

IV-195 - UTILIZAÇÃO DO SISTEMA-TESTE *ALLIUM CEPA* NA AVALIAÇÃO DO EFEITO GENOTÓXICO DO PESTICIDA PARATIONA METÍLICA

Barbara Rodrigues Geraldino de Andrade⁽¹⁾

Bióloga pela Universidade Gama Filho. Mestre em Saúde pública pela Escola Nacional de Saúde Pública ENSP/FIOCRUZ/RJ na sub-área Toxicologia Ambiental. Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos na Escola de Química/UFRJ.

Cláudia Giannini Ferreira

Graduanda do Curso de Ciências Biológicas. Aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Tratamento de Águas e Reúso de Efluentes - Escola de Química – UFRJ.

Marcela Carrera de Castro

Graduanda do curso de Engenharia Química. Aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Controle de Poluição das Águas PEQ/UFRJ.

Juacyara Carbonelli Campos

Engenheira Química pela Escola de Química - UFRJ. Doutora em Engenharia Química/Tecnologia Ambiental pela COPPE/UFRJ. Professora Adjunta do Departamento de Processos Inorgânicos da Escola de Química - UFRJ.

Márcia W. C. Dezotti

Graduada em Química pela Unicamp, mestrado e doutorado em Química pela Unicamp e pós-doutorado pela North Carolina State University. Atualmente é Professora Associada no Programa de Engenharia Química da COPPE/UFRJ.

Endereço⁽¹⁾: Laboratório de Controle de Poluição das Águas COPPE/UFRJ. Caixa Postal: 68502 - Rio de Janeiro, RJ- Brasil Cep: 21941-596.Tel: (21) 2562-8302 - e-mail: bandrade@peq.coppe.ufrj.br

RESUMO

Quando se pretende estudar a qualidade da água, as análises físico-químicas consistem de métodos eficientes para avaliar as características gerais, mas pouco expressa sobre a sua toxicidade. A única maneira pela qual se pode avaliar a segurança de uma substância, de várias, ou a interação entre elas e com o meio, é através dos ensaios de toxicidade. Em se tratando de micropoluentes, os danos ocasionados aos seres expostos a estes compostos são aqueles decorrentes da toxicidade crônica, o que significa dizer, que são danos decorrentes da exposição a baixas concentrações por um prazo prolongado. Os pesticidas são apontados por produzir efeitos indesejáveis aos organismos vivos e à biota em geral, como alterações reprodutivas e até mesmo o câncer. Isto porque, alguns destes compostos são completamente seguros e apresentam o potencial de induzir dano ao DNA. Nesse contexto, o presente estudo avaliou o potencial do pesticida parationa metflica induzir mutações e aberrações cromossômicas em células de *A. cepa*. Estudos realizados mostram que o pesticida em estudo, na concentração de 30mg/L, foi capaz de ocasionar a tanto a indução de aberrações cromossômicas, como a formação de micronúcleos. Desta forma, o processo de reavaliação toxicológica deste composto deve ser bem conduzido, de forma a garantir que os riscos sejam verdadeiramente estimados, para que a população e a biota não fiquem expostas a riscos.

PALAVRAS-CHAVE: Pesticida, parationa metflica, genotoxicidade, mutagenicidade, aberrações cromossômicas.

INTRODUÇÃO

Inúmeros poluentes são encontrados em nosso ambiente de consumo, inclusive na água potável, e que na maioria das vezes podem ser encontrados em quantidades muito pequenas (ordem de nanograma por litro), mas que, ainda assim, podem prejudicar a saúde das populações. Doenças como câncer, alterações metabólicas, perda da capacidade reprodutora, deformações em órgãos reprodutores, comportamento sexual anormal e alterações do sistema imunológico são alguns dos problemas relacionados à exposição a este grupo de substâncias.

O uso de pesticidas veio como uma alternativa para solucionar o problema da escassez de alimentos. No entanto, além dos efeitos desejáveis surgiram efeitos maléficos a eles associados, como as alterações

reprodutivas ocasionadas a pássaros que estavam sendo contaminados por produtos lançados nas culturas e a contaminação de muitos outros organismos que consumiam estes alimentos contaminados através da cadeia alimentar.

A larga utilização de agrotóxicos tem trazido uma série de transtornos e modificações no meio ambiente, seja através da contaminação das comunidades de seres vivos que o compõem, seja através da sua acumulação nos sistemas abióticos dos ecossistemas (água, ar, solo, sedimentos etc.). Além de interferir no funcionamento e manutenção adequada dos ecossistemas contaminados, essas substâncias atuam causando efeitos indesejáveis em espécies não alvos, como a espécie humana.

Muitos pesticidas usados na agricultura há bastante tempo, estão sendo submetidos à reavaliação toxicológica. Isto porque, na literatura existem dados acerca dessas substâncias sugerindo que as mesmas possuem ação negativa sobre os organismos, como o pesticida parationa metílica (PM), suspeito por ocasionar dano ao DNA e de alterar o sistema endócrino de seres vivos. A PM é amplamente utilizada no Brasil como inseticida e acaricida, tem seu uso suspenso de diversos países, tendo sido banido, inclusive, na Comunidade Européia.

Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais têm recebido um importante destaque, pois, sabe-se que, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos e químicos, na qual o homem e os organismos possam estar expostos. Nesse contexto, os agrotóxicos representam uma perturbação relevante para muitas espécies aquáticas e terrestres. Tem sido verificado que estes produtos químicos afetam, potencialmente, todos os grupos de organismos em ecossistemas aquáticos, tais como os microrganismos, os invertebrados, as plantas e os peixes.

O ensaio do micronúcleo é um dos testes mais habitualmente usados para avaliar o potencial genotóxico de substâncias, correspondendo à análise da frequência de Micronúcleos (MN), que avalia tanto quebras cromossômicas como disfunções na mitose (FENECH, 2000). Ribeiro (2003) descreve o teste do micronúcleo como uma técnica simples e vantajosa, pelo fato de poder ser usada em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio do cariótipo do organismo teste utilizado, aplicável a qualquer tipo celular.

A utilização de bioensaios utilizando plantas com finalidade de monitorar a presença de compostos tóxicos no ambiente aquático tem sido empregada com êxito nos últimos anos. Em uma extensa revisão sobre pesticidas em plantas superiores, onde foi avaliada a capacidade de pesticidas interferirem com o DNA. Sharma & Panneerselvam (1990) listaram um total de 178 ingredientes ativos testados em pelo menos 31 espécies vegetais diferentes, empregando uma variedade de órgãos e parâmetros genéticos, onde aproximadamente 30% dos compostos foram considerados genotóxicos.

O objetivo principal do presente estudo foi avaliar o potencial genotóxico, isto é, a ocorrência de células com aberrações cromossômicas; e avaliar o potencial mutagênico, através da frequência de micronúcleos, do pesticida parationa metílica sobre células meristemáticas no sistema-teste de *Allium cepa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A parationa metílica (pureza 99%) foi obtida da Supelco® (Sigma-Aldrich). As soluções foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema Milli-Q, usada também como controle negativo (CN). O Metil Metanosulfonato, controle positivo, (CP) é um agente alquilante, amplamente utilizado como indutor de danos no DNA e no presente estudo.

Os ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade e citotoxicidade em células meristemáticas de *Allium cepa* foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982). As sementes de *Allium cepa*, dispostas em placas de Petri forradas com papel filtro, foram colocadas para germinar em água Milli-Q, até que as raízes atingissem o tamanho de 1 a 1,5 cm de comprimento, o que demora em média, 5 dias. Após este procedimento, as sementes germinadas foram encaminhadas para a etapa de tratamento, que consistiu em transferir as sementes já germinadas para placas de Petri contendo as concentrações de PM que se desejava estudar, onde permaneceram por 24 horas. Concomitante ao tratamento com a substância de interesse (PM) foram mantidas, durante o mesmo período, placas de Petri com o grupo controle negativo (água Milli-Q) e grupo controle positivo (MMS).

Decorrido o tempo de tratamento (exposição) que durou 24h, as raízes foram separadas em dois grupos:

1º) o primeiro foi fixado em Carnoy ;

2º) o segundo foi transferido para placas contendo água Milli-Q, onde permaneceu por mais 24h, totalizando 48 horas, que correspondeu ao período de recuperação para avaliar a comportamento das células danificadas.

Após esse período de 48 horas desde o início da exposição, as raízes foram separadas identificadas e fixadas. A fixação ocorreu em Carnoy por 6 a 18 horas em temperatura ambiente. Após a fixação, o material foi armazenado em geladeira (4°C), em uma nova solução de Carnoy recém preparada, até o momento do preparo das lâminas.

As radículas, previamente fixadas, foram lavadas em dois banhos de 5 minutos em água destilada e submetidas ao reativo de Schiff por aproximadamente 2 horas, em câmara escura, segundo metodologia descrita por Feulgen e Rossenbeck (1924) *apud* Mello e Vidal (1978). Com os meristemas corados e lavados em água corrente, as lâminas foram confeccionadas, prontas para a avaliação de aberrações cromossômicas, de micronúcleos, morte celular e análise de índice mitótico.

Foram confeccionadas cinco lâminas por tratamento e analisadas 500 células de cada uma delas, totalizando 2.500 células por tratamento. A observação foi realizada em microscopia óptica, em aumento de 400 vezes, as melhores imagens foram registradas por fotografia.

Para a análise dos efeitos citotóxicos, foram analisados os índices mitóticos (IM) de cada tratamento. Para a análise dos efeitos genotóxicos, todos os tipos de aberrações cromossômicas encontradas, tais como perdas de cromossomos, aderências cromossômicas, pontes cromossômicas, dentre outras, foram consideradas. Para a análise dos efeitos mutagênicos foi registrada a ocorrência de micronúcleos presentes nas células de todos os ensaios realizados.

Para análise estatística dos dados, foram comparadas as médias amostrais com o grupo não exposto (controle negativo) através do teste de Kruskal-Wallis, através do software BioEstat 5.0, para determinar as diferenças entre os grupos.

RESULTADOS

Através da comparação das médias pelo teste de Kruskal-Wallis pode-se afirmar, em nível de significância estatística de 5% ($p < 0,05$), que o controle negativo não apresentou diferença do controle positivo, para o desfecho índice mitótico, mas diferiu estatisticamente do grupo tratado com 30 mg/L de parationa metílica, conforme observado na Tabela 1. Foi observada uma ação citotóxica da PM na concentração de 30 mg/L.

Tabela 1. Número total de células avaliadas por experimento, total de células em interfase e mitose, com respectivos índices interfásico e mitótico.

| Substância | CN | CP | PM |
|----------------------|-------|-------|--------------------|
| No. Células | 2590 | 2881 | 3059 |
| Células em Interfase | 2195 | 2479 | 2728 |
| Células em Mitose | 395 | 402 | 331 |
| Índice Interfásico | 84,75 | 86,05 | 89,18 ^a |
| Índice Mitótico | 15,25 | 13,95 | 10,82 ^a |

[^a ≠ CN ($p < 0,05$)]

A frequência de células nas fases da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) seguiu um mesmo padrão, não tendo sido observada nenhuma diferença entre os grupos, conforme observado na Tabela 2. É possível notar que a maioria das células estava em prófase, esse fato era esperado já que esta é a fase da mitose mais demorada. Em relação aos índices de divisão celular, não foi observada nenhuma diferença estatística.

Tabela 2. Índices de prófase, metáfase, anáfase e telófase. As frequências de células em divisão nos três grupos de tratamento.

| Substância | CN | CP | PM |
|--------------------|-------|-------|-------|
| Índice de Prófase | 85,87 | 85,09 | 78,88 |
| Índice de Metáfase | 3,46 | 4,99 | 6,34 |
| Índice de Anáfase | 2,25 | 3,7 | 4,48 |
| Índice de Telófase | 8,42 | 6,22 | 10,3 |

Em relação ao índice de micronúcleos foi verificado que o CP e a PM diferem estatisticamente do controle negativo, o que comprova a ação genotóxica do pesticida em estudo. Na Tabela 3, pode-se observar que a indução de micronúcleos no grupo tratado com MMS – controle positivo e com 30 mg/L de PM foi muito semelhante. Tendo sido observado em torno de 20% das células em divisão celular (mitose), com presença de micronúcleo, tanto no CP, quanto no PM.

Tabela 3. Número total de células, soma do número observado de MN nas cinco lâminas, índice de mutagenicidade, soma do número de AC e índice de AC, observados em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição durante 24h nas soluções teste.

| Substância | CN | CP | PM |
|------------------------------|------|--------------------|----------------------|
| Nº Total de células | 2590 | 2881 | 3059 |
| Células em mitose | 395 | 402 | 331 |
| Nº de Micronúcleo | 3 | 81 | 74 |
| Índice de Mutagenicidade (%) | 0,76 | 20,15 ^a | 22,36 ^a |
| Nº de AC | 2 | 17 | 43 |
| Índice de AC (%) | 0,51 | 4,23 ^a | 12,99 ^{a,b} |

[^a ≠ CN (p<0,05); ^b ≠ CP (p<0,05)]

Comparando o índice de mutagenicidade e de aberrações cromossômicas, de acordo com o observado na Tabela 3, pode-se considerar que o CP induziu tanto a formação de aberrações cromossômicas, como a ocorrência de formação de micronúcleos. Tal ocorrência deve ter sido ocasionada em virtude do MMS (controle positivo) tratar-se de um agente mutagênico de ação direta e rápida, por isso as células sofreram aberrações cromossômicas e em seguida as aberrações cromossômicas resultaram na origem de células alteradas que se fixaram, resultando na formação de micronúcleos, onde a frequência deste desfecho foi relativamente elevada e significativamente diferente do grupo controle para ambos desfechos.

A PM diferiu estatisticamente (p≤0,05) dos grupos controles (negativo e positivo) no que tange as aberrações cromossômicas, indicando que ela foi capaz de induzir alterações nas células meristemáticas de *A. cepa*, na concentração de 30 mg/L, numa frequência mais elevada que aquela observada no controle positivo (MMS).

As aberrações cromossômicas são originadas de mudanças na estrutura dos cromossomos, resultantes de quebras, trocas ou rearranjos cromossômicos, que podem ser letais ou causar danos genéticos, tanto somáticos quanto herdáveis às células (CHOY, 2001). Neste estudo a concentração de PM testada induziu variados tipos de aberrações, relacionadas principalmente aos efeitos clastogênicos, como as pontes e quebras cromossômicas. As principais alterações encontradas podem ser visualizadas na Figura 1.



Figura 1. a) célula em mitose – anáfase com ponte; b) célula em interfase, em destaque micronúcleo; c) células em divisão celular, telófase com perda cromossômica.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

A parationa metflica foi capaz de induzir aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. Isso pôde ser observado avaliando os índices de aberrações cromossômicas, que foram muito elevados, quando comparados ao grupo controle;

Além de induzir aberrações cromossômicas, a PM na concentração de estudo, foi capaz de aumentar a frequência de micronúcleos. Como os micronúcleos aparecem nas células filhas de células expostas, a observação de ocorrência desse evento surge em resposta ao dano ocasionado às células meristemáticas de *A. cepa*.

Os resultados positivos para mutagenicidade e genotoxicidade, na concentração de 30 mg/L, podem nos indicar as raízes de *A. cepa* constituem um sistema-teste prático, sensível e eficiente para se avaliar os efeitos clastogênicos de uma grande variedade de químicos ambientais.

O mecanismo de ação dos compostos genotóxicos e carcinógenos parece estar relacionado às características eletrofílicas do produto original ou metabólico biologicamente ativo, pois esses acabam se ligando, covalentemente, as macromoléculas dos tecidos vivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. Mutation Research, Amsterdam, v.281, p.89-92, 1982.
2. MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. Ciência e Cultura, São Paulo, v.30, p. 665-676, 1978.
3. SHARMA, C. B. S. R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. Crit. Ver. Plant. Sci., v. 9, pp 409-442. 1990.
4. CHOY, W.N. Regulatory Genetic toxicology tests. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Marcel Dekker, New York, p.93-113. 2001.
5. FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
6. RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagenese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 355p.
7. SHARMA, C. B. S. R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Crit. Ver. Plant. Sci.**, v. 9, pp 409-442. 1990.