguando, assim, sua seletividade, e citogenotoxicidade.

## **METODOLOGIA**

**Determinação das concentrações:** O octanoato de ioxinila foi obtido a partir de um herbicida comercial. De acordo com a bula aprovada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, [S.d.]), o fabricante recomenda, para a cultura de

cebola, a aplicação de  $1\text{L}\cdot\text{ha}^{-1}$  do produto comercial sendo que esse volume deve ser diluído em água (de 200 a 400L de volume de calda). Foram estabelecidas as concentrações utilizadas no presente trabalho: 0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e  $2,5\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  sendo, essa última, o equivalente à concentração de 400L de volume de calda.

**Índice mitótico e anormalidades cromossômicas:** Para determinação do índice mitótico e da frequência de anormalidades cromossômicas sementes de *Allium cepa* cv. Baia periforme foram colocadas em placas de Petri, forradas com duas folhas de papel filtro Whiltmann nº2, contendo 3mL das soluções com herbicida nas concentrações previamente estabelecidas (0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e  $2,5\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sendo água destilada usada como controle negativo e MMA (metil metano sulfonato 10ppm) como controle positivo. Os tratamentos foram mantidas em câmara tipo BOD, a  $25^{\circ}\text{C}$ , com fotoperíodo de 12he as coletas de pontas de raízes realizadas após 72 e 96 horas de exposição.

O material coletado foi armazenado em Carnoy, mantido a  $-18^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . As lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento descrito por Rodrigues e colaboradores (2013). Para determinação do índice mitótico (IM) foram analisadas 6000 células por tratamento, sendo o cálculo realizado por meio da expressão:  $\text{IM} = (\text{NCM} / \text{NTC}) * 100$ , onde NCM é o número de células em mitose e NTC o número total de células analisadas.

Os critérios para aceitar a presença de alterações cromossômicas foram considerados de acordo com os padrões estabelecidos por Leme e Marin Morales (2009) cujo trabalho relata que as anormalidades cromossômicas são caracterizadas por alterações na estrutura ou no número de cromossomos e podem ser visualizadas tanto na intérfase quanto na mitose.

Dentre as anormalidades cromossômicas buscou-se verificar a presença de micronúcleos, cromossomos perdidos, stickiness, C-metáfase, ponte em anáfase, ponte em telófase, cromossomo atrasado em anáfase, cromossomo atrasado em telófase e núcleo lobulado. A frequência das anormalidades cromossômicas foi calculada com base no total de células avaliadas por tratamento.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

**Índice mitótico:** As sementes expostas aos tratamentos apresentados anteriormente foram analisadas após 72 e 96h de exposição. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela:

Tabela 1: Índice mitótico (IM) de sementes de *Allium cepa* verificado após 72 e 96h de exposição aos controles e tratamentos.

Tratamento ( $\mu\text{L.mL}^{-1}$ )	IM (%)		IM (%)	
	72h		96h	
Controle negativo	12 $\pm$ 0,17	aA	5,86 $\pm$ 0,06	aB
0,15	4,32 $\pm$ 0,05	cA	4,27 $\pm$ 0,13	bA
0,31	2,46 $\pm$ 0,10	cB	5,85 $\pm$ 0,07	aA
0,62	7,07 $\pm$ 0,02	bA	3,75 $\pm$ 0,14	bB
1,25	7,07 $\pm$ 0,04	bA	5,85 $\pm$ 0,04	aB
2,5	4,28 $\pm$ 0,12	cA	4,05 $\pm$ 0,09	bA
Controle positivo	3,4 $\pm$ 0,04	cA	2,4 $\pm$ 0,05	cA

Letras minúsculas devem ser comparadas entre os dados da mesma coluna. Letras maiúsculas devem ser comparadas entre os dados da mesma linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p>0,05$ ).

**Anormalidades cromossômicas:** As anormalidades cromossômicas avaliadas foram: cromossomo perdido, cromossomo atrasado, c-metáfase, ponte em anáfase, ponte em telófase, stickiness, núcleo lobulado e micronúcleo. A frequência de anormalidades cromossômicas encontradas em cada tratamento após 72 e 96 horas de exposição estão disposta na tabela:

Tabela 2: Frequência de anormalidades cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* após 72 e 96h de exposição aos tratamentos e controles.

Tratamento	Frequência de Anormalidades (%) – 72h		Frequência de Anormalidades (%) – 96h	
	Controle Negativo	0,42 $\pm$ 0,01	cA	0,34 $\pm$ 0,01
0,15	1,32 $\pm$ 0,27	bA	0,92 $\pm$ 0,04	bB
0,31	1,07 $\pm$ 0,18	bA	1,32 $\pm$ 0,01	aA
0,62	1,72 $\pm$ 0,04	aA	0,92 $\pm$ 0,04	bB
1,25	0,75 $\pm$ 0,05	cA	0,65 $\pm$ 0,08	cA
2,5	1,25 $\pm$ 0,05	bA	1,15 $\pm$ 0,08	aA
Controle Positivo	0,6 $\pm$ 0,11	cB	1,52 $\pm$ 0,04	aA

Letras minúsculas devem ser comparadas entre os dados da mesma coluna. Letras maiúsculas devem ser comparadas entre os dados da mesma linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste Scott-Knott ( $p>0,05$ ).

Observa-se que em todos os tratamentos, a anormalidade encontrada com maior frequência foi o micronúcleo e que a frequência de micronúcleos em todos os tratamentos e controle positivo foi superior àquela encontrada no controle negativo. De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), o micronúcleo é a principal anormalidade cromossômica indicadora de citogenotoxicidade o que torna esse parâmetro importante para a avaliação de contaminantes. A frequência e a distribuição das anormalidades verificadas após os intervalos observados podem indicar que o octanoato de ioxinila apresenta citogenotoxicidade para células meristemáticas de cebola.

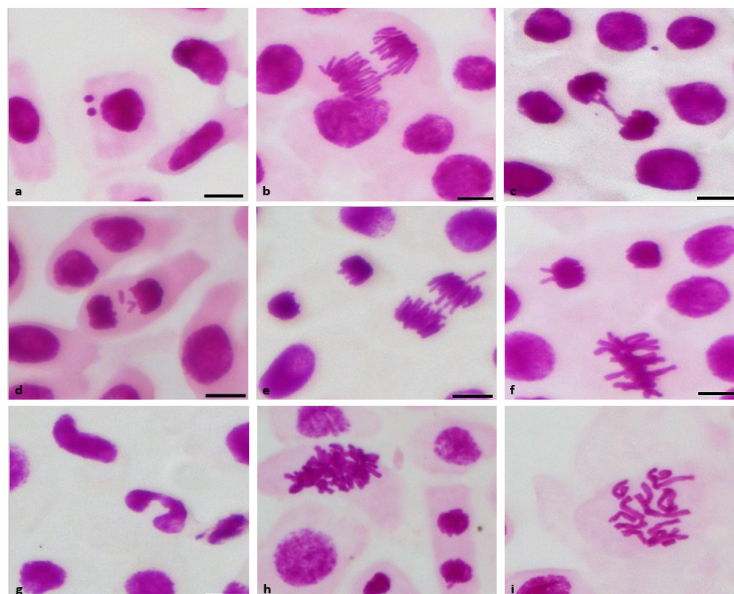


Figura 1: Anormalidades cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao herbicida. Em a: micronúcleo; b: ponte em anáfase; c: ponte em telófase; d: cromossomo perdido; e: cromossomo atrasado em anáfase; f: cromossomo atrasado em telófase; g: núcleo lobulado; h: stickiness; i: c-metáfase. Barra: 10 $\mu$ m.

## CONCLUSÃO

A redução do índice mitótico observada após 72h de exposição aos tratamentos com o herbicida juntamente aos resultados do índice de anormalidades cromossômicas mostram que o octanoato de ioxinilafoi citogenotóxico para o bioteste *Allium cepa*.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos órgãos de fomento CNPq, Capes e FAPEMIG aos recursos e a infraestrutura que facilitaram a realização da pesquisa. Em diferentes momentos e de maneiras distintas, contribuíram para o conhecimento produzido e possibilitaram a produção do presente trabalho.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, A. D. M. *et al.* Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste Allium (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 20, n. 1–2, p. 65–72, 2007.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. *Revista Ambiente e Agua*, v. 10, n. 1, p. 130–140, 2015.

CAVALIERI, S. D. *Agência Embrapa de Informação Tecnológica*. 2011. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn05zz5y02wx5ok0liq1mqmbc6m9w.html>>. Acesso em: 18 maio. 2016.

CHANDRA, S. *et al.* Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of the Total Environment*, v. 347, n. 1–3, p. 46–52, 2005.

RESENDE, G. M.; COSTA, N. D. Cultivo da Cebola no Nordeste. *Sistemas de Produção*, p. 4–7, nov. 2007.

DIZDARI, A. M.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. *Procedia Technology*, v. 8, p. 19–26, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212017313000674>>.

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.

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.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIMAN, R. *et al.* Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 99, n. 1, p. 61–64, 2011.

LIMAN, R.; CIĞERCI, I. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 118, p. 38–42, 2015.

LUBER, J. *et al.* Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca Sativa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 87, n. 2, p. 903–913, 2015.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. *Herbicidas: mecanismos de ação e uso*. **Embrapa Cerrados**. Planaltina-DF: [s.n.], 2008.

MILANEZ DE RESENDE, G.; DUARTE COSTA, N. Plantas daninhas na cebola. **Embrapa Semi-árido**, p. 90, 2007.

MOHAMMED, K. P. *et al.* Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 777, n. 1, p. 29–32, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. S. **Mecanismos de ação de herbicidas**. 1º ed. Curitiba, PR: Omnipax, 2011. Disponível em: <<http://omnipax.com.br/livros/2011/BMPD/BMPD-livro.pdf>>.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 390, n. 1–2, p. 121–127, 1997.