



THAÍS TEODORO DE MOURA

**PROSPECÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DE UM
HERBICIDA À BASE DE NICOSULFURON EM CÉLULAS DE
Allium cepa L.**

**LAVRAS – MG
2021**

THAÍS TEODORO DE MOURA

**PROSPECÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DE UM HERBICIDA À BASE DE
NICOSULFURON EM CÉLULAS DE *Allium cepa* L.**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel.

Prof. PhD. Larissa Fonseca Andrade-Vieira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2021**

THAÍS TEODORO DE MOURA

**PROSPECÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DE UM HERBICIDA À BASE DE
NICOSULFURON EM CÉLULAS DE *Allium cepa* L.**

**GENOTOXICITY OF A NICOSULFURON-BASED HERBICIDE IN *Allium cepa*
ROOT TIPS CELLS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do curso de Ciências Biológicas, para obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 23 de Fevereiro de 2021.

Me. Cibelli Paula de Castro UFLA

Me. Francielen Barroso Aragão UFES

Dr. Marcel José Palmieri UFLA

Prof. PhD. Larissa Fonseca Andrade-Vieira
Orientadora

**LAVRAS – MG
2021**

*À minha mãe Patrícia por todo apoio, amor, carinho
e por ser um dos meus exemplos de vida:
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus por me amparar durante este caminho, me concedendo força, coragem e proteção durante todo esse percurso.

A minha mãe, Patrícia, o meu incondicional amor e gratidão, que tanto lutou e não mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Sempre me apoiando em todas as decisões que eu tomasse, e nunca me deixando faltar nada! Continuamente absteve-se de muita coisa para que eu pudesse ter o privilégio de estudar tudo pelo que eu me interessasse, desde diversos curso durante a minha adolescência, até agora durante a graduação. Portanto, devo grande parte da conclusão desta jornada a ti.

As minhas companheiras de moradia, Bruna, Cristiene, Ruliane e Sabrina, por todo apoio afetivo, companheirismo, por todos os ensinamento, e por todas as risadas e momentos descontraídos que tivemos durante o tempo em que moramos juntas, os quais me ajudaram muito a não desistir.

Aos meus amigos, Anna, Gabriel, Geovanne, Lucas, Matheus, Pamela, Pedro e Victória Rafaela, pelo ombro amigo e pelo apoio afetivo durante essa caminhada.

Aos meus amados familiares por toda a torcida e amor.

A minha orientadora, Larissa, por toda atenção, paciência e por todo aprendizado.

A minha orientadora de extensão, Sabrina, por todo o carinho, paciência, amizade e por todo aprendizado. Agradeço também por você ser a mãezona do projeto e por sempre puxar a nossa orelha com carinho.

Aos professores e colegas do curso de Ciências Biológicas pelos saberes compartilhados.

A Universidade Federal de Lavras por ter sido o meu lar durante esses anos.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

A todos vocês; o meu muito obrigada!

RESUMO

Para avaliação de substâncias potencialmente tóxicas que estão no ambiente, diversas técnicas estão disponíveis, entre elas as que se baseiam em análises citogenéticas são particularmente interessantes, incluindo a avaliação da frequência de aberrações cromossômicas (AC) e de micronúcleos (MN). No presente trabalho avaliou-se a genotoxicidade, citotoxicidade e a mutagenicidade de diferentes concentrações de herbicida comercial a base de Nicosulfuron por meio das análises de presença de alterações cromossômicas, de alterações no índice mitótico e da frequência de micronúcleos em células meristemáticas e F1 de raízes de cebola (*Allium cepa* L.). Para isso foram utilizadas 06 diferentes concentrações (1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/L) de herbicida contendo o princípio ativo Nicosulfuron. Tratamento com água ultrapura foi aplicado como controle negativo (CN). Houve redução de até 23% do índice mitótico nos tratamentos em relação ao CN, desta forma, não apresentando efeito citotóxico. A partir da segunda concentração testada (possuindo 3,125 mg/L de herbicida a base de Nicosulfuron) foi observado efeito genotóxico, havendo aumento gradativo e significativo da frequência de alterações cromossômicas em relação ao controle negativo, sendo ainda diretamente proporcional a frequência de divisões celulares. Houve aumento significativo de micronúcleos em relação ao controle negativo a partir da terceira concentração (6,25 mg/L) nas células meristemáticas e apenas na quinta concentração (25 mg/L) nas células de F1, apresentando assim efeito mutagênico nestes tratamentos. As alterações cromossômicas encontradas foram predominantemente aneugênicas.

Palavras-chave: Nicosulfuron. Ecogenotoxicologia. Citogenética.

ABSTRACT

Several techniques are available for evaluation the toxic potential of substances that are in the environmental. The ones based on cytogenetic analyzes are particularly interesting, and includes the evaluation of the frequency of chromosomal aberrations (CA) and micronuclei (MN). In the present work, the genotoxicity, cytotoxicity and mutagenicity of different concentrations of commercial herbicide based on Nicosulfuron were evaluated. It was the analyzed the presence of chromosomal alterations, changes in the mitotic index and the frequency of micronuclei in meristematic and F1 cells from root tip of onion (*Allium cepa* L.). Six concentrations (1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25 and 50 mg/L) of Nicosulfuron present in commercial herbicide were tested. MiliQ water treatment was applied as a negative control (NC). A reduction up to 23% in the mitotic index was observed in the treatments in relation to the NC and so, a cytotoxic effect was not detected. Solutions with 3,125 mg/L or more of Nicosulfuron in the commercial product exert a genotoxic effect with a gradual and significant increase in the frequency of chromosomal alterations in relation to the negative control. There was also a significant increase in micronuclei frequency in relation to the negative control from the third concentration (6,25 mg/L) in the meristematic cells and only in the fifth concentration (25 mg/L) in the F1 cells, thus demonstrating a mutagenic effect of the commercial based Nicosulfuron herbicides in these conditions. The chromosomal alterations observed were predominantly aneugenic.

Keywords: Nicosulfuron. Ecogenotoxicology. Cytogenetic.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Agrotóxicos	11
1.2 Nicosulfuron	11
1.3 Bioensaios	11
1.4 Objetivo Geral	11
1.5 Objetivos Específicos	11
2 MATERIAL E MÉTODOS	12
2.1 Soluções	12
2.2 Modelo Vegetal e Exposição	12
2.3 Análise Citogenética	13
2.4 Análise Estatística	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

Até o momento, estudos utilizando o Nicosulfuron para avaliar sua toxicidade foram conduzidos preferencialmente na espécie vegetal *Zea mays* L. tanto no campo quanto no laboratório e em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura, em solos estudando seus resíduos e em ambientes aquáticos avaliando os efeitos em microalgas e peixes (GONZALEZ & UKRAINCZYK, 1996; LEBOULANGER et al., 2001; SPADER & VIDAL, 2001; CAVALIERI et al., 2008; EROZ-POYRAZ & POYRAZ, 2018). Portanto, o presente trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do Nicosulfuron em células de ponta de raiz de *Allium cepa* L., modelo vegetal que segundo FISKESSJO (1993) é um teste confiável para avaliar os efeitos de produtos químicos e poluentes ambientais em materiais biológicos, ter cromossomos grandes e de fácil visualização, mostrar boa correlação com outros sistemas de testes, ser barato e de fácil manuseio e armazenamento.

1.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são grupos de substâncias utilizadas no meio rural para controle de pragas e doenças, e o Brasil é o país que mais utiliza agrotóxicos no mundo devido a sua extensa área de plantio, havendo predomínio dos monocultivos de soja, milho e cana (PIGNATI et al., 2017; BARBOSA et al., 2020). Ainda segundo BARBOSA et al. (2020), os agrotóxicos são responsáveis por diversas intoxicações que resultam em alterações no funcionamento fisiológico das células por meio do contato digestivo, respiratório, dérmico e ocular.

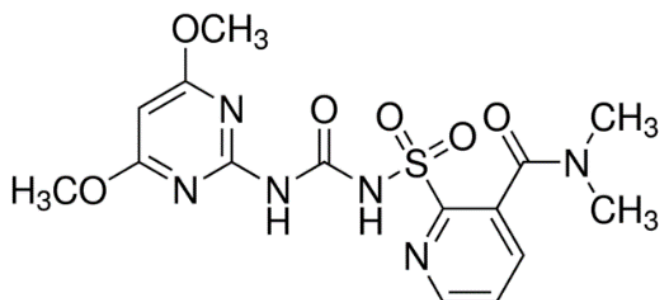
Os agrotóxicos são usados para proteger as culturas contra doenças, pragas e plantas daninhas, sendo os herbicidas, fungicidas e inseticidas as classes mais utilizadas (CORRÊA & PERREIRA, 2018; MELLO et al., 2019). O Brasil é o terceiro maior produtor de milho do mundo e este representa a segunda maior cultura do país (TABOSA, 2015; DE ARAÚJO, 2017; SENA, 2017). Para o milho, o controle químico de ervas daninhas é comumente realizado com herbicidas de pré e pós-emergência (PANNACCI & COVARELLI, 2019).

1.2 Nicosulfuron

Um desses é o herbicida com ingrediente ativo Nicosulfuron, que controla plantas daninhas em pós emergência (MEROTTO JUNIOR et al., 1997). O Nicosulfuron 2- (4,6-

dimetoxipirimidina-2-il-carbamoilsulfamoil) – N, N dimetilnicotinamida ($C_{15}H_{18}N_6O_6S$) pertence ao grupo químico das sulfoniluréias, que promove a inibição da enzima ALS – acetolactato sintase. É um herbicida sistêmico aplicado principalmente para controle de gramíneas e algumas dicotiledôneas (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005 apud CAVALIERI et al., 2008; TREZZI & VIDAL, 2001 apud SCHUELTER et al., 2018).

Figura 1 – Fórmula química da molécula de Nicosulfuron



Fonte: Sigma-Aldrich (2018)

Os resíduos de Nicosulfuron podem ser encontrados no solo, em águas superficiais, águas subterrâneas e em algumas culturas, possuindo persistência baixa a moderada no ambiente (SABADIE, 2002; BENZI et al., 2011). Os herbicidas do grupo químico das sulfoniluréias por serem solúveis em água possuem mobilidade de moderada a alta, podendo penetrar profundamente no solo (BENZI et al., 2011). Segundo o mesmo autor, a degradação natural deste tipo de herbicida pode levar a formação de moléculas novas mais tóxicas e mais estáveis no ambiente, se fazendo assim de extrema importância os estudos de potencial tóxico deste herbicida. Dentre os efeitos já conhecidos desse herbicida em modelos vegetais suscetíveis, se observa a necrose e amarelamento dos ápices, nanismo, clorose das bordas foliares, nervuras avermelhadas, clorose internerval, dormência de sementes e aumento da porcentagem de sementes inviáveis, além de afetar a produção de matéria seca (MARTINS et al., 2007; MARCHI et al., 2008).

1.3 Bioensaios

Os bioensaios de curto prazo tem sido amplamente utilizados para avaliar amostras ambientais (MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). Dentre eles, os que utilizam como modelo plantas superiores, utilizando principalmente pontas de raiz e células mãe de pólen, se destacam por serem altamente confiáveis, excelentes indicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos,

carcinogênicos e mutagênicos, possuem baixo custo e fácil manuseio, além de não precisarem passar por aprovação em comissões de ética e servirem como alarme de efeitos genotóxicos à saúde humana (FISKESJO 1985; GRANT, 1978, 1994, 1999; YI & MENG, 2003; LEME & MARIN-MORALES, 2009; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). No meio ambiente a raiz é a primeira parte da planta a ser exposta a agentes tóxicos presentes no solo e na água, desta forma, a análise de células de pontas de raiz é um método rápido para monitoramento de toxicidade (ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018).

Em meio aos ensaios com plantas superiores, as espécies *Tradescantia paludosa*, *Vicia faba* e *Allium cepa* são as mais frequentemente utilizadas (MA, 1999). O bioensaio com *Allium cepa* foi desenvolvido e descrito por Levan (1938) e resume-se na avaliação das alterações no ciclo mitótico de células meristemáticas de ponta de raiz de cebola. Os bioensaios com este modelo vegetal são comumente utilizados em laboratório, devido sua alta sensibilidade, quando se busca conhecer as alterações no ciclo celular e quebras cromossômicas visando a avaliação de amostras ambientais para estudos de toxicologia ambiental e detecção de genotoxicidade (RANK & NIELSEN, 1993; CAMPOS et al., 2008 apud ANDRADE et al., 2010; SILVEIRA et al., 2017).

A avaliação do ciclo celular, que é composta pela interfase (G1, S e G2) e a fase M (prófase, metáfase, anáfase e telófase), possibilita conhecer a estrutura organizacional dos cromossomos e como eles se comportam durante a divisão celular (ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018). Segundo a mesma autora, as alterações no índice mitótico determinam o grau de citotoxicidade, enquanto que as alterações cromossômicas no ciclo celular determinam a genotoxicidade de um poluente ambiental. Os micronúcleos (MN) são um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, e determinam a mutagenicidade de um poluente ambiental (FISKESJO, 1985; FENECH et al., 1999). Esses são avaliados preferencialmente nas células F1 (células filhas), que são células diferenciadas que já terminaram o processo de divisão celular.

Um dos principais intuitos dos bioensaios que utilizam cromossomos como um sistema de monitoramento é descobrir se uma determinada substância é aneugênica, ou seja, se ela é capaz de gerar alteração na estrutura celular, estando relacionada ao mau funcionamento do fuso mitótico ou à fixação dos cromossomos no fuso, levando ao aumento ou diminuição do número de cromossomos da espécie; ou clastogênica, ou seja, se ela é capaz de gerar quebras cromossômicas, se o dano ocorre diretamente no DNA, levando a alteração na estrutura cromossômica. Sendo que se a substância é clastogênica ela é genotóxica e acarreta em danos citológicos ou genéticos, além disso, quando um químico é testado como clastogênico é também

um possível carcinogênico para humanos (GRANT, 1978; GRANT & OWENS, 2001; LEME & MARIN-MORALES, 2009; ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018). Ainda segundo GRANT (1978) e GRANT & OWENS (2001), herbicidas que causam aberrações cromossômicas em células vegetais também causam em culturas de células animais, apresentando frequentemente aberrações cromossômicas idênticas.

1.4 Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos de um herbicida comercial contendo o princípio ativo Nicosulfuron em células de ponta de raiz do modelo vegetal *Allium cepa* L. (cebola).

1.5 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial mutagênico de diferentes doses de herbicida comercial contendo o princípio ativo de Nicosulfuron por meio da frequência de micronúcleos presentes nas células F1;
- Avaliar o potencial cito-geno-tóxico de diferentes doses de herbicida comercial contendo o princípio ativo de Nicosulfuron por meio das alterações cromossômicas presentes no ciclo celular das células meristemáticas da *Allium cepa* L.;
- Contribuir para os estudos de toxicologia ambiental por meio de ensaios de baixo custo e ampla confiabilidade na determinação e entendimento da ação de agentes tóxicos ao DNA.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos e análises deste trabalho foram realizados no Laboratório de Citogenética, no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

2.1 Soluções

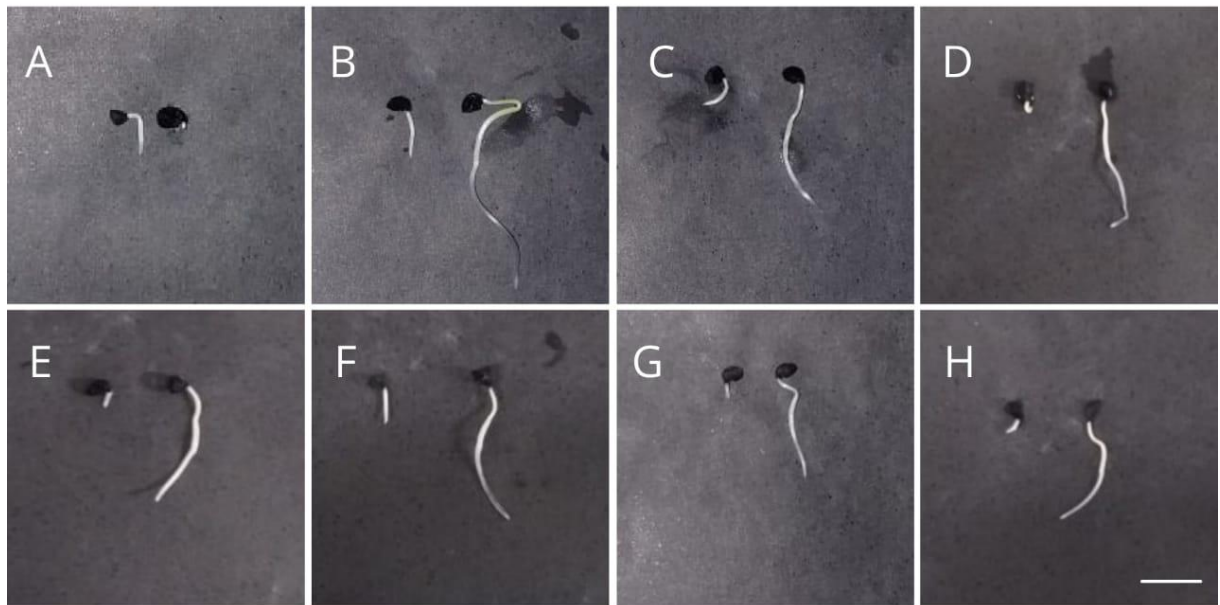
Diferentes volumes (0,8; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25 e 2,50 ml) do produto comercial (NORTOX 40 SC) contendo 40,00 g/L (4,000 % m/v) do princípio ativo de Nicosulfuron foram diluídos em 50 ml de água, obtendo-se as respectivas concentrações finais (1,563; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50 mg/L), nomeadas respectivamente como NIC 1, NIC 2, NIC 3, NIC 4, NIC 5 e NIC 6, que foram utilizadas para tratar as sementes de cebola no presente estudo. A solução de água ultrapura foi utilizada como controle negativo (CN).

2.2 Modelo Vegetal e Exposição

A espécie vegetal utilizada como modelo no estudo foi a *Allium cepa* L. (variedade baia periforme) que foi adquirida em casas agro comerciais locais.

As sementes foram dispostas em placas de Pétri de polietileno de 9 cm de diâmetro, revestidas com papel alumínio, cada uma contendo um papel filtro embebido em 3ml de água MiliQ para germinação. Estas foram mantidas em estufa do tipo BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) na temperatura de 24°C por 48h, sendo que cada placa de Pétri possuía 50 sementes. Após as 48h de germinação, foram selecionadas 20 raízes de cada tratamento e então foram embebidas em 3ml de cada concentração das soluções a serem testadas (item 2.2). Estas foram mantidas em estufa do tipo BOD na temperatura de 24°C por mais 48h. Cada placa de Pétri representou uma repetição e possuía 20 raízes de cebola, sendo que realizou-se 6 repetições por tratamento, seguindo delineamento experimental inteiramente ao acaso. Foram medidas as menores e maiores raízes após a germinação e também após a exposição aos diferentes tratamentos (Figura 2).

Figura 2 – A imagem mostra as medidas das maiores e menores raízes após exposição aos tratamentos e a barrinha branca a direita corresponde a 1 cm. Após a germinação, medindo 4,83mm e 0,96mm (A); CN, medindo 6,53mm e 34,65mm (B); Concentração 1,563 mg/L, medindo 5,48mm e 18,78mm (C); Concentração 3,125 mg/L, medindo 2,57mm e 23,02mm (D); Concentração 6,25 mg/L, medindo 2,68mm e 17,15mm (E); Concentração 12,5 mg/L, medindo 5,30mm e 19,23mm (F); Concentração 25 mg/L, medindo 2,96mm e 16,79mm (G); Concentração 50 mg/L, medindo 3,14mm e 20,32mm (H).



Fonte: Da Autora (2019).

2.3 Análise Citogenética

Após as 48h de exposição aos tratamentos (item 2.2) as raízes foram coletadas e fixadas em Etanol: Ácido Acético (3:1) e armazenadas no freezer por pelo menos 24h. Para o preparo das lâminas as raízes passaram por 3 banhos de 5 minutos cada em água destilada, para a remoção do fixador, seguida por hidrólise com HCl 1M a 60°C por 10 minutos em banho maria. Após, as raízes foram coradas em Reativo de Schiff por 1 hora e 30 minutos em ausência de luz. As lâminas foram então preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921), sendo que para cada tratamento foram confeccionadas 6 lâminas.

As análises foram realizadas em microscópio de luz, na objetiva de 40x, sendo contada 1.000 células por lâmina em 6 lâminas, totalizando 6.000 células por tratamento de cada região. Foram avaliadas lâminas da região F1 das raízes de cebola registrando as fases da divisão mitótica e o número de micronúcleos (MN) observados; e lâminas da região meristemática das

raízes de cebola registrando as fases da divisão mitótica e as alterações cromossômicas encontradas no ciclo celular.

2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2020).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve redução de até 23% do índice mitótico nos tratamentos em relação ao controle negativo. A porcentagem da frequência de alterações cromossômicas cresceu gradativamente e foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações do herbicida comercial contendo o princípio ativo Nicosulfuron, diferindo significativamente do CN a partir da segunda concentração (3,125 mg/L) (Tabela 1).

Tabela 1 - Alterações cromossômicas e frequência de alterações aneugênicas e clastogênicas em células meristemáticas de *Allium cepa* L. nas fases do ciclo celular.

	NIC 5	NIC 4	NIC 3	NIC 2	NIC 1	CN	TRATAMENTO
	39,28	42,28	49,34	48,69	66,81	51,76	PRÓFASE (%)
	39,79	40,38	35,43	32,98	19,34	25,33	METÁFASE (%)
	10,34	10,03	7,09	9,95	5,93	13,22	ANÁFASE (%)
	10,59	7,32	8,14	8,38	7,91	9,69	TELÓFASE (%)
	6,45a ± 0,98	6,15a ± 1,40	6,35a ± 1,02	6,37a ± 0,90	7,58a ± 2,42	7,57a ± 1,33	ÍNDICE MITÓTICO (%)
	2,44	6,90	6,24	0,00	0,00	0,00	NÚCLEO COM BROTAMENTO
	26,84	20,70	31,21	40,00	28,21	14,53	CROMOSSOMOS NÃO ORIENTADOS NA METÁFASE
	9,76	27,61	37,45	13,33	28,21	0,00	C-METÁFASE
	31,72	27,61	6,24	0,00	0,00	0,00	CROMOSSOMOS ADERENTES
	17,08	6,90	12,48	40,00	42,74	42,74	PONTE
	2,44	0,00	6,24	0,00	0,00	0,00	FUSO TRIPOLAR
	0,68bc ± 0,25	0,48bc ± 0,12	0,27b ± 0,11	0,25b ± 0,13	0,12a ± 0,06	0,12a ± 0,06	ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS (%)
	10,77c ± 3,87	7,81bc ± 1,04	4,21ab ± 1,76	4,23ab ± 2,88	1,73a ± 1,07	1,66a ± 1,66	ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS/ DIVISÕES CELULARES
	52,50b ± 23,33	87,78b ± 16,30	68,33b ± 28,00	53,33b ± 24,00	50,00ab ± 40,00	11,11a ± 13,81	ANEUGÊNICAS (%)
	47,50a ± 23,33	12,22a ± 16,30	31,67a ± 28,00	46,67a ± 24,00	50,00ab ±40,00	88,89b ± 14,81	CLASTOGÊNICAS (%)

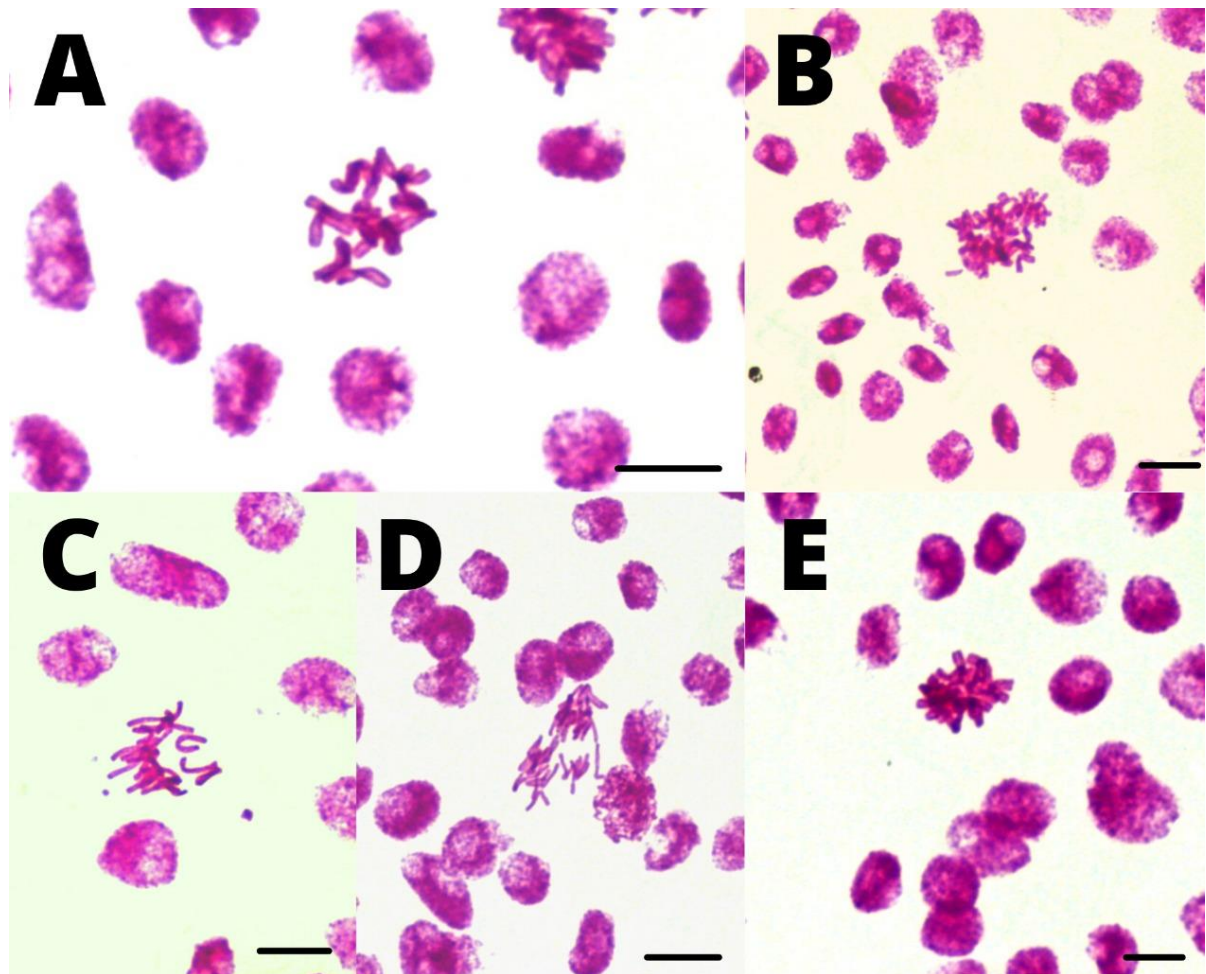
NIC 6	35,71	41,43	11,71	11,14	5.83a ± 0.61	0,00	19,52	34,16	24,40	9,76	2,44	0.68c ± 0.18	11.95c ± 3.34	67.22b ± 20.56	32.78a ± 20.56
--------------	-------	-------	-------	-------	-----------------	------	-------	-------	-------	------	------	-----------------	------------------	-------------------	-------------------

Fonte: Da autora (2021)

Ainda segundo FISKESJO (1993), uma substância só é considerada causadora de efeitos citotóxicos quando possui redução de mais de 50% do índice mitótico, sendo que neste trabalho houve redução máxima de 23%, portanto, o princípio ativo de Nicosulfuron não apresentou efeito mitodepressivo. A frequência de alterações cromossômicas nos tratamentos variou de 0,12% à 0,68%, com um crescimento gradativo, sendo ainda diretamente proporcional ao aumento das concentrações. A relação entre a frequência de alterações cromossômicas encontradas e a frequência de células em divisão no controle negativo foi de 1,66% enquanto que nos tratamentos variou de 1,73% à 11,95%, apresentando também crescimento gradativo. Esses resultados apresentam dose-dependência, a qual também foi encontrada em outros trabalhos utilizando o Nicosulfuron e outros herbicidas (FERNANDES et al., 2009; EROZ-POYRAZ & POYRAZ, 2018).

Há diversos tipos de anormalidades cromossômicas induzidas por pesticidas, algumas delas causadas por alterações na dinâmica do fuso mitótico e correta fixação dos cromossomos. Dentre estas anormalidades aneugênicas, temos a metáfase colchicínica ou c-metáfase. Esta alteração é resultado da interrupção do ciclo celular na metáfase, e é caracterizada por cromossomos que se encontram bem condensados, separados e espalhados no interior das células. As células binucleadas, multinucleadas e poliplóides, por outro lado são consequência do efeito prolongado de um agente tóxico nas células. A presença de cromossomos não orientados no plano equatorial da célula, ou segregação retardada dos cromossomos ou cromátides na anáfase e telófase. A anáfase multipolar e a segregação retardada dos cromossomos ou cromátides na anáfase e telófase, surgem da ação de substâncias químicas na organização dos microtúbulos, e são consequência da ligação incorreta do fuso mitótico ao centrômero dos cromossomos ou do encurtamento e alongamento de alguns microtúbulos do fuso mitótico fora de sincronia com os demais. A presença de cromossomos aderentes ou pegajosos são consequência de alterações físico-químicas do DNA, proteínas, ou ambos, formando aglomerações e indicam efeitos altamente tóxicos dos químicos testados (Figura 3). E os núcleos condensados, indicam morte celular (GRANT, 1978; BABICH et al, 1997; EL-GHAMERY et al., 2003; FREITAS et al., 2016; ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018).

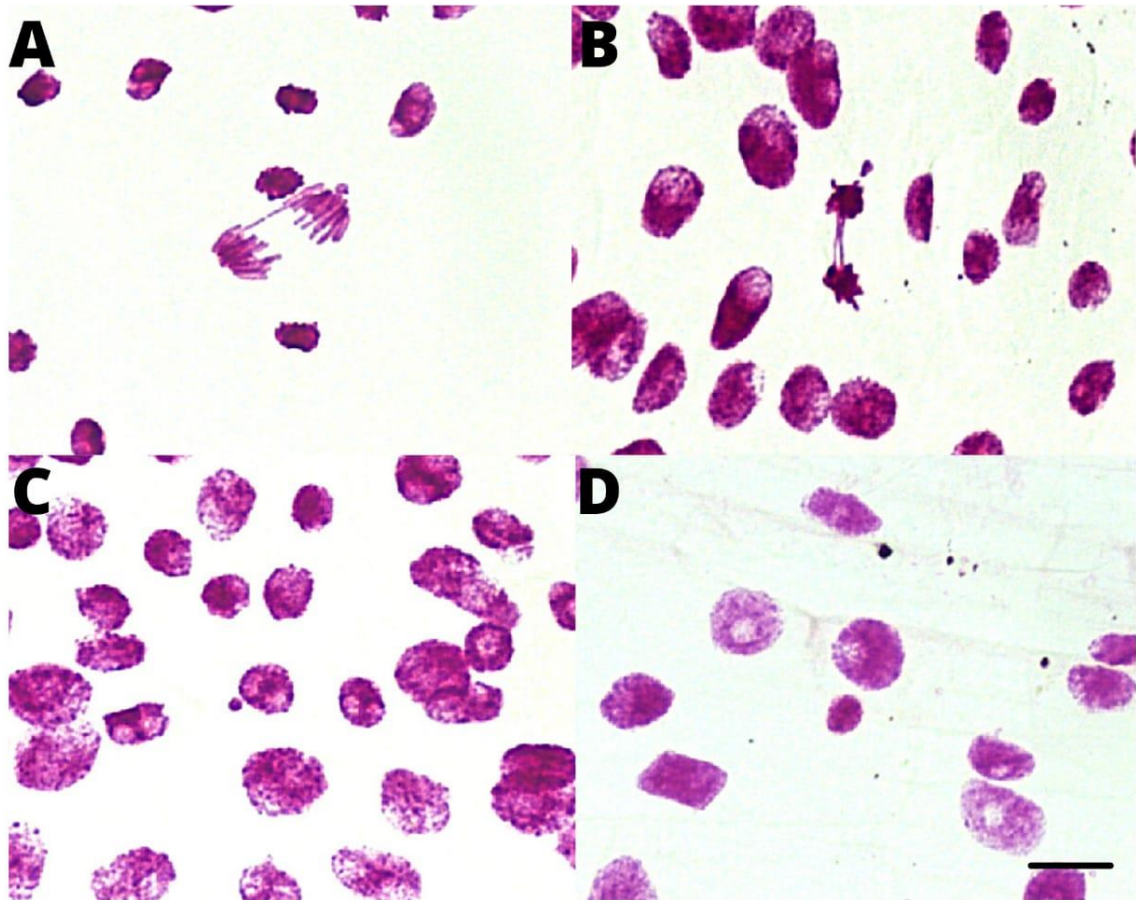
Figura 3 – C-metáfase (A); Metáfase poliplóide (B); Cromossomos não orientados (C); Fuso tripolar (D); Cromossomos aderentes (E). A barrinha preta a direita corresponde a 20 μm .



Fonte: Da autora (2020).

Dentre as alterações clastogênicas se encontram as pontes (Figura 4) e fragmentos cromossômicos, que são originados a partir de quebras na molécula de DNA. As quebras geralmente estão relacionadas a perda dos telômeros (porção final dos cromossomos, cuja função é garantir proteção e estabilidade cromossômica). A ponte se origina a partir da fusão da porção terminal de dois cromossomos que posteriormente são arrastados pelas fibras do fuso ligadas aos seus centrômeros, onde cada um dos centrômeros está ligado ao fuso de um dos pólos celulares. Os fragmentos cromossômicos são reconhecidos pela célula por possuírem partes do material genético, onde posteriormente são envoltos na membrana após a divisão celular, originando os micronúcleos (Figura 4), os quais são facilmente observados nas células da geração F1 (EL-GHAMERY et al., 2003; ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018).

Figura 4 – Ponte na anáfase (A); Ponte na telófase (B); Micronúcleo nas células meristemáticas (C); Micronúcleo nas células F1 (D). A barrinha preta a direita corresponde a 20 μm .



Fonte: Da autora (2020).

A frequência de micronúcleos nos tratamentos NIC 1 e NIC 2 (concentrações 1,563 e 3,125 mg/L) não diferiu significativamente do controle negativo e nem das concentrações seguintes, sendo que houve aumento significativo de MN em relação ao CN apenas a partir da terceira concentração (6,25 mg/L) nas células meristemáticas e a partir desta concentração os tratamentos não diferiram entre si. Nas células de F1, apenas a quinta concentração (25 mg/L) diferiu estatisticamente do CN, sendo que os tratamentos NIC 1, NIC 4 e NIC 6 (concentrações 1,563; 12,5 e 50 mg/L) não diferiram dos demais tratamentos e nem do CN (Tabela 2). Os tratamentos que diferiram do CN apresentaram desta forma efeito mutagênico.

Tabela 2 – Comparação da frequência de micronúcleos nas células meristemáticas em relação as células F1

TRATAMENTOS	MN (%) – CÉLULAS MERISTEMÁTICAS	MN (%) – CÉLULAS F1
CN	0.10a ± 0.10	0,38a ± 0,12
NIC 1	0.22ab ± 0.16	0,50ab ± 0,17
NIC 2	0.20ab ± 0.10	0,33a ± 0,10
NIC 3	0.38b ± 0.15	0,40a ± 0,10
NIC 4	0.68b ± 0.36	0,68ab ± 0,24
NIC 5	0.37b ± 0.20	0,82b ± 0,32
NIC 6	0.37b ± 0.23	0,63ab ± 0,20

Fonte: Da autora (2021)

A análise de micronúcleos está entre os endpoints utilizados para detecção de mutagenicidade, devido a estes representarem danos não corrigidos pelo sistema de reparo celular, e conseqüentemente serem permanentes e transmissíveis às gerações celulares seguintes (ANDRADE-VIEIRA & SILVEIRA, 2018). Os MN são um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formados por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos filhos durante a divisão celular (cromossomos não orientados), estando relacionados a perdas ou quebras cromossômicas, sendo assim um representante de efeitos aneugênicos e clastogênicos de uma determinada substância, e portando, um bom indicador de danos no DNA, cromossômicos e de eventos mutagênicos (FISKESJO, 1985; FENECH et al., 1999; YI & MENG, 2003; LEME & MARIN-MORALES, 2009). As alterações cromossômicas encontradas neste trabalho foram predominantemente aneugênicas, desta forma os micronúcleos encontrados provém de cromossomos inteiros que não foram incluídos nos núcleos filhos devido a alterações nas fibras do fuso mitótico durante o ciclo celular. Foi encontrado maior quantidade de MN em F1 devido a estas células já terem terminado a divisão celular e já estarem diferenciadas, o que vai de acordo com PALMIERI et al. (2016), que diz que células F1 são mais adequadas para se avaliar a frequência de MN. Os resultados obtidos neste trabalho com os testes de micronúcleos vão de acordo com trabalhos anteriores de teste de micronúcleos, que mostram efeito mutagênico do

Nicosulfuron apenas em algumas concentrações, conforme observado nos testes com camundongos apresentado por EXTTOXNET, 1996 apud LEPOSHKIN et al., 2013.

Todas essas alterações cromossômicas, se persistentes e deletérias, ativam os mecanismos de morte celular, que no microscópio são indicados por núcleos interfásicos excessivamente condensados, se apresentando muito mais escuros e menores do que os núcleos interfásicos normais (ANRADE-VIEIRA et al., 2011; ANDRADE-VIERIA et al., 2012).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo vegetal *Allium cepa* L. se provou eficiente para detecção de efeitos cito-genotóxicos e mutagênicos do herbicida comercial contendo o princípio ativo de Nicosulfuron. Este químico não apresentou efeito citotóxico, não induzindo a redução significativa do IM. Entretanto, apresentou efeito genotóxico, induzindo alterações cromossômicas, e mutagênico, induzindo a formação de MN nas células meristemáticas e persistindo nas gerações futuras destas, como observado nas células F1. Seu mecanismo de ação se mostrou predominantemente aneugênico, afetando a dinâmica do fuso mitótico.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C. & GEDRAITE, L. S. **The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 04, p. 626-631, 2010.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.12.012>>
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; BOTELHO, C. M.; LAVIOLA, B. G.; PALMIERI, M. J. & PRAÇA-FONTES, M. M. **Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays**. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 86, n. 01, p. 373-382, 2014.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420130041>>
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S. & DAVIDE, L. C. **Effects of spent pot liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa***. *Journal of Environmental Management*, v. 107, p. 140-146, 2012.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.04.008>>
- ANDRADE-VIEIRA, L. F.; GEDRAITE, L.S.; CAMPOS, J. M. S. & DAVIDE, L. C. **Spent pot liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death**. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 882-888, 2011.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.010>>
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. & SILVEIRA, G. L. **Cyto (Geno) Toxic endpoints assessed via cell cycle bioassays in plant models**. *Cytotoxicity-IntechOpen*, p. 117-129, 2018.
Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72997>>
- BABICH, H.; SEGALL, M. A. & FOX, K. D. **The *Allium* test – A simple, eukaryote genotoxicity assay**. *The American Biology Teacher*, v. 59, p. 580-583, 1997.
Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/4450386>>
- BARBOSA, R. S.; SOUZA, J. P.; ALMEIDA, D. J.; SANTOS, J. B.; PAIVA, W. S. & PORTO, M. J. **The possible consequences of exposure to pesticides: a systematic review**. *Research, society and development*, v. 09, n. 11, 2020.
Disponível em: <<https://doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10219>>
- BELLING, J. **On counting chromosomes in pollen-mother cells**. *The American Naturalist*, v. 55, p. 573-574, 1921.
Disponível em: <<https://www.journals.uchicago.edu/doi/pdfplus/10.1086/279843>>
- BENZI, M.; ROBOTTI, E. & GIANOTTI, V. **HPLC-DAD-MSn to investigate the photodegradation pathway of nicosulfuron in aqueous solution**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* v. 399, p. 1705-1714, 2011.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00216-010-4467-0>>
- CAVALIERI, S. D.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; BIFFE, D. F.; RIOS, F. A. & FRANCHINI, L. H. M. **Tolerância de híbridos de milho ao herbicida Nicosulfuron**. *Planta Daninha. Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas*, v. 26, n. 01, p. 203-214, 2008.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/27962>>

CORRÊA, J. A. J. & PEREIRA, J. N. **Análises das intoxicações por agrotóxicos de uso agrícola no Brasil entre 2009 a 2014.** Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais – Edição Especial do Congresso de Gestão Ambiental do Baixo Amazonas (CONGABA), v. 09 n. 06, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.6008/CBPC2179-6858.2018.006.0017>>

DE ARAÚJO, M. S. P.; DE SOUZA, V. R.; FERREIRA, F. H. A. & DE CARVALHO, D. F. **Evapotranspiração e coeficientes da cultura do milho Caatingueiro em monocultivo e consorciado com feijão-de-porco.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 21, n. 01, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n1p27-31>>

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A. & EL-YOUSER, M. A. A. **Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L.** Mutation Research, v. 537, p. 29-41, 2003.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00052-4)>

EROZ-POYRAZ, I. & POYRAZ, I. **Nicosulfuron genotoxicity on germinated maize (*Zea mays* L.) grains.** Fresenius Environmental Bulletin, v. 27, n. 11, p. 7586-7594, 2018.

Disponível em:

<https://www.researchgate.net/profile/Ismail_Poyraz/publication/329143675_NICOSULFURON_GENOTOXICITY_ON_GERMINATED_MAIZE_ZEA_MAYS_L_GRAINS/links/5e33fdd692851c7f7f0f1827/NICOSULFURON-GENOTOXICITY-ON-GERMINATED-MAIZE-ZEA-MAYS-L-GRAINS.pdf>

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W. P.; ZEIGER, E. & BONASSI, S. **The human micronucleus project – An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans.** Mutations research, v. 428, n. 01-02, p. 271-283, 1999.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00053-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00053-8)>

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C. & MARIN-MORALES, M. A. **Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent – Trifluralin herbicide.** Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72, n. 06, p. 1680-1686, 2009.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>>

FISKESJO, G. **The Allium test as a standard in environmental monitoring.** Hereditas, v. 102, n. 01, p. 99-112, 1985.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>>

FISKESJO, G. **The Allium test – A Potential Standard for the Assessment of Environmental Toxicity.** Environmental Toxicology and Risk Assessment, v. 02, p. 331-345, 1993.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1520/STP13165S>>

FREITAS, A. S.; CUNHA, I. M. F.; ANDRADE-VIEIRA, L. F. & TECHIO, V. H. **Effect of SPL (spent pot liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of histone H3 in *Lactuca sativa* L.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 124, p. 426-434, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>>

GONZALEZ, J. M. & UKRAINCZYK, L. **Adsorption and Desorption of Nicosulfuron in Soils.** *Journal of Environmental Quality*, v.25, n. 06, p. 1186-1192, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.2134/jeq1996.00472425002500060003x>>

GRANT, W. F. **Chromossome aberrations in plants as a monitoring system.**

Environmental Health Perspectives, v. 27, p. 37-43, 1978.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1289/ehp.782737>>

GRANT, W. F. **Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals.** *Mutation Research*, v. 426, n. 02, p. 107-112, 1999.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00050-0)>

GRANT, W. F. & OWENS, E. T. **Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens.** *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v.488, n. 02, p. 93-118, 2001.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(00\)00064-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(00)00064-8)>

GRANT, W. F. **The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens.** *Mutation Research*, v. 310, n. 02, p. 175-185, 1994.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90112-0](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90112-0)>

LEBOULANGER, C.; RIMET, F.; LACOTTE, M. H. & BÉRARD, A. **Effects of atrazine and nicosulfuron on freshwater microalgae.** *Environmental International*, v.26, n. 03, p. 131-135, 2001. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(00\)00100-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(00)00100-8)>

LEME, D. M. & MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application.** *Mutation research*, v. 682, n. 01, p. 71-81, 2009.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>>

LEPOSHKIN, I.; MEDVEDEV, V.; ZHMINKO, P.; GRINKO, A. & ZVARYCH, G. **Toxicology-Hygienic assessment and regulation of nicosulfuron containing herbicides for maize protection.** L.I. Medved's Research center of preventive toxicology, food and chemical safety, Ministry of health, Ukraine (State enterprise). СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ТОКСИКОЛОГІЇ, ХАРЧОВОЇ ТА ХІМІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, 2013.

Disponível em: <

http://www.medved.kiev.ua/web_journals/current/toxicology/3_2013/str24.pdf>

LEVAN, A. **The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*.** *Hereditas*, v. 24, p. 471-486, 1938.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>>

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S. & GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso.** *Documentos Embrapa Cerrados*, p. 36, 2008.

Disponível em:

<<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571939/1/doc227.pdf>>

MARTINS, D.; TRIGUERO, L. R. C.; DOMINGOS, V. D.; MARTINS, C. C.; MARCHI, S. R. & COSTA, N. V. **Seletividade de herbicidas aplicados em pós-emergência sobre capim-braquiária**. Revista Brasileira de Zootecnia. Sociedade Brasileira de Zootecnia, v. 36, n. 06, p. 1969-1974, 2007.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/6001>>

MA, TE-HSIU. **The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China**. Mutation Research, v. 426, n. 02, p. 103-106, 1999.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00049-4](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00049-4)>

MELLO, F. A.; FAGIANI, M. A. B.; SILVA, R. C. R.; & NAI, G. A. **Agrotóxicos: impactos ao meio ambiente e à saúde humana**. Colloquium Vitae, v. 11, n. 02, 2019.

Disponível em: <<http://journal.unoeste.br/index.php/cv/article/view/2285>>

MEROTTO JUNIOR, A.; GLIIDOLIN, A. F.; ALMEIDA, M. L. & HAVERROTH, H. S. **Aumento da população de plantas e uso de herbicidas no controle de plantas daninhas em milho**. Planta Daninha, v. 15, n. 02, p. 141-151, 1997.

Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/77882>>

MITCHELMORE, C. L. & CHIPMAN, J. K. **DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring**. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 399, n. 2, p. 135-147, 1998.

Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2)>

PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; GEDRAITE, L. S. & DAVIDE, L. C. **Cytotoxicity of Spent Pot Liner on Allium cepa root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 133, p. 442-447, 2016.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.016>>

PANNACCI, E. & COVARELLI, G. **Efficacy of mesotrione used at reduced doses for post-emergence weed control in maize (Zea mays L.)**. Crop Protection, v. 28, n. 1, p. 57-61, 2009.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219408001555>>

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C. & PIGNATTI, M. G. **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde**. Ciência & Saúde Coletiva, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>>

RANK, J. & NIELSEN, M. H. **A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures**. Hereditas, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

Disponível em <<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1993.t01-3-00049.x>>

R CORE TEAM (2014). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020.
Disponível em: <<http://www.R-project.org>>

SABADIE, J. **Nicosulfuron: Alcoholysis, Chemical Hydrolysis, and Degradation on Various Minerals**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 03, p. 526-531, 2002.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf010873s>>

SCHUELTER, A. R.; SILVA, M. F.; SOUZA, I. R. P.; MARCOLIN, J. & SCHUSTER, I. **Tolerância genética de linhagens de milho aos herbicidas tembotrione e nicosulfuron**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.17, n. 02, p. 317-327, 2018.
Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1096587>>

SENA, D. V. A.; ALVES, E. U. & MEDEIROS, D. S. **Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. ‘Sertanejo’**. Ciência Rural, v. 47., n. 03, 2017.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150705>>

SIGMA-ALDRICH. **Nicosulfuron**. 2018.
Disponível em:
<<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/nicosulfuron4104111199109411?lang=pt®ion=BR>>

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J. & ANDRADE-VIEIRA, L. F. **Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.** Chemosphere, v. 178, p. 359-367, 2017.
Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>>

SPADER, V. & VIDAL, R. A. **Seletividade e dose de injúria econômica de nicosulfuron aplicado em diferentes estágios de desenvolvimento da cultura do milho**. Cienc. Rural, Santa Maria, v. 31, n. 06, p. 929-934, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000600001>>

TABOSA, F. J. S.; IRFFI, G. D. & PENNA, C. M. **Análise de clube de convergência para o mercado brasileiro do milho**. Revista de Economia e Agronegócio, v. 11, n.1, p. 235-253, 2015.
Disponível em: <<https://doi.org/10.25070/rea.v11i2.220>>

YI, H. & MENG, G. **Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba***. Mutation research, v. 537, n. 01, p. 109-114, 2003.
Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00054-8)>