

## ADEQUAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TRIFLURALINA PARA USO COMO CONTROLE POSITIVO EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE SEMENTES DE CEBOLA

VIVIANE AGUILAR VIGHI<sup>1</sup>; CAMILA SILVEIRA SINNEMANN<sup>2</sup>; LUANA BUENO LONGARAY<sup>3</sup>; MAICON NARDINO<sup>4</sup>; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA<sup>5</sup>; VERA LUCIA BOBROWSKI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [vivi\\_vighi@hotmail.com](mailto:vivi_vighi@hotmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [sinnemann08@outlook.com](mailto:sinnemann08@outlook.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – [lubuelong@gmail.com](mailto:lubuelong@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [nardinomn@gmail.com](mailto:nardinomn@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – [biahgr@gmail.com](mailto:biahgr@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – orientadora – [vera.bobrowski@gmail.com](mailto:vera.bobrowski@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A agricultura dos tempos atuais segue dependendo de insumos agrícolas e agentes químicos, em virtude da grande escala produtiva e comercial. Dentre os produtos mais utilizados estão os herbicidas, como por exemplo, a trifluralina, pertencente a classe das dinitroanilinas, a qual tem sido usada na agricultura desde 1963 para o controle de plantas daninhas e tem se apresentado como um excelente herbicida controlando eficientemente gramíneas e algumas espécies dicotiledôneas de sementes pequenas (RAIMONDI et al., 2010; SOFIATTI et al., 2012). O mecanismo de ação deste produto é a inibição da mitose nos tecidos meristemáticos, interrompendo a formação das fibras do fuso acromático e causando má formação celular. As dinitroanilinas agem na divisão mitótica ligando-se ao microtúbulo no lugar das proteínas tubulinas, interrompendo a síntese da fibra e, conseqüentemente, impedindo a movimentação dos cromossomos. Essa classe de compostos não têm efeito na divisão de células animais, o que lhes confere baixa toxicidade ao homem e fauna (ROMAM et al., 2007).

Devido ao seu mecanismo de ação a trifluralina tem sido utilizada como controle positivo em ensaios de biomonitoramento ambiental, assim como o cloreto de níquel, o sulfato de cobre, o paracetamol, o etilmetanosulfonato (EMS), o glifosato, etc., dependendo do bioindicador adotado, visando induzir anormalidades cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico (BRAGA; LOPES, 2015; SANTOS et al., 2018; HISTER et al., 2017). Para se estudar o efeito de um tratamento é preciso comparar os resultados obtidos no grupo experimental com os observados nos grupos controle. As substâncias controle são usadas nos ensaios como um controle de qualidade. A que for selecionada para induzir alterações será o controle positivo, a outra, na qual o efeito esperado é o inverso será o controle negativo (MOORE et al. 1999).

Dentre os bioindicadores vegetais o *Allium test* (cebola - *Allium cepa* L.) é um dos mais utilizados em ensaios toxicológicos, uma vez que é possível obter sementes e bulbos ao longo do ano, é de fácil execução e de baixo custo; resultados obtidos em um curto período de tempo; a espécie apresenta cromossomos grandes e em pequeno número ( $2n=2x=16$ ), facilitando a análise citogenética; os efeitos observados nesse biomonitor correlacionam-se aos verificados em modelos animais, propiciando a detecção de genotoxicidade (aneugênese/clastogênese e alterações cromossômicas numéricas e estruturais); é altamente sensível (GRANT, 1994).

O objetivo deste trabalho foi identificar a concentração adequada de trifluralina a ser utilizada como controle positivo na análise de divisões mitóticas e alterações citogenéticas em células meristemáticas radiculares de sementes de cebola.

## 2. METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante o ano de 2018.

As sementes comerciais de cebola isentas de produtos químicos, foram submetidas à temperatura de 4 °C por sete dias para superação da dormência. Para a execução do experimento, cada concentração do herbicida trifluralina foi diluído em água destilada nas seguintes concentrações para a obtenção dos tratamentos: 0,12; 0,18 e 0,24 mL/L; utilizando-se água destilada como controle negativo. Empregaram-se quatro repetições de 20 sementes as quais foram semeadas em placas de Petri, tendo como substrato uma folha de papel filtro, umedecidas com quantidade de solução de cada tratamento equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Em seguida, as placas foram levadas para câmara de germinação a  $25 \pm 1$  °C. Durante o período do experimento realizou-se o monitoramento da umidade do papel germiteste e para mantê-lo umedecido foi adicionando 2 mL de água quando necessário.

Os efeitos cito e genotóxico dos tratamentos foram verificados pela análise do ciclo mitótico e calculados os índices mitótico (IM), metafásico (IMet) e anafásico (IAf), e das anormalidades cromossômicas (IAC). Para tanto, as raízes foram coletadas quando obtiveram em torno de 0,5cm, fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial) e mantidas por 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as raízes foram transferidas para álcool 70% até a análise microscópica.

Para proceder a análise das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento das raízes (GUERRA; SOUZA, 2002), hidrolisadas em HCL 5 N durante dez minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. Para cada tratamento foram analisadas vinte lâminas e observadas 250 células/lâmina pela técnica de varredura, totalizando 5000 células/tratamento, sendo que cada tratamento continha cinco repetições. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da normalidade residual. Atendendo as pressuposições foi realizada a análise de variância e de regressão linear a 5 % de probabilidade de erro utilizando o programa Statistix 9.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação do ciclo celular permite a detecção da toxicidade por meio de anormalidades no IM e pela presença de alterações cromossômicas ou nucleares, possibilitando entender os efeitos mutagênicos e genotóxicos das substâncias avaliadas (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Neste trabalho, analisando os dados do IM nas diferentes concentrações de trifluralina, foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ). A curva de regressão, apresentada na figura 1, mostra que o modelo de grau dois (quadrática) foi o que melhor representou a relação entre as concentrações testadas, pois com o aumento da concentração do herbicida observamos um decréscimo do IM. Para as demais variáveis avaliadas não houve diferença estatística significativa.

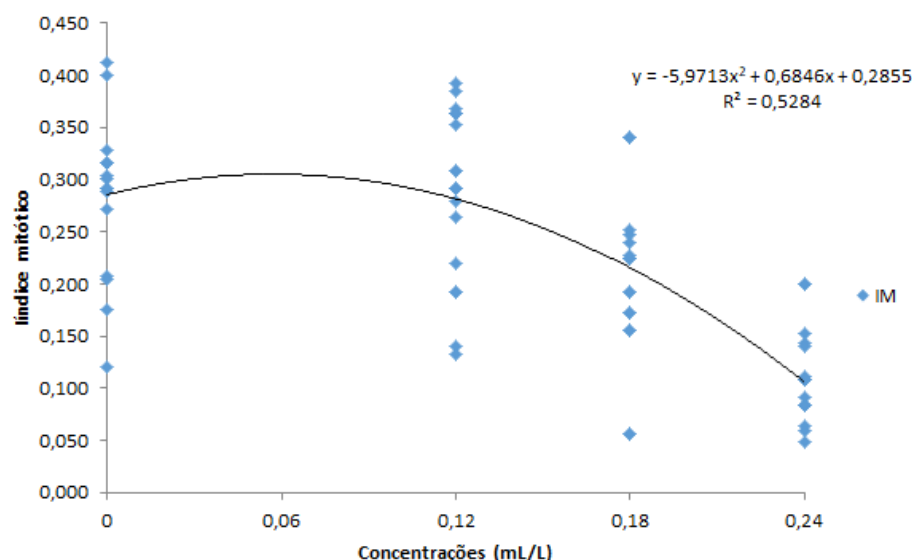


Figura 1. Gráfico da curva ajustada e das médias observadas para a variável índice mitótico (IM) para tecidos meristemáticos radiculares de sementes cebola tratadas com diferentes concentrações do herbicida trifluralina.

O IM é avaliado por meio da contagem de células em divisão pelo número total de células do tecido meristemático (FERNANDES et al., 2007), sendo que a redução desse índice pode ser ocasionada devido a exposição do organismo ao contaminante, causando danos no crescimento e desenvolvimento.

KARASMAILOGLU (2014) cita vários autores que relatam efeitos semelhantes no IM em *Allium cepa* para inseticidas como cipermetrina e fenvalerato, e herbicidas como atrazina, avenoxan e diuron, bem como a trifluralina. De acordo com İLBAŞ et al. (2012), estes compostos atuam causando danos no crescimento e desenvolvimento do organismo devido a um bloqueio na fase G1 ou inibição da síntese de DNA na fase S.

#### 4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que as diferentes concentrações testadas de trifluralina causaram um efeito tóxico reduzindo a proliferação celular em raízes de sementes de cebola, sendo um eficiente controle positivo em bioensaios

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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**, Amsterdam, v.88, p.252-259, 2007.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, p.175-185, 1994.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos**: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo, Funpec, 131p.2002.

HISTER, C.A.L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K.C.; STEFANELLO, R. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste in vivo de *Allium cepa* L. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.43-48, 2017.

İLBAŞ, A.İ., GÖNEN, U., YILMAZ, S., DADANDI, M.Y. Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells, **Turk J Bot**, Ankara, v.36, p.263-268, 2012.

KARASMAILOGLU, M.C. Evaluation of potential genotoxic effect of trifluralin in *Helianthus annuus* L. (sunflower). **Caryologia**, Florence, v.67, n.3, p. 216-221, 2014.

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

MOORE, M.M.; COLLARD, D.D.; HARRINGTON-BROCK, K. Failure to adequately use positive control data leads to poor quality mouse lymphoma data assessments. **Mutagenesis**, Oxford, v.14, n.3, p.261-263, 1999.

RAIMONDI, M.A.; OLIVEIRA JR, R.S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D.F. et al. Atividade residual de herbicidas aplicados ao solo em relação ao controle de quatro espécies de *Amaranthus*. **Planta Daninha**, Viçosa, v.28, p.1073-1085, 2010.

ROMAM, E.S.; BECKIE, H.; VARGAS, L.; HALL, L.; RIZZARDI, M.A.; WOLF, T. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Berthier, 2007.

SANTOS, I.M.C. dos.; MELO, H.M. de; CARNEIRO, J.K.R.; OLIVEIRA, M.A.S. Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica do extrato de *Morinda citrifolia* em diferentes concentrações sobre o teste *Allium cepa*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.17, n.1, p.40-45, 2018.

SOFIATTI, V.; SEVERINO, L.S.; SILVA, F.M. de O.; SILVA, V.N.B.; BRITO, G.G. Pre and post emergence herbicides for weed control in castor crop. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.37, p.235-237, 2012.