



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO
CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS, MUTAGÊNICOS E GENOTÓXICOS DO HERBICIDA TRIFLURALINA, UTILIZANDO *Allium cepa* E *Oreochromis niloticus* COMO SISTEMAS-TESTES

THAÍS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES

ORIENTADORA: Profa Dra. Maria Aparecida Marin Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

Junho - 2005

Aos meus amados pais Bernadete (*in
memorian*) e Josué.

"O trabalho é fundamental, e o êxito não depende só do talento ou inspiração, mas depende, grandemente, da vontade e da "transpiração" ".

(Marin-Morales)

“MÃE

*Em nossa infância de sonhos com a magia do amor
é fada que nos mostra a vida sem os espinhos da dor.*

*E quando, na mocidade, trilhamos grandes desertos,
é estrela de luz amiga guiando os passos incertos.*

*E no fim, desiludidos, sem esperança e ninguém,
é saudade que nos lembra, fomos felizes também!”*

(Gonçalves Ribeiro)

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus adorados pais Bernadete e Josué. À minha mãe pelas melhores lembranças, por nunca ter deixado de estar ao meu lado, mesmo longe dos meus olhos, pois permanece viva em meu coração. Ao meu pai o homem mais maravilhoso e corajoso que já conheci, o pai mais carinhoso e mais lindo do mundo.

Aos meus familiares por sempre torcerem pelo meu sucesso.

À minha querida tia Zilda por zelar pela nossa família e por todas as orações, as quais, tenho certeza, levaram luz ao meu caminhar.

À Elisiana por cuidar do meu pai com tanto carinho.

À minha amiga e orientadora Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales, exemplo de profissional e de ser humano. Obrigada pelos conselhos e pela confiança. Você será sempre meu referencial no trabalho e na vida.

Ao Norberto por compreender os atrasos de sua esposa e invasões em sua casa até altas horas, inclusive em feriados.

Às minhas amigas do coração Vanessa, Maína e Lota por todas as lembranças doces e por saber que apesar da distância e dos muitos afazeres, nunca me esqueceram.

Ao casal que eu mais amo no mundo, Léo e Ira, exemplos de amizade, dedicação, perseverança e acima de tudo de amor.

Aos meus amigos de infância, Juliano, Valquíria e Carla, obrigada por continuarem a fazer parte da minha vida.

Às minhas irmãs, Márcia e Tati. Obrigada pela extrema ajuda na confecção desta dissertação, obrigada pela companhia, pelo cuidado, por todas as alegrias, sorrisos e por compartilharem os momentos de loucura e os poucos de lucidez, vocês são muito importantes pra mim.

Aos meus amigos Zé Guto, Fred, Matheus e Bixão. Ao Zé pela impertinência, pelos vários toques e inesquecíveis momentos. Ao Fred por beber socialmente comigo nas lembranças tristes, nas alegrias e em todos os outros momentos também. Ao Matheus, meu

primeiro e único co-orientado, obrigada pelo respeito, pela confiança e pela ajuda na confecção desta dissertação. Ao Bixão pela companhia mais do que agradável. EU NÃO CONSIGO mais viver sem vocês.

Ao meu querido Du Murakami, obrigada pela confiança, força e pela ajuda na realização deste trabalho. Jamais esquecerei do apoio que me deu em um dos momentos mais difíceis da minha vida.

Ao meu querido amigo Akio Ronaldo pela companhia nos vários finais de semana que passamos trabalhando e pela ajuda na correção das referências bibliográficas desta dissertação.

À Mari sabugosa e ao Salada pela companhia maravilhosa e pelas viagens inesquecíveis.

Obrigada Republikanas (Juzina, Ana, Nayla e Tati) e aos agregados (Espuma, e Ivys) por compreenderem meu mau humor e meu estresse e pelos bons momentos de boas risadas.

Obrigada aos companheiros do Departamento de Biologia: Bombeiro, Reinaldo, Pedro, João, Rosângela, Anita, Juliana, Douglas, Marielle, Fábio Pirulito, Izabela, Jaú, Akio, Zezão e Cauré.

Aos alunos da pós-graduação, principalmente ao Vagner, à Sandra, à Érica, à Thaisa, ao Andrigo, à Lucilene e à Thalita.

Às gatinhas marinsetes Jaqueline, Janaína, Daniela, Renata, Angélica e Dânia por compartilharem as dúvidas e as poucas certezas. Obrigada por entenderem o monopólio da orientadora e dos computadores.

Ao amigo Kleber Gagari pela amizade e por me dar todas as dicas sobre os cuidados com os peixinhos e por me ensinar a preparar minha primeira lâmina de sangue.

Ao Biólogo Frederico Gonzalez Colombo Arnoldi pela assistência e colaboração na área Molecular.

Obrigada à Profa. Dra. Sanae Kasahara e à Profa. Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti do Laboratório de Citogenética e Mutagenese da UNESP-Rio Claro.

Agradecimento especial à Profa Dra Dejanira Fransceschi de Angelis do Laboratório de Toxicidade de Águas da UNESP-Rio Claro por oferecer estrutura adequada para a realização da minha pesquisa e pelo apoio acadêmico.

Ao Prof. Dr. Marcos Aparecido Pizano por ter sido extremamente prestativo e por todas as pertinentes sugestões para o meu trabalho.

À Profa. Dra. Doralice Maria Cella do Departamento de Biologia da UNESP-Rio Claro pelas dicas e sugestões.

Ao Prof. Dr. José Carlos Marconato do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP-Rio Claro por ajudar a esclarecer minhas dúvidas de química.

À Profa. Dra. Eliane Gonçalves do Departamento de Zoologia da UNESP-Rio Preto pelo fornecimento dos peixes para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Silvia Tamie Matsumoto e à minha amiga Sílvia pelo carinho, por ter cuidado de minhas tristezas e por todas as sugestões.

À Profa. Dra. Lúcia Regina Ribeiro pela aquisição do indispensável filtro do cometa e por incentivar, a todos, o conhecimento e a pesquisa.

Ao Prof. Dr. Roberto Goitein pelas informações sobre a fisiologia e comportamento dos peixes.

Agradeço aos técnicos e amigos do Departamento de Biologia e do Departamento de Bioquímica e Microbiologia da UNESP-Rio Claro: Rogilene, Gerson, Anderson, Beto e Zito.

À Cristiane Mileo, desenhista do Departamento de Biologia, pela amizade e por me salvar quando meu computador entrava em crise.

À todos os funcionários da UNESP-Rio Claro, principalmente, à Lucila, à Heloísa, à Neusa e ao Betinho.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação da área de Biologia Celular e Molecular da UNESP-Rio Claro.

Ao Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro.

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Deus por me permitir vivenciar toda essa experiência.

Enfim...

“Aos que se tornaram familiares, aos que nasceram familiares e aos que conheci antes de ontem;

Aos que me deixaram louca e aos que enlouqueci;

Aos que me criticaram em tudo e a um ou outro que aturou minha “chatura”;

Aos amigos que passaram e aos que se estagnaram em mim;

Aos que me consideram muito e aos que com razão fizeram pouco;

Aos que conhecem o que penso e aos que só conhecem o que faço;

Aos que passam o dia todo comigo e aos que estão o tempo todo em mim.

Este trabalho é a soma de todos vocês. E se não é melhor, é por falta de memória, mas não por falta de amigos”. (Efraim Rodrigues)

ÍNDICE

	<i>páginas</i>
1. RESUMO	11
2. ABSTRACT	12
3. INTRODUÇÃO	13
4.OBJETIVOS GERAIS.....	15
5. REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1. Mutagênese ambiental	16
3.2. Aspectos da lei dos agrotóxicos	18
3.3. Contaminação ambiental por agrotóxicos	19
3.4. Allium cepa como organismo teste	21
3.5. Teste de aberrações cromossômicas em Allium cepa	23
3.6. Peixes como organismo-teste.....	25
3.7. Teste do micronúcleo	26
3.8. Ensaio do cometa.....	29
6. ARTIGO 1 (artigo de revisão)	32
Caracterização, Modos de Ação e Efeitos do Herbicida Trifluralina.	
7. ARTIGO 2.....	86
Indução de Aberrações Cromossômicas e Nucleares em Sistemas- Teste de Allium cepa pela Ação do Herbicida Trifluralina.	
8. ARTIGO 3.....	126
Evidências de Ação Mutagênica do Herbicida Trifluralina sobre Sistema Teste de <i>Allium cepa</i> .	
9. ARTIGO 4.....	157
Efeitos do Herbicida Trifluralina em Sistema Teste de <i>Oreochromis niloticus</i> .	

10. ARTIGO 5.....	181
Ensaio do Cometa como Ferramenta de Avaliação do Potencial Genotóxico do Herbicida Trifluralina.	
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	194
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	198

1. RESUMO

O controle de plantas daninhas é fundamental para a produção agrícola, devido à sua competição pelos fatores limitantes de crescimento (nutrientes, água, luz) e aos seus efeitos alelopáticos. Pesticidas orgânicos sintéticos têm se tornado um importante elemento nas práticas de produção agrícola tecnificada, dando um grande impulso na indústria agroquímica em todo mundo. Os benefícios de tais produtos são claramente visíveis nos substanciais aumentos na produtividade. No entanto, o destino final desses compostos orgânicos, principalmente dos herbicidas, têm causado sérias preocupações, pelo grande volume utilizado. Preocupados principalmente com a possível interação desses produtos com o material genético dos organismos, nosso estudo visou compreender a ação da trifluralina, por ser este herbicida amplamente utilizado na agricultura. O presente estudo aborda avaliações toxicológicas, de mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade do herbicida trifluralina. Também foram abordadas as características químicas, físicas, persistência, mobilidade, processo de degradação e mecanismos de ação do herbicida. Alguns dados foram obtidos junto às pesquisas realizadas na literatura científica disponível sobre o produto, mas a maioria das apresentações, aqui registradas, são decorrentes da própria investigação realizada com a aplicação do produto em organismos testes. Os dados obtidos foram comparados e discutidos, principalmente, com citações de autores especialistas no estudo da ação do produto e nas publicações da Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (USEPA). Aspectos da legislação brasileira dos agrotóxicos também foram sucintamente abordados.

Palavras chave: Trifluralina, toxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*.

2. ABSTRACT

The controlling of weed plants is fundamental for agricultural production, due to their competition by the limiting factors of growing (nutrients, water, light) and due to their allelopathic effects. Synthetic organic pesticides have become an important element in the practice of technical agricultural production, resulting in a great impulse in agrochemical industry around the world. The benefits from these products are clearly visible in the substantial increasing in the productivity. Otherwise, the final destination of these organic compounds, mainly of the herbicides, have caused serious worrying because their high volume. Preoccupation mainly with the possible interaction of these products with the genetic organisms material, our study has the aim to examine the trifluralin action because this herbicide is widely utilized in the agriculture. The present work also looks at the toxicological interactions of mutagenicity, genotoxicity and carcinogenicity of the trifluralin herbicide as well the chemical and physical features, persistence, mobility, degradation process, and herbicide action mechanisms. Some data are from researches done in the available scientific literature about the product, but the majority of the presentation here reported is from our own investigation realized with the application of products in test organisms. The data collected were compared and discussed mainly with report of expert authors in the study of the action of the product and using publications in the United States Environmental Protection Agency (USEPA). Aspects of Brazilian agrotoxic legislation were also briefly discussed.

Key-words: Trifluralin, toxicity, mutagenicity, genotoxicity, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus*.

3. INTRODUÇÃO

A agricultura praticada em nosso país ainda é altamente dependente de insumos químicos, dentre os quais os agrotóxicos. Os agrotóxicos vêm sendo usados por mais de quarenta anos devido a sua eficácia em controlar uma grande variedade de pragas, doenças e plantas daninhas que infestam as lavouras, garantindo uma maior produtividade e, conseqüentemente, um maior retorno econômico da atividade agrícola.

Sem o uso de agrotóxicos, a produção e a qualidade dos alimentos seria drasticamente afetada, como também haveria um comprometimento na disponibilidade de alimentos que poderia levar a uma substancial alta nos preços dos produtos agrícolas. Embora os benefícios do uso de agrotóxicos sejam claros, muitos questionamentos são feitos sobre a real necessidade de sua utilização, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente. Seus efeitos adversos, como o comprometimento da saúde da população e a contaminação do meio ambiente, passam muitas vezes despercebidos pela sociedade diante dos benefícios econômicos gerados. No entanto, tem-se observado, ao longo dos anos, que o uso indiscriminado dos agrotóxicos tem levado ao aparecimento de resíduos desses compostos nos diferentes compartimentos do meio ambiente (água, solo e ar) e em produtos alimentícios. Devido à periculosidade que os agrotóxicos apresentam à saúde humana e à manutenção da biodiversidade, há hoje uma necessidade urgente de se intensificarem os estudos que possibilitem um monitoramento

eficiente de possíveis contaminações ambientais. Tais estudos são fundamentais para que se estabeleçam estratégias visando a redução dos riscos de contaminação. Ainda hoje, há uma escassez de informações precisas sobre os mecanismos de ação, as medidas de segurança para a aplicação de agrotóxicos, bem como sobre os seus efeitos sobre o ambiente e sobre a saúde humana.

Apesar da dificuldade em se estabelecer ligações diretas entre os efeitos ecológicos e a saúde humana, o uso de espécies sentinelas, associadas aos problemas ambientais, é a base para essa conexão. A comunidade científica como um todo admite hoje que a saúde humana depende da saúde ambiental e que a contínua degradação do meio ambiente ameaça a qualidade de vida da população.

Muitos tipos de organismos são utilizados como bioindicadores da avaliação de possíveis efeitos de contaminação natural ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos, vermes bênticos, esponjas, anfíbios e peixes têm sido utilizados como biomonitores de toxicidade de poluentes. Plantas, particularmente *Tradescantia*, *Allium cepa* e *Vicia faba*, têm sido utilizadas para a avaliação da poluição presente na água, no solo e na atmosfera.

Estudos genéticos podem contribuir na compreensão dos modos de ação de diversas substâncias. Os estudos dos processos pelos quais as células são mutadas, tanto espontaneamente como por agentes ambientais, são extremamente importantes para a manutenção dos ecossistemas e do bem estar da humanidade. Atualmente, várias ferramentas genéticas estão disponíveis para o estudo de mutagenicidade e genotoxicidade, pois constituem um suporte tecnológico para o desenvolvimento de metodologias mais eficientes que possam complementar dados já existentes, ampliando os conhecimentos sobre a complexidade genética e fisiológica dos organismos. Essas ferramentas têm sido utilizadas como recursos importantes para a detecção e caracterização das potencialidades de indução de danos genéticos por xenobiontes e para o entendimento de como esses eventos ocorrem na complexidade dos organismos.

4. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho foi:

- Investigar os possíveis danos celulares e genéticos, decorrentes da exposição a doses residuais do herbicida trifluralina nos organismos testes *Allium cepa* (cebola) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Para esta investigação, foram utilizados testes capazes de avaliar mutagenicidade do herbicida tais como o teste de aberrações cromossômicas e o teste do micronúcleo. O ensaio do cometa também foi realizado em eritrócitos nucleados de *Oreochromis niloticus* com a finalidade de se avaliar a ação genotóxica do herbicida;
- Avaliar a sensibilidade dos testes e dos organismos utilizados como bons bioindicadores na investigação de xenobiontes;
- Contribuir com informações sobre os potenciais efeitos do herbicida trifluralina sobre o meio ambiente, além de fornecer subsídios que possam servir de alerta para possíveis efeitos sobre o homem.

5. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Mutagênese ambiental

Os seres vivos estão expostos às ações de numerosos agentes potencialmente tóxicos. Estes agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos e podem provocar efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e, em alguns casos, genéticos (ARNAIZ, 1995).

A toxicologia estuda a ação de compostos químicos e outros xenobióticos sobre os organismos, com ênfase especial nos efeitos adversos ou danosos (RAND & PETROCELLI, 1985). A genética toxicológica tem por finalidade identificar e analisar a ação desses compostos em relação a sua capacidade de interagir com o material genético dos organismos (AL-SABTI & METCALFE, 1995).

Pesquisas que investigam a ação de agentes mutagênicos ambientais vêm tendo grande importância, pois se sabe que, embora ocorram mutações espontâneas, a maior parte delas é induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, aos quais o homem pode estar exposto (MATSUMOTO, 2004).

Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações na molécula de DNA, que podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células. Alterações não reparadas, ou reparadas erroneamente, originam mutações de ponto e/ou

cromossômicas (CONNOR & FERGUSON, 1993), tais como quebras e "gaps" que são normalmente visualizadas em cromossomos metafásicos. Na anáfase, os tipos aberrantes encontrados são geralmente quebras, perdas, pontes cromossômicas e multipolaridades. As quebras podem ser simples ou aos pares, e as pontes podem ser simples ou múltiplas (NATARAJAN & OBE, 1982; PAVLICA et al., 2000; MATSUMOTO & MARIN-MORALES, 2004). A maioria das substâncias químicas com potencial mutagênico é capaz de alterar o material genético em todas as fases do ciclo celular, porém, para se fixarem como alterações cromossômicas, necessitam de mecanismo de replicação do DNA, logo após a ocorrência dessas alterações (OBE & BEEK, 1982).

Muitos agentes mutagênicos induzem efeitos sobre núcleos eucromáticos, que podem ser detectados citologicamente pela inibição e interrupção do progresso da divisão celular, aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, troca de cromátides irmãs entre outros, utilizando diferentes organismos-testes como bactérias, plantas e animais, tanto *in vitro* como *in vivo* (PEÑA, 1996).

Efeitos genotóxicos podem promover quebras no DNA, acarretando em perda de material genético e mutações que inviabilizam a célula ou que decorrem em processos carcinogênicos. Atualmente, a genotoxicidade é avaliada utilizando-se diversos testes que incluem vários organismos e resultam em informações seguras e precisas, quanto à potencialidade em causar lesão no DNA.

Muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico de agentes poluidores, tais como: análise de aberrações cromossômicas, análise de DNA "*fingerprinting*", análise da frequência de quebras na molécula de DNA; ensaio do cometa; quantificação dos adutos de DNA e teste do micronúcleo (McCARTHY et al., 1989; DEPLEDGE, 1996; MATSUMOTO et al., 2005).

Assim, dependendo da mutação a ser investigada e do tipo de material a ser avaliado, é realizada a escolha do organismo e do teste mais adequado ao estudo (MATSUMOTO, 2003).

O uso de bioensaios é eficiente para a identificação de toxicidade. Segundo White et al. (1996) muitas fontes poluidoras são capazes de reduzir a sobrevivência de um organismo. A redução da sobrevivência se deve aos danos causados no genoma das células

somáticas e/ou germinativas. Esses danos têm sido relacionados às desordens genéticas e ao câncer.

Bioensaios com *Salmonella* (teste de Ames) são, freqüentemente, utilizados para avaliação de mutagenicidade de agentes xenobiontes. Desde o advento destes testes, muitas outras análises têm sido utilizadas para avaliar a mutagenicidade, sendo o DNA o alvo desses estudos (WHITE et al., 1996).

Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de mutagenicidade é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK et al., 2002).

De acordo com Steinert (1996), o ensaio do cometa tem sido considerado um teste sensível para avaliar estresse citotóxico e genotóxico e pode detectar a influência de um amplo espectro de agentes contaminantes.

O teste de SMART, que utiliza a espécie *Drosophila melanogaster*, além de utilizar um organismo experimental eucariótico, possibilita a detecção simultânea de mutações gênicas e cromossômicas (GRAF et al., 1986; WÜRGLER & VOGEL, 1986).

O ensaio do micronúcleo avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, caracterizando a potencialidade mutagênica do agente estudado. A técnica é aplicada, principalmente, em monitoramento da poluição ambiental e usa diversos organismos testes (roedores, peixes e plantas, dentre outros) como bioindicadores.

3.2. Aspectos da lei dos agrotóxicos

Segundo Grisolia (2005), o Brasil possui uma legislação específica sobre os agrotóxicos (Lei nº 7.802/89), lei esta que regulamenta seu uso em todo o território. Esta legislação apresenta parâmetros bem semelhantes aos das legislações dos países europeus, dos Estados Unidos e do Canadá, as quais prevêm a proibição de um agrotóxico que apresente características de carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade, que provoquem distúrbios hormonais ou danos no aparelho reprodutor ou ainda apresentem características que causem danos ao meio ambiente.

Desde a implantação da lei dos agrotóxicos, há 15 anos, nenhum agrotóxico no Brasil sofreu qualquer tipo de restrição por apresentar as características antes citadas. O processo de registro completa-se após as avaliações de eficácia agrônômica pelo Ministério da Agricultura, de toxicidade à saúde humana pelo Ministério da Saúde e de periculosidade ao meio ambiente pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama), sendo o Ministério da Agricultura o órgão registrante (GRISOLIA, 2005).

3.3. Contaminação ambiental por agrotóxicos

Os agrotóxicos são biocidas por natureza, isto é, são venenos utilizados na agricultura para exterminar alguma forma de vida, aquelas que para o homem constituem uma praga agrícola. Assim, não há agrotóxico inofensivo e nesse grupo muito diversificado de compostos químicos, alguns fungicidas, inseticidas e herbicidas são extremamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana (GRISOLIA, 2005).

O emprego dos agrotóxicos na agricultura resultou em um aumento considerável na produtividade mas, por outro lado, trouxe conseqüências adversas ao homem, visto que estes agentes estão relacionados com uma variedade de doenças, incluindo o câncer, assim como conseqüências adversas ao ambiente. A prática mundial do uso de agrotóxicos, muitas vezes indiscriminada e abusiva, vem trazendo preocupações às autoridades públicas e aos envolvidos com saúde e sustentabilidade de recursos naturais, em conseqüência da contaminação ambiental (UETA et al., 1998).

Inúmeros trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos no ecossistema (PARSONS & WITT, 1989). Dentre os efeitos nocivos ao ambiente pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar e ocasionar danos à saúde (EDWARDS, 1973).

Os efeitos mutagênicos derivados da ação de agrotóxicos podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear, incorporação no DNA durante a replicação celular, interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula (VEIGA, 1995).

A avaliação dos níveis de contaminação terrestre por agrotóxico envolve a utilização de espécies silvestres, como roedores, marsupiais, répteis e anfíbios, como

bioindicadores. Nesses animais pode-se estudar as frequências de aberrações cromossômicas, as lesões neurológicas, a fertilidade e a ocorrência de tumores associados à detecção, por espectrofotometria ou cromatografia, de resíduos no sangue ou nos tecidos, além de detectar danos no DNA, por meio do ensaio do cometa (GRISOLIA, 2005).

Os impactos dos agrotóxicos sobre a biota do solo variam de acordo com as suas características físicas e com o tipo de microflora. A meia-vida do agrotóxico no solo e o risco de contaminação do lençol freático dependem também da interação de diferentes fatores, como: estrutura molecular, intensidade de aplicação, características físicas e microbiológicas do solo e vias de degradação do agrotóxico (GRISOLIA, 2005).

Hayes et al. (1995) relataram a incidência de linfomas malignos em cães expostos ao herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D). Os cães expostos ao 2,4-D apresentaram resíduos do herbicida na urina. A exposição decorreu do fato de que nos Estados Unidos o 2,4-D é muito utilizado na manutenção de gramas em jardins, quintais e pátios.

Em relação à água, embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996). Uma vez na água, dependendo das características físico-químicas, o resíduo do agrotóxico pode tanto se ligar ao material particulado em suspensão, como se depositar no sedimento do fundo ou ser absorvido por organismos, podendo então ser detoxicados ou acumulados (NIMMO, 1985). Existem diversos estudos na literatura para se determinar a presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas (MALLET & MALLET, 1989; DURAND & BARCELO, 1989; BARCELO, 1994; BARCELO et al., 1996), além de estudos sobre os efeitos de herbicidas sobre organismos aquáticos (TUNDISI, 1990; RODRIGUES, 1993).

Os químicos utilizados na agricultura podem chegar aos rios carregados pelas chuvas, por despejos industriais e urbanos e por assoreamento do solo (YAMAGISHI et al., 1981; OHYAMA et al., 1986). Além disso, os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos por aplicações intencionais ou por deriva e escoamento superficial, a partir de áreas que sofreram aplicações diretas desses produtos (EDWARDS, 1973).

Os agrotóxicos presentes em corpos d'água podem penetrar nos organismos aquáticos através de diversas portas de entrada. O grau de acumulação desses produtos depende do tipo de cadeia alimentar, da disponibilidade e persistência do contaminante na água e, especialmente, de características físicas e químicas que possuem (SPACIE & HAMELINK, 1985). Os peixes e invertebrados podem acumular os agrotóxicos em concentrações muito acima daquelas encontradas nas águas nas quais eles vivem, pois estes compostos podem se ligar ao material particulado em suspensão e serem ingeridos pelos organismos aquáticos (NIMMO, 1985), dentre outros processos. Vários países, principalmente aqueles em desenvolvimento, têm sofrido com os problemas derivados dos efeitos adversos dos compostos químicos encontrados nos ecossistemas, que vem influenciando na sobrevivência de organismos aquáticos como, por exemplo, os peixes (PARKINSON & AGIUS, 1988).

3.4. *Allium cepa* como organismo teste

Vegetais superiores são sistemas genéticos freqüentemente utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais. Atividades mutagênicas de químicos podem ser analisadas em diferentes sistemas testes vegetais como em *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*. Por meio desses sistemas vegetais podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e testes citogenéticos (CONTE et al., 1998; TIMBREL, 1999; RANK et al., 2002). Bioensaios com plantas têm sido considerados mais sensíveis e mais simples quando comparados com bioensaios que utilizam animais. Esses organismos-teste têm sido validado em estudos de colaboração internacional entre os "United Nations Environmental Program" (UNEP), "World Health Organization" (WHO) e "US Environmental Protection Agency" (USEPA), que provaram a eficiência destes organismos para o monitoramento de mutagenicidade causada por poluentes ambientais (MENKE et al., 2001 e GRANT, 1999). Os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de agrotóxicos, constituem, portanto, um importante material para testes genéticos e de monitoramento desses contaminantes (MA et al., 1995).

Vegetais superiores são atualmente reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas (SHARMA & PANNEERSELVAN, 1990).

Para o estudo de mecanismos básicos e determinação dos efeitos de alguns químicos, *Allium* tem sido um sistema-teste bastante utilizado. Entre as espécies de *Allium*, *Allium cepa* (cebola) é a mais indicada como material-teste padrão pela “Royal Swedish Academy of Science” (FISKESJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982). A espécie *Allium cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxico, mutagênico e genotóxico de várias substâncias (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985; MATSUMOTO, 2004), sendo utilizada como um organismo padrão para testes rápidos (SMAKA-KINCL et al., 1996), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (GRANT, 1982; RANK & NIELSEN, 1993; CHAUHAN et al., 1999). Alterações cromossômicas em *Allium cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos ou aneugênico, classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIÉ-CIFREK et al., 2002).

O teste do *Allium cepa* é um teste confiável para biomonitoramentos de cito e genotoxicidade para diferentes substâncias químicas. Ma et al. (1995), usando de testes *in situ* com células meristemáticas de *Allium* e *Vicia faba*, concluíram que esses materiais constituem uma eficiente ferramenta para monitoramento ambiental.

Allium cepa tem sido indicada como um eficiente organismo-teste de citotoxicidade e mutagenicidade, devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; QUINZANI-JORDÃO, 1987).

O uso do *Allium cepa* como material-teste foi originalmente introduzido por Levan em 1938 (FISKESJÖ, 1985; RANK & NIELSEN, 1993) e, a partir daí, tem sido utilizado para avaliar e classificar a toxicidade de químicos presentes no meio ambiente (FISKESJÖ, 1985). Essa espécie tem sido utilizada como material vegetal teste indicador de mutagenicidade por diversos autores como Rank & Nielsen (1993, 1997, 1998), Khors et al. (1997), Smaka-Kincl et al. (1997), Kovalchuck et al. (1998), Chauhan et al. (1999), dentre outros. Testes com *Allium cepa* são adequados por oferecer parâmetros macroscópicos como turgescência, mudança de cor, formato,

textura, espessura e comprimento da raiz, e parâmetros microscópicos como anáfases prematuras, aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, C-mitoses e micronúcleos, que podem se caracterizar em evidências ou até indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular.

Segundo Rank & Nielsen (1993), a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *Allium* foi calculada como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores. Os testes com *Allium cepa* também apresentam uma alta correlação com os resultados obtidos com outros sistemas-teste de mamíferos (GRANT, 1982). Para Chauhan et al. (1999), o *Allium cepa* é um dos melhores sistemas-teste já estabelecido, sendo rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos.

Segundo Fiskesjö (1985), resultados positivos obtidos pelo teste de *Allium cepa* devem ser considerados como uma indicação de que o químico testado também pode causar danos biológicos em outros organismos.

Os cromossomos de plantas têm ajudado na pesquisa do câncer (LEVAN, 1951). Por essa razão o teste de *Allium* têm tido grande importância, uma vez que promove um diagnóstico rápido sobre reações causadas por agrotóxicos, cujo produto químico pode ser arriscado para saúde humana (BUSHRA et al., 2002).

3.5. Teste de aberrações cromossômicas em *Allium cepa*

A avaliação da genotoxicidade de químicos perigosos/danosos tem sido feita há muitos anos, por meio de testes com vegetais superiores (RANK, 2002). Durante a década de 30, Levan (1938) demonstrou que a colchicina poderia causar distúrbios no fuso mitótico, levando a uma poliploidização em células meristemáticas de raízes de *Allium*. Posteriormente, Levan (1945) demonstrou que várias soluções de sais inorgânicos induziam diferentes tipos de aberrações cromossômicas em células de meristemas radiculares de *Allium cepa*. Desde então, muitos novos testes de mutagenicidade utilizando microorganismos, linhagens celulares de mamíferos e outros sistemas biológicos têm sido desenvolvidos, mas os testes com vegetais ainda são utilizados, rotineiramente, em muitos laboratórios em todo mundo, como indicadores de potencial mutagênico de diversos agentes. Além disso, ensaios com vegetais são úteis para se testar amostras ambientais complexas como esgoto (GROVER & KAUR, 1999),

águas de rios (RANK & NIELSEN, 1998), e solos contaminados (CHANG et al., 1997; KOVALCHUCK et al., 1998; COTELLE et al., 1999).

Alguns dos ensaios vegetais realizados com *Allium cepa*, *Vicia faba* e *Tradescantia paludosa*, que foram utilizados nos estudos dos efeitos mutagênicos das radiações ionizantes e de mutágenos químicos, são hoje empregados para se avaliar a mutagenicidade/clastogenicidade de poluentes ambientais (GROVER et al., 1999). Estudos realizados por Grover et al. (*op cit.*), mostraram que os ensaios com vegetais apresentam resposta positiva, com relação aos poluentes. Esses autores avaliaram os efeitos genotóxicos de pesticidas, utilizando vegetais e mamíferos como organismos testes. Nestes estudos eles observaram existir uma correlação significativa (91,5%) entre os dois sistemas. A eficácia do sistema teste vegetal foi também registrado por Constantin & Owens (1982).

Testes de Aberrações cromossômicas, utilizando-se *Allium*, padronizados por Fiskejő (1985), são realizados desde o final da década de 30. Esse teste constitui em um ensaio muito sensível e confiável para monitoramento ambiental. Ele é baseado na avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de substâncias químicas em espécies do gênero *Allium* por meio do registro da atividade mitótica (índice mitótico) e anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes dessas plantas (VIDAKOVIÉ-CIFREK, 2002).

Diferentes espécies de *Allium* têm sido utilizadas como sistemas testes biológicos para se estudar efeitos de poluentes ambientais, tanto decorrentes de ação de substâncias químicas (GRANT, 1982; FISKEJŐ, 1988) como por radioatividade (KOVALCHUCK et al., 1998; EVSEEVA & KHRAMOVA, 2002). A espécie mais frequentemente utilizada para a realização dos testes de aberrações cromossômicas é o *Allium cepa*, pelo consistente conhecimento da duração do seu ciclo celular e da sua reação a muitos agentes mutagênicos (EVSEEVA, 2003).

Os testes de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* fornece um rápido exame dos efeitos tóxicos de substâncias químicas complexas e de íons metálicos.(FISKEJŐ, 1985; GRANT, 1982; FISKEJŐ, 1988; FISKEJŐ, 1993; FISKEJŐ, 1993; GRANT, 1994; NIELSEN & RANK, 1994). Ele foi o primeiro dos nove ensaios com vegetais avaliados pelo Programa Gene-Tox da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (GRANT, 1994, CONSTANTIN & OWENS, 1982).

Este teste tem sido amplamente utilizado, principalmente, para se monitorar os impactos derivados de emissão de efluentes em rios (FISKEJÖ, 1993; RANK & NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996).

A contagem da incidência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células de meristemas radiculares fornece um método fácil para se estudar os efeitos de diferentes agentes mutagênicos como compostos de mercúrio, selênio, zinco e cádmio, bem como de pesticidas (FISKEJÖ, 1979; FISKEJÖ, 1988; GULATI et al., 1994; BORBOA & DE LA TORRE, 1996). Curiosamente, a eficiência do teste de micronúcleo, realizado com células de raízes de *Allium cepa*, para se detectar a clastogenicidade dos raios-X foi superior à encontrada para o teste com *Vicia faba* (MA et al., 1995).

Testes realizados com *Allium cepa* tem recebido uma atenção especial, principalmente após ter sido adaptada para se avaliar efeitos de poluentes do solo e da água como, por exemplo, os ácidos clorofenoxiacéticos e clorofenóis (FISKEJÖ et al., 1981), o alumínio (BERGGREN & FISKEJÖ, 1987), os sais de metais pesados (LIU et al., 1995) e outras substâncias químicas derivadas de efluentes industriais (FISKEJÖ, 1985; VIDA KOVIC et al., 1993) e de atividade agrícola (FRANEKIC et al., 1994; GROVER et al., 1997).

3.6. Peixes como organismo-teste

Segundo Powers (1989), os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental.

Além disso, os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta (ATEEQ et al., 2002).

De acordo com Harshbarger & Clark (1990), a possibilidade dos peixes serem mantidos em laboratório e facilmente expostos à substâncias tóxicas, de maneira similar aos vertebrados superiores, permitem sua utilização para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

Atividades genotóxicas em peixes podem ser avaliadas usando uma variedade de “end-points”, incluindo a indução de adutos de DNA (SIKKA et al., 1990; STEIN et al., 1993), análises de quebras de fita simples usando ensaio do cometa (SHUGART et al., 1992) e ação mutagênica por meio do teste do micronúcleo.

Uma variedade de espécies de peixes é extensivamente utilizada também para estudos de carcinogenicidade. Dentre as espécies mais utilizadas estão a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e o medaka japonesa (*Oryzias latipes*) (METCALFE, 1989).

De acordo com Alves-Costa (2001), as espécies *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Hoplias malabaricus* são excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos. *Oreochromis niloticus* é uma importante espécie de peixe comercializável do sudeste do Brasil, particularmente do estado de São Paulo. É também uma espécie comumente encontrada em estuários pelo mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

3.7. Teste do micronúcleo

Para Landolt & Kocan (1983) e Heddle et al. (1983), uma das mais promissoras, baratas e rápidas técnicas de avaliação de mutagenicidade é o teste do micronúcleo. Micronúcleos são massas de cromatina com aparência de um pequeno núcleo, resultante da condensação de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que atrasaram sua migração para os pólos na anáfase (SCHMIDT, 1976; AL-SABTI & METCALFE, 1995). Alguns autores, baseados em análises com linfócitos humanos, sugerem que o DNA excedente na célula, eventualmente, forma um broto originando um micronúcleo que é expulso sob a forma de uma “mini cell” (SHIMIZU et al., 1998).

Embora o micronúcleo possa se originar espontaneamente, a sua indução é comumente utilizada para se detectar danos no material genético, resultantes de exposição a um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983).

De acordo com Stopper & Müller (1997) uma das causas do aparecimento de células micronucleadas seria a indução de alterações na maquinaria mitótica, principalmente, alteração no fuso e no cinetócoro.

A ocorrência de micronúcleos, segundo Macgregor et al. (1987), Hayashi et al. (1994), Walker et al. (1996), tem sido utilizada como indicativo de efeitos clastogênicos

(quebras no DNA) e de efeitos aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal).

Tem sido demonstrado que distúrbios no aparato mitótico (fuso, cinetócoro) e funcionamento incorreto da enzima topoisomerase II podem estar envolvidos na formação de micronúcleos (STOPPER & MÜLLER, 1997). De acordo com Sheaf et al. (1991), os micronúcleos podem ser induzidos por eventos que atuam como inibidores do sistema de reparo. Essa afirmação está de acordo com Weirich-Schwaiger et al. (1994), que salientaram que, além da correlação com a capacidade de reparo celular, também a idade da célula pode influenciar na frequência de micronúcleos em fibroblastos humanos.

Como citado anteriormente, os micronúcleos podem também ser formados pela perda de um cromossomo inteiro. Neste caso esse micronúcleo é decorrente de dano no aparelho mitótico da célula (fuso mitótico, cinetócoro ou centrômero) ou dano na própria estrutura cromossômica (FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003).

A utilização de técnicas moleculares, como sondas específicas para a região centromérica do cromossomo ou anticorpos anticinetócoro, permite distinguir micronúcleos originados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal da célula (RIBEIRO, 2003).

As conseqüências da formação do micronúcleo, produzido espontaneamente ou por indução, podem ser um passo tanto para uma transformação neoplásica como para a eliminação do dano genético. A inclusão de um gene supressor de tumor no micronúcleo e a subsequente inativação ou perda do mesmo poderia gerar neoplasia e, portanto, ser um passo para a carcinogênese (STOPPER & MÜLLER, 1997). Entretanto, os autores ainda afirmam que se a célula micronucleada morrer, se o micronúcleo for reintegrado na cromatina ou se a cromatina no micronúcleo estiver acessível para a transcrição, a formação do micronúcleo pode não se caracterizar em evento precursor de carcinogênese.

De acordo com Kramer et al. (1990), os micronúcleos são capazes de sintetizar DNA, porém não está claro se a informação genética dentro do micronúcleo é acessível para a célula. Segundo Obe & Beek (1982), micronúcleos decorrentes de aberrações cromossômicas têm um ciclo celular retardado em relação ao núcleo principal.

Se o micronúcleo contém cromossomos inteiros e a síntese de DNA no micronúcleo for sincrônica com a síntese de DNA no núcleo principal, a reintegração do

cromossomo contido no micronúcleo ao genoma nuclear parece possível (GUSTAVINO et al., 1994).

Tem-se discutido por Stopper & Müller (1997) que a formação de micronúcleos pode ser uma maneira de eliminação de dano genético. Estudos realizados por Von-Hoff et al. (1992) em tumores humanos, descreveram a presença de oncogene amplificado nesses tumores, geralmente presentes em elementos acêntricos extracromossômicos. A eliminação desses elementos poderia ser acelerado pela formação de micronúcleos.

O teste do micronúcleo foi originalmente desenvolvido como um teste que utilizava eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores (SCHMIDT, 1976) e mais tarde estendido a eritrócitos circulantes (MACGREGOR et al., 1980). Esse teste tem sido também aplicado, com sucesso, em eritrócitos de peixes. Hayashi et al. (1998) descrevem o teste do micronúcleo como uma técnica vantajosa, pelo fato de poder ser usado em qualquer população celular em proliferação, sem que seja necessário o conhecimento prévio de seu cariótipo.

Os eritrócitos de peixes são especialmente preferidos para esse teste, pois sendo nucleados, os micronúcleos podem ser marcados facilmente como um resultado de atividade clastogênica (AL-SABTI & METCALFE, 1995). Eritrócitos de sangue periférico de *Oreochromis niloticus* são utilizados para detectar a presença de mutágenos ambientais, através do teste de micronúcleos (GRISOLIA et al., 2001).

Os ensaios de micronúcleos, especificamente em peixes, representam um meio sensível de medida de atividade genotóxica no laboratório e no campo. Vários estudos têm mostrado que eritrócitos periféricos de peixes têm uma alta incidência de micronúcleos após exposição de diferentes poluentes no campo e em condições de laboratório (HOFTMAN & DE RAAT, 1982; AL-SABTI, 1986; DAS & NANDA, 1986; CROSS & HOSE, 1986; HOSE et al., 1987; METCALFE, 1988; AL-SABTI & HARDIG, 1990; AL-SABTI, 1991; HUGHES & HEBERT, 1991; UEDA et al., 1992; SCHULTZ et al., 1993; AL-SABTI et al., 1994; AL-SABTI, 1994). Os tecidos relacionados a hematopoiese, em função da necessidade da reposição constante das células sanguíneas, apresentam elevada frequência de divisões celulares, sendo as células oriundas deste tecido bastante indicadas para a aplicação do teste do micronúcleo *in vivo*.

Atualmente, uma grande variedade de organismos, como invertebrados aquáticos, anfíbios e peixes têm sido utilizados para testes do micronúcleo *in vivo* (ÇAVAS & ERGENE-GÖZÜKARA, 2003; FERRARO et al., 2004).

Ateeq et al. (2002), utilizando eritrócitos de peixe-gato (*Clarias batrachus*) para a avaliação tóxica dos herbicidas 2,4-D e butacloro, observaram um aumento significativo da frequência de micronúcleos e de células alteradas após exposição desses organismos a esses agentes. Esses resultados mostram que o teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe parece ser uma ferramenta sensível para a avaliação da ação de agrotóxicos sob material genético dos organismos.

3.8. Ensaio do cometa

Considerada por Monteith & Vanstone (1995) como uma das melhores ferramentas para o biomonitoramento ambiental, o ensaio de cometa, pode ser utilizado para se avaliar danos em células em proliferação ou não, *in vivo* ou *in vitro* e podem ser aplicadas com o propósito de análises genotoxicológicas.

O ensaio do cometa é particularmente uma técnica valiosa e barata, que permite a detecção de diferentes respostas celulares ao dano e reparo de DNA, em qualquer população de células eucarióticas que pode ser obtida por uma suspensão simples (SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997; MITCHELMORE & CHIPMAN, 1998). A técnica requer pequenas amostras celulares (1-10.000 células) e os resultados podem ser obtidos em um único dia. Ostling & Johanson (1984) e Olive et al. (1990) têm mostrado que a sensibilidade do ensaio do cometa em detectar danos em células simples é comparável a outros métodos de avaliação, sendo usado na investigação da genotoxicidade de vários agentes (SINGH et al., 1988, 1991; TICE et al., 1990; OLIVE et al., 1991, 1992; BETTI et al., 1993; MATSUMOTO et al., 2005).

O ensaio do cometa, por ser considerado sensível, rápido, econômico, além de requerer poucas células para a sua execução (MICHELMORE & CHIPMAN, 1998; SASAKI et al., 1997; KOSZ-VNENCHAK & ROKOSZ, 1997), tem sido indicado como um método para se detectar mudanças muito pequenas na estrutura do DNA, célula a célula, tais como as atividades de reparo, o modo de seu empacotamento e a sua integridade (KOPPEN et al., 1999).

Ostling & Johanson (1984) foram os primeiros a desenvolver uma técnica, de eletroforese em gel para detectar danos de DNA na taxa de células únicas. Nessa técnica, as células embebidas em agarose foram colocadas em uma lâmina de microscopia, lisadas por detergentes e sais, e o seu DNA liberado para ser submetido à eletroforese sob condições neutras. As células com uma alta frequência de quebras duplas do DNA mostraram uma migração crescente de DNA em direção ao ânodo. A migração de DNA foi quantificada por coloração com brometo de etídeo e pela medida da intensidade da fluorescência de duas posições fixas, dentro do padrão de migração, usando fotômetro microscópico. As condições neutras usadas limitaram a utilidade do ensaio.

O método do ensaio do cometa foi desenvolvido por Singh et al. (1988), que adaptaram outras metodologias já utilizadas, para desenvolver uma técnica de eletroforese de célula única (SCGE-single cell gel electrophoresis), sob condições alcalinas. Essa técnica evidencia a ocorrência de quebras em cadeia simples do DNA. A visualização subsequente da mobilidade dos fragmentos de DNA nuclear tornou-se um meio bastante adequado para se detectar danos no DNA de células únicas. Os protocolos para o ensaio do cometa variam entre laboratórios, porém, recentemente, Macnamee et al. (2000) propuseram modificações nos métodos ortodoxos de célula única, fazendo com que várias células fossem processadas de uma só vez, aumentando a eficiência da técnica, sem comprometer a sua confiabilidade. Os resultados obtidos por eles demonstraram-se similares àqueles previamente relatados, quando utilizaram o ensaio do cometa convencional.

A simplicidade e a reprodução da técnica do cometa, bem como a rapidez de resposta associada aos danos sofridos pelo DNA, torna o uso desse ensaio largamente aplicável para a avaliação da genotoxicologia ambiental (RIBAS et al., 1995). Assim, embora este método permita quantificar o dano em células individuais e detecte quebras de fita simples, associadas com a perda de super empacotamento, também pode ser possível o seu uso para detectar a presença de ligações cruzadas (OLIVE et al., 1990).

Michelmore & Chipman (1998) concluíram que o ensaio de cometa é um método adequado como biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outros organismos aquáticos, destacando a sensibilidade das células sangüíneas destes animais aos efeitos genotóxicos.

Durante a última década, o ensaio do cometa foi extensivamente utilizado como uma ferramenta básica em muitas áreas de pesquisa, sendo aplicadas como metodologia de biomonitoramento ambiental, avaliação dos efeitos da radiação sobre os organismos, investigação de processos de reparo do DNA e ecotoxicologia genética. Frenzilli et al. (2000) utilizaram o ensaio do cometa para a validação dos efeitos genotóxicos de 18 compostos químicos, revelando sua eficiência na identificação de agentes genotóxicos. Os mesmos pesquisadores também demonstraram que a produção de quebras nas fitas do DNA pode ser correlacionadas com as propriedades mutagênicas e carcinogênicas dos poluentes ambientais.

Garaj-Vrhovac & Zeljezic (2002) mostraram em estudo sobre a influência de uma mistura complexa de herbicidas em trabalhadores ocupacionalmente expostos, que o ensaio do cometa mostrou ser uma técnica sensível, para avaliação deste tipo de químico, capaz de detectar quantidades significativas de quebras no DNA ($p < 0,001$), permitindo aos autores sugerir que uma exposição, a longo prazo, aos pesticidas testados poderia causar danos no genoma em células somáticas e, portanto, representaria um perigo potencial à saúde humana.

6. **ARTIGO 1** (artigo de revisão)

CARACTERIZAÇÃO, MODOS DE AÇÃO E EFEITOS DO HERBICIDA TRIFLURALINA

Thaís C. C. Fernandes¹, Marcos A. Pizano¹ e *Maria A. Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, cep: 13506-900, Rio Claro/SP-Brasil

*Autor responsável pela correspondência: fone- (19)3526-4143; fax: 3536-0009.

Agência de fomento: CAPES

O manuscrito será submetido à Revista Brasileira de Toxicologia

RESUMO

O presente estudo traz informações gerais sobre os agrotóxicos, tais como conceitos, classificações de toxicidade e de periculosidade ambiental além de discorrer sobre a utilização indiscriminada de herbicidas o que caracteriza uma das maiores preocupações dos pesquisadores, uma vez que essa substância química é a mais utilizada dentre os agrotóxicos no mundo todo. Dentre os herbicidas, a trifluralina, um herbicida da família das dinitroanilinas amplamente utilizado no controle de ervas daninhas é vista com mais detalhes, sendo destacada a sua caracterização, seu modo de ação e efeitos em sistemas orgânicos. As características químicas e físicas dessa substância são aqui apresentadas, assim como sua degradação, mobilidade, persistência no solo, concentrações permitidas e concentrações encontradas no ar e na água. A trifluralina é tida como uma substância que interfere na polimerização dos microtúbulos, impedindo, desta forma, a divisão mitótica dos organismos para os quais é tóxica. Neste estudo são discutidas duas atuações do herbicida que levam à interferência na formação do microtúbulo. A primeira, e mais conhecida, trata da formação do complexo herbicida-tubulina e a segunda sobre a possível interferência do herbicida na regulação dos níveis do cálcio citoplasmático. O efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico também são destacados neste artigo. O objetivo dessa revisão foi resumir, em um único documento, informações importantes sobre uma das substâncias químicas mais empregadas na agricultura e discutir, a partir das informações obtidas, seu mecanismo de ação e seus possíveis efeitos sobre os organismos.

Palavras chave: Trifluralin, meio ambiente, toxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, carcinogenicidade, microtúbulo e mitose.

1. INTRODUÇÃO

O uso de substâncias químicas para controlar doenças, pragas e plantas daninhas da agricultura teve seu início no final do século XIX, mas, somente após a Segunda Guerra Mundial, essa prática seguiu critérios mais científicos (LORENZI, 1990). De acordo com os alvos contra os quais são destinados, os produtos químicos usados na agricultura são denominados de inseticidas, fungicidas, herbicidas, nematocidas, entre outros (KOTAKA e ZAMBRONE, 2001).

O conjunto de produtos químicos, acima referidos, recebe as denominações de defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários ou agrotóxicos (este último restrito ao Brasil, por força da Lei n. 7.802/89) (KOTAKA e ZAMBRONE, 2001).

De acordo com a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989, art. 2º inciso I, agrotóxicos são:

a) "Produtos e ou agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos"; b) "substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento" (MACHADO, 2001).

Todos os agrotóxicos têm a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital de organismos indesejáveis, para os quais são tóxicos. Estes químicos agem diretamente em um organismo indesejável, eliminando-o ou controlando-o de alguma maneira, como, por exemplo, interferindo em seu processo reprodutivo (BAIRD, 2002).

Desde a sua introdução, os agrotóxicos vêm caracterizando um problema, em potencial, para a saúde humana. Quanto à ingestão de alimentos contaminados com esses produtos, sabe-se que cerca da metade dos alimentos consumidos nos Estados Unidos, contém níveis mensuráveis de, no mínimo, um agrotóxico. Por essa razão, muitos deles foram banidos ou tiveram seu uso limitado (BAIRD, 2002).

Além disso, segundo Langenbach (1989), o uso de agrotóxicos tem causado um grande número de acidentes, principalmente, entre os trabalhadores rurais. A manipulação caseira, na maioria das vezes, é inadequada, ocorrendo, periodicamente, situações de envenenamento e de contaminação ambiental.

O uso inadequado dos agrotóxicos foi objeto de advertência mundial em 2002 pela FAO (Food and Agriculture Organization), que revisou do Código Internacional de Conduta sobre a Distribuição e a Utilização de agrotóxicos (FAO, 2002).

O Brasil é o quarto maior consumidor mundial de substâncias químicas empregadas na agricultura e a soja representa o maior gasto com agrotóxico (cerca de 35%), dentre as culturas brasileiras (FERRO, 2003).

A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com base no Decreto nº 98.816/90, classificou os agrotóxicos quanto ao seu Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA), levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram classificados em I, II, III, IV, definindo-os como altamente perigoso, muito perigoso, perigoso e pouco perigoso, respectivamente (COMPÊNDIO, 1996).

As diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registros e extensão de uso de agrotóxicos e afins no Brasil, estão disciplinadas na portaria 03 de 16 de janeiro de 1992 (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 1991). Essa portaria classificou os agrotóxicos em função da sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico, tanto ao homem como aos demais organismos vivos presentes no ambiente. Foram estabelecidas 4 classes de toxicidade: I, II, III, IV, que se referem à extremamente tóxico, altamente tóxico, medianamente tóxico e pouco tóxico, respectivamente.

A preocupação com a contaminação por agrotóxico no Brasil tem despertado o interesse de pesquisadores. O ambiente (RIEDER, 1999; DORES, 2000), os alimentos (PIZANO e BAPTISTE, 1998; VIEIRA, 1999) e o leite humano, (MATUO e col., 1990; OLIVEIRA, 1997) têm sido alvos de estudo em algumas regiões brasileiras, porém poucos autores como Schio (2001); Guimarães (2000); Ribeiro (1999) e o IBGE (1999) tem desenvolvido trabalhos que avaliam a periculosidade ambiental, decorrente do uso dos agrotóxicos (VIEIRA et al., 2001).

O consumo de agrotóxicos no Brasil é de aproximadamente 3,2Kg de ingrediente ativos por hectare. Cerca de 88% do total de agrotóxicos que são comercializados vão para os Estados de São Paulo (22%), Paraná (16%), Rio Grande do Sul (13%), Mato Grosso (12%), Minas Gerais (10%), Goiás (9%) e Mato Grosso do Sul (6%). As culturas de soja, milho, citros e cana-de-açúcar consomem cerca de 66% do total, sendo que apenas a cultura da soja é responsável pelo consumo de 33% desse montante (JORNAL EXPRESS, 2004).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas constituem o grupo mais empregado na agricultura (aproximadamente 65%). Esses químicos têm como função controlar plantas

daninhas, um dos fatores redutores de produtividade, sem injuriar as culturas agrícolas. De acordo com Ashton e Mônaco (1991), planta daninha é toda planta que cresce onde não é desejada. Essas plantas tendem a competir com cultivares, por meio da extração de elementos do solo que são vitais como água, luz, CO₂ e nutrientes, interferindo no desenvolvimento da cultura e afetando a produção agrícola. Estima-se que as perdas ocasionadas nas culturas agrícolas, pela interferência das plantas daninhas, no Brasil, estejam em torno de 20-30% (LORENZI, 1990). Os herbicidas são também utilizados para eliminar plantas das margens de estradas e rios e para marcar, corretamente, as linhas de trilhas (BAIRD, 2002).

O mecanismo da ação de muitos herbicidas sobre os organismos não está completamente compreendido (CHEVREUIL e col., 1996; KIM e FEAGLEY, 1998; ABDEL-RAMHAM e col., 1999). A falta de informação detalhada da ação dos herbicidas sobre o meio biológico pode acarretar em prejuízo à saúde humana (MUNGER e col., 1997; GORELL e col., 1998).

Os herbicidas podem ser classificados segundo diferentes critérios, relacionados às suas propriedades, características, uso, eficácia e permanência no ambiente. (DEUBER, 1992). Quanto ao seu caráter químico, os herbicidas podem ser classificados como carbamatos, amidas, difeniléteres, aminofosforado, dinitroanilinas, entre outros. Os herbicidas do grupo das dinitroanilinas tem por base a estrutura da anilina, contendo moléculas de NO₂ nas posições 2 e 6 ou 3 e 5 do anel. Este grupo possui mais de dez diferentes herbicidas, entre os quais estão trifluralina, dinitramine, oryzalin e pendimethalin (DEUBER, 1992).

A trifluralina tem sido usada na agricultura desde 1963 (GROVER e col., 1997). Esse herbicida é registrado isoladamente ou em misturas nas seguintes culturas: soja, citros, café em formação, algodão, amendoim, feijão, alho, vagem, girassol, mamona, mandioca, berinjela, cenoura, quiabo, brócolis, repolho, couve-flor, cebola-de-transplante, citros, girassol, pimentão, tomate, canteiros de gladiolo e plantas ornamentais (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DO HERBICIDA TRIFLURALINA

A trifluralina é um herbicida de derivados benzênicos pertencente a família dos dinitroanilina (BYRD e col., 1995). O herbicida apresenta-se sob a forma de um concentrado emulsionável ou na forma de um sólido cristalino amarelo alaranjado. É pouco solúvel em água (solubilidade de 0,2 a 0,4 mg/L a 25 graus), medianamente volátil (vapor de pressão de $1,1 \cdot 10^{-4}$ mmHg a 25°C), possui densidade igual a 1,36 g/cm³ a 22° C, é considerado alcalino e de longa persistência no ambiente (120-240 dias) (DEUBER, 1992). A trifluralina tem alta afinidade com o solo (SANDERS e SEIBER, 1983), é relativamente imóvel e possui meia-vida de 3 a 18 semanas, dependendo do solo e da localização geográfica (CALDERON e col., 1999).

A composição química da trifluralina é: α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina (BELLINASSO e col., 2004) e sua fórmula química estrutural é demonstrada na figura 1.

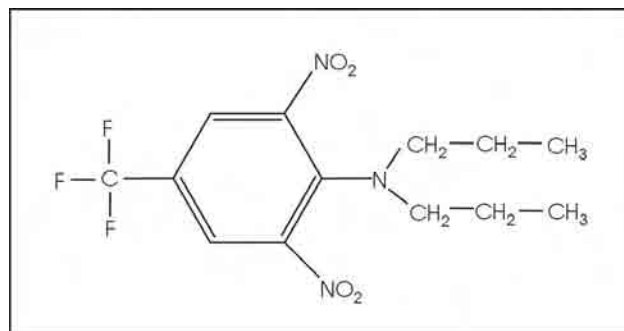


Figura 1: estrutura química do herbicida trifluralina.

O produto comercial contém nitrosodipropilamina, um contaminante carcinogênico (NDPA) (USEPA, 1987). Esse composto reage com o DNA no 0⁶ da Guanina e pode provocar mutação (COOPER e PORTER, 2000). Devido à preocupação decorrente desta característica, a "Environmental Protection Agency" (EPA) exigiu que as indústrias se certificassem de que os produtos com o princípio ativo da trifluralina apresentassem concentrações de, no máximo, 0,5 ppm de nitrosodipropilamina. A EPA concluiu que a trifluralina com essa concentração de nitrosodipropilamina não oferece risco toxicológico aos organismos. (USEPA, 1987; FEDERAL REGISTRE, 1982).

A USEPA (1999) classifica o herbicida trifluralina como do grupo C: possivelmente carcinogênico para humanos, baseado em evidências com animais e não em humanos.

De acordo com a portaria 03 de 16 de janeiro de 1992, o herbicida trifluralina é considerado altamente tóxico (classe toxicológica II) e muito perigoso (classe II) quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental estabelecido pela Portaria Normativa n. 139 de 21 de dezembro de 1994 do IBAMA, com base no decreto n. 98.816/90. De acordo com

Worthing (1991) a trifluralina é proibida na Colômbia, Suécia e Belize, tendo o seu uso restringido na Guatemala e EUA.

3. COMPORTAMENTO DO HERBICIDA TRIFLURALINA NO AMBIENTE

3.1. Comportamento no solo

O herbicida trifluralina é fortemente adsorvido pelos colóides da matéria orgânica e pouco pelos da argila. Em solos ricos em matéria orgânica, a adsorção impede a absorção do produto pelas raízes das plantas, não sendo aconselhável o uso deste herbicida nestas condições (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998). A lixiviação é muito reduzida, assim como o movimento lateral no solo. Sua principal característica é a persistência em solos decorrente de sua baixa mobilidade, o que pode provocar danos em cultivos posteriores à sua aplicação (CALDERON e col., 1999).

Herbicidas como a trifluralina, aplicados em pré-emergência, atuam melhor quando a umidade do solo é de média a elevada. Com isso, o herbicida pode ser, pelo menos, parcialmente solubilizado e distribuído nas primeiras camadas da superfície do solo, o que o protegerá contra perdas (DEUBER, 1992).

A degradação desse herbicida no solo ocorre por via química, microbiana e por fotólise. A degradação química promove dealquilação do grupo amino, redução do grupo nitro a amino, oxidação parcial do grupo trifluorometil a carboxi e, subsequentemente, a degradação em fragmentos menores. A degradação microbiana pode ocorrer em condições aeróbicas e anaeróbicas (Figura 2). No entanto, observa-se que a degradação ocorre, principalmente, em condições anaeróbicas, como as observadas em solos de drenagem

insuficiente, quando as chuvas são sucessivas. Em condições anaeróbicas, em um mesmo período de tempo, 98% da trifluralina degrada-se, enquanto que em condições aeróbicas só se decompõe 25% do produto. Dentre os fungos com capacidade de degradar o herbicida trifluralina temos o *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp e *Tricoderma* sp (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

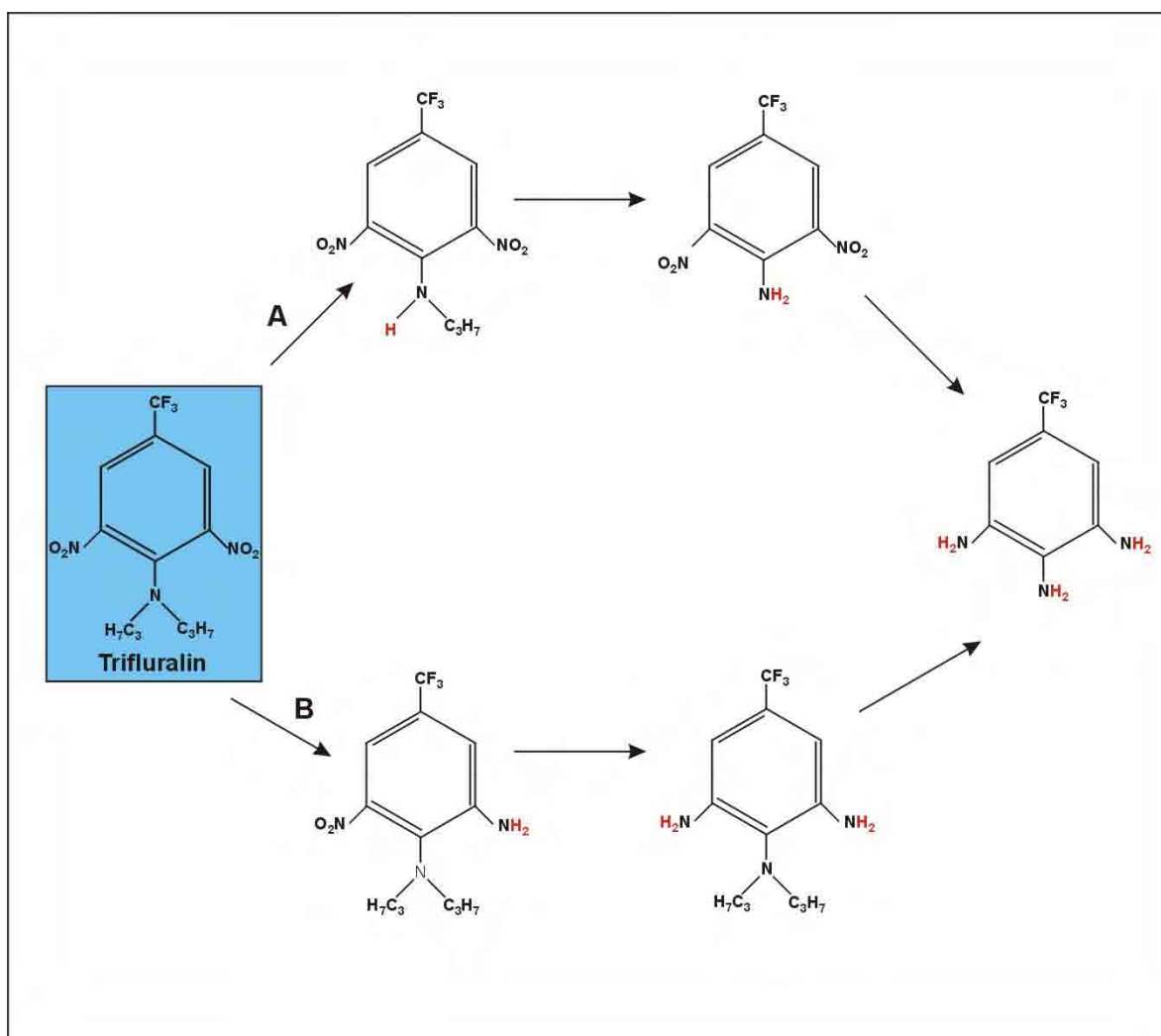


Figura 2: Degradação microbiana do herbicida trifluralina por via aeróbica (A) e anaeróbica (B). Extraído de Audus (1980).

O herbicida trifluralina também é sensível à degradação pelos raios ultravioletas e sua volatilização também é um dos fatores importantes da perda do produto no solo (SELIM e ZHU, 2002; CINDY e col., 2004).

A fotodecomposição da trifluralina geralmente envolve 3 processos: dealquilação oxidativa da propilamina, ciclização e redução do grupo nitro (Figura 3) (DIMOU e col., 2004).

O primeiro produto da fotólise da trifluralina, de acordo com Dimou e col. (2004) e ilustrado na figura 3, parece ser um mono-dealquilado derivado do composto principal, originando o composto 1. A dealquilação é atribuída à oxidação do radical livre. Outro intermediário da fotodegradação parece ser formado por reações de ciclização. Os compostos médios 5 e 4 são formados, aparentemente, pela reação entre a propilamina α carbono da trifluralina e o grupo NO_2 do composto 1 e são identificadas as 2- etil -7nitro-1-propil-5 (trifluorometil)-1*H*-benzimidazole e 2-etil-4 nitro-6- (trifluorometil)-1*H*-enzimidazole, respectivamente. O dealquilado benzimidazole (composto 4) é o fotoproduto mais estável, podendo persistir no ambiente por um tempo maior, possibilitando a sua detecção. Este produto pode ser formado pela reação de dealquilação do composto 5.

Os compostos 4 e 5 podem ser reduzidos em água por mecanismos não muito claros (CROSBY, 1972), direto da formação de aril hidroxilamina (KLUPINSKI e col., 2003) para formar o composto 6 e 7, respectivamente. Esses produtos também têm sido formados durante a degradação química da trifluralina (KLUPINSKI e col., 2003). Os compostos 2 e 3 são formados pela redução do grupo NO_2 para NH_2 do composto 1 e 2,6-dinitro-4-(trifluorometil) benzenamine (composto ND), respectivamente. Esses compostos têm sido

também identificados durante a degradação química da trifluralina (KLUPINSKI e col., 2003), mostrando que esta rota acontece também em outros processos, além da fotodegradação (DIMOU e col., 2004).

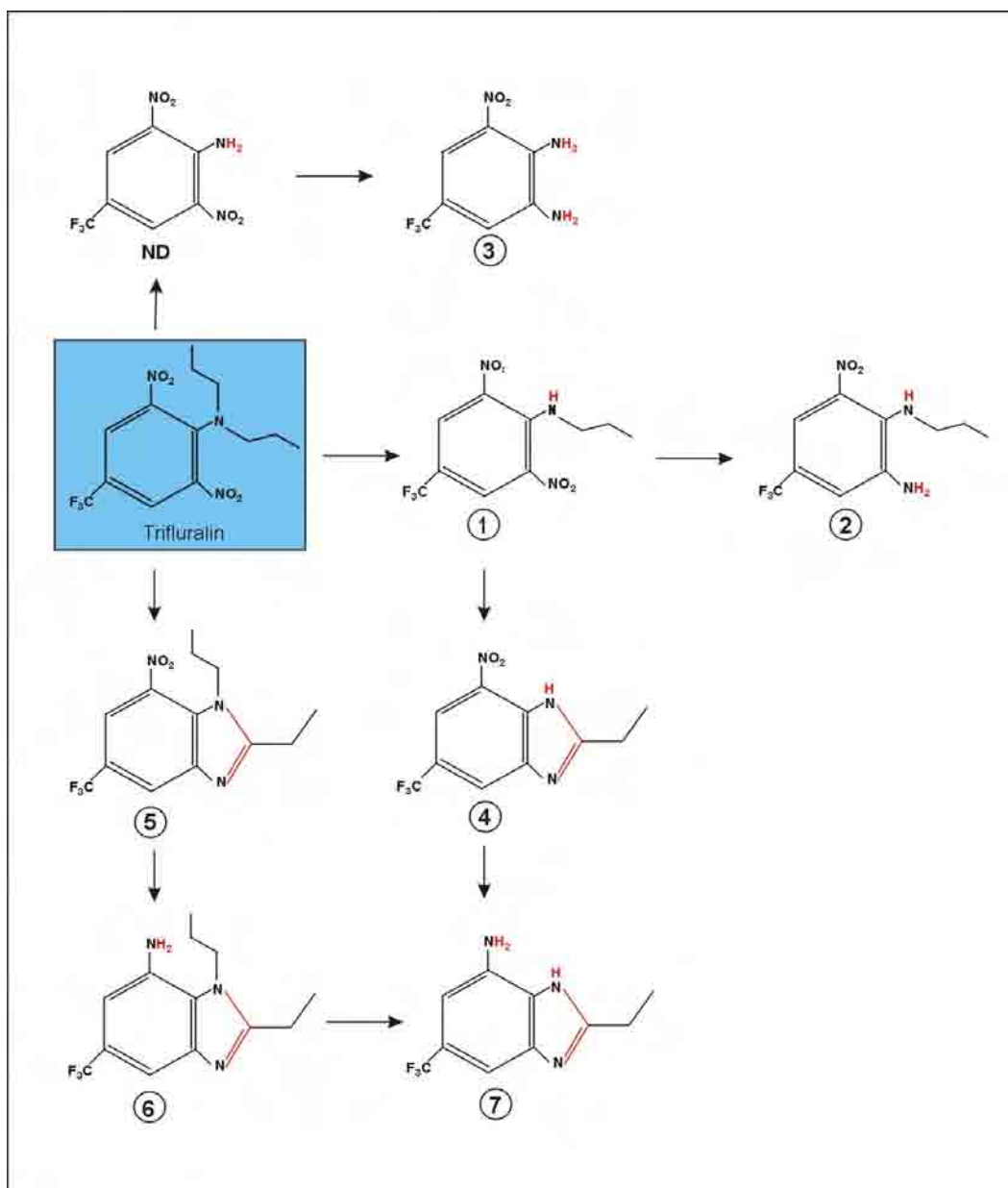


Figura 3: Fotodegradação do herbicida trifluralina. *ND= Substância não detectada na fonte. Esquema modificado de Dimou e col. (2004).

A persistência média do herbicida trifluralina no solo para as doses recomendadas em condições de campo é de 1,8 ppm de resíduo após 180 dias da aplicação (ALMEIDA, 1985). No entanto, segundo o mesmo autor essa persistência pode variar de acordo com o tipo de solo e as condições climáticas.

3.2. Comportamento do herbicida na água

A contaminação da água pela trifluralina pode ocorrer, eventualmente, por lixiviação de sedimentos, durante a limpeza de equipamentos ou por derrames acidentais. No entanto, somente 0,5% da quantidade aplicada no solo é lixiviada e pode vir a contaminar fontes aquíferas. Essa porcentagem representa uma contaminação muito baixa da água, representando concentrações menores que $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Conseqüentemente, o herbicida trifluralina não é comumente detectado em águas superficiais (GROVER e col., 1997; ZIMMERMAN e col., 2000).

Dayama e Coupe (1997), Thurman e col. (1998) e Zimmerman e col (2000) em suas análises no Rio Mississippi detectaram taxas extremamente baixas do herbicida trifluralina (menores que 0,1 g/L). Uma vez que esse herbicida é amplamente utilizado, os autores afirmam que as baixas concentrações do herbicida detectadas em águas superficiais podem ser atribuída à sua baixa mobilidade no solo e a baixa solubilidade em água (menor que 1 mg/L).

De acordo com a revisão da resolução do CONAMA n° 020/86, sobre Classificação e Enquadramento de corpos de água, o valor máximo aceitável de trifluralina nos corpos de água é de 0,2 $\mu\text{g/L}$ (CONAMA, 2003). O Brasil apresenta uma legislação que também

regulamenta os níveis máximos de agrotóxicos em água potável, baseados em sua periculosidade. Esses dados estão regulamentados na Portaria n° 1460, de 29 de dezembro de 2000, e estabelece que a quantidade máxima aceitável de trifluralina na água de beber deve ser igual ou menor que $20 \mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, a USEPA (2001) e a legislação da Comunidade Européia (EC., 1982) estabeleceu um valor muito mais baixo, $2\mu\text{g L}^{-1}$ e $0,1\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Segundo Dimou e col. (2004), a degradação da trifluralina na água é influenciada pela presença de íons nitrato, o qual acelera a reação de fotólise. Os produtos derivados desta reação têm baixas ou nenhuma toxicidade, quando comparados com o produto íntegro.

3.3. Comportamento do herbicida no ar

Grover e col. (2000) afirmam que o herbicida trifluralina é dissipado rapidamente na atmosfera. Dependendo da estação, cerca de 25% do produto aplicado é volatilizado, mas são encontrados no ar, no máximo, $2\text{-}3 \mu\text{g m}^{-3}$, de trifluralina, logo após a aplicação, diminuindo para menos que 100ng por m^{-3} após algumas horas (WAITE e col., 2005). Segundo a “United States Environmental Protection Agency” (1993), foram encontrados na atmosfera do Canadá, entre os anos de 1988-89, uma concentração média de $0,27 \text{ng/m}^3$ de herbicida no ar, com uma variação de 0 a $3,4 \text{ng/m}^3$.

Mongar e Miller (1988) afirmam que as baixas concentrações encontradas desse herbicida na atmosfera se devem à rápida reação da trifluralina com radical hidroxila (OH) e à reação de fotólise que promove a degradação do produto.

3.4. Comportamento do herbicida nas plantas

A trifluralina é um herbicida de pré-emergência que deve ser incorporado ao solo e aplicado logo após a semeadura, quando as sementes das plantas estão em início do processo de germinação (RIBAS e col., 1996). A absorção do herbicida ocorre principalmente pelo caulículo e, secundariamente, pelas radículas das plântulas, no início da germinação (RODRIGUES e ALMEIDA, 1998).

A trifluralina apresenta, como principal mecanismo de ação, a inibição do processo de divisão celular mitótica. Este herbicida atua, basicamente, sobre os meristemas e tecidos dos órgãos subterrâneos como, raízes, gemas, epicótilo, hipocótilo, plúmula, rizomas, tubérculos e sementes (DEUBER, 1992).

A inibição do desenvolvimento radicular pela ação da trifluralina, tanto no crescimento da raiz principal quanto na emissão de raízes secundárias, é muito evidente em algumas dicotiledôneas. Também é comum ocorrer o engrossamento do hipocótilo (DEUBER, 1992).

De acordo com Almeida (1985), a trifluralina induz diversas mudanças bioquímicas em plantas superiores, incluindo alterações nos teores de carboidratos, lipídios, nitrogênio e, principalmente, alterações nos ácidos nucleicos. Com isso, o produto afeta a divisão celular nos tecidos meristemáticos, inibindo a germinação de sementes e a formação de novas células na radícula e no caulículo.

Bayer e col. (1967) relataram que a trifluralina promove a diminuição da zona de tecido meristemático e a interrupção de divisões mitóticas em raízes de trigo, algodão e

cebola. Células de cebola tratadas com trifluralina apresentaram-se pequenas, densas e multinucleadas, anormais, frágeis e aberrantes (HACSKAYLO e col., 1968). Estudos realizados com *Allium cepa* por Fernandes (2002) mostraram que a toxicidade de concentrações residuais de trifluralina podem induzir alterações nessa planta. A autora verificou que o herbicida promoveu inibição no crescimento da planta, maior turgescência, maior fragilidade e maior espessura das raízes, em relação ao tratamento controle.

Segundo Almeida (1985), plantas cultivadas em solos tratados com a trifluralina só exibiram resíduos nas raízes. Não foi detectado resíduo, em folhas, frutos e sementes, em análise com sensibilidade de até 5ppb. Essa informação nos sugere que o herbicida trifluralina não deve ser transportado pela seiva, para outros tecidos da planta.

4. MODOS DE AÇÃO DO HERBICIDA TRIFLURALINA

O crescimento e o desenvolvimento das plantas depende do processo mitótico nas regiões meristemáticas das mesmas. A divisão celular é um processo que demanda um correto funcionamento de diferentes organelas celulares, estruturas e produtos de muitos genes. Desta maneira, esse processo é alvo potencial de vários químicos que podem alterar a cinética de divisão celular inibindo-a ou interrompendo-a totalmente (BOND, 1987).

Os dinitroanilines, família a que pertence o herbicida trifluralina, as amidas fosfóricas e os N-fenilcarbamatos são compostos químicos microtúbulo-despolimerizantes (MOREJOHN e col., 1987; VERHOEVEN e col., 1990; MOREJOHN e FOSKET, 1991; RAMULU e col., 1995). Microtúbulos são filamentos de estrutura subcelular, compostos basicamente pela proteína tubulina heterodimérica (Figura 4 A) (QUADER, 1997). Os

microtúbulos exercem importantes funções celulares, estando diretamente relacionados ao ciclo mitótico e indiretamente ao desenvolvimento do organismo. Essas estruturas participam de diversos processos celulares como a migração dos cromossomos, manutenção da estrutura celular, orientação e disposição das microfibrilas de celulose, formação da parede celular, movimento intracelular, bem como da diferenciação celular (MOREJOHN, 1991; JORDAN e WILSON, 1999). A função dos microtúbulos nos processos subcelulares pôde ser melhor entendida quando foi possível tratar células com toxinas que interferiram na sua formação. Entre os fatores que mais afetam a ação dos microtúbulos na célula, temos os químicos, hormonais e iônicos, além de gradientes elétricos ou ainda fatores ambientais, tais como temperatura, luminosidade, gravidade e pressão (QUADER, 1997; JORDAN e WILSON, 1999).

Muitos dos conjuntos de microtúbulos celulares são lábeis e dependem desta labilidade para suas funções. O fuso mitótico é um dos mais extraordinários exemplos, cuja formação se dá após a desorganização dos microtúbulos citoplasmáticos no início da mitose. Por essa razão, o fuso mitótico é o alvo de uma variedade de drogas antimitóticas específicas que interferem na troca de subunidades de tubulina entre os microtúbulos e o “pool” de tubulinas livres (ALBERTS e col., 2002).

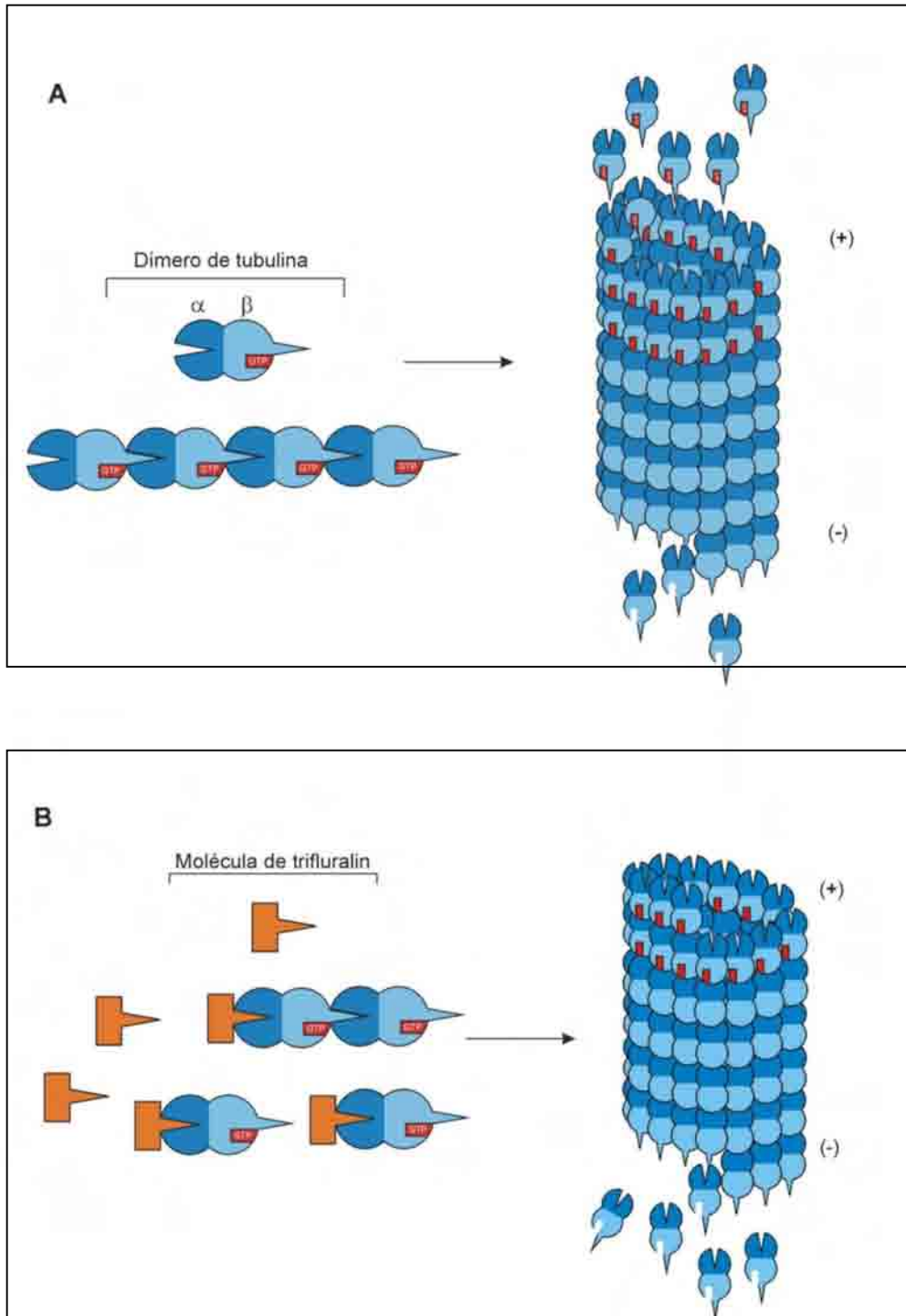


FIGURA 4: dímeros de tubulina formando microtúbulo (**A**); complexo herbicida-tubulina, impedindo a polimerização do microtúbulo (**B**).

Assim como em *Chlamydomonas reinhardtii*, os autores Hanser e col. (1998) verificaram que, em plantas, substâncias tóxicas como a colchicina e alguns herbicidas formam complexos com o dímero da α e β -tubulina, impedindo sua polimerização normal.

Concentrações submicromolares de trifluralina promoveram em *Toxoplasma goodii* o bloqueio total da citocinese e a inibição da divisão nuclear por interferência no fuso intranuclear e em outros componentes do citoesqueleto (STOKKERMANS e col., 1996). Análises *in vitro* em *Chlamydomonas reinhardtii* mostraram que o herbicida trifluralina liga-se, especificamente, nas tubulinas, mostrando que esta é o primeiro alvo subcelular da ação dos dinitroanilinas (ANTHONY e HUSSEY, 1999).

De acordo com os autores *op cit*, este complexo herbicida-tubulina está relacionado com a interrupção do crescimento dos microtúbulos. Com a despolimerização dos microtúbulos na posição menos, os túbulos começam, progressivamente, a ficar mais curtos resultando, eventualmente, na completa perda do microtúbulo (Figura 4 B). Os autores ainda afirmam que os microtúbulos corticais estão entre os mais resistentes à ação do herbicida trifluralina e os fusos e fragmentos de microtúbulos entre os mais sensíveis.

Anthony e col. (1998) afirmaram que, em geral, a seqüência das tubulinas é altamente conservada dentre os diferentes organismos, e esta conservação está relacionada com as funções básicas dos microtúbulos.

Mahresh e Larry (1980), no entanto, acreditam que os herbicidas dinitroanilinas, dependendo do organismo, tem diferentes afinidades às tubulinas uma vez que não interagem com as tubulinas de vertebrados, mas interagem com as tubulinas de plantas e de *Chlamydomonas*. Essa situação é reforçada pelos dados de Anthony e Hussey (1999), Baird

e col. (2000), Breviário e Nick (2000) e Yemets e Blume (1999), que afirmam ser os herbicidas dinitroanilina compostos com maior especificidade para se ligar às tubulinas de plantas do que às de vertebrados.

Estudos sobre a resistência de plantas aos herbicidas dinitroanilinas, mostraram que algumas espécies vegetais possuem uma mutação natural que promove uma alteração na seqüência dos pares de bases, e conseqüentemente no seu código genético. Uma dessas alterações de base causa uma mudança nos aminoácidos da proteína tubulina. A treonina, aminoácido normal da posição 239, é mudada para isoleucina, o que impede a ligação do grupo NO₂ dos herbicidas dinitroanilina com a molécula de tubulina, impedindo assim o seu mecanismo de ação (Figura 5) (ANTHONY e HUSSEY, 1999).

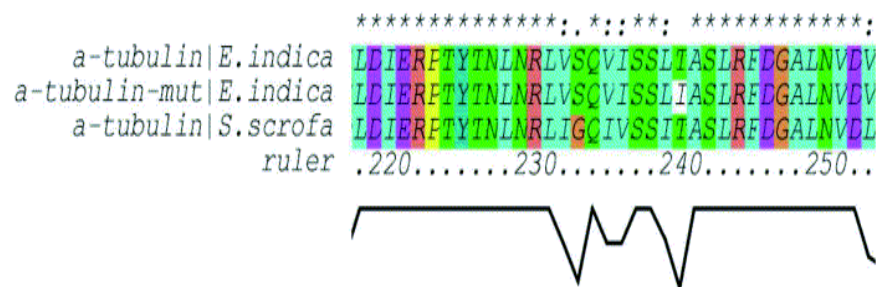


Figura 5: Alinhamento da seqüência da α -tubulinas evidenciando a posição da substituição na tubulina de *E. indica* mutante (Thr 239 para Ile- representada em branco) (extraída de Blume e col., 2002).

A partir dessas informações, seria intuitivo hipotetizar a idéia de que talvez a menor afinidade do herbicida trifluralina para os vertebrados devesse ao fato desses não apresentarem o aminoácido treonina na posição 239, aparentemente o sítio alvo do herbicida. No entanto, verifica-se na figura 6 que o aminoácido treonina na posição 239 da proteína α -tubulina está presente em vegetais, parasitas e vertebrados, incluindo o homem.

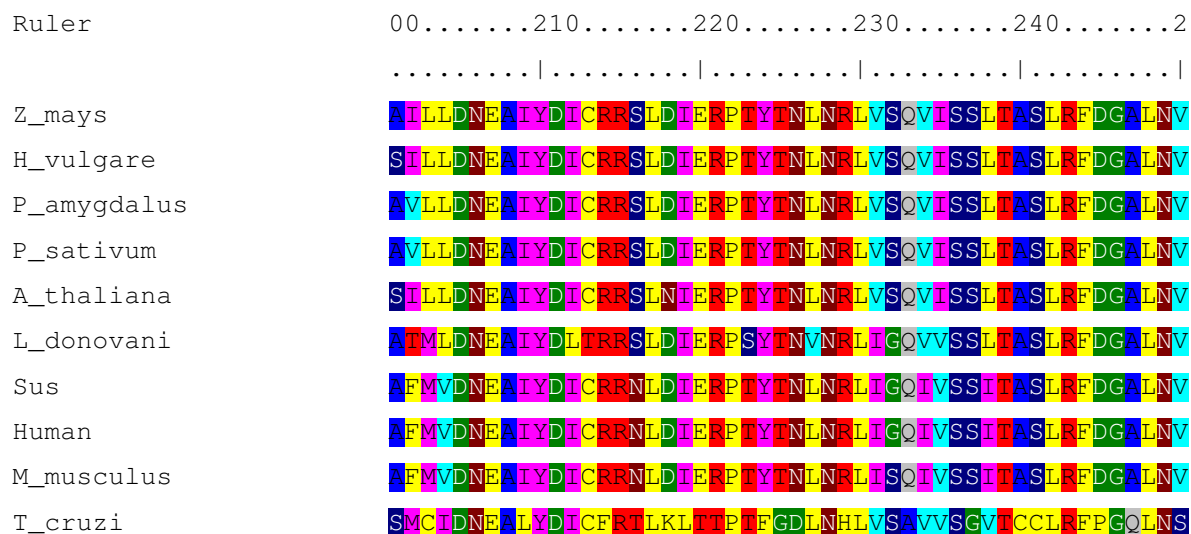


Figura 6: Comparação entre as seqüências de aminoácidos da α -tubulina das espécies *Zea mays* (vegetal), *Hordeum vulgare* (vegetal), *Arabidopsis thaliana* (vegetal), *Prunus amygdalus* (vegetal), *Pisum sativum* (vegetal) *L. Donovanii* (parasita), *Trypanosoma cruzi* (parasita), *Mus musculus* (vertebrado), *Sus scrofa* (vertebrado) e *Homo sapiens*. As seqüências foram obtidas a partir da base de dados da NCBI de acordo com os códigos P14641, Y08490, P29511, P33629, U12589, U09612, M97956, P05213, P02550 e P04687, respectivamente (YAMAMOTO e col., 1998). As seqüências foram alinhadas por meio do programa ClustalW (HIGGINS e col., 1994) utilizando-se os parâmetros “default”. O alinhamento foi então analisado utilizando-se o programa MPAlign (ARNOLDI e DEBONZI, 2004).

Segundo Sree e col. (1988), Hansen e col. (1998) e Vidaković-Cifrek e col. (2002) a trifluralina pode inibir a polimerização dos microtúbulos por meio da ligação com a tubulina, mas pode também promover alterações na concentração de íons cálcio no citoplasma e influenciar a regulação da polimerização e despolimerização dos microtúbulos. De acordo com Hertel e col. (1981) mudanças na quantidade de Ca^{2+} livre no citoplasma, devido a ação da trifluralina, pode, além de promover problemas nos microtúbulos, alterar processos bioquímicos e fisiológicos que são dependentes do cálcio, tanto nos animais quanto nas plantas.

Segundo Vidaković-Cifrek e col. (2002), a trifluralina pode aumentar a concentração do íon Ca^{+2} no citoplasma influenciando a divisão mitótica de raízes de cebola.

Devido a estrutura química da trifluralina, esse herbicida tende a receber 2 elétrons no seu anel benzênico, o que aumenta, significativamente sua toxicidade, uma vez que o hidrogênio do grupo NH_2 da trifluralina tende a se ligar ao grupo polar das membranas celulares e causar desordem em sua estrutura, tendo como consequência a promoção de distúrbios de funcionamento (ARGESE e col., 2002). Essa desordem na estrutura das membranas parece interferir na permeabilidade, principalmente, das membranas plasmática e mitocondrial. A trifluralina altera a permeabilidade das membranas por promover um colapso no potencial elétrico das membranas acarretando em efluxo de Ca^{+2} do interior das mitocôndrias e a entrada de Ca^{+2} do exterior para o interior da célula por meio das proteínas uniportadoras aumentando assim, as concentrações desse íon no interior citoplasmático.

Considerando que baixos níveis de cálcio são necessários para a polimerização, Hepler (1992) afirma que fusos mitóticos podem sofrer distúrbios devido aos elevados níveis desse íon. Baixas concentrações de cálcio livre no citoplasma (0,1-0,2 μM) são essenciais para prevenir a precipitação de fósforo, competir com o Mg^{2+} por sítios de ligação e funcionar como mensageiro secundário (MARSCHNER, 1988).

De acordo com Alberts e col. (1997) o Ca^{+2} é importante para a regulação da atividade das enzimas mitocondriais e é importado do citosol através de um gradiente

eletrostático de H⁺. Acredita-se também que esse processo seja importante para a remoção de Ca⁺² do citosol, quando os níveis de Ca⁺² citosólico se tornam perigosamente altos.

Outro fator importante a ser considerado é a geração de derivados, por biodegradação dos agrotóxicos (FISHBEIN, 1984; HONG e col., 2000). Um dos sub-produtos da biodegradação do herbicida trifluralina é uma anilina: 2,6 dinitro-anilina (Figura 7) (WANG e ARNOLD, 2003):

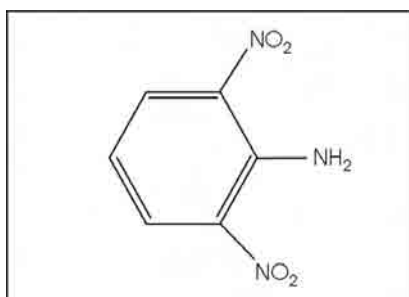


Figura 7: Estrutura química do 2,6 dinitro-anilina.

As anilinas são compostos que causam uma variedade de efeitos tóxicos, dependendo das mudanças estruturais que sofrem. Vários estudos demonstraram que as anilinas e os halógenos de anilina podem induzir a formação de metahemoglobina e também ser tóxico para rins e fígado, tanto *in vitro* como *in vivo* (VALENTOVICK e col., 1996; HONG e col., 2000). Os aminofenóis, produtos primários do metabolismo das anilinas, são compostos que estão relacionados com a indução de neurotoxicidade (VALENTOVICK e col., 1996).

5. EFEITO TÓXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA.

5.1. Toxicidade aguda

Estudos de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeitos adversos num curto período de tempo. Geralmente, trata-se da administração de uma única dose ou exposições múltiplas em 24 horas. Para a avaliação do potencial toxicológico, considera-se o aparecimento de efeito num período de até 14 dias (PAINE, 1993). O objetivo desses resultados é identificar órgãos que possam ser alvos potenciais e determinar a variabilidade das respostas ao agente entre as diferentes espécies (OPAS/USEPA, 1996).

Algumas concentrações e dosagens letais da trifluralina responsáveis pela morte da metade dos animais expostos a um determinado tratamento em um certo período de tempo estão apresentados na tabela 1.

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde) (1992), a trifluralina promove a oxidação da hemoglobina (com a formação metahemoglobina), a destruição de glóbulos vermelhos, além de ser tóxica para os rins e fígado, e provocar depressão do sistema nervoso central. Pode provocar vômito, diarreia, debilidade, sudorese, perda da visão, de memória e de concentração, e severa dermatite. Este herbicida é considerado neurotóxico e irritante gastrointestinal. Pode causar morte por fibrilação ventricular (WORTHING, 1991), embora vários autores (WORTH, 1970; BEM-DYKE e col., 1970; LADONIN e col., 1980; GAINES e LINDER, 1986; ROYAL SOCIETY OF CHEMISTS, 1990; RODRIGUES E ALMEIDA, 1998) afirmem que a trifluralina seja uma substância de baixa toxicidade.

Meister (1992) constatou que o herbicida trifluralina não apresenta efeito tóxico em testes com animais quando estes são expostos ao produto por via oral, pela derme ou quando inalado. Náuseas e severo desconforto gastrointestinal podem ocorrer depois da ingestão de trifluralina. Quando aplicado nos olhos de coelho produziu uma leve irritação que se reverteu em 7 dias. Em humanos pode induzir alergias na pele e, quando inalado, pode causar irritação na garganta e nos pulmões.

Tabela 1: Concentrações e dosagens letais (CL50 e DL50) da trifluralina para diferentes organismos.

Tratamento	Espécie	Grupo	Nome popular	Toxicidade
CL50 (48h)	<i>Lepomis macrochirus</i>	Peixe	Brânquia azul	19 $\mu\text{g L}^{-1}$
CL50 (48h)	<i>Mola mola</i>	Peixe	Peixe lua	19 $\mu\text{g L}^{-1}$
CL50 (48h)	<i>Cyprinus carpio</i>	Peixe	carpa	1.0 mg L^{-1}
CL50 (96h)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Peixe	Truta arco-íris	0,21 mg L^{-1}
CL50 (96h)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Lepomis macrochirus</i> , <i>Mola mola</i>	Peixe (jovem)	Truta arco-íris, Brânquia azul, Peixe lua.	10-90 $\mu\text{g L}^{-1}$
CL50 (48h)	<i>Daphnia magna</i>	Microcrustáceo	-	0,56 mg L^{-1}
CL50 (96h)	<i>Procambarus clarkii</i>	Crustáceo	lagosta	12 mg L^{-1}
DL50 (oral)	<i>Apis mellifera</i>	Inseto	Abelha do mel	0,011 mg abelha^{-1}
DL50 (oral)	<i>Mus musculus</i>	Mamífero	Camundongo de laboratório	>500 mg kg^{-1}
DL50 (oral)	<i>ratus norvegicus</i>	Mamífero	Rato de laboratório	> 10.000 mg kg^{-1}
DL50 (oral)	-	Mamífero	cachorro	> 200 mg kg^{-1}
DL50 (oral)	-	Mamífero	Coelho	> 200 mg kg^{-1}
DL50 (oral)	-	Ave	Galinha	> 200 mg kg^{-1}

Dados extraídos de Gangolli (1999).

5.2. Toxicidade crônica

Toxicidade crônica é aquela em que os efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo, geralmente excedendo 80% do tempo de vida do animal (AZEVEDO e CHASIN, 2003). O objetivo é identificar anormalidades e/ou doenças que podem ser desencadeadas pela substância testada e caracterizar as condições de exposição e a dose/concentração que poderá induzir doenças específicas ou mesmo a morte dos organismos (OPAS/USEPA, 1996).

Na tabela 2 estão apresentadas algumas informações quanto a toxicidade crônica, sub-aguda e sub-crônica do herbicida trifluralina, para diferentes organismos.

Dados da "National Cancer Institute" (NCI) (2000) relataram que ratos submetidos à exposição crônica de trifluralina, em baixas concentrações, apresentaram um aumento de carcinomas hepatocelular e uma maior incidência de adenomas brônquicos alveolares. Também foi constatado em ratos submetidos à exposição em baixas concentrações do herbicida trifluralina um aumento de câncer de bexiga. Foi observado que quando ratos machos foram submetidos a doses elevadas do herbicida trifluralina, esses apresentaram uma maior incidência de tumores em células foliculares e na glândula tireóide (ENMERSSON e col., 1980).

De acordo com "Occupational Health Service" (1991), o contato prolongado da trifluralina com a pele pode causar dermatite alérgica. A WSSA (1989) afirma que a administração de trifluralina em cachorros por meio de gavagem, por 2 anos, não promove efeito tóxico.

No entanto, a USEPA (1989), em ensaios crônicos com trifluralina, realizados com 60 animais (ratos F344) que receberam na dieta doses de 0, 813, 3250 e 6500 ppm, por 2 anos, foram observados danos no fígado e nos rins desses animais.

De acordo com Worthing (1991), a trifluralina é altamente tóxica e neurotóxica. O autor afirma que o herbicida tem a capacidade de se acumular no tecido adiposo e de inibir a função imunológica do timo. É considerado possivelmente teratogênico e fetotóxico, tem a característica de alterar o sistema endócrino e reprodutor, diminui o número e a mobilidade de espermatozoides, além de aumentar a quantidade de espermatozoides anormais.

Tabela 2: Dados sobre toxicidade sub-aguda, crônica e sub-crônica do herbicida trifluralina.

Tratamento	Espécie	Grupo	Nome popular	Toxicidade	Sintomas
LOEC	<i>Amphiprion percula</i>	Peixes	Peixe palhaço	5 μ g L ⁻¹	-
NOEL	<i>Amphiprion percula</i>	Peixe	Peixe palhaço	2 μ g L ⁻¹	-
CE50 (10 dias)	<i>Chlorococcum</i> sp	Protozoário	-	2,5 mg L ⁻¹	-
Sub-aguda (derme-14 dias)	<i>Oryctolagus caniculus</i>	Mamífero	Coelho	2mL Kg ⁻¹	diarréia e leve eritema
Sub- crônico (oral-3 meses)	<i>Ratus norvegicus</i>	Mamífero	Ratos	25, 50 e 100 mg kg ⁻¹ dia ⁻¹	não promoveu efeitos na sobrevivência ou na aparência*

* A pesagem dos fígados dos animais submetidos à dieta com 50 e 100mg Kg⁻¹, de certo modo, apresentaram-se maiores quando comparados com os animais controle. Dados extraídos de Gangolli (1999).

6. EFEITO CITOTÓXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA.

Estudos citotóxicos são realizados para identificar o potencial de diversos agentes em promover a morte significativa de células nos organismos. O objetivo é avaliar se esse dano pode acarretar em um comprometimento de tecidos, órgãos ou do organismo como um todo.

Estudos realizados por Ovidi e col. (2001) testaram em *Nicotiana tabacum* a concentração de 1,53 mg/ml de trifluralina e observaram que o herbicida tem um efeito específico no aparato reprodutivo das plantas, pela ação direta sobre a formação dos tubos polínicos, por acarretar uma completa despolimerização dos microtúbulos. Os autores ainda sugerem que o citoesqueleto de microtúbulos dos tubos polínicos podem ser usados como bioindicadores para estudos de toxicidade induzidos por agentes aneugênicos, como a trifluralina.

Fernandes (2002) afirma que o herbicida trifluralina age sobre o desenvolvimento da planta, promovendo redução no índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa*, o que leva ao comprometimento no crescimento do organismo.

As afirmações da autora *op cit* estão de acordo com as descrições, para esse mesmo herbicida, feitas por Villarias (1981), onde o autor comprova a ação da trifluralina como um herbicida pré-emergente, utilizado para inibir germinação e impedir o estabelecimento de ervas daninhas em culturas. De acordo com Bayer e col. (1967), a trifluralina promove a diminuição da zona de tecido meristemático, o que comprova a sua ação sobre a inibição do crescimento.

7. EFEITO MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO DO HERBICIDA TRIFLURALINA.

Os efeitos mutagênicos dos agrotóxicos, em geral, podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação no DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (TIMBRELL, 1999).

Efeitos genotóxicos podem promover quebras no DNA, acarretando em perda de material genético e mutações que inviabilizam a célula ou que decorrem em processos carcinogênicos. Atualmente, a genotoxicidade é avaliada utilizando-se diversos testes que incluem vários organismos e resultam em informações seguras e precisas, quanto a sua potencialidade em causar lesão no DNA.

O potencial genotóxico e mutagênico do herbicida trifluralina tem sido investigado por vários pesquisadores, por meio de diferentes ensaios e organismos (RIBAS e col. 1996). A maioria dos resultados relatados nesses testes são negativos ou inconclusivos (WATERS e col., 1982; OSABA, 1995). Testes como os de aberrações cromossômicas têm mostrado evidências de mutagenicidade em várias espécies de plantas (WU, 1972; GRIGORENTO e col., 1986; FERNANDES, 2002). No entanto, testes realizados em bactérias (USEPA, 1987), em *Drosophila melanogaster* (BRYANT e MURNIK, 1979; FOUREMAN, 1981), em células medulares de camundongo (NEHÉZ e col. 1980; PILINKAYA, 1987) e em cultura de células (IARC, 1991) demonstraram resultados contraditórios àqueles obtidos em plantas.

Estudos realizados por PEÑA (1996) e CANEVARI (1996) indicam que baixas concentrações de trifluralina podem induzir efeitos mutagênicos. Essas autoras observaram a presença, significativa, de micronúcleos em eritrócitos de peixes submetidos a

tratamentos agudos com este herbicida. Quando os diâmetros dos micronúcleos foram mensurados por Canevari (1996), os dados indicaram que esses poderiam ser derivados de perdas de cromossomos inteiros, constatando assim o efeito aneugênico do herbicida, devido a interferência do agrotóxico no fuso mitótico.

Análises citohistológicas de raízes de plântula de feijão, tratadas com várias concentrações de trifluralina, realizadas por Corso e col. (1986), apontaram para a presença de alterações no número, tamanho e forma de núcleos, além de mau formações e desorganização dos tecidos vasculares. Esses autores observaram também células com 2, 3 e 4 núcleos. Quando as células apresentavam-se uninucleadas, estas eram duas vezes maiores que o da planta controle.

Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o herbicida trifluralina também apresentaram problemas durante a divisão mitótica, tais como: poliploidias, C-metáfases, anáfases multipolares, pontes anafásicas e telofásicas, atrasos cromossômicos e perdas de material genético (Figura 8) (FERNANDES, 2002).

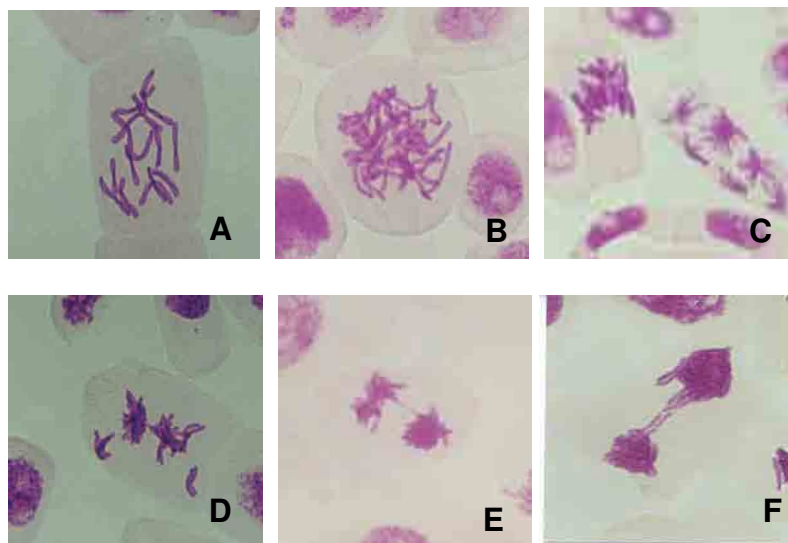


FIGURA 8: Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o herbicida trifluralina. **A-** C-metáfase; **B-** célula poliplóide; **C-** célula multipolar; **D-** perda de material genético; **E-** ponte cromossômica; **F-** telófase com atraso cromossômico.

Segundo Fernandes (2002), nos bioensaios com meristemas radiculares de *Allium cepa* tratados com trifluralina foram observados uma grande quantidade de células interfásicas com mais de um núcleo e células com a presença de micronúcleos e “mini cell” (Figura 9).

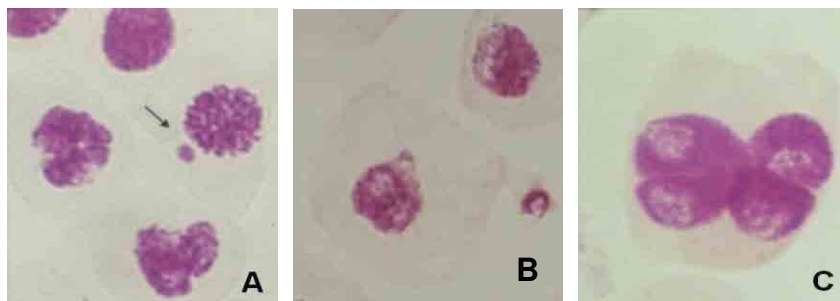


FIGURA 9: Células meristemáticas de *Allium cepa* tratadas com o herbicida trifluralina. **A-** célula com micronúcleo; **B-** célula e com “mini cell” adjacente; **C-** célula polinucleada.

Lignowski e col. (1972), observaram C-metáfases, micronúcleos, núcleos amebóides e poliploidias em meristemas radiculares de trigo e de cebola submetidos a ação do herbicida trifluralina. Devido à ocorrência de metáfases irregulares, eles concluíram que, provavelmente, o fuso foi rompido devido à ação do herbicida sob o mesmo.

Bioensaios realizados com trifluralina, utilizando *Pisum sativum* como material teste, revelaram uma reação positiva do herbicida com o aumento de alterações cromossômicas, efeitos C- mitóticos e antimitóticos (GRANT e col., 2001).

Fernandes (2002) afirmou que, dentre as células de meristemas radiculares de *Allium cepa* em divisão, a trifluralina promove um aumento significativo no índice de metáfases irregulares. Esses dados corroboram com as afirmações de Lignowski e col. (1972), Lee e col. (1997), Dow e col. (1998), Werbovetz e col. (1999) e Ovidi e col. (2001), que caracterizaram a trifluralina como um potente inibidor de microtúbulos, tendo capacidade, portanto, de acumular um grande número de células meristemáticas em metáfase.

Kaya e col. (2004), utilizando o teste de recombinação e mutações somáticas (SMART) em *Drosophila melanogaster*, obtiveram resultados positivos quanto a genotoxicidade do herbicida trifluralina.

Testes de genotoxicidade, utilizando o ensaio do cometa em cultura de linfócitos humanos, demonstraram que a trifluralina produziu um aumento significativo no comprimento da cauda do cometa. Esse aumento se deve às quebras no DNA, dadas pela indução de reparo por excisão de nucleotídeos, decorrente das lesões promovidas pela ação do herbicida (RIBAS e col., 1995). Quanto à frequência de células portadoras de cometa, o

autor observou que, após 48 horas de exposição ao herbicida, poucas células com cometas foram encontradas, mas esses resultados mostraram-se estatisticamente significativos.

De acordo com Ribas e col. (1996), a trifluralina apresenta um fraco efeito genotóxico em culturas de célula humanas porque promove uma redução na proliferação celular. O mesmo autor afirma que esse herbicida não revelou efeitos clastogênicos, uma vez que promoveu pouca indução de troca entre cromátides irmãs.

O teste do micronúcleo realizado por Ribas e col. (1996), utilizado para detectar atividade aneugênica, também teve resposta negativa, o que contradiz estudos de vários outros autores que afirmam que o herbicida trifluralina promove aberrações cromossômicas e alterações nucleares decorrentes de problemas nos fusos mitóticos (BRYANT, 1977; FOUREMAN, 1981; DONNA e col. 1981; CANEVARI, 1996; PEÑA, 1996; FERNANDES, 2002; entre outros).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da produtividade agrícola aconteceu em decorrência de vários fatores, entre eles o melhoramento genético, tecnologias de melhoria de implementos agrícolas e o uso de substâncias que permitem a correção de solos e controle de espécies indesejáveis para a agricultura (agrotóxicos).

O uso de agrotóxicos tem causado discussões e polêmicas entre a comunidade científica e seus usuários, registrando, de diversas formas, indicações vantajosas e desvantajosas para o seu uso. Dentre as indicações contrárias ao uso de agrotóxicos podemos destacar a falta de estudos detalhados sobre a ação desses químicos sobre os organismos expostos, impossibilitando associações da ação desse produto com o

aparecimento de problemas futuros. No solo, o herbicida é moderadamente persistente, o que pode vir a comprometer organismos que, eventualmente, estejam expostos a ele. A trifluralina é uma substância com atividade anti-mitótica, pois impede a divisão celular, fato esse que pode levar a um comprometimento do desenvolvimento dos organismos.

Existem relatos que comprovam que a trifluralina caracteriza-se como uma substância de grande toxicidade aguda para peixes, mas poucos são as descrições de sua toxicidade crônica e de seu efeito citotóxico.

Os estudos mutagênicos e genotóxicos realizados com esse químico são, na maioria das vezes, inconclusivos ou até contraditórios.

Pouco se tem de informação sobre a toxicidade dos produtos derivados da degradação da trifluralina.

9. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP-Brasil, ao biólogo Frederico Gonzalez Colombo Arnoldi pela consultoria sobre os dados moleculares e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAMHAM, A.R., WAUCHOPE, R.D., TRUMAN, C.C., DOWLER, C.C. Runoff and leachin of atrazina and alachlor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. *Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants*, New York v. 34, n.2 , p. 381-396, 1999.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publshing, 2002.

ALMEIDA, F.S. *Guia de herbicidas; recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional*. Londrina: IAPAR, 1985.

ANTHONY, R. G., WALDIN, T. R., RAY J. A., BRIGHT, S. W. J., HUSSEY, P. J. Herbicide resistance caused by spontaneus mutation of the cytoskeletal protein tubulin. *Nature*, New York v. 393, p. 260-263, 1998.

ANTHONY, R. G., HUSSEY, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytokeleton. *Trends in Plant Science*, Oxford v. 4, n.3, p. 112-116, 1999.

ARNOLD, F. C., DEBONZI, D. H. MPAlign: Graphical and multiplatform tool for molecular alignments. *Proceedings of II International Conference on Bioinformatics and Computational Biology*, Angra dos Reis, 2004.

ARGESE, E., BETTIOL, C., FASOLO, M., ZAMBON, A., AGNOLI, F. Substituted aniline interaction with submitochondrial particles and quantitative structure-activity relationships. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam v. 1558, p. 151-160, 2002.

ASHTON, F.M., MÔNACO, T.J. *Weed science: principles and practices*. New York: John Wiley, 1991.

AUDUS, L.J. *Herbicides*. London: Academic Press, 1980, p. 608.

AZEVEDO, F.A., CHASIN, A. A. M. *As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia*. São Paulo: Rima, 2003.

BAIRD, W. V., BLUME, YaB., WICK, S. Microtubular and cytoskeletal mutants. In: ed. Nick, P. Springer: 2000, p. 159-91.

BAIRD, C. *Química Ambiental*. Porto Alegre: Bookman, 2002

BAYER D.E., FOY C.L., MALLORY T.E., CUTTER E.G. Morphological & histological effects of trifluralin on root development. *Am. J. Bot.* v.54, p. 945-952, 1967.

BELLINASO M de. L., HENRIQUE L.A., GAYLARDE C.C., GREER C.W. Genes similar to naphthalene dioxygenase genes in trifluralin-degrading bacteria. *Pest Manag. Sci.*, Sussex v. 5, p. 474-478, 2004.

BEM-DYKE, R., SANDERSON, D.M., NOAKES, D.N. Acute toxicity data for pesticides- 1970. *Pest Control.*, London v. 9, p. 119-127, 1970.

BLUME, Ya.B., NYPORKO, A. Yu., YEMETS, A. I., BAIRD, W.V. Structural modeling of the interaction of plant α -tubulin with dinitroaniline and phosphoroamidate herbicides. *Cell Biology International*, London v. 27, p. 171-174, 2003.

BREVIARIO, D., NICK, P. Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications. *Transgenic Res.*, London v. 9, p. 383-93, 2000.

BRYANT, M.L., MURNIK, M.R. Mutagenicity of the herbicide trifluralin in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, Amsterdam v. 53 , p. 235, 1977.

BYRD, R.A., MARKHAM, J. K., EMMERSON, J.L. Developmental toxicity of dinitroaniline herbicides in rats and rabbits. *Fundamental and Applied toxicology*. v. 26, p. 181-190, 1995.

BOND D.J. Mechanisms of aneuploid induction. *Mutation Research*, Amsterdam v. 181, n. 2, p. 257-266, 1987.

CALDERÓN, M.J., HERMOSÍN, M.C., CORNEJO, J. y MORENO, F. Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. *Estudios de la Zona No Saturada del Suelo*. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Tascón: 1999. Tenerife, p.83-88.

CANEVARI, R.A. Avaliação dos efeitos genotóxicos e diâmetro dos micronúcleos obtidos em *Prochilodus lineatus* (Pisces, *Prochilodontidae*) submetidos a tratamentos agudos com o inseticida azodrin e o herbicida trifluralina. Londrina. 1996. [Monografia (Bacharelado) em biologia geral Universidade Estadual de Londrina].

CHEVREUIL, M., GARMOUMA, M., TEIL, M.J., CHESTERIKOFF, A. Occurrence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the

atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of Paris area. Science of the environment. v. 182, p. 25-37, 1996.

COMPÊNDIO de Defensivos Agrícolas. São Paulo: Andrei, 1996.

CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente-Revisão da Resolução 020/86 "Classificação e enquadramento de corpos de água". 12 e 13 de junho de 2003.

COOPER, M.T., PORTER, T.D. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. Mutation Research, Amsterdam v. 6, p.45-52, 2000.

CORSO, G. M., MARIN-MORALES, M. A., GRACIOLI, L. A., GOBATTO-RODRIGUES, A. A. Influência do herbicida trifluralin sobre a endomorfologia de raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Rio Vermelho). In: Congresso Brasileiro de Herbicida e Plantas Daninhas, 16^o, Campo Grande 1986. Anais. Campo Grande, 1986.

CROSBY, D. G. Fate of organic pesticides in the aquatic environment. Adv. Chem. Ser., Washington v. 111, p. 173, 1972.

CYNDY M. COOKE, GEORGE SHAW, CHRISD. COLLINS. Determination of solid-liquid partition coefficients (K_d) for the herbicides isoproturon and trifluralin in five UK agricultural soils. Environmental Pollution, Barking v. 132, p. 541-552, 2004.

DAYAMA, A., COUPE, R.H. Jr. Pesticides in the Yazoo River and Bogue Phalia, February through September 1996. In: Daniel JB, editor. Proceedings of the 27th Mississippi Water Resources Conference, Jackson, MS, March 25–26, 1997. Mississippi Water Resources Institute, Starkville MS. p.127–132, 1997.

DEUBER, R. Botânica das plantas daninhas. In: DEUBER, R. Ciência das plantas daninhas. Jaboticabal: FUNEP, 1992.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO 13 - 12 -91. Portaria no. 03, de 16 de janeiro de 1992. Termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991".

DIMOU, A. D., SAKKAS, V. A., ALBANIS, T. A. Trifluralin photolysis in natural waters and under the presence of isolated organic matter and nitrate ions: kinetics and photoproduct analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Lausanne v. 163, p. 473-480, 2004.

DONNA, A., BETTA, P.G., GAGLIARDI, F., GHIAZZA, G.F., GALLARETO, M. and GABUTTO, V. Preliminary experimental contribution to the study of possible carcinogenic activity of two herbicides containing atrazine-simazine and trifluralin as active principle. *Pathologica*, Gênova v. 73, p. 707-721, 1981.

DORES, E. F. G. C. Contaminação por pesticidas das águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso. 2000. [Tese de doutorado Universidade Federal de Mato Grosso].

DOW, G., REYNOLDSON, J., THOMPSON, A. Comparative efficacy of two tubulin inhibitors, aldabenzole and trifluralin, against *Plasmodium berghei*. *Parasitology International*, Tokio v. 47, p.133-281, 1998.

E. C. EUROPEAN COMMUNITIES. Directive Relating to the Quality of Water Intended for Human Consumption 1982, 80/778/EEC, office for official. Publications of the European Communities, L-2985 Luxemborg.

ENMERSON, J.L., PIERCE, E.C., MCGRATH, J.P. The chronic toxicity of compound 36352 (trifluralin) given as a compound of the diet to the fischer 344 rats for two years. Studies r-87 and R-97 (unpublished study received September 18, 1980 under 1471-35; submitted by Elanco Products Co., Division of Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), 1980.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. New Code Of Conduct on Pesticides adopted. Rome, FAONEWSROOM, 4 nov. 2002. Disponível via WWW, através do endereço:<
<http://www.fao.org/english/newsroom/news/2002/10525-em.html>>m Acesso em outubro de 2004.

FERNANDES, T.C.C. Uso do teste de *Allium cepa* na detecção da toxicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina. Monografia (Bacharel), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002.

FERRO, F. D. Agrotóxicos estão Matando Produtor Rural. Disponível em :
<http://www.preservacaolimeira.com.br/agrotoxicos/ferro2.htm>. Acesso em 31 de outubro de 2003.

FISHBEIN, L. The Handbook of Environmental Chemistry. Part C- Anthropogenic Compounds. Berlin, v. 3, p 1-40, 1984.

FOUREMAN, P.A. Identification of aneuploidy inducing chemicals in *Drosophila*. Environ. Mutagen., New York v. 3, p. 319, 1981.

GAINES, T. B., AND LINDER, R. E. Acute toxicity of pesticides in adult and weanling rats. *Fundam. Appl. Toxicol.*, Akron v. 7, p. 299-308, 1986.

GANGOLLI, S. *The dictionary of substances and their effects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, v. 7. 1999, 998p.

GORELL, J.M., JHONSON, C.C., RYBICKI, B.A., PETERSON, E.L., RICCHARDSON, R.J. The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farmin, well water, and rural living. *Neurology, Madras* v.50, p.1346-1350, 1998.

GRANT, W.F., OWENS, E.T. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutation Research, Amsterdam*. v. 188, p. 93-118, 2001.

GRIGORENTO, N.K., FASILCHENKO, V.F., MEREZHINSKI, Y.G., MORGUN, V.V., LOGVINENKO, V.F., SHARMANKIN, S.V. Cytogenetic activity of a herbicide treflan, and its metabolites as applied to maize. *Tsiol. Genet.* v. 20, p. 294-298, 1986.

GROVER, R., WOLT, J.D., CESSNA, A. J., SCHIEFER, H.B. Environmental fate of trifluralin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* v. 153, p. 1-64, 1997

GROVER, R., CESSNA, A.J., WAITE, D.T. Volatilization losses na transport in air of triazine herbicides. In: LE BARON, H.M., GIANESSI, L.P., McFARLAND, J., BURNSIDE, O.C., editors. *The triazine herbicides*. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science B.V., 2000.

GUIMARÃES, L.T. Utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) para identificação de áreas potenciais para disposição de resíduos na Bacia do Paquequer, município de Teresópolis-RJ. [Rio de Janeiro], 2000.

HACSKAYLO J., AMATO V.A. 1968. Effect of trifluralin on roots of corn & cotton. *Weed Sci.* v.16, p. 513-515.

HANSEN, A. L., GERTZ, A., JOERSBO, B., ANDESRSSEN, S.B. Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica*, Wageningen v. 101, p. 231-237, 1998.

HEPLER, P.K. Calcium and mitosis. *Int Ver Cytol.* v. 2, p. 1273-1282, 1992.

HERTEL C., QUADER H, ROBINSON D. G., ROOS I., CARAFOLI E., MARME D. Herbicides and fungicides stimulate Ca²⁺ efflux from rat liver mitochondria. *Febs Lett.* Amsterdam v.127, n.1 p. 37-39, 1981.

HIGGINS, D., THOMPSON, J., HIGGINS D. G., GIBS, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalty weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 22, p. 4673-4680. 1994.

HONG, S.K., ANESTIS, D.K., HENDERSON, T.T., RANKIN, G.O. *Toxicol. Lett.* v. 114, 125-133. 2000.

IARC (1991) IARC Monographs on the evolution of carcinogenic risks to humans. Occupational Exposures insecticide Application, and Some Pesticides. v. 53. Lyon, France.

IBGE–Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas-DP/DADG/DRNEA/PAS-1998/1999. Uso de Agrotóxicos no Estado do Paraná. Disponível via WWW através do endereço: <<ftp://ftp.ibge.gov.br/pub/ProducaoAgricola/UsodeAgrotoxicosnoEstadodoParana/Tabelas/Tabe-laselecionadas.xls>> Acesso em 7/1/2003.

JORDAN, M.A., WILSON, L. The use and action of drugs in analyzing mitosis. *Methods in Cell Biology*, New York v. 61, p. 267-295, 1999.

JORNAL EXPRESS. Consumo de pesticidas no Brasil. Extraído de [http//w.w.w.jornalexpress.com.br](http://w.w.w.jornalexpress.com.br), acessado em 02 de junho de 2004.

KAYA B., MARCOS R., YANIKOGLU A., CREUS A. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*, Amsterdam v. 557, p. 53-62, 2004.

KLUPINSKI, T. P., CHIN, Y. P. Abiotic Degradation of Trifluralin by Fe(II): Kinetics and Transformation Pathways. *Environ. Sci. Technol.*, Easton v. 37, p. 1311-1318, 2003.

KIM, J.H., FEAGLEY, S.E. Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor, and metribuzin in a commerce soil. *Journal of Environmental Science and Health-B: Pesticides and Food Contaminants*, New York v. 33, p. 529-546, 1998.

KOTAKA, E. T., ZAMBRONE, F.A.D. Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos. Campinas, SP: ILSI Brasil, 2001.

LANDONIN, V. F., HASSAN, A., WINTERINGHAM, F. P. W. Dinitroaniline pesticides. *Chemosphere*, Oxford v. 9, p. 67-69, 1980.

LANGENBACH, T. Pesticidas: Tecnologia sofisticada em mãos desinformadas. *Ciência Hoje*. São Paulo. v.10, p.66-68, 1989.

LEE, J.H., ARUMUGANATHAN, K.; YEN, Y., KAEPLER, S., BAENZIGER, P. S. Root tip cell cycle synchronization and metaphase-chromosome isolation suitable for flow sorting in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, Ottawa v.40, p.633-638, 1997.

LIGNOWSKI, E.M., SCOTT, E.G. Effect of trifluralin on mitosis. *Weed Sci.* v. 20, p. 267-270, 1972.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas. Nova Odessa: Editora Plantarum. 1990.

MACHADO, P.A.L. Direito ambiental brasileiro. São Paulo, Malheiros editores LTDA. 1031p, 2001.

MAHRESH, K. U., LARRY D. N. Mode of dinitroaniline herbicide action. *Plant. Physiol.*, Minneapolis v. 66, p. 1048-1052, 1980.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press, Harcourt Brace, 1988.

MATUO, Y. K., LOPES, J.N.C., MATUO, T. Contaminação do leite humano por organoclorados- DDT, BHC e Ciclodienos. Jaboticabal: FUNEP, 1990.

MEISTER, R.T. Farm Chemical Handbook '92. Willoughby: Meister Publishing Company, 1992.

MONGAR, K., MILLER, G.C. Vapor phase photolysis of trifluralin in an outdoor chamber: *Chemosphere*, Oxford v. 17, p. 2183-2188, 1988.

MOREJOHN, L.C., BUREAU, T.E., MOLÉ-BAJER, J., BAJER, A., FOSKET, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. *Planta*, Berlin v. 172, p.41-147, 1987.

MOREJOHN, L.C. The molecular pharmacology of plant tubuline and microtubules: The cytoskeletal basis of plant growth and form In: ed. LLOYD C.W.: 1991. Academic Press, London, p.29-43.

MOREJHON, L. C., FOSKET, D. E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cell. *Pharmacol. Ther. Dent.*, New York v. 51, p. 217-230, 1991.

MUNGER, R., ISACSON, P., HU, S., BURNS, T., HANSON, J., LYNCH, C.F., CHERRYHOLMES, K., VANDORPE, P., HAUSLER, Jr. W. J. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicides-contaminated drinking water supplies. *Environmental Health Perspectives.*, Research Triangle Park v. 105, p. 308-314, 1997.

N.C.I. INSTITUTE NACIONAL CANCER. Bioassay of trifluralin for possible carcinogenicity Bethesda, MD, 2000.

NEHÉZ, M.; PÁLDY, A. SELYPES, A. AND BERENCSI, G. Experiments on the mutagenic effects of two pesticides, DNOC and trifluralin. *Mutation Research*, Amsterdam v. 74, p. 202-203, 1980.

OCCUPATIONAL HEALTH SERVICES. MSDS for Trifluralin. OHS Inc., Secaucus, NJ. 1991.

O.M.S. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD: Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Ginebra, 1992.

OLIVEIRA, M.A.G. Níveis de resíduos de praguicidas organoclorados no leite de mães de uma população de Cuiabá, Mato Grosso. 1997. [Dissertação de Mestrado da ISC-UFMT].

OPAS/USEPA (Organización Panamericana de La Salud y Agencia de Protección Ambiental de Los Estados Unidos de América). Taller nacional de introducción a la evaluación y manejo de riesgos. Brasilia: OPA/EPA, mai. 1996.

OSABA, M.L. Detección de actividad genotóxica mediante el ensayo de mutación y recombinación somáticas en alas de *Drosophila melanogaster*. Análisis de 14 plaguicidas. Bilbao. 1995. [PhD Thesis, Universidad del País Vasco].

OVIDI, E., GAMBELLINI, G., TADDEI, A.R., CAI, G., CASINO, C.D., CECI, M., RONDÍNÍ, S., TIEZZI, A. Herbicides and the microtubular apparatus of *Nicotiana tabacum* pollen tube: immunofluorescence and immunogold labelling studies. *Toxicology in Vitro*, Oxford v.15, p.143-151, 2001.

PAINE, A.J. The design of toxicological studies. In: BALLANTYNE, B., MARS, T., TURNER, P. *General applied Toxicology*, New York: McMillan Press. 1993.

PEÑA, L.F.M. Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos em bioensaios. Londrina. 1996. [Tese de mestrado em Genética e Melhoramento – Universidade Estadual de Londrina].

PILINSKAYA, M.S.A Evaluation of the cytogenetic effect of the herbicide treflan and of a number of its metabolites on mammalian somatic cells. *Tsitol. Genetic.* v. 21, p. 131-135, 1987.

PIZANO, M.A., BAPTISTA, G.C. de. Resíduos de fenitroton em frutos e folhas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill) estaqueado. *Scientia Agrícola*, Piracicaba v. 55, n. 2, p. 203-209, 1998.

QUADER, H. Cytoskeleton: Microtubules. *Progress in Botany*, Berlin v. 59, p. 375-395, 1997.

RAMULU, K.S., VERHOEVEN, H.A., DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl and colchicine in potato. *Protoplasma*, New York v. 160, p. 65-71, 1995.

RIBAS, G., FRENZILLI, G., BARALE, R., MARCOS, R. Herbicide-induced damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel eletrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research*, Amsterdam v. 344, p. 41-54, 1995.

RIBAS, G. J. S., CARBONELL, E. N. X., CREUS, A., MARCOS, R. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutation Research*, Amsterdam v. 371, p. 15-21, 1996.

RIBEIRO, M. de F. S. Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental dos Produtos Químicos de uma Industria Petroquímica. Teses/dis.- Saneamento Ambiental: 1999 Disponível via WWW, através do endereço: <http://www.mackenzie.com.br/pos_graduacao/dissertacoes_teses_99/saneamento.pdf> Acesso em jan de 2003.

RIEDER, A. Indicadores de riscos de contaminação e de danos ao ambiente e a saúde humana por pesticidas às bordas do Alto Pantanal. Cuiabá. 1999. [Tese de doutorado da UFMT].

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA F.S de. Guia de herbicidas. Edição dos autores, Londrina. 1998.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTS. Trifluralin. In The Agrochemical Handbook, 2nd ed., Update 5, p. A412. Graham, Cambridge. 1990.

SANDERS PF, SEIBER JN. A chamber for measuring volatilization of pesticides for model soil and water disposal system. Chemosphere, Oxford v.12, p. 999-1012, 1983.

SELIM H.M., ZHU H. Retention and mobility of deltamethrin in soils. Transport. Soil Science. v. 167, p. 580-589, 2002.

SCHIO, R. Caracterização toxicológica de produtos domésticos que geram resíduos sólidos perigosos e sua destinação no município de Campo Grande-MS, 2001. Dissertação (Mestrado) -- SARH, PPG-TA-UFMS, Campo Grande.

SREE, K.R., VERHOEVEN, H.A., DIJKHUIS, P. Mitotic dynamics of micronuclei induced by amiprofos-metyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants. Theoretical and Applied Genetics, Berlin v. 75, p. 575-584, 1988.

STOKKERMANS, T.J.W., ARTZMAN, J.D.S., KEENEN, K., MORRISSETTE, N.S., TILNEY, L.G., ROOS, D.S. inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. Experimental Parasitology, San Diego v. 84, p. 355-370, 1996.

THURMAN, E.M., Zimmerman, L.R., Scribner EA, Coupe RH Jr. Occurrence of Cotton Pesticides in Surface Water of the Mississippi Embayment. US Geological Survey Fact Sheet. v.4, p. 22-98, 1998.

TIMBRELL, J.A. Introduction to Toxicology. London: Taylor & Francis, 1999.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1987. Trifluralin health advisory. Office of Drinking Water, Washington, DC.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1989 (jan). Health Advisory Summary: Trifluralin. USEPA, Washington, DC.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1993. Health advisories for drinking waters contaminants, Lewis Publishers, Boca laton, FL, USA .

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 1999. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Science Information Management Branch Health Effects Division Office of Pesticide Programs.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. 2001 (nov). Environmental Law Institute Research Report na Opportunities for Advancing Environmental Justice: Na Analisis of US-EPA, Washington, DC.

VALENTOVIC, M.A., BALL, J.G., HONG, S.K., ROGERS, B.A., MEADOWS, M.K., HARMON, R.C., RANKIN, G.O. In vitro toxicity of 2-and 4-chloroaniline: comparisons ith 4-amino-3-chlorophenol, 2-amino-5-chlorophenol e aminophenols. Toxicol. In Vitro, Oxford v. 10, p. 713-720, 1996.

VERHOEVEN, H.A., RAMULU, K.S., DIJKHUIS, P.A. comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta*, Berlin v. 182, p. 408-411, 1990.

VIEIRA, S. L. P. Resíduos de pesticidas organoclorados e organofosforados em tomate (*Lycopersicon esculentum* P. Miller) comercializados em Cuiabá, Mato Grosso. 1999. Dissertação (Mestrado) – ISC-UFMT, Cuiabá.

VIEIRA, L.V., GALDINO, S., PADOVANI, C.R. Utilização de Pesticidas na Agropecuária dos Municípios da Bacia do Alto Taquari de 1988 a 1996 e Risco de Contaminação do Pantanal, MS, Brasil. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001. 53p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 27). ISSN 1517-1965.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, M., PAVLICA, I., REGULA, D.P. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* v. 43, p. 284-291, 2002.

VILLARIAS, J.L. Guia de aplicacion de herbicidas. Madri: Mundi, 1981.

WAITE, A.D.T., BAILEY, A. P. SPROULL, B. J.F., QUIRING, A. D.V., CHAU, B.D..F J., BAILEY, C. J. CESSNA, C. Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of some herbicides currently used on the Canadian Prairies. *Chemosphere*, Oxford. v. 58, p.693–703, 2005.

WANG S., ARNOLD W.A. Abiotic reduction of dinitroaniline herbicides. *Water Res. Supl.* 37, v. 17, p. 4191-201. 2003.

WATERS, M.D., SANDHU, S.S., SIMMON, V.F., MORTELMANS, K.E., MITCHELL, A. D., JORGENSEN, T.A., JONES, D.C., VALENCIA, R., GARRET, N.E. Study of pesticide genotoxicity. *Basic Life Sci.* [S.I.] v. 21, p. 275-326, 1982.

WERBOVETZ, K.A., BRENDLE, J.J., SACKETT, D.L. Purification, characterization, and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Amsterdam v. 98, p. 53-65, 1999.

WSSA HERBICIDE HANDBOOK COMMITTEE. *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*, 6th Ed. WSSA, Champaign, 1989.

WHOTH, H.M. The toxicological evaluation of benfen and trifluralin. I: Pesticides Simposia: Inter-American Conference on toxicology and Occupational Medicine, DEICHMANN, W.B., PENALVER, R.A., RADOMSKI, J.L., Eds. Halos and Associates, Miami, 1970.

WORTHING C.R, ed. *The pesticide manual*, 9th ed. Farnham, British Crop Protection Council, 1991.

WU, T.P. Some cytological effects of treflan and mitomycin C on root tips of *Vicia faba*. *Taiwania*, Taipei v. 17, p. 248-254, 1972.

YEMETS, A.I., BLUME, Y.A.B. Resistance to herbicides with antimicrotubular activity: from natural mutants to transgenic plants. *Russ J. Plant. Physiol.*, New York v. 46, p. 899-907, 1999.

YAMAMOTO, E., ZENG, L., BAIRD, W.V. α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*. *Plant Cell*, Berlin v. 10, p. 297-308, 1998.

ZIMMERMAN, L.R., THURMAN, E.M., BASTIAN, K.C. Detection of persistent organic pollutants in the Mississippi Delta using semipermeable membrane devices. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam v. 248, p. 1, 2000.

_____. 1982 (Aug. 4). Trifluralin; Determination concluding the rebuttable presumption against registration; notice of availability of position documents. *Federal Register*, Washington v. 47, p.33777-84.

7. ARTIGO 2

**INDUÇÃO DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS E
NUCLEARES EM SISTEMA-TESTE DE *Allium cepa* PELA
AÇÃO DO HERBICIDA TRIFLURALINA**

Thaís Cristina Casimiro Fernandes¹, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo¹ e Maria Aparecida
Marin-Morales¹

Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24^A, 1515, cep: 13506-900,
Rio Claro/SP

O manuscrito será submetido à revista "Cell Biology and Toxicology"

RESUMO

Os microtúbulos garantem, por meio da polimerização dos fusos mitóticos, da formação do fragmoplasto e da presença de centrossomos, o sucesso da divisão mitótica. A trifluralina, um dos herbicidas mais utilizados no controle de ervas daninhas, é um potente inibidor do processo de divisão celular mitótica devido a sua interferência na polimerização dos microtúbulos. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do herbicida trifluralina em células meristemáticas de *Allium cepa* bem como avaliar a sua ação sobre o material genético dessa espécie. Para a realização do estudo, radículas de *A. cepa* foram submetidas às diversas concentrações do herbicida (0,42; 0,84; 1,67 e 3,34ppm) por 24 horas e, posteriormente, testada a capacidade de recuperação das células que sofreram injúrias pela substância, submetendo as radículas a um tratamento de 48 horas em água mili-Q. A análise das células dos meristemas radiculares de *A. cepa*, submetidos às diversas concentrações testadas do herbicida trifluralina, mostraram uma inibição do índice mitótico significativo para as concentrações de 0,84; 1,67 e 3,34ppm e induziram a formação de alterações como C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos, perdas, quebras e pontes cromossômicas, células polinucleadas e núcleos amebóides, principalmente, quando as radículas foram expostas às duas concentrações mais baixas (0,42 e 0,84ppm). Algumas das alterações encontradas parecem ser decorrentes de alterações anteriores devido à ação do herbicida nas diferentes fases e em mais de um ciclo celular consecutivo. Os resultados obtidos em nossas análises comprovam a ação microtúbulo despolimerizante do herbicida, o que permite caracterizá-lo como uma substância aneugênica. A ação aneugênica da trifluralina promove um efeito severo na célula, pois impede a segregação simétrica do

material genético durante a divisão celular. O período de recuperação por 48 horas parece não ter sido suficiente para restabelecer a integridade das células expostas ao herbicida. Uma vez que o organismo teste utilizado nesse estudo parece ter boa correlação com testes realizados em mamíferos, alertamos para a eventual possibilidade de quantidades residuais do herbicida trifluralina terem potencialidade para causar também problemas à saúde humana, uma vez que os tipos de alterações registradas neste estudo são também apontadas como alterações relacionadas às neoplasias.

Palavras chave: Aberrações cromossômicas, *Allium cepa*, microtúbulo, mitose, trifluralina.

INTRODUÇÃO

A separação das cromátides irmãs e a subsequente formação de duas células filhas idênticas depende de uma perfeita sincronia entre os cromossomos ao se dirigirem para os pólos das células. O estabelecimento das posições bipolares dos fusos é precedido pelo movimento dos centrossomos para direções opostas da célula e a partir do estabelecimento dessas estruturas nestes locais é que tem início a polimerização dos microtúbulos do aparelho mitótico. Na prometáfase, os centrossomos orientam a polimerização dos microtúbulos de forma contínua até que os fusos estabeleçam contato com o cinetócoro dos cromossomos (Sumara et al., 2004). Uma vez estabelecida a ligação entre o fuso e o cinetócoro, as cromátides são separadas e transportadas para pólos opostos da célula. A membrana nuclear é então restabelecida, envolvendo cada um dos materiais genéticos separados pela anáfase, constituindo, então, os núcleos filhos, finalizando o processo de cariocinese.

Após a divisão do material genético, os microtúbulos polares residuais formam, em vegetais, o fragmoplasto. Essa estrutura serve de base para a formação da lâmina celular primordial, onde será depositada a nova parede celular e que será responsável por determinar, precisamente, as posições das duas células filhas em relação às células adjacentes. Assim, os planos de divisão celular mitótica, junto com o crescimento celular, determinam o desenvolvimento dos vegetais (Alberts et al., 2002).

Os microtúbulos garantem, por meio da polimerização dos fusos mitóticos, da formação de fragmoplastos e dos microtúbulos corticais, o sucesso da divisão mitótica (Hepler et al., 1993).

A trifluralina, um dos herbicidas mais utilizados no controle de ervas daninhas, é um agente inibidor do processo de divisão celular mitótica, atuando basicamente sobre os meristemas e tecidos de órgãos subterrâneos como raízes, gemas, epicótilo, hipocótilo, rizomas, tubérculos e sementes (Deuber, 1992).

Vários autores (Morejohn et al., 1987; Morejohn, 1991; Ribas et al., 1996; Anthony & Hussey, 1999; Pavlica et al., 1998, Anthony et al., 1998) afirmam que o herbicida trifluralina atua sob o processo de crescimento dos microtúbulos, impedindo ou interrompendo sua formação. Anthony & Hussey (1999) acrescentam ainda que, dentre os microtúbulos, os corticais são considerados mais resistentes à ação do herbicida trifluralina e os fusos e fragmentos de microtúbulos os mais sensíveis.

Devido a interferência desse herbicida na polimerização dos microtúbulos, a trifluralina tem sido testada em *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* com o intuito de se obter resultados positivos quanto ao controle desses parasitas responsáveis pelo desenvolvimento das doenças de Chagas, da malária e da toxoplasmose, respectivamente. No entanto, apesar da trifluralina ser muito pouco tóxica para mamíferos (LD50 em ratos é de 500mg/kg⁻¹) e inibir a maior parte dos microtúbulos dos parasitas, existe evidências de possível potencial carcinogênico do produto o que tem inviabilizado o desenvolvimento de drogas antiprotozoárias a base de trifluralina (Stokkermans et al., 1996; Werbovetz et al., 1999 e Bogitsh et al., 1999).

"Environmental Protection Agency" (USEPA) (1999) classifica a trifluralina como substância do grupo C: possivelmente carcinogênica para humanos. Dados da "National Cancer Institute" (NCI) (2000) e de Emmerson et al. (1980) relatam a carcinogenicidade do

produto, para ratos, confirmada pelo aumento de carcinomas após exposição crônica dos organismos a esse herbicida.

Testes de recombinação e mutações somáticas (SMART) em *Drosophila melanogaster* tem demonstrado resultados positivos também quanto a genotoxicidade do herbicida trifluralina (Kaya et al., 2004).

De acordo com Ovidi et al. (2001), estudos realizados com *Nicotiana tabacum* indicam que a trifluralina tem um efeito específico no aparato reprodutivo das plantas, pela ação direta sobre a formação do tubo polínico, devido a interferência na polimerização dos microtúbulos dessas estruturas. Os autores ainda sugerem que o citoesqueleto de microtúbulos dos pólenes podem ser usados como um bioindicador para estudos de toxicidades induzidas por herbicidas.

Bioensaios realizados com trifluralina, utilizando *Pisum sativum* como material teste, revelaram uma reação positiva do herbicida com o aumento de alterações cromossômicas, efeitos C-mitóticos e antimitóticos (Grant et al., 2001).

Uma das mais antigas e utilizadas ferramentas para se realizar estudos de avaliação de mutagenicidade é o teste de aberrações cromossômicas. Esse teste, baseado na citogenética clássica, é um dos poucos métodos diretos usados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (Rank et al., 2002).

Testes citogenéticos são úteis para identificar os efeitos danosos de diversas substâncias, em suas várias concentrações e após diferentes tempos de exposição (Al-Sabti & Kurelec, 1985; Al-Sabti, 1989; Abdou et al., 1989; Kak & Kaul, 1989; Kumar & Sinha, 1989; Rao, 1989; Chauahan & Sunderaramen, 1990; El-Khodary et al., 1990; Panda et al.,

1990; Singh et al., 1990; Kumar et al., 1991; De-Serres, 1992; Matsumoto & Marin-Morales, 2004).

Os testes que avaliam as aberrações cromossômicas têm sido largamente reconhecidos. De acordo com Natarajan (2002), estas alterações revelam as conseqüências das ações mutagênicas de agentes químicos, aos quais muitos organismos estão expostos, inclusive o homem. Tanto as aberrações estruturais como as numéricas têm sido observadas em estudos na área de saúde humana, como nos casos de anormalidades congênitas em recém-nascidos e neoplasias em humanos.

A avaliação da mutagenicidade de químicos perigosos/danosos tem sido feita por meio de testes com vegetais superiores (Rank et al., 2002). Por serem receptores biológicos diretos de agrotóxicos aplicados no campo, esses organismos constituem, conseqüentemente, um importante material para testes genéticos e de monitoramento deste tipo de poluente ambiental. Vegetais superiores são atualmente reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas (Sharma & Panneerselvan, 1990).

A espécie *Allium cepa* tem sido, freqüentemente, utilizada para se determinar efeitos citotóxico, mutagênico e genotóxico de várias substâncias (Grant, 1982; Fiskejö, 1985; Matsumoto & Marin-Morales, 2004), sendo utilizada como um organismo padrão para testes rápidos (Smaka-Kincl et al., 1996), por apresentar boa correlação com sistemas teste de mamífero (Grant, 1982; Rank & Nielsen, 1993; Chauhan et al., 1999). Alterações cromossômicas em *Allium cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos

ou aneugênico, caracterizados de acordo com o tipo de alteração induzida (Vidaković-Cifrek et al. 2002).

O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos do herbicida trifluralina em células meristemáticas de *Allium cepa*, bem como avaliar a sua ação sobre o material genético dessa espécie.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Químico testado

A trifluralina é um herbicida de derivados benzênicos, pertencente à família das dinitroanilinas. Esse herbicida é de pré-emergência e deve ser aplicado e incorporado ao solo logo após a semeadura, quando as sementes das plantas estão no início do seu processo de germinação (Ribas et al., 1996). O herbicida é indicado para culturas de soja, citros, café em formação, algodão, amendoim, feijão, vagem, girassol, mamona, mandioca, berinjela, cenoura, quiabo entre outras (Rodrigues & Almeida, 1998). A composição química da trifluralina é α, α, α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina (CAS number 1582-09-8) e é classificado como uma substância medianamente tóxica (classe II) (DOU, 1991).

2.2. Organismo teste

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste, para se avaliar os efeitos mutagênicos do herbicida trifluralina, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ($2n = 2X = 16$ cromossomos) de um mesmo lote (variedade Baia periforme), estocadas em local escuro e acondicionadas a temperatura de 6-10° C.

2.3. Solução de tratamento e preparação das radículas

O herbicida trifluralina foi diluído em água destilada nas proporções de 1: 10³; 1,9: 10³; 3,7:10³; 7,5:10³. Levando-se em consideração a quantidade de produto ativo (trifluralina) contido no produto comercial (445g/L), obteve-se então as concentrações de 0,42ppm; 0,84ppm; 1,67ppm e 3,34ppm da substância trifluralina.

As sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em temperatura ambiente, em placas de Petri recobertas com papel de filtro umedecido com água mili-Q. Quando as radículas atingiram cerca de 1cm de comprimento foram transferidas para placas de Petri cobertas com papel alumínio, para evitar a degradação do herbicida (fotosensível) e expostas ao tratamento com as diversas concentrações do produto.

2.4. Tratamentos

Foram realizados 2 tratamentos com as concentrações acima descritas do herbicida trifluralina, como segue:

- 1- Tratamento de 24 horas: Radículas com cerca de 1 cm de comprimento foram expostas, por 24h, às diferentes concentrações pré-estabelecidas do herbicida trifluralina. Após esse período, alguns exemplares foram coletados e fixados em Carnoy (3:1(v/v)) e o restante seguiu para o tratamento de recuperação;
- 2- Tratamento de recuperação: algumas radículas que passaram pelo tratamento de 24 horas foram transferidas para outra placa de Petri, com água mili-Q, para um tratamento de recuperação por 48 horas.

O teste controle foi realizado com sementes submetidas à germinação somente em água mili-Q. As coletas e as fixações dos meristemas ocorreram, conjuntamente, para os dois tratamentos (24h e 48h).

As radículas fixadas foram submetidas a uma hidrólise ácida em HCl 1 N a 60° C, durante 8 minutos e posteriormente submetidas ao reativo de Schiff por 2 horas, em local escuro. As pontas das raízes foram seccionada, em lâmina, para a extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração das células, foi adicionada aos meristemas uma gota de carmim acético (1%). O material foi recoberto por lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina. Essa pressão foi bem suave, para não haver comprometimento das análises. O material foi analisado em microscópio de luz (Germany, Carl Zeiss) com aumento de 400 vezes.

Foram realizados, em ambos os tratamentos, cerca de 15.000 contagens de células para cada concentração investigada. O mesmo número de células foi observado para o teste controle.

Através de análises citológicas, foram observadas células portadoras de anormalidades e quantificado o índice mitótico, segundo as fórmulas:

$$\text{IAC (índice de alterações cromossômicas)} = \frac{\text{número de células alteradas}}{\text{total de células observadas}} \times 100$$

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{total de células observadas}} \times 100$$

2.4. Análise estatística

Após a obtenção dos resultados do estudo, foi realizada a análise estatística pelo método Kruskal-Wallis. Este é um teste não-paramétrico, conhecido como teste H, destinado a comparar 3 ou mais amostras independentes de mesmo tamanhos ou desiguais, cujos escores devem ser mensurados, pelo menos, a nível ordinal.

3. RESULTADOS

Nossos resultados mostraram que, após tratamento das radículas de *A. cepa* com as diversas concentrações do herbicida trifluralina, foi observado uma inibição do índice mitótico (Tabela 1, Figura 1) e a presença de aberrações cromossômicas e nucleares como C-metáfases, metáfases poliplóides, metáfases com aderências cromossômicas, anáfases multipolares, anáfases e telófases com atrasos, perdas, quebras e pontes cromossômicas, células polinucleadas e núcleos amebóides (Tabela 1, Figura 2).

3.1. Índice Mitótico

A partir de valores obtidos sobre índices mitóticos, é possível avaliar o potencial de uma determinada substância em inibir ou aumentar a proliferação celular. As análises do índice mitótico, referentes às radículas tratadas com o herbicida trifluralina por 24 horas, apresentaram um decréscimo significativo no índice de divisão celular, para as concentrações de 0,84; 1,67 e 3,34ppm (Tabela 1, Figura 1). Após o período de recuperação de 48 horas com água mili-Q, as radículas tratadas com as concentrações de 0,42 (resultado não significativo para tratamento de 24 horas e 48 horas) e 0,84ppm apresentaram um leve aumento no índice de divisão celular. Já as radículas tratadas com as concentrações de 1,67

e 3,34ppm, após o período de recuperação exibiram frequências de aproximadamente 1,6 e 6,4 vezes maiores embora as diferenças numéricas tenham sido proporcionais (acréscimo de 8,53 e 7,32 pontos, respectivamente). Mesmo após o aumento da frequência de células em divisão, as concentrações 0,84; 1,67 e 3,34ppm continuaram apresentando uma inibição significativa no processo da mitose, quando comparadas ao teste controle.

3.2. Células aberrantes

Nossos testes, realizados com o herbicida trifluralina, apontaram a presença de aberrações cromossômicas e nucleares. Algumas das alterações encontradas parecem ser decorrentes de uma somatória de efeitos ocorridos em diferentes fases do ciclo celular e ou devido a persistência da ação do herbicida em mais de um ciclo consecutivo, o que parece potencializar seu efeito (Esquema apresentado na figura 3).

Os resultados obtidos com o tratamento de 24 horas, utilizando as diferentes concentrações do herbicida trifluralina e com o tratamento de 48 horas em água mili-Q apontaram a presença de C-metáfases, metáfases poliplóides e metáfases com aderência cromossômica (Tabela 1, Figura 2 A, B e C). Esses resultados foram significativos para as concentrações de 0,42ppm e 0,84ppm em ambos os tratamentos quando comparados com os resultados obtidos para o teste controle (Tabela 1). A concentração de 1,67ppm apresentou frequências significativas de C-metáfases e células poliplóides somente após o tratamento de recuperação de 48 horas em água mili-Q. Já a concentração de 3,34ppm, somente a presença de aderência cromossômica foi estatisticamente significativa, após tratamento de 24 horas (Tabela 1).

Nossos estudos registram também problemas na segregação cromossômica durante a anáfase (Figuras 2 e 3). Como pode ser visto na tabela 1 e figura 2 (E, F, G, H, J, N, O e P) as concentrações testadas do herbicida trifluralina promoveram várias aberrações cromossômicas como perdas, quebras, atrasos, pontes e multipolaridade durante a anáfase e telófase (Figura 2 G, D, E, N, F, P, H e J). Dentre as alterações observadas, a presença de pontes cromossômicas foi significativa para as concentrações de 0,42ppm, 0,84 e 1,67ppm, antes e após o tratamento de recuperação, quando comparadas ao controle (Tabela 1).

Problemas decorrentes do estabelecimento de pontes cromossômicas, tais como quebras cromossômicas (Figura 3), apesar de estar presente em todas as concentrações e nos dois tratamentos (24 e 48 horas), mostraram níveis de significância, após o tratamento de 24 horas, somente para a concentração de 1,67ppm. Após tratamento de recuperação a concentração de 1,67ppm apresentou uma baixa frequência dessa alteração, enquanto que as concentrações 0,42 e 0,84ppm passaram a apresentar frequências significativas de quebras cromossômicas, quando comparados com os testes controle. Atrasos cromossômicos foram pouco observados nesse estudo (Tabela 1).

A exposição das radículas por 24 horas nas concentrações de 0,42; 0,84 e 1,67ppm levaram a uma indução significativa nas frequências de perdas cromossômicas. Após o tratamento de recuperação, somente a concentração de 0,84ppm continuou a apresentar taxa significativa dessa aberração. Já a concentração de 3,34ppm que não havia apresentado frequências significativas após tratamento de 24 horas, mostrou resultado significativo após o período de recuperação.

As aberrações cromossômicas encontradas nos testes realizados parecem ser determinantes quanto ao aparecimento de alterações no núcleo das células (Figura 3). Os

resultados obtidos para o tratamento de 24 horas com as diferentes concentrações do herbicida trifluralina apontam a presença de células polinucleadas para as concentrações mais baixas testadas (0,42 e 0,84ppm), dados estes estatisticamente significativos (Tabela 1). Após o tratamento de recuperação de 48 horas em água mili-Q, houve um aumento da frequência dessa alteração para as concentrações de 0,42 e 1,67ppm (Tabela 1). As análises estatísticas desses resultados foram significativas para as concentrações 0,42; 0,84 e 1,67ppm (Tabela 1). Também foi observada para essas concentrações a presença de núcleos amebóides, tanto para o tratamento de 24 horas como para o tratamento de 48 horas (Figura 2 L e M). Essa alteração nuclear parece ser resultante de células multipolares com ponte (Figuras 2 e 3).

A figura 4 expressa a frequência total de células aberrantes após a exposição das radículas de *A. cepa* às diversas concentrações testadas do herbicida, antes e após tratamento de recuperação. O gráfico mostra a manutenção dos níveis significativos de alterações celulares para as concentrações de 0,42 e 0,84ppm e o aumento da frequência das alterações para a concentração de 1,67, após o tratamento de recuperação.

4. DISCUSSÃO

O uso indiscriminado de herbicidas tem acarretado, muitas vezes, em envenenamento e em contaminação ambiental (Langenbach, 1989). Desta maneira, este é um importante estudo que avalia os efeitos do herbicida trifluralina sobre o material genético, fornecendo informações de sua ação potencial sobre os organismos e contribuindo, conseqüentemente, para um melhor esclarecimento sobre uma das muitas substâncias químicas de grande utilização na agricultura.

O herbicida trifluralina é considerado uma substância microtúbulo despolimerizante (Morejhon et al., 1987; Morejhon, 1991; Ribas et al., 1996; Anthony & Hussey, 1998; Pavlica et al., 1998, Anthony et al., 1999; Ovidi et al., 2001). Segundo Gisselsson et al. (2004), Ochi et al. (2003) e Sumara et al. (2004) esse tipo de substância pode ser capaz de promover mudanças críticas no processo de divisão celular, podendo resultar em instabilidade genômica.

Existem duas versões para a ação microtúbulo-despolimerizante do herbicida trifluralina: 1- ligação do herbicida às moléculas de tubulina, impedindo a polimerização dos microtúbulos (Upadhyaya & Noodén, 1977, Anthony et al., 1998; Werbovetz et al., 1999; Anthony & Hussey, 1999; e Bogitsh et al. 1999); 2- Aumento do conteúdo de íons cálcio nas células, promovendo problemas na regulação polimerizante/despolimerizante dos microtúbulos (Hertel et al., 1981; Sree et al., 1988; Hansen, 1998 e Vidaković-Cifrek et al., 2002).

Anthony & Hussey (1998) afirmam que os herbicidas dinitronilinas, como a trifluralina, possuem um radical NO_2 responsável pela sua ligação às moléculas de tubulina. O complexo formado, herbicida-tubulina, inviabiliza a formação dos microtúbulos e, conseqüentemente, dos fusos mitóticos, uma das estruturas responsáveis pelo sucesso do processo de divisão celular. Já para Hertel et al. (1981), Sree et al. (1988), Hansen (1998) e Vidaković-Cifrek et al. (2002), o herbicida trifluralina, além de atuar junto às moléculas de tubulina, pode alterar e desregular a concentração de cálcio na célula. Tanto a formação quanto a estrutura e a degradação dos microtúbulos são controladas pelo íon cálcio (Hepler e Wayne, 1985; Hepler, 1992) que, em alta

concentração, acarreta em uma menor taxa de polimerização de microtúbulos (Hepler,1992).

Os resultados obtidos em nossas análises comprovam a ação microtúbulo despolimerizante do herbicida o que permite caracterizá-lo como uma substância aneugênica. A ação aneugênica desse herbicida promove um efeito severo na célula, pois impede a segregação simétrica do material genético durante a divisão celular, levando a um desbalanço genômico característica esta que, de acordo com Wolley et al. (1982); Ruhong et al. (1997), também é observada em células neoplásicas.

Uma das comprovações da ação aneugênica do herbicida, em nosso estudo, foi a presença significativa de C-metáfases. A presença de C-metáfases é uma evidência da completa inativação do fuso mitótico das células (Fiskejö, 1985; Fiskejö, 1993), o que significa que nenhuma placa equatorial foi organizada, levando a um atraso ou impedimento da divisão dos centrômeros.

Além da presença de C-metáfases, também foram observadas frequências significativas de metáfases poliplóides. Essa alteração pode ter ocorrido devido ao impedimento do processo de citocinese, em decorrência da dificuldade na formação do fragmoplasto. A ausência do fragmoplasto impede a formação de células filhas, originando células poliplóides (Vidaković-Cifrek et al., 2002). O bloqueio da citocinese também foi observado em *Toxoplasma gondii* quando esse organismo foi exposto a quantidades micromolares do herbicida trifluralina (Stokkerman et al., 1996). Células poliplóides, pelo seu grande desequilíbrio decorrente de seu conteúdo cromossômico aumentado, tendem a apresentar uma maior contração cromossômica (Fiskejö, 1985; Fiskejö, 1993).

Nossos resultados sugerem que o aumento da contração cromossômica pode ser decorrente, também, de inativação da despolimerização dos fusos. Acreditamos que a contração dos cromossomos pode ser capaz de promover aderências cromatídicas e cromossômica. De acordo com Fiskejö e Levan (1993), Marcano & Del Campo (1995) e Marcano et al. (1998), a aderência cromossômica é um sinal comum da ação tóxica sobre material genético e decorre, provavelmente, em um efeito irreversível para a célula. A aderência é um tipo de anormalidade que envolve a matriz protéica do material cromatínico e não, propriamente, a molécula de DNA. A aderência cromossômica, por ser um processo irreversível, geralmente promove a morte da célula (Fiskejö, 1988; Fiskejö, 1995; Fiskejö, 1997).

As aderências cromatídicas, segundo Marcano et al. (2004) originam pontes e, conseqüentemente, quebras cromossômicas. De acordo com Giacomelli (1999), as pontes cromossômicas resultantes de aderência podem ser múltiplas e persistirem até a telófase.

Uma vez aderidas, as cromátides permanecem unidas e, quando separadas, na anáfase, podem levar a ruptura do cromossomo. Essa sugestão esclareceria a presença de pontes e quebras cromossômicas após tratamento com a trifluralina. Porém, a maioria das quebras cromossômicas observadas em nosso estudo parece ocorrer em porções teloméricas (Figura 2 D). Neste caso, as quebras então seriam as responsáveis pela formação das pontes cromossômicas devido à característica pegajosa que os cromossomos adquirem quando perdem porções teloméricas de suas estruturas. Essa característica clastogênica não é inerente ao princípio ativo da trifluralina. No entanto, o produto comercial pode conter, nitrosodipropilamina, um contaminante carcinogênico que reage com o DNA no O⁶ da Guanina e pode provocar tais mutações (Cooper & Porter, 2000).

Como a região telomérica dos cromossomos contém um bloco de nucleotídeos G adjacentes, provavelmente o contaminante seja o responsável pelas possíveis quebras teloméricas registradas neste estudo em células meristemáticas de *A. cepa*, após exposição ao herbicida trifluralina.

Kuriyama (1982) afirma que agentes poliploidizantes têm sido responsáveis por induzir acumulação de centrossomos supernumerários. Os centrossomos são centros de orientação dos fusos mitóticos que se replicam durante o ciclo celular, em paralelo com a replicação do DNA (Ghadimi et al., 2000). São estruturas responsáveis pela bipolaridade da célula durante a segregação dos cromossomos na anáfase, o que mantém a integridade genômica numérica do organismo (Sumara et al., 2004). A presença de centrossomos supernumerários, juntamente com a ausência da citocinese e problemas nos fusos mitóticos, comprometem a fidelidade da segregação cromossômica e induzem a formação de anáfases multipolares e, conseqüentemente a presença de células polinucleadas (Ochi et al., 2003). De acordo com Rank & Nielsen (1998) as anáfases multipolares decorrem do mau funcionamento do fuso mitótico, que distribui os cromossomos de forma irregular, encaminhando-os para mais de dois pólos nas células, contrariamente ao que ocorre em células de divisão celular normal. Em nossos estudos, observamos que, provavelmente, os cromossomos contidos nos múltiplos pólos formados, tendem a se descondensarem e se reestruturarem, formando células únicas com vários núcleos (Figuras 2 H, I e Figura 3). Nossos resultados corroboram com as afirmações de Kuriyama, (1982), Rank & Nielsen (1998) e Ochi et al. (2003), uma vez que observamos níveis significativos de células poliplóides, multipolares e polinucleadas.

Muitas das anáfases multipolares observadas neste estudo apresentaram também pontes cromossômicas (Figura 2 J). Essa desarmonia cromossômica instalada durante a divisão nuclear parece não impedir que a membrana nuclear se reestruture. No entanto, a membrana acompanha a distribuição irregular do material genético na célula e dá origem a núcleos disformes (núcleos amebóides) (Figura 2 L, M e Figura 3). Nossos resultados corroboram com as afirmações de Lignowski et al. (1972) que descrevem, além de C-metáfases, micronúcleos e células poliplóides, também a presença de núcleos amebóides em meristemas radiculares de trigo e de cebola submetidos a ação do herbicida trifluralina.

Segundo Gisselsson et al. (2004), em estudos sobre instabilidade genômica que levam ao desenvolvimento de células neoplásicas, substâncias aneugênicas tem a potencialidade de induzir alterações celulares do tipo aneuploidia. A interrupção da polimerização dos fusos mitóticos, durante a anáfase, pode promover uma ligação unilateral dos fusos aos cromossomos, impossibilitando a movimentação desse para os pólos. Os cromossomos tendem a ficar dispersos no citoplasma caracterizando uma perda de material genético, que acarretará em aneuploidia. (Shamina et al., 2003).

Nossos resultados mostraram freqüências significativas de células com perdas cromossômicas observadas nas fases de metáfase, anáfase e telófase. Esse material genético sem orientação de fuso tende a migrar, aleatoriamente, para uma das células filhas e derivar células com $2n \pm 1$ cromossomos.

De acordo com vários autores (Hedlle & Carraro, 1977; Viaggi et al., 1987; Nüsse et al., 1994; Fenech, 2000), as perdas e quebras cromossômicas como também o próprio material genético excedente, promovido por replicação do conteúdo gênico (Shimizu et al., 2000; Leach & Jackson-Cook, 2004; Morejhon et al., 1987; Morejhon, 1991; Ribas et al.,

1996; Pavlica et al., (1998) tendem a formar micronúcleos que podem vir a ser eliminados da célula sob a forma de "mini cells".

Também foi verificada em nosso estudo a presença de atrasos cromossômicos na anáfase e na telófase. Acreditamos que essa alteração se deva não por interferência na polimerização e sim na despolimerização dos microtúbulos. A ausência ou interferências no evento de despolimerização impossibilita o encurtamento do fuso e impede ou atrasa a movimentação dos cromossomos para os pólos. Acreditamos que essa alteração deva ocorrer devido às possíveis mudanças do conteúdo de cálcio presente na célula, causadas pela ação do herbicida. Entendemos que somente a formação do complexo tubulina-herbicida não seria suficiente para promover atraso cromossômico, pois esse complexo interfere, exclusivamente, na polimerização dos microtúbulos e o atraso cromossômico acontece pela falta de despolarização dessas estruturas.

As aberrações nucleares e cromossômicas observadas e discutidas nesse estudo foram mais evidentes e significativas para as concentrações mais baixas testadas para esse herbicida (0,42; 0,84 e 1,67ppm) (Tabela 1, Fig 4). A concentração mais alta (3,34ppm) apresentou apenas resultado significativo para as alterações do tipo, metáfases com aderência cromossômica e perdas cromossômicas (Tabela 1). Essa concentração também mostrou ser um potente inibidor do processo de divisão celular mitótica (Figura 1). Esse resultado pode ser explicado pela própria indicação do uso deste herbicida nessa concentração, que tem como objetivo impedir o desenvolvimento de plantas indesejáveis, por um bloqueio da sua divisão celular (Ribas et al., 1996). Como as substâncias mutagênicas agem normalmente durante a replicação ou durante as fases da divisão celular, quando não houver o evento de divisão não há possibilidade de se avaliar a ação

mutagênica. Podemos afirmar, assim, que nessa concentração (3,34ppm), por haver um efeito tóxico comprovado (indução de um baixo índice mitótico), não foi possível estimar o efeito mutagênico do produto.

O período de recuperação por 48 horas parece não ter sido suficiente para restabelecer a integridade das células expostas ao herbicida, pois não houve alteração nos seus níveis de significância. Foi observado um aumento no total de aberrações para a concentração de 1,67ppm e valores próximos entre os dois tratamentos para as concentrações de 0,42 e 0,84ppm (Figura 4). A concentração de 3,34ppm apresentou uma menor frequência de aberrações após o período de recuperação (Figura 4). No entanto, acreditamos que esse resultado não esteja relacionado ao restabelecimento da célula alterada, mas sim a um efeito citotóxico dessa concentração, observado pela baixa frequência de células em processo de mitose e pela presença, após tratamento de 24 horas, de metáfases com aderência cromossômica que tendem a inviabilizar a célula (Tabela 1). Esses resultados talvez representem os sérios danos causados pelo herbicida ao material genético, promovendo injúrias graves à célula, comprometendo assim a sua fisiologia.

Desta forma, acredita-se que os efeitos residuais do herbicida trifluralina podem constituir um grande problema para organismos expostos. Este pode, eventualmente, persistir residualmente no solo, podendo causar sérios problemas em cultivos posteriores, bem como aos organismos presentes no solo.

Uma vez que o organismo teste utilizado parece ter boa correlação com testes realizados em mamíferos (Grant, 1992; Rank & Nielsen, 1993; Chauhan et al., 1999), alertamos para a eventual possibilidade de quantidades residuais do herbicida trifluralina, terem a potencialidade para causar também problemas à saúde humana, uma vez que os

tipos de alterações registradas neste estudo são também apontadas como alterações relacionadas às neoplasias (Ochi, 2002; Xu et al., 1999; Susanne, 2005; Ochi et al., 2003; Gisselsson et al., 2004).

5. CONCLUSÃO

Nosso estudo mostrou, por meio de observações de indução de aberrações cromossômicas e nucleares que o herbicida trifluralina pode ser considerado uma substância aneugênica. A trifluralina parece atuar nos microtúbulos dos fusos mitóticos devido, principalmente, à falta de segregação correta dos cromossomos observada, em nosso estudo, durante a anáfase. O herbicida também age bloqueando a citocinese, o que leva a formação de células poliplóides. No entanto, esse químico parece não atuar nos microtúbulos corticais (formadores de centrossomos), desta maneira, acreditamos que a presença de anáfases multipolares, observadas neste estudo, foram decorrentes de centrossomos supernumerários presentes na célula após várias replicações sofridas pela mesma sem que houvesse o evento da citocinese. As quebras observadas podem ser consequência das aderências cromatídicas ou por uma ação clastogênica de contaminantes do produto, como o nitrodipropilamina.

Devido a frequência significativa das alterações encontradas, podemos afirmar que as concentrações 0,42; 0,84 e 1,67ppm são genotóxicas para *Allium cepa*. A concentração mais alta avaliada neste estudo (3,34ppm) pode ser considerada tóxica para o organismo testado, devido a inibição significativa de divisão celular e por apresentar alterações irreversíveis no material genético, o que pode causar inviabilidade celular.

O período de recuperação não foi suficiente para restabelecer a integridade das células comprometidas pela ação do herbicida trifluralina, visto que algumas alterações aumentaram ou mantiveram sua frequência significativa. Essa informação nos permite inferir que o herbicida promove uma ação contínua e persistente no organismo e nos alerta sobre a influência de doses residuais sobre o material genético dos organismos.

Sugerimos que as concentrações de 0,42ppm e 0,84ppm podem ser consideradas como “concentrações diagnósticos” de mutagenicidade do herbicida trifluralina, ou seja, aquela que pode trazer maiores informações, quanto aos danos no material genético induzidos nos organismos. Essas concentrações mostraram um maior efeito sobre a indução de irregularidades celulares tanto quanto aos tipos como à quantidade de aberrações cromossômicas e nucleares no organismo teste usado.

As células meristemáticas de *Allium cepa* mostraram ter boa correlação com testes realizados com animais, uma vez que nossos resultados mostraram as mesmas alterações significativamente frequentemente observadas em células neoplásicas. Desta forma, este estudo traz informações adicionais e importantes, também, para alertar sobre a possível ação carcinogênica do herbicida trifluralina para humanos, principalmente as doses residuais, o que confirma a classificação da EPA, para a trifluralina, como uma substância possivelmente carcinogênica para humanos.

4. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP-Brasil, à Profa Dra Dejanira de Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de

Biologia da UNESP-Rio Claro, ao biólogo Eduardo Murakami pela colaboração na confecção dos esquemas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Índice mitótico e frequências de células aberrantes observadas após exposição das radículas de *Allium cepa* ao herbicida trifluralina, antes e após tratamento de recuperação.

Alterações	Controle			0,42ppm			0,84ppm			1,67ppm			3,34ppm		
	24h	48h		24h	48h		24h	48h		24h	48h		24h	48h	
IM	25, 3±8,44	24,46±9,61		25, 75±17	24,89± 10,10		8,89*± 5,43	9,94*± 9,36		11,64*± 10,60	19,17*± 9,99		1,36*± 1,7	8,68*± 0,46	
C-M	0,0±0,0	0,0±0,0		0,65*±0,71	0,29*±0,37		0,35*±0,42	0,52*±0,67		0,06±0,12	0,79*±1,34		0,0±0,0	0,0±0,0	
PP	0,0±0,0	0,0±0,0		0,17*±0,25	0,28*±0,86		0,18*±0,46	0,24*±0,36		0,0±0,0	0,44*±0,62		0,0±0,0	0,058±0,01	
AdC	0,0±0,0	0,0±0,0		0,47*±0,39	0,35*±0,58		0,51*±0,41	0,62*±0,75		0,22*±0,28	0,39*±0,48		1,05*±1,59	0,0±0,0	
AC	0,0±0,0	0,0±0,0		0,10±0,12	0,09±0,14		0,14±0,29	0,11±0,21		0,006±0,03	0,02±0,04		0,0±0,0	0,0±0,0	
PC	0,0±0,0	0,0±0,0		0,6*±0,5	0,22*±0,22		0,26*±0,34	0,22*±0,35		0,27*±0,18	0,17*±0,39		0,0±0,0	0,0±0,0	
QC	0,02±0,04	0,04±0,05		0,04±0,16	0,26*±0,08		0,06±0,08	0,23*±0,25		0,38*±0,41	0,08±0,08		0,09±0,04	0,10±0,04	
MP	0,0±0,0	0,0±0,0		0,33*±0,36	0,24*±0,31		0,26*±0,25	0,39*±0,46		0,02±0,05	0,11±0,13		0,0±0,0	0,0±0,0	
PN	0,0±0,0	0,0±0,0		1,25*±1,9	1,44*±2,69		1,47*±2,23	0,43*±0,72		0,0±0,0	0,81*±1,29		0,0±0,0	0,0±0,0	
PdC	0,0±0,0	0,02±0,04		0,34*±0,22	0,09±0,09		0,37*±0,3	0,32*±0,26		0,22*±0,17	0,16±0,05		0,09±0,04	0,19*±0,05	
Total de AB	0,02±0,06	0,06±0,014		3,95*±0,37	3,26*±0,41		3,6*±0,42	3,08*±0,16		1,17*±0,14	2,97*±0,30		1,23*±0,34	0,35±0,07	

* Significativo $p < 0,05$; **IM**: Índice mitótico; **C-M**: C-metáfase; **PP**: Célula poliplóide; **AdC**: Aderência cromossômica; **AC**: Atraso cromossômico;

PC: Pontes cromossômicas; **QC**: Quebra cromossômica; **MP**: Anáfase multipolar, **PN**: Célula polinucleada; **PdC**: Perda cromossômica; **AB**: Aberrações celulares.

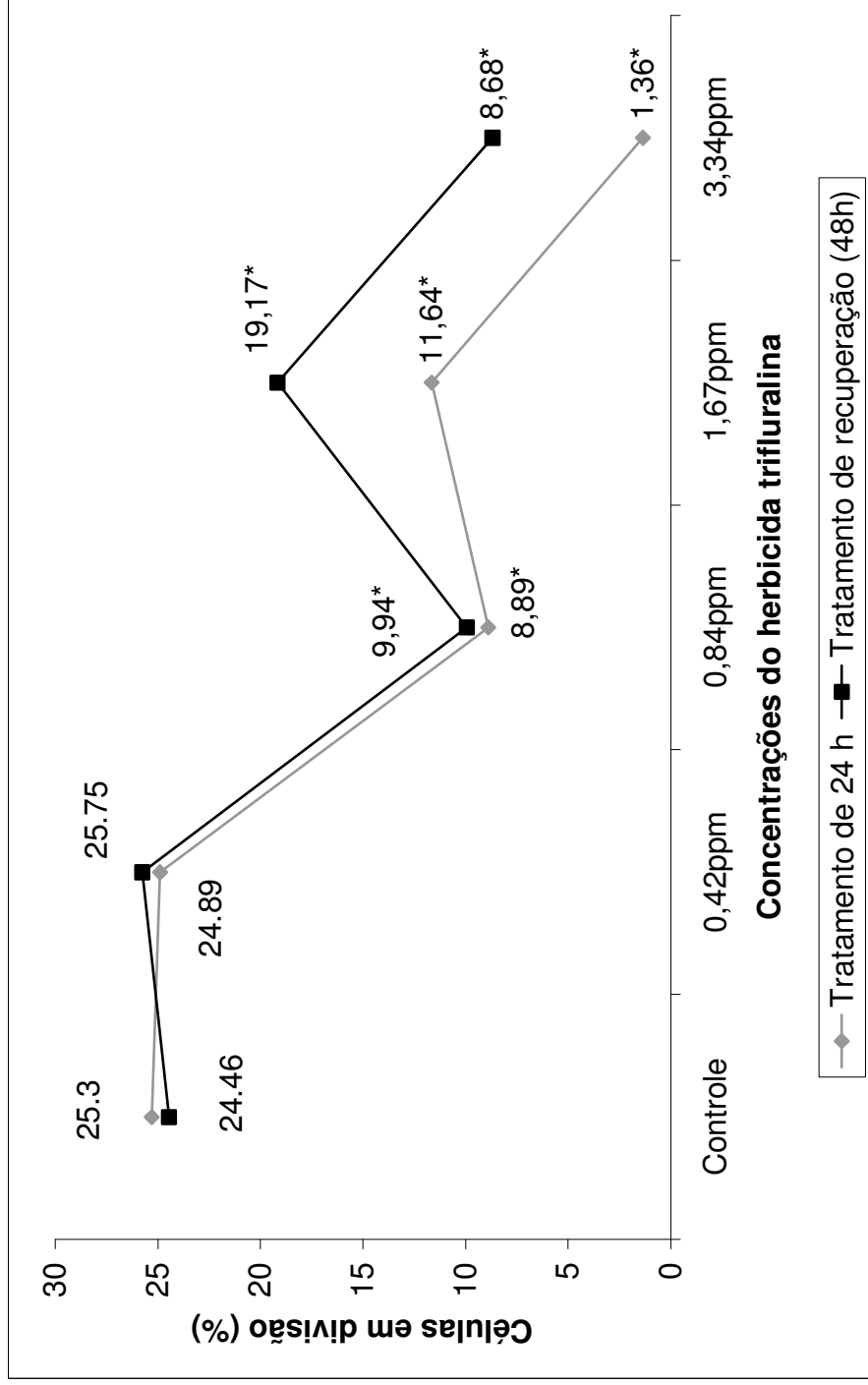


Figura 1: Freqüência de células em divisão celular mitótica antes e após tratamento de recuperação.

*Significativo $p < 0,01$

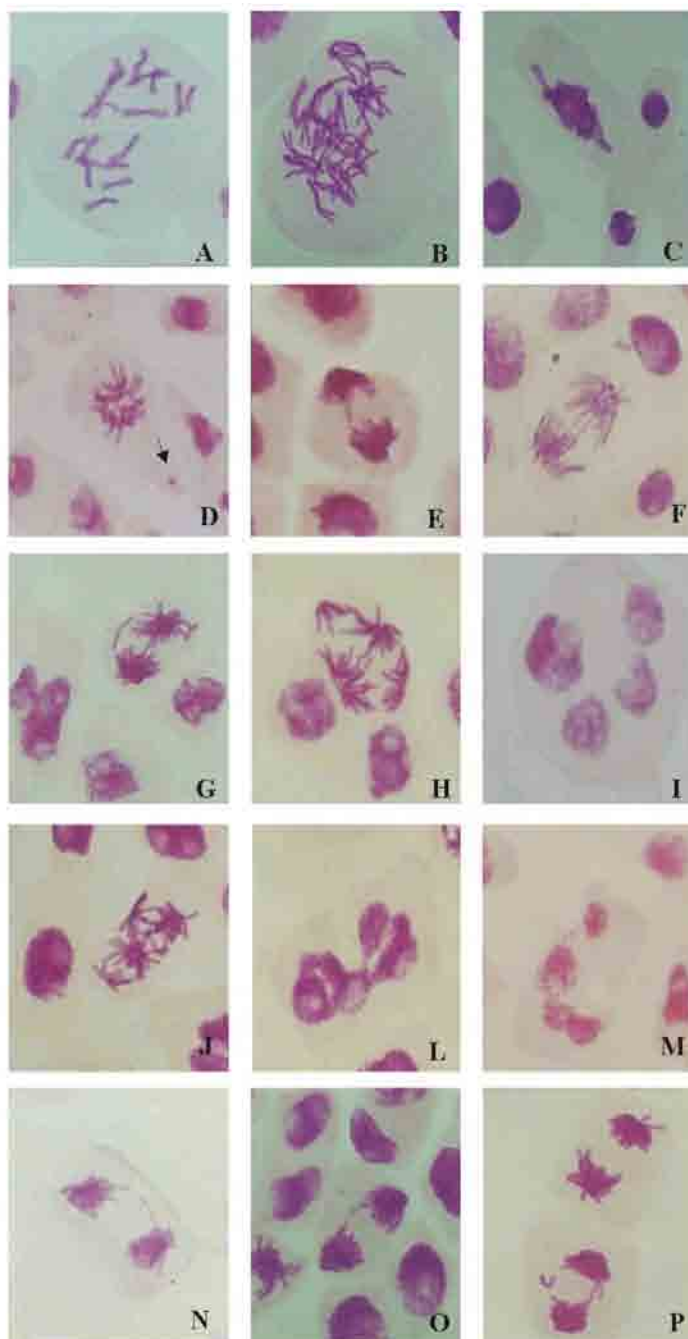


Figura 2: Aberrações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* após tratamento com o herbicida trifluralina. **A:** C-metáfase; **B:** Célula poliplóide; **C:** Aderência cromossômica; **D:** Metáfase com quebra cromossômica; **E:** Anáfase com atraso cromossômico; **F:** Ponte cromossômica em anáfase; **G:** Anáfase com perda cromossômica; **H:** Anáfase multipolar; **I:** Célula polinucleada; **J:** Anáfase multipolar com ponte; **L:** Núcleo amebóide em intérfase; **M:** Núcleo amebóide em prófase; **N:** Telófase com atraso cromossômico; **O:** Telófase com ponte cromossômica; **P:** Telófase com perda, ponte e atraso cromossômico.

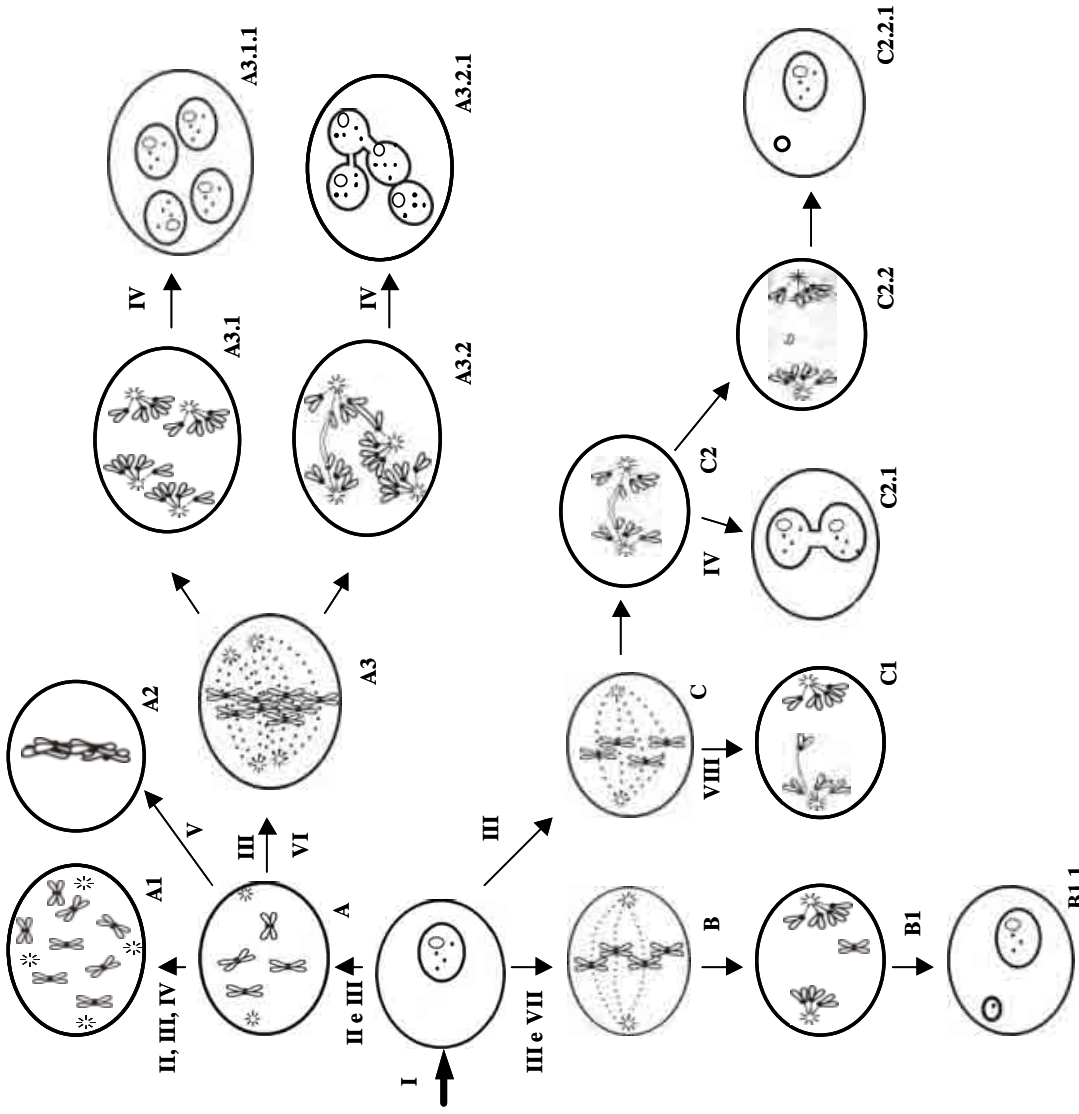


Figura 3: Ação aneugênica do herbicida trifluralina: **A:** C-metáfase; **A1:** C-metáfase poliploide; **A2:** Célula com aderência cromossômica; **A3:** Metáfase poliploide com centrosoma supernumerário; **A3.1:** Anáfase multipolar; **A3.1.1:** Célula polinucleada; **A3.2:** Anáfase multipolar com ponte e aderência cromatídica; **A3.2.1:** Célula com núcleo amebóide; **B:** Metáfase com ausência parcial da polimerização de fuso; **B1:** Perda cromossômica; **B2:** Célula micronucleada; **C:** Metáfase normal; **C1:** Atraso cromossômico na anáfase; **C2:** Anáfase com ponte cromossômica; **C2.1:** Núcleo amebóide; **C2.2:** quebra cromossômica; **C2.2.1:** Célula micronucleada.
I - Ação do herbicida sobre a célula;
II - Ausência total de fuso;
III - Replicação do material genético;
IV - Ausência de citocinese;
V - Continuidade da contração cromossômica e atração intercromossômica;
VI - Restabelecimento da polimerização do fuso;
VII - Ausência parcial de polimerização do fuso;
VIII - Despolimerização diferencial entre os fusos;

* Observar a relação entre o número de centrômeros dos cromossomos e o número de representantes nos núcleos.

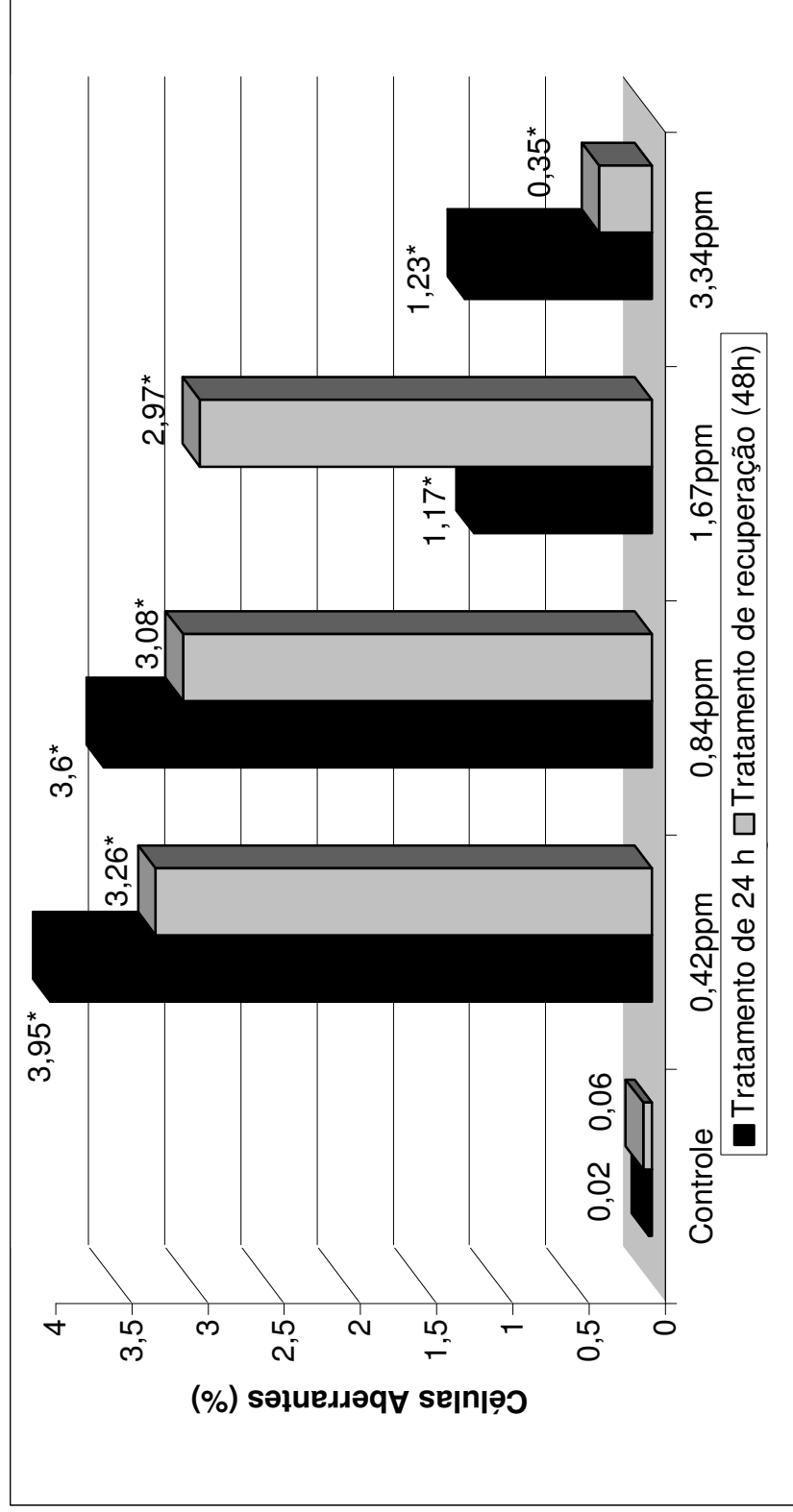


Figura 4: Freqüência do total de células aberrantes para todas as concentrações testadas do herbicida trifluralina antes e após o tratamento de recuperação. *Significativo $p < 0,01$.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdou RF, Megalla AM, Moharram KM, Abdel-Gawad THI, Sherif MAL, Lottfy AE. Cytological effects of fungal metabolites produced by fungi isolated from Egyptian poultry feedstuffs. *J Basic Microbiol.* 1989; 29: 131-139.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell.* New York: Garland Publishing, 2002: 1293p.

Al-Sabti K, Kurelec B. Chromosomal aberration in onion (*Allium cepa*) induced by water chlorination by-products. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1985; 34: 80-88.

Al-Sabti K. *Allium* test for air and water borne pollution control. *Cytobios.* 1989; 58: 71-78.

Anthony RG, Waldin TR, Ray JA, Bright SWJ, Hussey PJ. Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin. *Nature.* 1998; 393: 260-263.

Anthony RG, Hussey PJ. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. *Trends in Plant Science.* 1999; 4: 112-116.

Bogistsh BJ, Middleton OL, Ribeiro-Rodrigues R. Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* 1999; 85: 475-480.

Chauhan JKS, Sunderaraman V. Effect of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cell of *Allium cepa*. *Cytologia.* 1990; 55: 91-98.

Chauhan LKS, Savena PM, Gupta SK. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *A. cepa*. *Environment and Experiment Botany*. 1999; 42: 181-9.

Cooper MT, Porter TD. Mutagenicity os nitrosamines in methyltransferase-deficient strain of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and redutase. *Mutation Research*. 2000; 6: 45-52.

De-Serres FJ. Preface: Higher plants as effective monitors of environmental mutagens. *Mutation Research*. 1992; 270: 1-3.

Deuber R. Botânica das plantas daninhas. In: Deuber R. *Ciência das plantas daninhas*. Jaboticabal: FUNEP; 1992: 31-73.

Diário Oficial da União. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registrose extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins- nº 1, de 9 de dezembro de 1991”.

El-Khodary S, Habib A, Haliem A. Effects of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*. 1990; 55: 209-215.

Emmerson JL, Pierce EC, McGrath JP. The chronic toxicity of compound 36352 (trifluralin) given as a component of the diet to Fischer 344 rats for two years. Studies R-87 and R97, submitted by Elanco Products Co., division of Eli Lilly Co.) as cited in IRIS and discussed in Peer Review of Trifluralin by the Toxicology Branch Peer Review Committee (April 11, 1986 memorandum from R. Bruce Jaeger), 1980.

Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 2000; 455: 81-95.

Fiskejö G. The *Allium*-test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 1985; 102: 99-112.

Fiskejö G. *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. 1988; 197: 243- 260.

Fiskejö G, Levan A. Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. *Atlas*. 1993; 21: 139-149.

Fiskejö G. *Allium* test. *Meth Mol Biol*. 1995; 43: 119-127.

Fiskejö G. *Allium* test for screening chemicals, evaluation of cytological parameters, In: Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS (Eds). *Plants for Environmental Studies*. New York: Lewis Publishers; 1997: 307-333.

Ghadimi BM, Sackett DL, Difilippantonio MJ, Schröck E, Neumann T, Jauho A. Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 27: 183-190.

Giacomelli FRB. Avaliação do comportamento meiótico em variedades de aveia (*Avena sativa*) recomendadas para a região sul. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Maringá-PR.1999.

Gisselsson D, Palsson E, Yu C, Mertens F, Mandahl N. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. *Cancer Letters*. 2004; 206: 69-76.

Grant WF. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plantas. In: Fleck RA, Hollander A (eds) *Genetic toxicology: na agricultural perspective*. New York: Plenum Press; 1982: 353-378.

Grant, W.F., Lee, H.G., Logan, D.M., and Salamone, M.F. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.* 1992; 270: 53-64.

Grant WF, Owens ET. Chromosome aberration assay in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutation Research.* 2001; 188: 93-118.

Hansen AL, Gertz A, Joersbo B, Andersen SB. Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in *Beta vulgaris* L. ovule culture. *Euphytica.* 1998; 101: 231-237.

Heddle JA, Carrano AV. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ -irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutation Research.* 1977; 44: 63-69.

Hepler PK. Calcium and mitosis. *Int Ver Cytol.* 1992; 2: 1273-1282.

Hepler PK, Wayne RO. Calcium and plant development. *Ann Ver Plant.* 1985; 36:397-439.

Hepler PK, Cleary AL, Gunning BES, Wadsworth P, Wasteneys GO, Zhang DH. Cytoskeletal dynamics in living plant cells. *Cell Biol Int.* 1993; 17: 127-142.

Hertel C, Quader H, Robinson DG, Roos I, Carafoli E, Marme D. Herbicides and fungicides stimulate Ca^{2+} efflux from rat liver mitochondria. *FEBS Lett.* 1981; 127: 37-39.

Kak SN, Kaul BL. Interaction of hyperthermia with gamma rays in *Allium cepa* cells. *Indian J Exp Biol.* 1989; 27:98-99.

Kaya B, Marcos R, Yanikoglu A, Creus A. Evaluation of the genotoxicity of four herbicides in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* using two different strains. *Mutation Research*. 2004; 557: 53-62.

Kumar D, Sinha SP. Threshold dose of cytogenetic toxicity of Lindane Mathion and Metacid in *Allium cepa* root-tip cells. *Cytologia*. 1989; 54: 547-552.

Kumar S, Duta LP, Zinyu R. Toxic effects of soots on root meristems of *Allium cepa*. *J Environ Biol*. 1991; 12: 31-35.

Kuriyama R. Effect of colcemid on the centrioloe cycle in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Sci*. 1982; 53: 155-171.

Langenbach T. Pesticidas: Tecnologia sofisticada em mãos desinformadas. *Ciência Hoje*. 1989; 10: 66-68.

Leach NT, Jackson-Cook C. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosomes replicate in micronuclei?. *Mutation Research*. 2004; 554: 89-94.

Lignowski EM, Scott EG. Efect of trifluralin on mitosis. *Weed Sci*. 1972; 20: 267-270.

Marcano L, Del-Campo A. Studio ultrestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebola *Allium cepa* L. tratadas com inhibidores metabólicos. *Ciencia*. 1995; 3: 73-82.

Marcano L, Bracho M, Montiel X, Carruyo I, Atencio L. Efecto mitóxico y genotoxico del cadmio em poblaciones meristemáticas de *allium cepa* L. (cebola). *Ciencia*. 1998; 6: 93-99.

Marcano L, Carruyo I, Del-Campo A, Montiel X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. Environmental Research. 2004; 94: 221-226.

Matsumoto, S. T; Marin-Morales, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. Cytologia. 2004; 69: 399-408.

Morejohn LC, Bureau TE, Mole-Bayer J, Bajer AS, Fosket DE. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. Planta. 1987; 172: 252-264.

Morejohn LC, Bureau TE, Mole-Bayer J, Bajer AS, Fosket DE. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization *in vitro*. Planta. 1987; 172: 252-264.

Morejohn LC. The molecular pharmacology of plant tubulin and microtubules. In: Lloyd CW (ed) The cytoskeletal basis of plant growth and form. London: Academic Press. 1991; 29-43.

N.C.I. Institute Nacional Cancer. Bioassay of trifluralin for possible carcinogenicity, Bethesda, MD, 2000.

Natarajan AT. Chromosome aberrations: past, present and future. Mutation Research. 2002; 504: 3-16.

Nüsse M, Beisker W, Kramer J, Miller BM, Scriber GA, Viaggi S, Weller EM, Wessels JM. Measurement of micronuclei by flow cytometry. Methods in Cell Biology. 1994; 42: 149-158.

Ochi T. Role of mitotic motors, dynein and kinesin, in the induction of abnormal centrosome integrity and multipolar spindles in cultured V79 cells exposed to dimethylarsinic acid. *Mutation Research*. 2002; 499: 73-84.

Ochi T, Suzuki T, Isono H, Schlagenhafen C, Goessler W, Tsutsui T. Induction of structural and numerical changes of chromosome, centrosome abnormality, multipolar spindles and multipolar division in cultured Chinese hamsters V79 cells by exposure to a trivalent dimethylarsenic compound. *Mutation Research*. 2003; 530: 59-71.

Ovidi E, Gambellini G, Taddei AR, Cai G, Casino CD, Ceci M, Rondini S, Tiezzi A. Herbicides and the microtubular apparatus of *Nicotiana tabacum* pollen tube: immunofluorescence and immunogold labelling studies. *Toxicology in Vitro*. 2001; 15: 43-151.

Panda KK, Maheswar L, Panda BB. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. *Sci Total Environ*. 1990; 96: 281-296.

Pavlica M, Hsiao K-C, Papes D, Bornman CH. Observation of the effects of 2,4-D and trifluralin on the cell cycle and microtubule morphology of shallot root tip and Chinese hamster fibroblast cell. *Biologia (Bratislava)*. 1998; 53: 91-98.

Rank J, Nielsen, MH. A modified *Allium cepa* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*. 1993; 118: 49-53.

Rank J, Nielsen MH. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*. 1998; 418: 113-9.

Rank J, Lopez LC, Nielsen MH, Moretton J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*. 2002; 136: 57-59.

Rao BV. Cytological effects of Pendimethalin in *Allium cepa* root meristems. *Cell Chromosome Res*. 1989; 12: 57-59.

Ribas G, Surrallés J, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocyte exposed in vitro. *Mutation Research*. 1996; 371: 15-21.

Rodrigues BN, Almeida FS. *Guia de Herbicidas*. Londrina: edição dos autores; 1998: 647.

Ruhong L, Yerganian G, Deusberg P, Kraemer A, Willer A, Rausch C. and Hehlmann R. Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of Chinese hamster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 14506–14511.

Sharma CBSR, Panneerselvan N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. *Crit Ver Plant Sci.* 1990; 9: 409-442.

Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test producere. *Mutation Research*. 1996; 368: 171-179.

Shamina NV, Silkova OG, Seriukova EG. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. *Cell Biology International*. 2003; 27: 657-664.

Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutation Research*. 2000; 448: 81-90.

Singh RM, Sharma A, Sarbhoy RK. Cytogenetical effects of agricultural chemical in onion (*Allium cepa* L.). *int Plant Dis*. 1990; 225-229.

Sree KR, Verhoeven HA, Dijkhuis P. Mitotic dynamics of micronuclei induced by amiprofos-metyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants. *Theoretical and Applied Genetics*. 1988; 75: 575-584.

Stokkermans TJW, Schwartzman JD, Keenan K, Morissette NS, Tilney LG, Ross DS. Inhibition of *Toxoplasma gondii* replication by dinitroaniline herbicides. *Experimental Parasitology*. 1996; 84: 355-370.

Sumara I, Giménez-Abián JF, Gerlich D, Hirota T, Kraft C, La Torres T. Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Current Biology*. 2004; 14: 1712-1722.

Susanne MG. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Seminars in Cancer Biology*. 2005; 15: 33-42.

Upadhyaya MK and Noodén LD. Mode of dinitroaniline herbicide action I. Analysis of the colchicine-like effects of dinitroaniline herbicides. *Plant Cell Physiol* 1977; 18: 1319-1330.

U.S. Environmental Protection Agency. Chemicals Evaluated for Carcinogenic Potential Science Information Management Branch Health Effects Division Office of Pesticide Programs. 1999.

Viaggi S, Bonatti S, Abbondandolo A. New evidence for the presence of chromosomes in micronuclei of human and Chinese hamster cells. *Mutagenesis*. 1987; 2: 367-370.

Vidakovivé-Cifrek Z, Pavlica M, Regula I. Papers D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. *Environmental Contamination and Toxicology*. 2002; 43: 284-291.

Xu, X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, Harris CC, Ried T, Deng CX. Centrosome amplification and a defective G₂-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. 1999; 3: 389-395.

Webovetz KA, Brendle JJ, Sackett DL. Purification, characterization and drug susceptibility of from *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999; 98: 53-65.

Wolley RC, Schrieber K, Koss LG, Karas A, Sherman A. DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 69: 15-22.

8. ARTIGO 3

**EVIDÊNCIAS DE AÇÃO MUTAGÊNICA DO HERBICIDA
TRIFLURALINA SOBRE SISTEMA TESTE DE *Allium cepa*.**

Thaís Cristina Casimiro Fernandes, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo e Maria Aparecida
Marin-Morales

Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24A, 1515, cep: 13506-900,
Rio Claro/SP

O manuscrito será enviado para a revista "Mutation Research".

RESUMO

Os micronúcleos são formados por meio de perdas cromossômicas durante a anáfase, por fragmentos acêntricos ou por expulsão de material genético excedente no núcleo. A trifluralina interfere na formação dos microtúbulos promovendo alterações no material genético inibindo assim a proliferação celular. Nosso estudo avaliou a potencialidade do herbicida trifluralina em induzir a formação de micronúcleos e outras alterações celulares, em meristemas radiculares de *Allium cepa*. Os tipos de anormalidades mais freqüentemente observadas, os processos envolvidos na sua formação e as estratégias celulares para a eliminação dos danos promovidos pelo herbicida, baseando-se na análise da indução e presença de perdas cromossômicas, células poliplóides, micronúcleos, “mini cells” são discutidas. Também são apresentadas sugestões das implicações da eliminação de material genético constituinte dos micronúcleos, tais como viabilidade celular e apoptose.

Palavras-chave: Trifluralina, *Allium cepa*, micronúcleo, agentes aneugênicos.

INTRODUÇÃO

Os herbicidas do grupo das dinitroanilinas, como a trifluralina, têm sido amplamente utilizados no controle seletivo de ervas daninhas [1]. O herbicida trifluralina, que tem ação pré-emergente, penetra nas sementes na região do hipocótilo e impede a divisão celular interferindo, diretamente, no desenvolvimento das plantas [2]. Esse herbicida é caracterizado como um composto químico microtúbulo despolimerizante que se liga às tubulinas através do seu radical NO_2 e impede a formação, principalmente, dos fusos mitóticos [3 e 4].

Os efeitos mutagênicos, derivados da ação de agrotóxicos, podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação no DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisões incorretas da célula [5].

Vegetais superiores são sistemas genéticos freqüentemente utilizados para o monitoramento de poluentes ambientais. Atividades mutagênicas de químicos podem ser analisadas em diferentes sistemas testes vegetais como em *Allium cepa*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare*. Por meio desses sistemas vegetais podem ser realizados ensaios de aberrações cromossômicas e testes citogenéticos [6 e 7]. Bioensaios com plantas têm sido considerados mais sensíveis e mais simples quando comparados com bioensaios utilizando animais. Esses organismos-teste têm sido validado em estudos de colaboração internacional entre os "United Nations Environmental Program" (UNEP), "World Health Organization" (WHO) e "US Environmental Protection Agency" (USEPA), que provaram a eficiência destes organismos para o monitoramento de mutagenicidade causadas por poluentes ambientais [8 e 9]. Os vegetais, por serem receptores biológicos diretos de agrotóxicos,

constituem um importante material para testes genéticos e de monitoramento desses poluentes ambientais [10].

Testes citogenéticos são úteis para identificar os efeitos danosos de uma substância, em suas várias concentrações e após diferentes tempos de exposição. Também são importantes para avaliar influência dos xenobiontes sobre os organismos [11 e 12].

Alterações cromossômicas como C-metáfases, anáfases multipolares, perdas cromossômicas, atrasos cromossômicos e poliploidias podem indicar problemas no fuso mitótico. A interrupção do fuso ou a sua formação incompleta pode promover uma segregação incorreta dos cromossomos para as células filhas, gerando anormalidades [13].

Alterações como micronúcleos podem se originar espontaneamente, porém, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genéticos, resultantes de exposição a um agente mutagênico [14]. O teste do micronúcleo tem sido um dos testes mais promissores para a avaliação de mutagenicidade ambiental, pela sua eficiência, simplicidade e rapidez [15]. A ocorrência de micronúcleos, segundo vários autores [16, 17 e 18] tem sido utilizada como indicativo de efeitos clastogênicos e aneugênicos.

Os danos cromossômicos estruturais e numéricos podem decorrer em formação de micronúcleo na geração celular e posterior à divisão e estar associados ao aparecimento e/ou progressão de tumores, e a efeitos reprodutivos adversos, sendo, portanto, aplicado para uma avaliação toxicológica inicial [19].

Testes como os de aberrações cromossômicas têm mostrado evidências de mutagenicidade desse herbicida em várias espécies de vegetais [20 e 21]. Bioensaios realizados com trifluralina, utilizando *Pisum sativum* como material teste, revelaram frequências significativas de alterações cromossômicas, efeitos C-mitóticos e antimitóticos

[22]. Estudos de toxicidade mostraram, em experimentos com ratos, que esse herbicida promove aumento na incidência de câncer de bexiga, tumores de células foliculares e da glândula tireóide [23].

Neste trabalho foi avaliada a potencialidade de indução de micronúcleos e de outras alterações celulares, em meristemas radiculares de *Allium cepa*, após exposição em várias concentrações do herbicida trifluralina. Foram avaliados também os tipos de anormalidades mais freqüentes, os processos envolvidos com a sua formação e as estratégias celulares para a eliminação dos danos promovidos pelo herbicida.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Químico testado

A substância investigada foi a 2,6 dinitro-N,N-dipropil4 (trifluorometil) benzenamina, cuja fórmula molecular é $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ (CAS number 1582-09-8) e que é comercialmente denominada trifluralina [24]. Esse herbicida é considerado, de acordo com a EPA, possivelmente carcinogênico para humanos, baseado em evidências com animais e não com humanos (grupo C) [25] e de classe II quanto ao potencial toxicológico [26].

2.2. Solução de tratamento e preparação das radículas

O herbicida trifluralina foi diluído em água destilada nas proporções de 1: 10^3 ; 1.9: 10^3 ; 3.7: 10^3 ; 7.5: 10^3 . Levando-se em consideração a quantidade de produto ativo (trifluralina) contido no produto comercial (445g/L), obteve-se então as concentrações de 0.42ppm; 0.84ppm; 1.67ppm e 3.34ppm da substância trifluralina.

Foram utilizadas em nossos testes sementes de *Allium cepa*, pela disponibilidade, em nossa região, de uma mesma variedade agronômica durante o ano todo. Isso nos garantiu a confiabilidade entre as várias repetições dos ensaios por confirmação dos resultados.

As sementes de *Allium cepa* foram colocadas para germinar em temperatura ambiente, em placas de Petri recobertas com papel de filtro umedecido com água mili-Q. Quando as radículas atingiram cerca de 1cm de comprimento, foram transferidas para placas de Petri cobertas com papel alumínio para evitar a degradação do herbicida (fotosensível) e expostas ao tratamento com as diversas concentrações do herbicida.

2.3. Tratamentos

Foram realizados tratamentos com as concentrações acima descritas do herbicida testado, como segue:

- 3- Tratamento de 24 horas: Radículas com cerca de 1 cm de comprimento foram expostas, por 24h, às diferentes concentrações pré-estabelecidas do herbicida trifluralina. Após esse período, alguns exemplares foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1(v/v)) e o restante seguiu para o tratamento de recuperação;
- 4- Tratamento de recuperação: algumas radículas que passaram pelo tratamento de 24 horas foram transferidas para outra placa de Petri, com água mili-Q, para um tratamento de recuperação por 48 horas.

O teste controle foi realizado com sementes submetidas à germinação somente em água mili-Q. As coletas e as fixações dos meristemas ocorreram, conjuntamente, para os dois tratamentos (24h e 48h).

Os meristemas foram submetidos a uma hidrólise ácida em HCl 1 N a 60° C, durante 8 minutos e posteriormente submetidas ao reativo de Schiff por 2 horas, em local escuro. As pontas das raízes foram seccionada, em lâmina, para a extração das suas regiões meristemáticas. Para intensificar a coloração das células, foi adicionada aos meristemas uma gota de carmim acético (1%). O material foi recoberto com lamínula, onde, com o auxílio de um estilete de madeira, foi feita uma leve pressão, somente para proporcionar um melhor espalhamento das células sobre a lâmina. Essa pressão foi bem suave, para não haver comprometimento das análises. O material foi analisado em microscópio de luz (Germany, Carl Zeiss) no aumento de 400 vezes.

Foram realizados, em ambos os tratamentos, cerca de 15.000 contagens de células para cada concentração investigada. O mesmo número de células foi observado para o teste controle.

2.4. Análise estatística

Após a obtenção dos resultados do estudo, foi realizada a análise estatística pelo método Kruskal-Wallis. Este é um teste não-paramétrico, conhecido como teste H, destinado a comparar 3 ou mais amostras independentes de mesmo tamanhos ou desiguais, cujos escores devem ser mensurados, pelo menos, a nível ordinal.

3. RESULTADOS

A partir das análises realizadas com os meristemas radiculares de *Allium cepa* foi observado, após o tratamento com as diversas concentrações do herbicida trifluralina, inibição do índice mitótico (Figura 1) e a presença de micronúcleos, "mini cells", núcleos

irregulares e alterações cromossômicas, tais como células poliplóides e perdas cromossômicas (Figura 2 e 3 respectivamente).

Na tabela 1 estão apresentadas as frequências das alterações celulares (perdas cromossômicas, metáfases poliplóides, brotos nucleares, micronúcleos e "mini cells"), observadas para as diferentes concentrações dos dois tratamentos.

3.1. Índice Mitótico

Os resultados obtidos com as análises do índice mitótico, referentes às radículas tratadas com o herbicida trifluralina por 24 horas, mostraram um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no índice de divisão celular, para as concentrações de 0,84, 1,67 e 3,34ppm (Tabela 1, Figura 1). Após o período de recuperação de 48 horas com água mili-Q, as mesmas concentrações apresentaram um aumento na frequência de células em divisão. No entanto, os resultados continuaram mostrando que as maiores concentrações testadas do herbicida foram capazes de inibir, significativamente, a divisão das células, quando comparadas ao controle (Tabela 1, Figura 1).

3.5. Perdas cromossômicas

Perdas cromossômicas são conseqüências de problemas no fuso mitótico. Em nossas análises foram observadas frequências significativas dessa alteração mitótica quando as radículas de *Allium cepa* foram expostas ao tratamento de 24 horas nas concentrações de 0,42; 0,84 e 1,67ppm. Após o tratamento de recuperação, apenas a concentração de 0,84ppm continuou a apresentar uma frequência significativa de perdas cromossômicas quando comparadas ao controle. A concentração de 3,34ppm, que não havia apresentado

freqüências significativas dessa alteração após tratamento de recuperação, exibiu um aumento dessa na freqüência de 0,09 para 0,19, tornando-se estatisticamente significativa quando comparada ao controle (Tabela 1). Foram observadas perdas cromossômicas evidentes, principalmente, nas fases de metáfase, anáfase e telófase (Figura 3).

3.4. Metáfases poliplóides

Os resultados obtidos para o tratamento de 24 horas com as diferentes concentrações do herbicida trifluralina apontam a presença de metáfases poliplóides (Figura 2 A) para as concentrações mais baixas testadas, sendo estes resultados significativos para a concentração de 0,42 e 0,84 ppm, quando comparado com os resultados obtidos para o teste controle (Tabela 1). Após o tratamento de recuperação de 48 horas em água mili-Q, houve um aumento da freqüência dessa alteração para todas as concentrações testadas ($p < 0,05$).

3.5. Alterações nucleares

Nossas análises mostraram alterações, na morfologia nuclear, caracterizadas pela presença de núcleos irregulares e de brotos nucleares como pode ser visto na figura 2 (C, D, E e F). Brotos nucleares foram vistos em todas as concentrações testadas e nos dois tratamentos. As freqüências foram significativas ao nível de 5% para todos os testes realizados, sendo os testes com as concentrações de 0,42 e 0,84ppm (24 e 48 horas) e 1,67ppm (48 horas) foram significativos ao nível de 1% (Tabela 1).

Em nossas análises, os brotos nucleares parecem ser decorrentes de eventos de poliploidizações, cujo material excedente é expulso da célula (figura 4). Uma evidência desse efeito é o tamanho semelhante dos núcleos das células portadoras de brotos e das

células poliploidizadas (Figura 2 A e B). Também foram observados núcleos irregulares, caracterizados por apresentar tamanho aumentado e morfologia alterada (Figura 2C). Essa alteração nuclear parece anteceder à formação do broto nuclear. A figura 4 apresenta uma possível seqüência de eventos que antecedem a formação do broto e a eliminação desse sob a forma de micronúcleo e “mini cell”.

3.2. Micronúcleos

Todas as concentrações do tratamento de 24 horas em trifluralina, exceto a concentração 3,34ppm, mostraram diferenças significativas, quando comparados com o grupo controle, em relação a presença de micronúcleos. Após o tratamento de recuperação de 48 horas em água mili-Q, foi observado um aumento no número de células com micronúcleos para todas as concentrações testadas do herbicida, exceto para a concentração de 3,34 ppm (Tabela 1, Figura 2 G e H).

Foram observadas células com micronúcleos em diferentes fases do ciclo celular, embora a maioria dos registros foram para células na fase de intérfase e prófase. Os micronúcleos, observados nas diferentes fases do ciclo celular apresentaram-se, na maioria das vezes, em sincronia de divisão com o núcleo principal. Porém, em alguns casos, não foi registrada essa sincronia como pode ser visto na tabela 2 e figura 5.

3.3. "Mini cells"

Como pode ser visto na figura 2 (J, L e M), dentre as anormalidades observadas, constatou-se a presença de pequenas células, com material genético reduzido ("mini cells"), localizadas, de maneira geral, próximas à membrana da célula que a originou. Essa

alteração foi observada para as concentrações de 0,42ppm, 0,84 e 1,67ppm, tanto para os tratamentos de 24 horas como para o período de recuperação de 48 horas em água mili-Q. Nossos dados mostraram um aumento da frequência dessa alteração após o período de recuperação (Tabela 1).

4. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que o herbicida trifluralina apresenta atividade mutagênica, principalmente nas baixas concentrações testadas. Esse efeito pode ser atribuído pela sua capacidade em promover alterações em células meristemáticas de *Allium cepa*, tais como, células portadoras de perdas cromossômicas, metáfases poliplóides, núcleos irregulares, brotos nucleares, micronúcleos e "mini cells". A ação da trifluralina parece persistir sobre as células ou ter a capacidade de bloquear os seus sistemas de reparo, pois, na maioria das vezes, mesmo após um tratamento de recuperação por um período de 48 horas em água mili-Q, houve continuidade do seu efeito ou até mesmo a sua intensificação.

A concentração de 3,34ppm apresentou um baixo índice de células portadoras de alterações e um alto índice de células em intérfase (Tabela 1, Figura 1). Esses resultados podem ser explicados pela própria indicação do uso agrônômico deste herbicida nesta concentração, que tem como objetivo impedir o desenvolvimento da planta, por bloquear a divisão celular [2]. Como as substâncias mutagênicas agem normalmente durante a replicação ou durante as fases da divisão celular, como não houve evento de divisão, não houve evidências de efeitos causados em fases pós-dependente da divisão. Segundo nossos resultados a concentração de 3,34ppm não apresentou qualquer ação mutagênica sob o

organismo testado, pois o efeito tóxico do produto impediu a divisão celular das células meristemáticas, não possibilitando assim a visualização de efeitos pós-dependentes do ciclo celular de *Allium cepa* (Tabela 1).

O grupo NO₂ da trifluralina é capaz de se ligar às moléculas de tubulina impedindo a sua polimerização e, conseqüentemente, à formação de microtúbulos. Dentre os microtúbulos, os fusos parecem ser os mais sensíveis à ação da trifluralina, devido a sua freqüente organização e desorganização durante os eventos da divisão celular [4]. Problemas na polimerização de microtúbulos pode estar relacionados com anormalidades celulares como células poliplóides e perdas cromossômicas. Essas anormalidades parecem levar a outras alterações celulares como a formação de núcleos irregulares, brotos nucleares, micronúcleos e "mini cells".

Micronúcleos podem ser resultados de fragmentos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo celular [27]. Desta maneira, uma substância capaz de induzir a formação de micronúcleos, pode ser considerada uma substância clastogênica ou anegênica [28]. A ação clastogênica é comprovada pela presença de micronúcleos decorrentes de quebras cromossômicas durante o processo de divisão celular. Já a ação aneugênica acontece pela inativação do fuso mitótico, que levará a perda de cromossomos inteiros, ficando os mesmos ausentes no núcleo principal da célula. Sendo assim, muitos micronúcleos que observamos nas células tratadas com o herbicida trifluralina devem ser, provavelmente, decorrentes da ação aneugênica desta substância. Nossos resultados mostram a evidência dessa ação, pelo registro de células, em várias fases da divisão, portadoras de perdas cromossômicas (Tabela 1, Figura 3).

Alguns autores acreditam que se o micronúcleo for formado por um cromossomo inteiro e se a sua síntese de DNA for sincrônica à síntese do DNA nuclear há possibilidade de haver uma reintegração do cromossomo perdido e presente no micronúcleo ao genoma nuclear [29]. No entanto, em nossos estudos foram encontradas algumas células que evidenciam que as porções de DNA que formaram os micronúcleos podem não se reintegrarem ao núcleo principal, pela falta de sincronia observada entre essas 2 estruturas (figura 5). Outras evidências celulares que também comprovam essa afirmação (não reintegração) são os eventos observados de eliminação de material genético contido no micronúcleo, sob a forma de "mini cells" e a presença de material genético altamente compactado nos micronúcleos (Figuras 5 B, E). Essa heterocromatinização é uma característica de células inviáveis por inativação do seu material genético.

Quando alguns genes são amplificados, o material excedente pode gerar núcleos com "shaped formations", estruturas estas que sugerem ser as precursoras dos micronúcleos [30, 31]. Os micronúcleos também podem aparecer decorrentes de replicação de cromossomos inteiros (por exemplo, do cromossomo X), como descrito em trabalhos realizados com linfócitos submetidos à metodologia de FISH [32]. Os autores, baseados em análises com linfócitos humanos, sugerem que o DNA excedente na célula, eventualmente, forma um broto originando um micronúcleo que é expulso sob a forma de uma "mini cell" [32]. "Mini cells" são pequenas porções citoplasmáticas portadoras de um reduzido conteúdo nuclear (Figura 2 J, L, M).

Nossos resultados confirmam as afirmações anteriores pela observação de micronúcleos em diversas localizações citoplasmáticas, o que nos sugere uma dinâmica de "migração" deste material genético desde o núcleo até a membrana celular, com a sua

conseqüente eliminação (Figuras 2 e 4). Para nós, essas "mini cells" seriam resultados de um evento de expulsão do material genético excedente, pois observamos um grande número de células poliplóides, evidenciadas na fase de intérfase e de metáfase (Figura 2 A e B). Essa poliploidização (amplificação total ou parcial do material genético) pode levar a uma certa inativação do material excedente, sob a forma de heterocromatina facultativa. Como a heterocromatina tem afinidade de ligação com proteínas associadas à membrana nuclear (lâmina nuclear) [33], podemos sugerir que essa cromatina facultativa deve sofrer essa migração para a periferia nuclear e, como não tem ligação com porções eucromáticas do interior do núcleo, continuaria em processo de migração, até a sua total expulsão do núcleo (Figuras 2 e 4).

Trabalho realizado com linfócitos humanos [34] descreve que a formação de “mini cells” pode ser um evento que garanta a viabilidade da célula, pois a presença de um micronúcleo no seu interior poderia comprometer sua fisiologia, levando a célula a morte. Os autores encontraram uma correlação positiva entre os eventos iniciais da apoptose e a formação de micronúcleos, após tratamento com inibidores de fuso celular. Pelos nossos estudos, acreditamos que se a célula passar por um processo de amplificação do material genético e houver a expulsão deste material excedente, por meio de micronúcleos que progridem para "mini cells", existe a possibilidade da célula readquirir a sua viabilidade pela normalização do seu conteúdo nuclear. No entanto, se o micronúcleo for formado por perdas cromossômicas ou por fragmentos, dependendo do material perdido, este pode desencadear o processo de morte celular. Por outro lado, se o material genético perdido incluir um gene supressor de tumor (no micronúcleo) haverá uma subsequente inativação do mesmo o que pode gerar neoplasia e, portanto, ser um passo para a carcinogênese [30].

Entendemos que a eliminação de um micronúcleo é um indicativo de manutenção de fisiologia celular, pois, se está havendo atividade de eliminação de alguma estrutura, isto significa que a célula está tendo resposta fisiológica. Contudo, como a duração do processo de brotamento nuclear e do processo de eliminação do micronúcleo da célula são desconhecidos [31], não se pode afirmar que uma célula portadora de micronúcleo irá desencadear um processo de morte, ou se está em processo inicial de eliminação.

A ação do herbicida foi capaz de induzir a formação de micronúcleos em células expostas, mesmo depois de um período de recuperação de 48 horas. Nossos resultados sugerem que as células expostas ao herbicida trifluralina, provavelmente, estejam sofrendo danos severos na sua integridade, pela alta frequência de células micronucleadas e das poucas "mini cells" observadas. A grande quantidade de células portadoras de micronúcleos, mesmo após o período de recuperação de 48 horas em água, pode ser uma evidência de que muitos dos micronúcleos podem não estar em processo de expulsão, pois devem ser decorrentes da ação aneugênica direta do herbicida e, portanto, derivados de perdas cromossômicas do complemento normal da célula.

5. CONCLUSÃO

O herbicida trifluralina é potencialmente mutagênico, por ter ação aneugênica comprovada. A ação aneugênica do herbicida é dada pela sua característica microtúbulo-despolimerizante, que leva a alterações celulares como: células poliploidizadas, células com perdas e quebras cromossômicas e, conseqüentemente, células com brotos nucleares, micronúcleos e "mini cells".

O herbicida trifluralina apresenta uma ação mutagênica persistente em células de *Allium cepa*, por continuar promovendo alterações, mesmo após um período de recuperação de 48 horas em água mili-Q.

A concentração do herbicida utilizada na agricultura e testada neste estudo (3,34ppm) promove um bloqueio da divisão celular, não podendo assim ser caracterizado como uma concentração indicada para a avaliação da ação mutagênica dessa substância. As concentrações de 0,42ppm; 0,84ppm e 1,67ppm de trifluralina podem ser consideradas potencialmente mutagênicas para *Allium cepa*, podendo ser usadas como substância teste de ensaios mutagênicos com essa espécie.

Os micronúcleos podem ser formados pela ação clastogênica, por ação aneugênica direta (perdas cromossômicas) ou aneugênica indireta (poliploidização e/ou amplificação gênica). Células micronucleadas podem ou não estar em processo de expulsão de material excedente, dependendo da origem do material contido no seu interior. Material amplificado poderia ser mais facilmente expulso ("mini cells"), enquanto que material perdido (elementos cromossômicos), poderia ter uma maior persistência no interior do citoplasma, permanecendo sob a forma de micronúcleos.

Os micronúcleos induzidos pela ação da trifluralina parecem nem sempre ser capazes de se reincorporar ao núcleo principal, pela falta de sincronia entre os mesmos, pela presença de "mini-cells" e pela alta compactação do material genético do micronúcleo (heterocromatinização), observados neste estudo.

6. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP-Brasil, à Profa Dra Dejanira Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biologia da UNESP-Rio Claro/SP, ao biólogo Eduardo Murakami pela colaboração na confecção dos esquemas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Índice mitótico e frequências das aberrações celulares observadas após exposição das radículas de *Allium cepa* ao herbicida trifluralina, antes e após tratamento de recuperação.

Alterações	Controle		0,42ppm		0,84ppm		1,67ppm		3,34ppm	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
IM	25,3±8,44	24,46±9,61	25,75±8,17	24,89±10,10	8,89**±5,43	9,94*±9,36	11,64*±10,60	19,17*±9,99	1,36*±1,7	8,68*±0,46
PC	0,0±0,0	0,02±0,04	0,34*±0,21	0,09±0,09	0,37*±0,3	0,32*±0,26	0,22*±0,16	0,16±0,05	0,09±0,04	0,19*±0,05
MP	0,0±0,0	0,0±0,0	0,17*±0,25	0,28*±0,86	0,18*±0,41	0,24*±0,36	0,0±0,0	0,44*±0,62	0,0±0,0	0,058±0,01
BN	0,19±0,14	0,04±0,08	2,25**±1,5	2,02**±1,59	1,39**±0,8	6,08**±4,06	0,74*±0,29	3,92**±1,97	0,63*±0,57	0,77*±0,46
MN	0,0±0,0	0,0±0,0	1,24**±1,37	1,85**±1,09	1,21**±2,87	3,76**±3,0	0,27*±0,36	2,81**±2,84	0,01±0,03	0,0±0,0
MC	0,0±0,0	0,0±0,0	0,10±0,16	0,18*±0,25	0,02±0,22	0,22*±0,58	0,03±0,12	0,06±0,19	0,0±0,0	0,0±0,0

* Significativo $p < 0,05$; ** significativo $p < 0,01$. **IM:** Índice mitótico; **PC:** Perda cromossômica; **MP:** Metáfase poliplóide; **BN:** Broto nuclear; **MN:** Célula com micronúcleo; **MC:** "Mini cell".

Tabela 2: Frequências de registros de micronúcleos sincrônicos e assincrônicos em meristemas radiculares de *A. cepa* tratados com o herbicida trifluralina por 24 e após tratamento de recuperação de 48 horas.

Concentrações	MN Sincrônico (MNS)				MN Assincrônico (MNA)			
	T	Nº de MN	Nº de MNS	% de MNS/ CA	Nº de MNA	Núcleo	MN	% de MNA/MN
Controle	24h	0	–	–	–	–	–	–
	48h	0	–	–	–	–	–	–
0,42ppm	24h	194	193	1,23	1	Metáfase	Intérfase	0,51
	48h	283	283	1,85	0	–	–	0,0
0,84ppm	24h	191	191	1,21	0	–	–	0,0
	48h	582	581	3,75	1	Telófase	Intérfase	0,17
1,67ppm	24h	46	42	0,24	1	Intérfase	Prófase	8,69
					1	Metáfase	Prófase	
					2	Prófase	Intérfase	
48h	452	449	2,79	3	Prófase	Intérfase	0,66	
3,34ppm	24h	2	2	0,013	0	–	–	0,0
	48h	17	17	0,0	0	–	–	0,0

MN: células micronucleadas; MNS: micronúcleo sincrônico; MNA: micronúcleo assincrônico; T: Tratamento; CA: células analisadas.

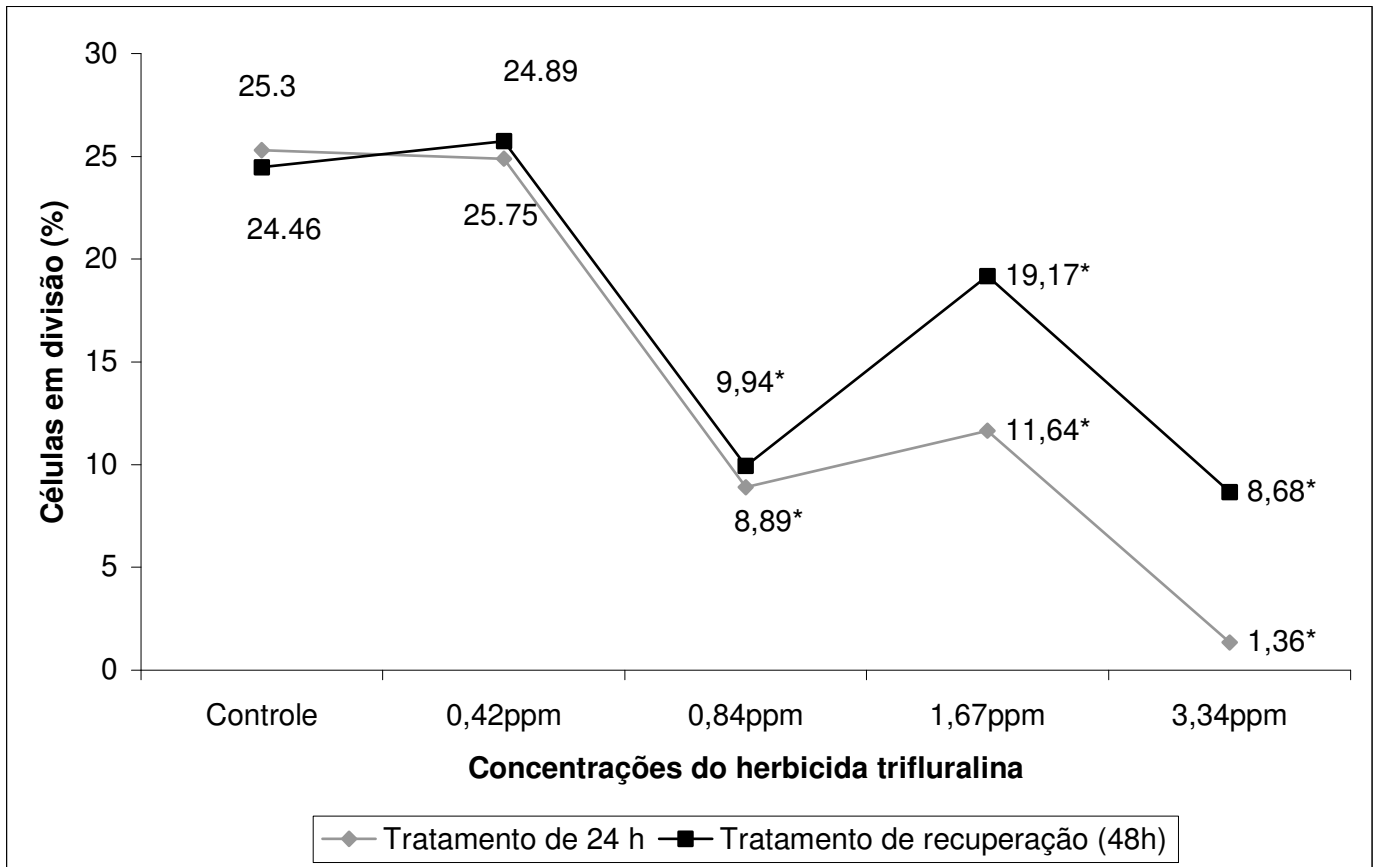


Figura 1: Freqüência de células em divisão celular mitótica antes e após tratamento de recuperação. *Significativo $p < 0,01$.

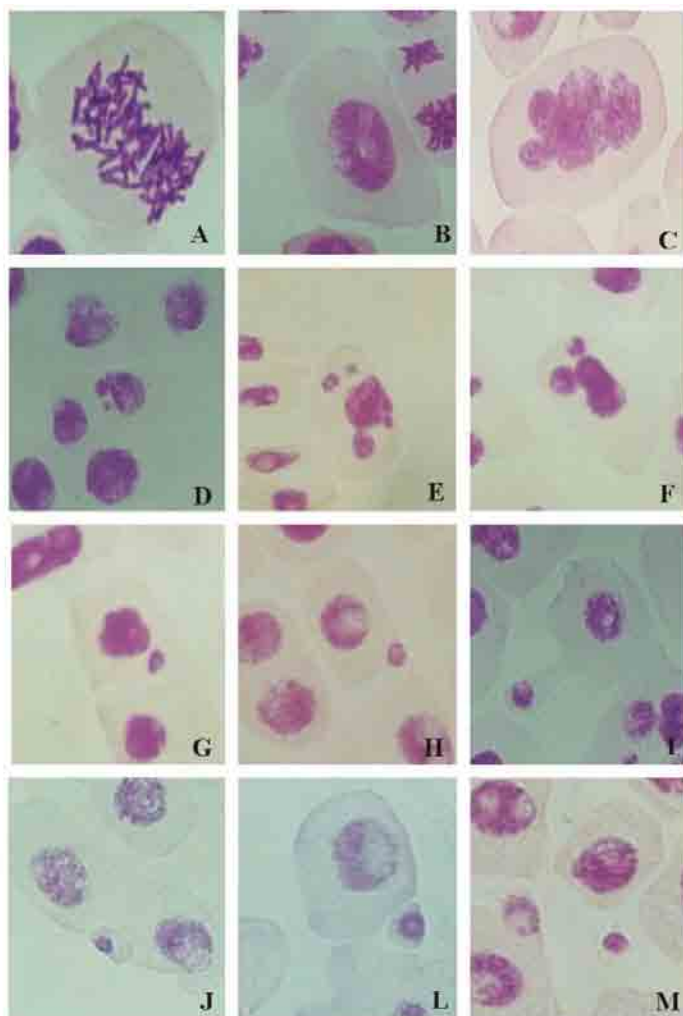


Figura 2: Alterações cromossômicas e nucleares induzidas pelo herbicida trifluralina
 A: célula poliplóide; B: núcleo poliplóide; C: núcleo disforme; D, E, F: brotos nucleares
 G: célula micronucleada; H: micronúcleo periférico; I: micronúcleo se desprendendo da célula; J, L e M: células com “mini cell” adjacente.

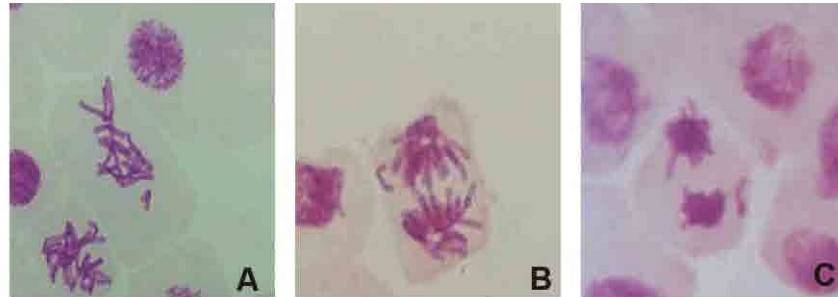


Figura 3: Perdas cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. Cepa* após exposição ao herbicida trifluralina. **A:** Perda de cromossomo na metáfase; **B:** Perda de cromossomo na anáfase; **C:** Perda de cromossomo na telófase.

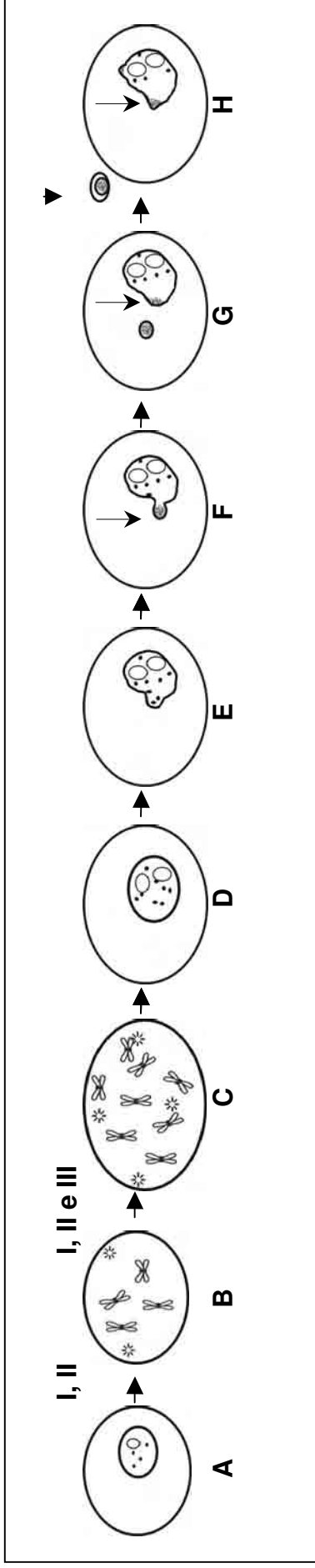


Figura 4: Sequências de eventos que levam a formação do broto nuclear e sua eliminação do núcleo e da célula na forma de micronúcleo e "mini cell" respectivamente. **A:** Célula exposta à ação do herbicida; **B:** C-metáfase poliplóide; **C:** C-metáfase; **D:** Núcleo poliplóide; **E:** Membrana nuclear com morfologia irregular; **F:** Broto nuclear eliminando material excedente com possível heterocromatinização; **G:** Célula com núcleo irregular e com a presença de micronúcleo; **H:** Célula com núcleo irregular e "mini cell" adjacente; **Seta:** indicação do material genético excedente na porção de formação do broto nuclear; **Cabeça de seta:** "Mini-cell";

I- Ausência total de fuso mitótico;

II- Ausência de citocinese;

III- Replicação do material genético.

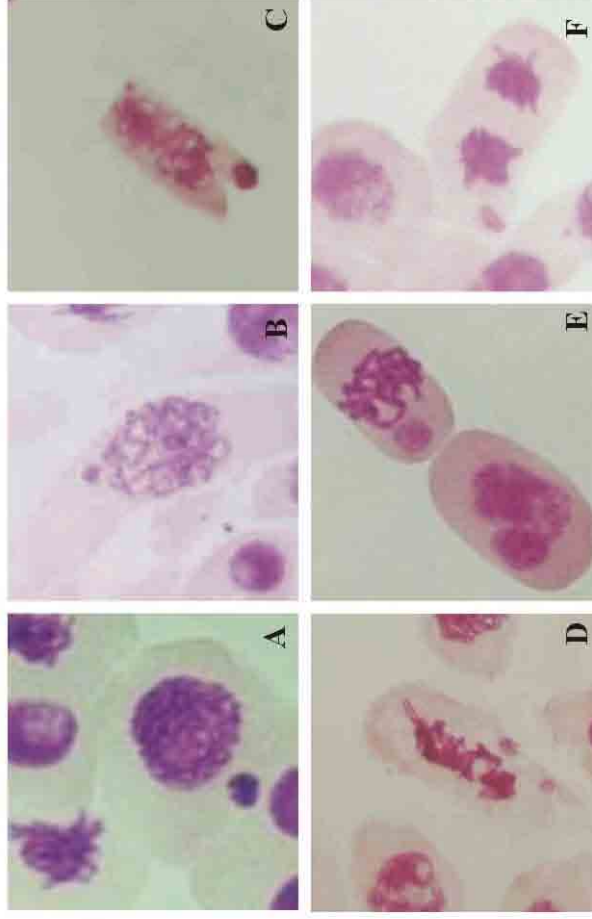


Figura 5: Células meristemáticas de *A. Cepa*, tratadas com o herbicida trifluralina, com a presença de micronúcleos assincronizados em relação ao núcleo principal. **A e B:** Núcleo em prófase e MN em intérfase; **C:** Célula em prómetáfase e MN em intérfase; **D:** Célula em metáfase (com aderência cromossômica) e MN em intérfase; **E:** Célula em metáfase e MN em prófase; **F:** Célula em telófase e MN em intérfase.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. G. Anthony, T. R. Waldin, J. A. Ray, S. W. J. Bright, P. J. Hussey, Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin, *Nature* 393 (1998) 260-263.
- [2] G. J. S. Ribas, E. N. X. Carbonell, A. Creus, R. Marcos, Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutation Research* 371 (1996) 15-21.
- [3] L. C. Morejhon, D. E. Fosket, The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cell, *Pharmacol. Ther.* 51 (1991) 217-230.
- [4] R.G. Anthony, P.J. Hussey, Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton, *Trends in Plant Science* 4 (1999) 112-116.
- [5] J.A Timbrell, *Introduction to Toxicology*. 2^a. Ed. Taylor & Francis Ed. 1999, 167p.
- [6] C. Conte, I. Mutti, P. Puglisi, A. Ferrarini, G. Regina, E. Maestri, N. Marmioli, DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution, *Chemosphere* 37 (1998) 2739-2749.

- [7] M. Menke, I.P. Chen, K.J. Angelis, I. Schubert, DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, *Mutat. Res.* 493 (2001) 87-93.
- [8] W.F. Grant, 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, *Mutat. Res.* 426 (1999) 107-112.
- [9] T.H. Ma, Z. Xu, C. Xu, H. Mcconell, E.V. Rabago, H. Arreola, H. Zhang, An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutation Research* 334 (1995) 185-195.
- [10] C. B. S. R. Sharma, N. Panneerselvan, Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems, *Crit. Ver. Plant. Sci.* 9 (1990) 409-442.
- [11] B. V. Rao, Cytological effects of pendimethalin in *Allium cepa* root meristems, *Cell Chromosome Res.* 12 (1989) 57-59.
- [12] F. J. De-Serres, Preface: Higher plants as effective monitors of environmental mutagens, *Mutat. Res.* 270 (1992) 1-3.
- [13] Z. Vidakovic, D. Paes, M. Tomic, Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test, *Water, Air and Soil pollution*, 69 (1993) 413-423.

[14] J. A. Heddle, M. Hite, B. Irkhart, J. T. E. Macgregor, M. F. Salamone, The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity a measure of the US environmental protection agency gene-tox program, *Mutation Research* 123 (1983) 61-118.

[15] I. Ferrari. Test do Micronúcleo em cultura temporária de linfócitos, In: M.N.Rabello-Gay, M. A. L. R. Rodrigues, R. Monteleone-Neto, *Mutagênese, teratogênese e carcinogênese. Métodos e Critérios de Avaliação*, Revista. Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, 1991, pp 107-112.

[16] J. T. Macgregor, J. A. Hit, E M.Heddle, B. H. Margolin, C. Ramel, M. F. Salamone, R. R. Tice, D. Wild, Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, *Mutat. Res.* 198 (1987) 103-112.

[17] M. Hayashi, T. Ueda, K. Uyeno, K. Wada, N. Kinae, K. Saotome, N. Tanaka, A. Takai, Y. F. Sasaki, N. Asano, T. Sofuni, Y. Ojima, Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms, *Mutation Research* 399 (1998) 125-133.

[18] J. A. Walker, D. R. Boreham, P. Unrau, A. M. V. Duncan, Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei, *Mutagenesis* 11 (1996) 419-424.

[19] L. R. Ribeiro, Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, In: L. R. Ribeiro, D. M. F. Salvadori, E. K. Marques, *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003. 355p.

[20] T.P. WU, Some cytological effects of treflan and mitomycin C on root tips of *Vicia faba*, *Taiwania* 17 (1972) 248-254.

[21] N.K. Grigorento, V.F. Fasilchenko, Y.G. Merezhinski, V.V. Morgun, V.F. Logvinenko, S.V. Sharmankin. Cytogenetic activity of a herbicide treflan, and its metabolites as applied to maize, *Tsiol. Genet.* 20 (1986) 294-298.

[22] W.F. Grant, E.T. Owens, Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens, *Mutation Res.* 188 (2001) 93-118.

[23] J.L. Emmerson, E.C. Pierce, J.P. McGrath, The chronic toxicity of compound 36352 (trifluralin) given as a component of the diet to Fischer 344 rats for two years. Studies R-87 and R97, submitted by Elanco Products Co., division of Eli Lilly Co.) as cited in IRIS and discussed in Peer Review of Trifluralin by the Toxicology Branch Peer Review Committee (April 11, 1986 memorandum from R. Bruce Jaeger), 1980.

[24] B.N. Rodrigues, F.S. Almeida, *Guia de Herbicidas*, edição dos autores, Londrina, 1998, 647p.

[25] U.S. Environmental Protection Agency, Chemicals evaluated for carcinogenic science information management branch health effects division office of pesticides programs, 1999.

[26] D.O.U (Diário Oficial da União) 13-12-91. Portaria n. 03, de 16 de janeiro de 1992. Termos das “Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, Renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins- n.1, de 9 de dezembro de 1991”.

[27] M. Fenech, J.W. Crott, Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay, *Mutation Research* 504 (2002) 131-136.

[28] H. Yi, Z. Meng, Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*, *Mutat. Res.* 537 (2003) 109-114.

[29] B. Gustavino, F. Degrassi, R. Filipponi, D. Modesti, C. Tanzarella M. Rizzoni, Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinine-stimulated human lymphocytes, *Mutagenesis* 9 (1994) 17–21.

[30] H. Stopper, S. O. Müller, Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview, *Toxicology in vitro* 11 (1997) 661-667.

[31] N. Shimizu, T. Shimura, T. Tanaka, Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei, *Mutation Research* 448 (2000) 81-90.

[32] N. T. Leach, C. Jackson-Cook. Micronuclei with multiple copies of the X chromosome: do chromosome replicate in micronuclei?, *Mutation Research* 554 (2004) 89-94.

[33] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing Inc., New York, 2002, 1294p.

[34] A. Elhajouji, F. Tibaldi, M. Kirsch-Volders, Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes, *Mutagenesis* 12 (1997) 133-140.

9. ARTIGO 4

EFEITOS DO HERBICIDA TRIFLURALINA EM SISTEMA

TESTE DE *Oreochromis niloticus* (PERCIFORMES, CICHLIDAE).

Thaís Cristina Casimiro Fernandes¹, Dejanira de Franceschi de Angelis¹ e Maria Aparecida

Marin-Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24 A, 1515, cep: 13506-

900, Rio Claro/SP

O manuscrito será submetido à revista “Caryologia”.

RESUMO

Embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não-pontuais de poluição da água, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes. Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental. O teste de micronúcleo é um teste simples e rápido, servindo para biomonitoramento da qualidade da água. Em vertebrados aquáticos, esse teste pode ser usado para avaliar a influência da contaminação de ambientes aquáticos. Em nosso estudo foram avaliados o potencial tóxico do herbicida trifluralina, por meio de alterações no comportamento natatório dos peixes, e a ação mutagênica dessa substância pela aplicação do teste do micronúcleo em eritrócitos. Para a realização desse estudo foram utilizados peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. Os peixes foram expostos por 72 horas à diversas concentrações do herbicida (0,02; 0,01; 0,005; 0,0025 e 0,0012ppm). O sangue dos organismos foi coletado por punção cardíaca e armazenado em geladeira por um período de 24 horas e 15 dias. Após esses períodos, as lâminas foram confeccionadas pelo método de esfregaço (extensões sangüíneas), fixadas, coradas com reativo de Schiff e contracoradas com "fast green". Nossos resultados mostraram que as maiores concentrações testadas (0,02 e 0,01ppm) podem ser consideradas tóxicas para o organismo utilizado, por promoverem a morte dos peixes e comprometerem a atividade muscular, comprovada por alterações na disposição e movimentação das nadadeiras. O teste do micronúcleo foi aplicado para as concentrações de 0,005; 0,0025 e 0,0012ppm, as quais não foram letais para o organismos. Os resultados desse estudo foram negativos quanto ao potencial mutagênico do herbicida,

uma vez que as concentrações não promoveram alterações (micronúcleos e alterações nucleares) significativas nos eritrócitos dos peixes expostos a elas. No entanto, atentamos para o tempo de armazenamento do sangue coletado. Quando o material foi preparado logo após a coleta observamos baixa frequência de alterações, porém o sangue coletado e armazenado por 15 dias apresentou frequências extremamente significativas de micronúcleos, inclusive no teste controle, mostrando que o tempo de armazenagem interfere nos resultados e pode levar a conclusões equivocadas.

Palavras-chave: *Oreochromis niloticus*, micronúcleo, trifluralina.

1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático tem sido o destino de efluentes urbanos, industriais e agrícolas. Devido ao possível potencial mutagênico e carcinogênico dos químicos contidos nesses efluentes, eles têm sido foco de atenção de pesquisadores preocupados com a poluição marinha e da água doce (Pain, 1995; Jonhson, 1998; Alzieu, 2000; Godwin, 2001).

O ensaio do micronúcleo (MN) é um teste muito usado para avaliar a mutagenicidade de poluentes ambientais e de diferentes químicos. MN são porções de cromatina intracitoplasmáticas que podem ser resultantes de quebras cromossômicas ou de perda de cromossomos inteiros durante o processo de divisão celular (Kirsch-Volders et al., 2000). A metodologia do micronúcleo, além de ser aplicável para roedores (Ribeiro et al., 2003), é também aplicada em organismos marinhos (Majone et al., 1988; Burgeot., 1995; Dopp et al., 1996; Venier et al., 1997; Bolognesi et al., 1999) e de água doce (Jaylet et al., 1986; Van Hummelen et al., 1989; Al-Sabti, 1991; Belpaeme et al., 1996; Mersch et al., 1996; Grisolia e Starling, 2001). Dentre os organismos de água doce este teste tem sido aplicado, principalmente, em peixes (Jaylet et al., 1986; Van Hummelen et al., 1989; Al-Sabti, 1991; Belpaeme et al., 1996; Sánchez-Galán et al., 1998; Grisolia e Starling, 2001).

Substâncias orgânicas, como os herbicidas, são amplamente utilizadas para controlar e ou destruir plantas daninhas. Essas substâncias têm uma importante atuação na agricultura moderna (IARC, 1991) mas, muitas vezes, são utilizadas indiscriminadamente, levando, periodicamente, a situações de envenenamento e de contaminação ambiental. Esse uso indiscriminado pode levar a um sério comprometimento do material genético de organismos expostos caracterizando-se em um problema, em potencial, para a saúde humana.

O herbicida trifluralina é um composto orgânico muito utilizado na agricultura, principalmente em plantações de milho e soja (Rodrigues e Almeida, 1998). Apesar de sua baixa mobilidade no solo, lixiviação reduzida (Calderon et al, 1999) e rápida degradação por meio da reação de fotólise (Dimou et al., 2004), o herbicida trifluralina pode, eventualmente, contaminar águas superficiais por meio de escoamento superficial, durante a limpeza de equipamentos ou por derrames acidentais (Grover et al., 1997; Zimmerman et al., 2000).

Esse herbicida atua na polimerização/despolimerização dos microtúbulos, interferindo no ciclo de divisão celular (Morejohn et al., 1987; Verhoeven et al., 1990; Morejohn e Fosket, 1991; Ramulu et al., 1995) e na regulação de Ca^{+2} citoplasmático (Hertel et al., 1981; Sree et al., 1988; Hansen, 1998 e Vidaković- Cifrek et al., 2002).

Segundo Gisselsson et al. (2004), substâncias aneugênicas como a trifluralina podem promover instabilidade genômica, por interferir na segregação cromossômica e por isso se relacionar com processos de indução do desenvolvimento de neoplasias.

A trifluralina é considerada altamente tóxica (DOU, 1991), muito perigosa (Compêndio, 1996) e possivelmente carcinogênica para humanos (USEPA, 1999). Porém, estudos sobre a toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade do herbicida trifluralina trazem resultados, muitas vezes, contraditórios e inconclusivos.

Neste estudo foi observada a toxicidade do herbicida trifluralina, por meio de mudanças no comportamento natatório de *O. niloticus* e pela ação mutagênica dessa substância, avaliada pela aplicação do teste do micronúcleo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Químico testado

A substância investigada foi a 2,6 dinitro-N,N-dipropil4 (trifluorometil) benzenamida, cuja fórmula molecular é $C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$ (CAS número 1582-09-8) e que é comercialmente denominada trifluralina. Foram testadas nesse estudo as seguintes concentrações do princípio ativo do herbicida: 0,02ppm; 0,01ppm; 0,005ppm; 0,0025ppm; 0,0012ppm.

2.2. Organismo teste

O organismo teste utilizado para avaliar o potencial mutagênico do herbicida trifluralina foi uma espécie de água doce conhecida popularmente, como Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A espécie *Oreochromis niloticus* é um peixe comercializável do sudeste do Brasil, particularmente no estado de São Paulo. É também uma espécie comumente encontrada em estuários do mundo todo, conhecida por responder, rapidamente, às alterações ambientais (Vijayan et al., 1996).

De acordo com Alves-Costa (2001), a espécie *Oreochromis niloticus* é um excelente sistema-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação de substâncias contaminantes de ecossistemas aquáticos.

2.3. Tratamento

Para o bioensaio, foram utilizados aquários de vidro revestidos com papel pardo, para evitar a entrada de luz, uma vez que a luz pode degradar o herbicida (fotossensível).

Os aquários foram preenchidos com 12 litros de água de poço artesiano. Essa água foi primeiramente aerada por 24 horas para depois ser inserido o herbicida para o preparo das diferentes concentrações do produto (0,02ppm; 0,01ppm; 0,005ppm; 0,0025ppm; 0,0012ppm). O teste controle foi realizado utilizando somente água de poço artesiano aerada por 24h. Em cada aquário, foram colocados 5 espécimes, previamente aclimatados, que permaneceram nessas condições por 72 horas, para serem assim estimados os possíveis efeitos do agrotóxico.

2.4. Coleta de material

Após os peixes terem sido expostos por 72 horas às diferentes concentrações residuais do herbicida trifluralina, foi realizada uma punção cardíaca, com seringa heparinizada, para a retirada de cerca de 3cc de sangue de cada espécime. Para o preparo das lâminas foi descartada a primeira gota de sangue da seringa, para evitar a contaminação deste com o líquido corporal e o muco. O material coletado foi armazenado em geladeira (6-10°C), para posteriormente ser utilizado na preparação das lâminas do teste do micronúcleo.

2.5. Teste do micronúcleo

O material coletado foi processado em dois tempos; aproximadamente 24 horas após a coleta e novamente depois de 15 dias. As lâminas foram confeccionadas por meio da técnica de esfregaço (extensões sangüíneas).

Foram realizadas cerca de três extensões sangüíneas, no mínimo, para cada indivíduo e para cada tempo. As lâminas foram fixadas, por 10 minutos, em metanol

absoluto. Após secagem por 24 horas, as lâminas foram submetidas ao reativo de Schiff (reação de Feulgen), por 2 horas, no escuro. Após a reação, as lâminas foram novamente coradas com “fast green” por 20 segundos. Esse corante foi usado para intensificar o contraste celular, e, conseqüentemente para uma melhor delimitação da célula. Foram analisadas cerca de 3.000 células sangüíneas de cada peixe do estudo (herbicida e controle) para cada tempo. As análises foram realizadas em microscópio de luz com o aumento de 1000 vezes. Foram quantificadas, além de células micronucleadas, também outras anormalidades nucleares. Para a análise estatística foi utilizado o teste do X^2 .

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos dados mostraram que as concentrações mais altas (0,02ppm e 0,01ppm) do herbicida trifluralina foram tóxicas para a espécie testada. A concentração de 0,02ppm promoveu a morte de 60% dos peixes em 24 horas, e a concentração de 0,01ppm, apesar de não ter sido letal nesse mesmo período de tempo (a morte dos exemplares ocorreu aproximadamente após 36 horas), induziu comportamentos alterados nos organismos expostos ao produto. Nesse caso, após 24 horas, os peixes mantinham-se em decúbito lateral e apresentavam atividade motora comprometida, observada pela disposição frontal das nadadeiras (Figura 1) e batimento reduzido das mesmas. Esse comportamento parece ter sido promovido, aparentemente, por problemas motores, devido a uma possível ação neurotóxica do herbicida trifluralina, como sugerido por Worthing (1991). Segundo Anthony e Hussey (1999), o herbicida tem como principal alvo de ação as tubulinas. Uma vez que cerca de 20% do total de proteínas solúveis extraídas do cérebro são tubulinas e os

microtúbulos estejam em uma densidade extraordinariamente alta nos prolongamentos das células nervosas (Alberts et al., 2002), talvez essa concentração (0,01ppm) do herbicida trifluralina, pudesse estar interferindo indiretamente na função dessas células, acarretando em alterações no comportamento dos peixes, como o avaliado neste estudo. No entanto, Mahresh e Larry (1980) afirmam que a trifluralina não interage com as tubulinas de vertebrados. Sendo assim, um outro efeito que sugerimos é de que a neurotoxicidade observada no organismo testado pode ser decorrente de uma ação direta da trifluralina sobre a regulação do cálcio do interior das células. Essa sugestão está embasada nas descrições de Vidaković-Cifrek et al. (2002) e Sree et al. (1988), que afirmam que a trifluralina promove aumento da concentração de íons cálcio no citoplasma.

Desta maneira, o comportamento dos peixes observados após a exposição à concentração de 0,01ppm se explicaria pela ação do cálcio na transmissão de impulso neuromuscular. De acordo com Alberts et al. (2002), esse processo inicia-se quando um impulso nervoso atinge o terminal do nervo e despolariza a membrana terminal. A despolarização abre, transitoriamente, canais de Ca^{+2} controlados pela voltagem existente na membrana. Como a concentração de Ca^{+2} fora da célula é 1000 vezes maior que a concentração no seu interior, a entrada de Ca^{+2} no terminal nervoso fica facilitada. O aumento na concentração de Ca^{+2} no citosol do terminal nervoso dispara a liberação localizada de acetilcolina dentro da fenda sináptica. A acetilcolina liberada liga-se a receptores de membrana de células musculares, abrindo canais de cátions. Com isso, há um influxo de Na^{+} que leva a uma despolarização crescente e localizada da membrana. A despolarização da membrana promove a abertura dos canais de Ca^{+2} , liberando o Ca^{+2}

contido no retículo sarcoplasmático. Esse aumento súbito de Ca^{+2} promove a contração muscular.

Baseado nas afirmações de Alberts et al. (2002) sobre a atuação do Ca^{+2} na contração muscular, sugerimos que o aumento da concentração de Ca^{+2} no citoplasma, promovido pela trifluralina, possa, de alguma maneira, induzir uma liberação constante de acetilcolina na fenda sináptica, estimulando a liberação de mais cálcio do retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, promovendo uma contração muscular constante. Esse fato explicaria o comportamento da nadadeira constantemente contraída (posição frontal) (Figura 1), após a exposição à concentração de 0,01ppm da trifluralina. Desta forma, sugerimos que essa concentração do herbicida trifluralina é capaz de alterar a atividade muscular, comprometendo os movimentos natatórios de *Oreochromis niloticus*.

As concentrações de 0,005ppm; 0,0025ppm e 0,0012ppm do herbicida trifluralina não promoveram nem a morte dos peixes nem alterações comportamentais, permitindo assim a continuidade do estudo.

Para a primeira coleta de sangue realizada, foram confeccionadas lâminas 24 horas após a coleta, e após 15 dias de armazenamento em geladeira. Mesmo acondicionando as amostras de sangue em condições de temperatura controlada (9°C) verificamos que o tempo de armazenagem pode interferir nos resultados do teste do micronúcleo. Os experimentos realizados com sangue armazenado por 24h exibiram resultados que apontam uma baixa indução de micronúcleos e de anormalidades nucleares (Tabela 1 e 2). No entanto, quando o sangue coletado foi processado após 15 dias da coleta, as taxas de indução de micronúcleos aumentaram significativamente. Foram observados, em média, 33, 28, 16 e

11 micronúcleos a cada 1000 células analisadas, nas concentrações de 0,005ppm; 0,0025ppm; 0,0012ppm e no controle, respectivamente. Além de induzir a formação de micronúcleos, o armazenamento do sangue por 15 dias também induziu o aparecimento de outras anormalidades que não foram registradas para o material, quando analisado após 24 horas da coleta (células binucleadas e “mini-cells”) (Tabela 1, Figura 2). Por esses resultados, podemos inferir que o tempo de armazenamento do sangue pode levar a formação de micronúcleos, independentemente da ação de xenobiontes sobre o organismo, pois até ensaios controle apresentaram as mesmas respostas pelas alterações observadas.

Segundo Ma et al., 1995 e Stopper e Müller, 1997; Kirsch-Volders et al., 2000; Klobucar et al., 2003, os micronúcleos são formados a partir de fragmentos cromossômicos ou de perdas de cromossomos inteiros durante a divisão celular. No entanto, nossos resultados nos levam a acreditar que esse não deve ser o único processo de formação de micronúcleos, uma vez que as células de sangue periférico, usadas neste estudo (após 15 dias de coleta) não passarão por processo de divisão celular e, portanto, quebras e perdas cromossômicas seriam impossíveis de ocorrerem. Eventualmente processos de degeneração nuclear (observadas em eventos de morte celular) podem também induzir a presença de fragmentação nuclear. Porém, nosso estudo não mostrou a presença de fragmentação nuclear juntamente com heteropiconose, como normalmente é encontrado em células que estão em processo de morte. Os núcleos observados no material processado, após 15 dias de coleta, não se caracterizavam pela presença de heteropiconose, pois sua coloração se apresentou um pouco menos intensa que os núcleos do material processado em um curto período de tempo após a coleta (24 horas). Além disso, foi observado um único fragmento em todas as células analisadas com todas as características de um micronúcleo. Para a

comprovação desses dados, novos ensaios devem ser realizados. Além de se repetir os tempos investigados, deve-se também avaliar novos períodos de envelhecimento do sangue, além de submeter o material a técnicas mais específicas. Nossos resultados trazem informações que podem caracterizar possíveis restrições ao uso da metodologia de micronúcleo, mostrando a necessidade de se investigar variáveis que possam comprometer a eficiência desta técnica.

Após o estabelecimento do melhor tempo para processar o ensaio do micronúcleo com o sangue de peixes (24 horas após a coleta) foram realizados testes que avaliaram a porcentagem de micronúcleos para se estimar a mutagenicidade do herbicida. A tabela 2 mostra os resultados obtidos com o teste do micronúcleo após a análise de 30.000 células para cada uma das concentrações e para o controle. Os resultados apontam que as concentrações testadas não podem ser consideradas mutagênicas para o organismo testado, uma vez que o único resultado estatisticamente positivo, quando comparado ao teste controle, referiu-se a porcentagem de anormalidades nucleares observadas apenas para a concentração de 0,0012ppm.

Oreochromis niloticus parece não ser um bom organismo para avaliar o potencial mutagênico do herbicida trifluralina ou então os eritrócitos periféricos não constituem em boas ferramentas para o estudo, uma vez que as doses mais altas testadas foram letais, antes mesmo do fim do experimento, e doses ligeiramente mais baixas não apresentaram nenhuma evidência da ação mutagênica do produto.

3. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP, à Profa Dra Dejanira Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP, ao aluno de Ciências Biológicas da UNESP-Rio Claro/SP Matheus Mantuanelli Roberto pela colaboração na confecção das figuras e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Avaliação da eficiência do teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe, para tempos diferentes de armazenagem do sangue.

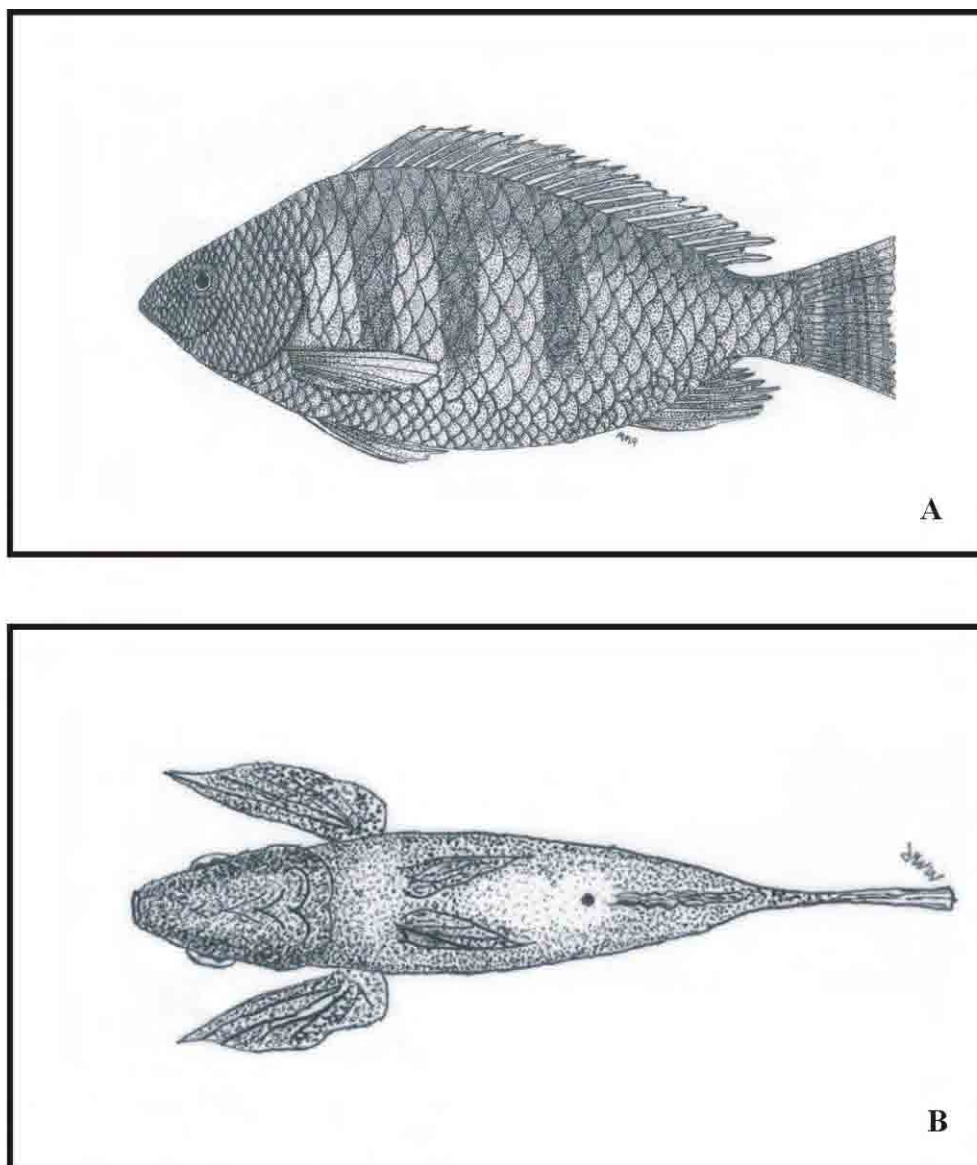
Concentrações	24horas				15 dias			
	N	MN (%)	N	AN (%) ¹	N	MN (%)	N	AN (%) ²
Controle	1	0,006	12	0,08	176	1,17	0	0
0,0012ppm	2	0,01	32	0,21	253	1,68	21	0,14
0,0025ppm	1	0,006	10	0,06	433	2,88	81	0,54
0,005ppm	3	0,02	21	0,14	499	3,33	68	0,45

N: Número de células alteradas; MN: Células micronucleadas; AN: Alterações nucleares; ¹ Presença somente de invaginações e brotos nucleares; ² Presença somente de células binucleadas, brotos nucleares e “mini cells”.

Tabela 2: Análise de células eritrocitárias de peixes submetidos a concentrações residuais do herbicida trifluralina, realizados 24 horas após a coleta do sangue.

Concentração (ppm)	N	Micronúcleo (%)	N	Anormalidades nucleares ¹
Controle	1	0,003 ± 0,02	14	0,047 ± 0,08
0,0012ppm	3	0,01 ± 0,03	64	0,21*± 0,31
0,0025ppm	1	0,003 ± 0,02	29	0,097 ± 0,09
0,005ppm	5	0,017 ± 0,4	40	0,13 ± 0,11

* significativo $p < 0,05$; N: Número de células alteradas; ¹ invaginações nucleares.



(Colaboração de Roberto, M. M.)

Figura 1: Desenho da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) antes e após tratamento com a concentração de 0,01ppm do herbicida trifluralina. **A:** apresentação característica do peixe e das nadadeiras em condições normais; **B:** disposição anormal das nadadeiras (posição frontal) e posição (decúbito ventral), observada após exposição de 24 horas ao herbicida.

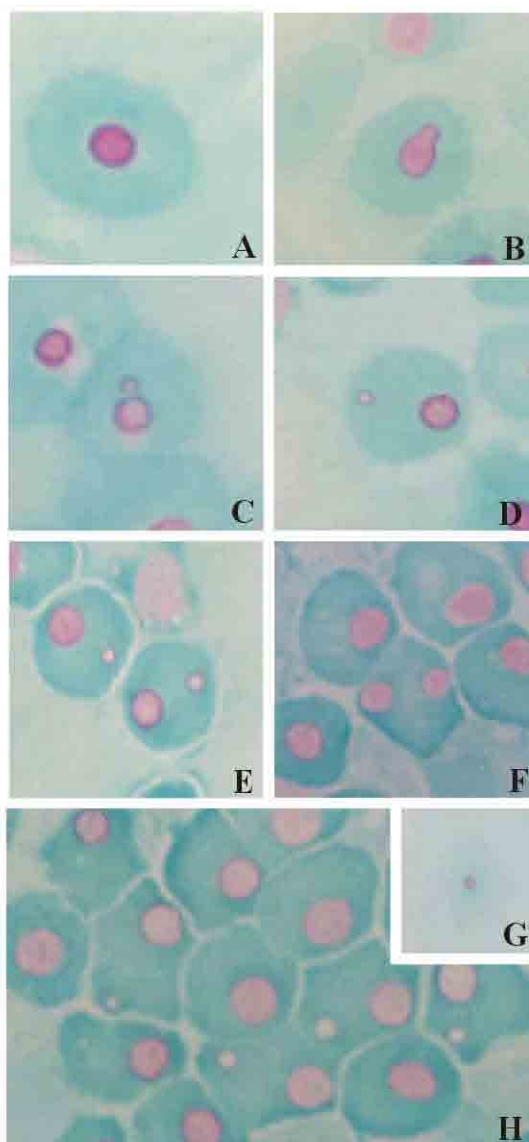


Figura 2: Micronúcleos e alterações nucleares observadas 15 dias após a coleta do material. **A:** eritrócito normal; **B:** evaginação nuclear; **C:** broto nuclear; **D e E:** células micronucleadas; **F:** célula binucleada; **G:** “mini cell”; **H:** grande número de células micronucleada num mesmo campo com apenas 1 micronúcleo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D., 2002- *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Publishing, p.

Al-Sabti, K., 1991- *Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their in binucleated blocked fish erythrocyte cells*. Mutation Research, 320: 157-163.

Anthony, R. G.; Hussey, P. J., 1999- *Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton*. Trends in Plant Science, 4: 112-116.

Alves-Costa, J. R. M. *Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus**. Curitiba : [s.n.], 2001. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

Alzieu, C., 2000- *Environmental impact of TBT: the French experience*. Sci Total Environ., 258:99-102.

Belpaeme, K.; Delbeke, K.; Zhu, L.; Kirchvolders, M., 1996- *Cytogenetic studies of brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay*. Mutagenesis, 11: 485-492.

Bolognesi, C.; Landini, E.; Roggieri, P.; Fabbri, R.; Viarengo, A., 1999- *Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies*. Environ. Mol. Mutagen., 33: 287-292.

Burgeot, T.; His, E.; Galgani, F., 1995- *The micronucleus assay in Crassostrea gigas for the detection of seawater genotoxicity*. Mutat. Res., 342: 125-140.

Calderón, M.J.; Hermosín, M. C.; Cornejo, J.; Moreno, F. Movilidad de trifluralina en laboreo tradicional y de conservación. Estudios de la Zona no saturada del suelo. Eds. R. Muñoz-Carpena, A. Ritter, C. Táscon: 1999. Tenerife, p. 83-88.

Compêndio de Defensivos Agrícolas. 1996, 5. ed. São Paulo: Andrei, 506 p.

Diário Oficial Da União 13 - 12 -91. Portaria no. 03, de 16 de janeiro de 1992. *Termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - nº 1, de 9 de dezembro de 1991"*.

Dimou, A.D.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A., 2004- *Trifluralin photolysis in natural waters and under the presence of isolated organic matter and nitrate ions: kinetics and photoproduct analysis*. Journal of Photochemistry and photobiology A: Chemistry, 163: 473-480.

Dopp, E.; Barker, C.M.; Schiffmann, D.; Reinisch, C.L., 1996- *Detection of micronuclei in hemocytes of Mya arenaria: association with leukemia and induction with an alkylating agent*. Aquat. Toxicol., 34: 31-45.

Gisselsson D, Palsson E, Yu C, Mertens F, Mandahl N. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. Cancer Letters. 2004; 206: 69-76.

Godwin, A.H., 2001- *The biological chemistry of lead*. Curr Poin Chem Biol., 5: 223-227.

Grisolia, C.K.; Starling, F.L.R.M., 2001- *Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges*. Mutat. Res., 491: 39-44.

Grover, R.; Wolt, J. D.; Cessna A. J.; Schiefer, H. B., 1997- *Environmental fate of trifluralin*. Ver. Environ. Contam. Toxicol., 153:1-64.

Hansen, A.L.; Gertz, A.; Joersbo, B.; Anderssen, S.B., 1998- *Antimicrotubule herbicide for in vitro chromosome doubling in Beta vulgaris L. ovule culture*. Euphytica, 101: 231-237.

Hertel, C.; Quader, H.; Robinson, D.G.; Roos, I.; Carafoli, E.; Marme, D., 1981- *Herbicides and fungicides stimulate Ca²⁺ efflux from rat mitochondria*. Febs Lett., 127: 37-39.

International Agency for Research on Cancer., 1991- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, vol 53, *Occupational exposures in insecticide application, and some pesticides*, Lyon, France.

Jaylet, A.; Deparis, P.; Ferrier, V.; Grinfeld, S.; Siboulet, R., 1986- *A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the new Pleurodeles waltl to detect mutagen in freshwater pollution*. Mut. Res., 164: 245-257.

Johnson, F. M., 1998- *The genetic effects of environmental lead*. Mutation Research, 410: 123-140.

Kirsch-Volders, M.; Sofuni, T.; Aaderma, M.; Albertini, S.; Eastmond, D.; Fenech, M.; Ishidate, M.; Lorge, E.; Norppa, H.; Surrallés, J.; Von Der Hude, W.; Wakata, A., 2000- *Report from the in vitro micronucleus assay working group*. Environ. Mol. Mutagen., 35: 167-172.

Klobuscar, G. I. V.; Pavlica, M.; Erben, R.; Papes, D., 2003- *Application of the micronucleus and comet assay to mussel Dreissena polymorpha haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments*. Aquatic Toxicology, 64: 15-23.

Ma, T-H.; Xu, Z. Mcconell, H.; Rabago, Ev; Arreola, Ga; Zhang, H., 1995- *The improved Allium/ Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants*. Mutation Reserch, 334: 185-195.

Mahresh, K.U.; Larry, D. N., 1980- *Mode of dinitroaniline herbicide action*. Plant. Physiol., 66: 1048-1052.

Majone, F.; Beltrame, C.; Brunetti, R., 1988- *Frequencies of micronuclei detected on Mytillus galloprovincialis by different staining techniques after treatment with zinc chloride*. Mutation Research, 209: 131-134.

Mersch, J.; Beauvais, M. N.; Nagel, P., 1996- *Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, Dreissena polymorpha, exposed to clastogens*. Mutat. Res., 371: 47-55.

Morejohn, L.C.; Bureau, T.E.; Molé-Bajer, J.; Bajer, A.; Fosket, D. E., 1987- *Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro*. Planta, 172: 41-147.

Morejhon, L. C.; Fosket, D. E., 1991- *The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cell*. Pharmacol. Ther., 51: 217-230.

Pain D. J (1995) Lead in the environment. In: Hoffman DJ et al. (eds) *Handbook of Ecotoxicology*, Lewis, Boca Raton, Chap. 16.

Ramulu, K.S.; Verhoeven, H.A.; Dijkhuis, P., 1995- *Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl and colchicine in potato*. Protoplasma, 160: 65-71.

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). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA, 2003. 355p.

Rodrigues, B.N.; Almeida, F.S. *Guia de herbicidas*. Edição dos autores, Londrina. 1998.

Sánchez-Galán, S.; Linde, A. R.; Izquierdo, J. I.; García-Vázquez, E., 1998- *Micronuclei and Fluctuating asymmetry in brown trout (Salmo trutta): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems*. Mutat. Res., 412: 219.

Sree, K.R.; Verhoeven, H.A.; Dijkhuis, P., 1988- *Mitotic dynamic of micronuclei induced by amiprofos-methyl and prospects for chromosome-mediated gene transfer in plants*. Theoretical and Applied Genetic., 75: 575-584.

Stopper. H.; Müller, S. O., 1997- *Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview*. Toxicology in vitro, 11: 661-667.

U.S. Environmental Protection Agency., 1999- *Chemical carcinogenic potential science information management branch health effects division office of pesticide programs.*

Van Hummelen, P.; Zoll, C.; Paulussen, J.; Kirsch-Volders, M.; Jaylet, A., 1989- *The micronucleus test in Xenopus: a new and simple in vivo technique for detection of mutagens in fresh water.* *Mutagenesis*, 4: 12-16.

Venier, P.; Maron, S.; Canova, S., 1997- *Detection of micronuclei in gill cells and hamocyte of of the mussels exposed to benzo[a]pyrene.* *Mutation. Research*, 390: 33-44.

Verhoeven, H.A.; Ramulu, K.S.; Dijkhuis, P.A., 1990- *Comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension cultures of Nicotiana plumbaginifolia.* *Planta*, 182: 408-411.

Vidaković-Cifrek, M.; Pavlica, I.; Regula, D. P., 2002- *Cytogenetic damage in shallot (Allium cepa) root meristems induced by oil industry "high-density brines".* *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 284-291.

Vijayan, M.M.; Morgan, J.D.; Sakamoto, T.; Grau, E.G.; Iwama, G.K., 1996- *Food de privation affects sewer acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes.* *Journal Experimental Biology*, 199: 2467-2475.

Worthing, C.R., 1991- *The pesticides manual*. 9th ed. Farnham, British Crop Protection Council.

Zimmerman, L.R.; Thurman, E. M.; Bastian, K. C., 2000- *Detection of persistent organic pollutants in the mississippi Delta using semipermeable membrane devices.* Sci. Total. Environ., 248: 169-79.

10. ARTIGO 5

**ENSAIO DO COMETA COMO FERRAMENTA DE
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO
HERBICIDA TRIFLURALINA**

Thaís Cristina Casimiro Fernandes¹ e Maria Aparecida Marin Morales¹

¹Universidade Estadual Paulista, IB-Campus de Rio Claro, Av. 24^A, 1515, cep: 13506-900,

Rio Claro/SP

1. INTRODUÇÃO

As alterações no material genético dos organismos, promovidas pelos agrotóxicos, podem ser diversos, tais como reação direta com o DNA nuclear; incorporação no DNA durante a replicação celular e interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta da célula (TIMBRELL, 1999).

O herbicida trifluralina é considerado um químico microtúbulo-despolimerizante, devido à característica de seu princípio ativo que atua, principalmente, sobre as proteínas tubulínicas, interferindo na polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, impedindo o processo de divisão celular (MOREJOHN et al., 1987; VERHOEVEN et al., 1990; MOREJOHN & FOSKET, 1991; RAMULU et al., 1995. No entanto, as formulações dos agrotóxicos também apresentam substâncias inertes que aumentam o poder de penetração, a capacidade de dispersão, a emulsidade, a solubilidade e a estabilidade dos ingredientes ativos, além de apresentar também impurezas (contaminantes) (GRISÓLIA, 2005).

De acordo com Grisólia (2005) muitos dos compostos chamados “inertes” têm atividade química e toxicológica bastante alta. O herbicida trifluralina pode conter, dentre outros, os inertes: xileno, etilbenzeno e naftaleno (VENTURES, 1995), além do contaminante nitrosodipropilamina, considerado carcinogênico por reagir com o DNA no O⁶ da Guanina e pode provocar mutações de ponto (COOPER & PORTER, 2000). Tanto o naftaleno (DELGADO-RODRIGUES et al., 1995) como o xileno (WEBER-LOFTI et al., 2005) e o etilbenzeno (MA et al., 1996) são considerados mutagênicos por promover alterações no material genético.

O ensaio do cometa é uma técnica para detecção de danos no DNA causados por agentes que induzem quebras no material genético. Este ensaio constitui uma técnica simples e sensível para quantificar danos no material genético em um pequeno número de células (OSTLING & JOHANSON 1984; OLIVE et al., 1990) e pode ser usado para avaliar a genotoxicidade de vários agentes físicos (SINGH et al., 1988, 1991; OLIVE et al., 1990, 1991, 1992) e químicos (TICE et al., 1990; BETTI et al., 1993).

Michelmore & Chipman (1998) concluíram que o ensaio de cometa é um método adequado como biomarcador não específico de genotoxicidade em peixes e outros organismos aquáticos, destacando a sensibilidade das células sangüíneas destes animais aos efeitos genotóxicos.

O objetivo deste estudo foi o de avaliar a ação genotóxica do herbicida trifluralina, por meio do ensaio do cometa, utilizando eritrócitos de *Oreochromis niloticus*.

2. MATERIAIS e MÉTODO

Para o bioensaio, foram utilizados aquários de vidro envolvidos com papel pardo, para evitar a entrada de luz, uma vez que o herbicida é fotosensível. Os aquários foram preenchidos com 12 litros de água de poço artesiano. Essa água foi primeiramente aerada por 24 horas para depois ser inserido o herbicida, nas diferentes concentrações a ser avaliadas (0,02ppm; 0,01ppm; 0,005ppm; 0,0025ppm; 0,0012ppm). O teste controle foi realizado utilizando somente água de poço artesiano aerada por 24h. Para se estimar o efeito do herbicida foram colocados em cada aquário 5 espécimes de peixe, previamente aclimatados e que permaneceram nas concentrações preparadas com o produto por 72 horas.

Após os peixes terem sido expostos às diferentes concentrações residuais do herbicida trifluralina, foi realizada uma punção cardíaca com seringa heparinizada, para a retirada de cerca de 3cc de sangue de cada espécime. A primeira gota de sangue da seringa foi descartada, para evitar a contaminação com o líquido corporal e o muco.

2.1. O ensaio do cometa

Para a realização deste ensaio, o sangue coletado foi processado no mesmo dia da coleta. Uma amostra de 10 µl de sangue foi diluída em 1.000 µl de solução fisiológica. As lâminas foram montadas com 10 µl da suspensão celular + 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37° C. As lâminas permaneceram em uma solução de lise (1ml de triton X-100, 10 ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de lauryl sarcosinato sódico para 1L) em geladeira por 1 hora. Após a lise, as lâminas permaneceram em tampão NaOH 300mM + EDTA 1mM (pH ~13) por 20 minutos em corrente de eletroforese a 25v, 300mA. As lâminas foram, a seguir, neutralizadas com Tris 0,4M por 15 minutos e fixadas em etanol por 10 minutos (Tice et al., 1990, com pequena modificação).

2.3. Análise dos dados do cometa

Para cada amostra de sangue foram analisados 100 núcleos. As lâminas foram coradas com brometo de etídio (0,02 mg/ml). A análise foi feita ao microscópio de fluorescência, filtro B - 3⁴ (excitação: $\lambda = 420 - 490\text{nM}$, barreira: $\lambda = 520\text{nM}$), em objetiva de 40x. Os núcleos foram classificados, visualmente, de acordo com a migração dos

fragmentos em: classe 0 (pouco dano); classe 1 (pequeno dano); classe 2 (médio dano) e classe 3 (grande dano).

Para análise estatística foi utilizado o teste do χ^2 , comparando o número total de cometas encontrados em cada tratamento e as suas diferentes classes.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com a análise do ensaio do cometa mostraram uma formação significativa de nucleóides com cauda, principalmente, com danos no DNA de classe 2 e 3 (Tabela 1, Figura 1). No entanto, não podemos inferir que as caudas observadas nos nucleóides sejam decorrentes somente de quebras no DNA, promovidas pela ação das concentrações testadas do herbicida trifluralina. Dados semelhantes registrados por Ribas et al. (1996) levaram os autores a sugerirem que o aumento significativo no comprimento da cauda de cometas, após tratamento com esse mesmo herbicida, poderia também estar associada a quebras no DNA, pela indução do sistema de reparo por excisão de bases ou de nucleotídeos, decorrentes de lesões promovidas pela ação da própria substância. Segundo Collins et al. (1997), o sistema de reparo pode ser responsável por quebras no DNA que aumentam a cauda dos cometas. Sendo assim, caudas muito longas podem indicar um grande potencial genotóxico ou uma eficiente atuação do sistema de reparo.

Os resultados apresentados neste estudo parecem ter sido ainda intensificados por problemas de adequação do protocolo utilizado, uma vez que até mesmo o teste controle apresentou um alto número de nucleóides portadores de caudas do tipo 2 e 3, diferentemente do observado em outros estudos. Acreditamos que, provavelmente, o tempo

de corrida na eletroforese pode ter intensificado a promoção das caudas. Esta afirmação esta de acordo com as citações de Gontijo et al. (2003) que afirmam que o tempo de corrida da eletroforese é fator dependente do tamanho da cauda, pois seus estudos comprovaram que diferentes tempos de corrida interferiram no tamanho da cauda dos cometas dos organismos testados. Para os autores, tempos de corrida acima do ideal promoveram, em *Oreochromis niloticus* expostos a um agente oxidativo (H_2O_2), o desenovelamento do nucleóide, dando origem a uma cauda que não representava o dano causado pela substância testada, mas sim um tempo excessivo de corrida que arrastou, mais facilmente, as alças de DNA desprovidas de proteínas.

Nosso estudo não apresentou resultados consistentes, principalmente quanto à ação genotóxica do herbicida trifluralina, avaliada pelo teste do cometa. O ensaio do cometa, por ser um teste muito sensível e criterioso, torna-se muitas vezes impróprio para ser usado como metodologia de investigação de potencial genotóxico de substâncias químicas. Para que este teste possa ser usado, com segurança, há uma necessidade de uma melhor adequação da metodologia com o organismo teste selecionado para o estudo. Um dos parâmetros a ser avaliado na adequação da técnica é o tempo de corrida, além da escolha de uma concentração adequada de suspensão celular.

4. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro/SP, à Profa Dra Dejanira Franceschi de Angelis do Laboratório de Toxicologia de Águas do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências da

UNESP-Rio Claro/SP e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Tabela 1: Teste do cometa realizado em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição dos organismos às diversas concentrações residuais do herbicida trifluralina.

Concentrações (ppm)	Células Analisadas		Classes			Escore	
	TNA	TNC	0	1	2		3
Controle	100	39	61	14	13	12	76
	100	22	78	2	10	10	52
	100	65	35	5	20	40	165
	100	40	60	10	5	25	95
	100	28	72	6	2	20	70
Total	500	194 ± 16,48	306 ± 6,48	37 ± 4,66	50 ± 7,03	107 ± 12,03	X=58,6 ± 43,80
0,0012 ppm	100	91	9	7	20	64	303
	100	89	11	29	17	43	192
	100	90	10	18	23	49	211
	100	92	8	40	30	22	144
	100	82	18	15	11	56	205
Total	500	444 ± 3,96	56 ± 3,96	109 ± 12,87	101 ± 7,05	234 ± 15,92	X= 211 ± 57,77
0,0025 ppm	100	98	2	18	10	70	248
	100	100	0	2	15	83	281
	100	78	14	10	18	50	196
	100	93	7	6	10	77	257
	100	90	10	20	10	60	160
Total	500	459 ± 8,67	33 ± 5,72	56 ± 7,69	63 ± 3,7	340 ± 13,2	X= 228,4 ± 50,86
0,005 ppm	100	95	5	5	10	80	265
	100	98	2	20	8	70	246
	100	96	4	0	6	90	282
	100	99	1	9	15	75	264
	100	98	2	8	17	73	261
Total	500	486 ± 1,64	14 ± 1,64	42 ± 7,37	56 ± 4,66	388 ± 7,83	X= 263,6 ± 12,82

* Significativo $p < 0,05$; **TNA**: total de nucleóides analisados; **TNC**: total de nucleóides com cauda.

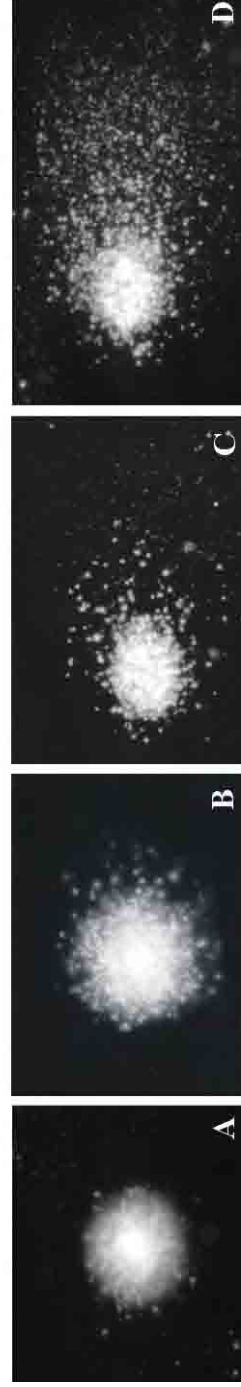


Figura 1: Danos no DNA observados em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*, após exposição ao herbicida trifluralina. **A:** classe 0; **B:** classe 1; **C:** classe 2; **D:** classe 3.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BETTI, C., BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B. V. L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats, **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 22, p. 172-180. 1993.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUSINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us?, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 375, p. 183-193. 1997.

COOPER, M. T.; PORTER, T. D. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium* coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 6, p. 45-52, 2000.

DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTIZ-MARTELLO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GÓMEZ-ARROYO, S. Genotoxicity of environmental important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 341, p. 235-247. 1995.

GONTIJO, A. M. M. C.; SPEIT, R. E. B. G.; REYES, V. A. V.; VOLPATO, G. L.; SALVADORI, D. M. F. Anesthesia of fish with benzocaine does not interfere with comet assay results, **Mutation Research**, Amsterdam, v. 534, p. 165-172. 2003.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. 1 ed. Brasília: ULBRA, 2005.

MA, T. H., XU, C., LIAO, S., McCONNELL, H., JEONG, B. S., WON, C. .D. In situ monitoring with the tradescantia bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and na incinerator. **Mutation Research**, Amsterdam v. 359, p. 39-59. 1996.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. .K. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using the single-gel electrophoresis comet assay. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 41, p. 161-182, 1998.

MOREJOHN, L. C.; BUREAU, T. E.; MOLÉ-BAJER, A.; FOSKET, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro, **Planta**, Berlin, v. 172, p. 141-147. 1987.

MOREJOHN, L. C.; FOSKET, D. E. The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cell, **Pharmacol. Ther.**, v. 51, p. 217-230. 1991.

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay, **Radiation Res.**, v. 122, p. 86-94. 1990.

OLIVE, P. L.; WLODEK D.; BANÁTH, J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis, **Cancer Res.**, v. 51, p. 4671-4676. 1991.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, **Exp. Cell Res.**, v. 198, p. 259-267. 1992.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298. 1984.

RAMULU, K. S.; VERHNOEVEN, H. A.; DIJKHUIS, P. Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, aminophos-methyl and colchicine in potato, **Protoplasma**, v. 160, p. 65-71. 1995.

RIBAS G, SURRALLÉS J, CARBONELL E, XAMENA N, CREUS A, MARCOS R. Genotoxic evaluation of the herbicide trifluralin on human lymphocyte exposed in vitro. **Mutation Research**, v. 371, p. 15-21. 1996.

TICE R. R.; ANDREWS, P. W.; SINGH, N. P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: B.M. Suntherland and A.D. Wordhead (Eds) **DNA damage and repair in human tissues**. New York: Plenum, 1990.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to toxicology**. 2^a Ed. Taylor & Francis Ed. 167p. 1999.
VENTURES INFORMATION. **Pesticide fact sheet: trifluralin**. Disponível em: <http://infoventures.com/e-hlth/>. Acesso em 6 de junho de 2003.

VERHOEVEN, H. A.; RAMULU, K. S.; DIJKHUIS, P. A. Comparison of the effects of various spindle toxins on metaphase arrest and formation of micronuclei in cell-suspension culture of *Nicotiana plumbaginifolia*, *Planta*, Berlin, v. 182, p. 408-411, 1990.

WEBER-LOFTI, F.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; GUILLEMAUT, P.; KLEINPETER, J.; DIETRICH, A. Specific plant DNA adducts as molecular biomarkers of genotoxic atmospheric environments. **Mutation Research**, Amsterdam v. 581, p. 55-67. 2005.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A trifluralina, assim como outros agrotóxicos, precisa ser melhor estudada para uma compreensão mais consistente de sua ação no ambiente e com isso um melhor estabelecimento do seu custo-benefício relacionado com o desenvolvimento sustentável e bem estar das gerações futuras.

Existem relatos que comprovam que a trifluralina caracteriza-se como uma substância de grande toxicidade aguda para peixes, mas poucos são as descrições de sua toxicidade crônica e de seu efeito citotóxico.

Os estudos mutagênicos e genotóxicos realizados com esse químico são, na maioria das vezes, inconclusivos ou até contraditórios. Pouco também se tem de informação sobre a toxicidade dos produtos derivados da degradação da trifluralina.

Nosso estudo mostrou, por meio das alterações observadas em *Allium cepa* que o herbicida trifluralina pode ser considerada uma substância aneugênica. Por meio da frequência significativa das alterações encontradas, podemos afirmar que as concentrações 0,42; 0,84 e 1,67ppm são mutagênicas para *Allium cepa* e que a concentração de 3,34ppm pode ser considerada tóxica para esse organismo, devido a inibição significativa de divisão celular e por apresentar alterações, irreversíveis, no material genético, o que inviabilizam as células.

O período de recuperação, aplicado nos ensaios realizados nesta pesquisa, não foi suficiente para restabelecer a integridade das células de *Allium cepa* comprometidas pela ação do herbicida trifluralina. Essa informação nos permite inferir que o herbicida promove uma ação contínua e persistente no organismo e nos alerta sobre os perigos de doses residuais sobre o material genético dos organismos.

Sugerimos que as concentrações de 0,42ppm e 0,84ppm podem ser consideradas “concentrações diagnósticos” de mutagenicidade do herbicida trifluralina, porque traz maiores informações, quanto aos danos no material genético do organismo testado, por promover a indução de diferentes tipos de aberrações nucleares e cromossômicas, em quantidades significativas para praticamente todas as alterações observadas.

Oreochromis niloticus parece não ser um bom organismo para avaliar o potencial mutagênico do herbicida trifluralina ou os seus eritrócitos não constituem boas ferramentas para o estudo, uma vez que as doses mais altas testadas foram letais, antes do fim do experimento, e doses ligeiramente mais baixas não apresentaram nenhuma evidência de ação mutagênica.

Nosso estudo mostrou que o procedimento realizado para a avaliação da presença de micronúcleos em células de sangue periférico de peixes, após exposição a um agente, deve ser realizada no máximo após 24 horas a coleta do sangue, para evitar resultados falso positivos.

Os resultados obtidos com *Oreochromis niloticus*, por meio do ensaio do cometa, não foram consistentes quanto à ação genotóxica do herbicida trifluralina. O ensaio do cometa, por ser um teste muito sensível e criterioso, torna-se muitas vezes impróprio para ser usado como metodologia de investigação de potencial genotóxico de substâncias químicas. Para que o mesmo possa ser usado, com segurança, há uma necessidade de uma melhor adequação da metodologia com o organismo teste selecionado para o estudo.

Allium cepa mostrou-se um organismo bastante sensível aos efeitos mutagênicos do herbicida trifluralina, fornecendo também informações sobre o mecanismo de formação das alterações observadas no estudo. Nossos estudos com *Allium cepa* mostraram que existe uma forte correlação entre a persistência do herbicida e o desenvolvimento de certas alterações celulares.

Micronúcleos também podem ser formados em *Allium cepa* por eliminação de material nuclear excedente decorrente de poliploidizações promovidas pela ação aneugênica do herbicida. Assim como outros autores, confirmamos a ação microtúbulo-despolimerizante do herbicida trifluralina, por meio das alterações encontradas em nosso estudo.

Este estudo traz informações que confirmam a classificação pela EPA para o herbicida trifluralina, como uma substância possivelmente carcinogênica para humanos, por meio de evidências em outros organismos e não em humanos, uma vez que as alterações encontradas nas células meristemáticas de *Allium cepa*, após exposição ao herbicida trifluralina, são frequentemente observadas em neoplasias. Porém são necessários mais estudos sobre o mecanismo de ação do herbicida, sejam eles relacionados à tubulina ou à alterações nas concentrações de cálcio citoplasmático. Os poucos estudos existentes nestas áreas tornam difíceis a compreensão de reações, como a dificuldade do herbicida em se ligar a tubulina de vertebrados, mesmo com a presença da treonina na posição 239, sítio de ligação do herbicida.

Apesar dos requintes de uma legislação moderna sobre agrotóxicos, principalmente sobre o processo de registro dos produtos que só permitem a utilização daqueles que apresentem resultados negativos quanto a mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, pode-se verificar muitos casos de contradição entre os resultados avaliados pela legislação e os dados que se encontram na literatura científica sobre os efeitos dos agrotóxicos. Desde a vigência da lei 7.802/89, há 15 anos, nenhum agrotóxico no Brasil sofreu qualquer tipo de restrição, o que traz preocupações, principalmente no que tange a validade dos testes realizados para essa avaliação.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic chemical on the cells of the common *Cyprinus carpio*L. **Comp. Biochemistry physiology**, Sweden, v. 85, p.5-9. 1986.

AL-SABTI, K.; HARDIG, J. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products in the Baltic sea. **Comp. Bioch. Physiol.**, Sweden, v. 97 C, p. 179-182. 1990.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium. Mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 320, p.157-163. 1991

AL-SABTI, K. Chromium-induced micronuclei in fish. **J Appl Toxicol.**, Chichester , v. 14, p. 333-336. 1994

AL-SABTI, K.; FRANKO, M.; ANDRIJANIC, B.; KNEZ, S.; STEGNAR, P. Chromium-induced micronuclei in fish. **Journal of applied toxicology**, Chichester, v. 13, p. 333-336, 1994.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 343, p. 121-135, 1995.

ALVES-COSTA, J. R. M. Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação ao chumbo (II): ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. 2001. Dissertação de mestrado, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

ARNAIZ, R. R. **Las Toxinas Ambientales y sus Efectos Genéticos** 2.ed. México: la ciencia/124, 1995. 95p.

ATEEQ, B.; M. ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p.135–144, 2002.

BARCELÓ, D. **Evaluación de la contaminación por plaguicidas en diversas zonas costeras de Europa** In: VALVERDE-GARCIA, A. & FERNANDÉZ-ALBA, A.B. (Eds.) SEMINARIO INTERNACIONAL SOBRE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS, 3. ed, 1994, Almería: Almería, 1994, p.163-186.

BARCELÓ, D.; CHIRON, S.; FERNANDEZ-ALBA, A.; VALVERDE, A.; ALPENDURADA, M.F. Monitoring pesticides and metabolites in surface water and groundwater in Spain. U.S.A. **American Chemical Society**, Easton, 1996, p.237-253.

BERGGREN, D.; FISKESJÖ, G. Aluminium toxicity and speciation in soil liquids-experiments with *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v. 6, p. 771-779. 1987.

BETTI, C.; BARALE, R.; POOL-ZOBEL, B. L. Comparative studies on cytotoxic and genotoxic effects of two organic mercury compounds in lymphocytes and gastric mucosa cells of Sprague-Dawley rats. **Environ Mol Mutagen**. New York, v.22, p. 172-180. 1993.

BORBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytol.**, v. 134, p. 481-486. 1996.

BUSHRA ATEEQ; M. ABUL FARAH; M. NIAMAT ALI; WASEEM AHMAD. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluate by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.514, p. 105-113. 2002.

ÇAVAS T.; ERGENE-GÖZÜKARA S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 534, p. 1-11. 2003.

CHAUHAN, Y. S.; SAXENA, N. P.; NAGESWARA RAO, R. C.; JOHNSEN, C., RAVINDRANATH, K. Portable rain ou shelter, a useful tool in drought research. **ACIAR Food Legume Newsl**,[S.I.], v. 25, p. 9. 1997.

CHAUHAN, L. K. S.; SAVENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *A. cepa*. **Environment and Experiment Botany**, [S.I.], v. 42, p. 181-9. 1999.

CONNOR, J. A.; FERGUSON, M. A. Essential medical genetic. **Smith Blackwell Scientific Publications**, London, 1993, 260p.

CONSTANTIN, M. J.; OWENS, E. T. Introduction and perspective of plant genetic and cytogenetic assays. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 99, p. 13-36. 1982.

CONTE, C.; MUTTI, I.; PUGLISI, P.; FERRARINI, A.; REGINA, G.; MAESTRI E.; MARMIROLI, N. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution, **Chemosphere**, Oxford, v.37, p. 2739-2749. 1998.

CORSO, G. M.; M. A. MARIN-MORALES; L. A. GRACIOLI & A. A. GOBATTO-RODRIGUES. Influência do herbicida trifluralin sobre a endomorfologia de raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Rio Vermelho). **Revista do XVI Congresso Brasileiro de Herbicida e Plantas Daninhas**, Campo Grande – MS. v.10, 1986.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J-F.; FÉRARD, J-F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*- micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 426, p. 161-171. 1999.

CROSS, J. N.; HOSE, J. E. The reproductive cycle of demersal fish in an area receiving urban wastes (Abstract). In: *Sixth International Ocean Disposal Symposium*, April 21-25, 1986, Pacific Grove, California, 116-117. 1986.

DAS, R. K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin-C and paper mill effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 175, p. 67-71, 1986.

DEPLEDGE, M. H. Genetic ecotoxicology: an overview. **Jornal of experimental marine biology and ecology**, Amsterdam, v. 200, p.57-66. 1996.

DURAND, G.; BARCELÓ, D. Liquid chromatographic analysis of chlorotriazine herbicides and its degradation products in water samples with photodiode array detection. I. Evaluation of two liquid-liquid extraction methods, **Toxicol. Environ. Chem.**, New York, v. 25, p. 1-11. 1989.

EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2. ed. U.S.A.: CRC Press, 1973, 170p.

EDWIN, D. O. Control of water pollution from agriculture. **Irrigation and Drainage**, New York, v.55, p. 1-101. 1996.

EVSEEVA, T. I.; KHRAMOVA, E. S. *Action of low concentration of ²³²Th on Tradescantia (clone 02) and meristematic root tip cells of Allium cepa*. In: Proceedings of the Fifth International Conference on High Levels of Natural Radiation and Radon Areas, Munich, pp. 489-491. 2002.

EVSEEVA, T. I.; GERAS'KIN, S. A.; SHUKTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, p. 235-248. 2003.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p.81-95, 2000.

FERRARO M. V. M.; FENOCCHIO A. S.; MANTOVANI M. S.; RIBEIRO C. O.; CESTARI M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.27, p. 103-107. 2004.

FISKEJÖ, G. Mercury and selenium in a modified *Allium* test. **Hereditas**, **64**: 142-146. 1979.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lunds-krona, v. 102, p. 99-112. 1985.

FISKEJÖ, G.; LASSEN, C.; RENBER, L. Chlorophenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 34, p. 333-444, 1981.

FISKEJÖ, G. The *Allium-test* an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 197, p. 243-260. 1988.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MeIC chemicals in the *Allium cepa*. **Atlas**, v. 21, p. 139-149. 1993

FISKEJÖ, G. *Allium* test. **Meth Mol Biol.**, v. 43, p. 119-127. 1995.

FRANEKIC, J.; BRATULIC, N.; PAVLIKA, M.; PAPES, D. Genotoxicity of thiocarbamates and their metabolites. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 325, p. 65-74, 1994.

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single gell assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 35, p. 206-221. 2000.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genoma damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 22, n. 4, p. 249-255. 2002.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

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

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. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 426, p.107-112. 1999.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E. Investigation of coffee in *Drosophila* genotoxicity test. **Fd. Chem. Toxicol.** [S. I.], v 24, p. 835-842. 1986.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44. 2001.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. 1 ed. Brasília: Editora ULBRA, 2005. 394p.

GROVER, R., WOLT, J. D., CESSNA, A. J., SCHIEFER, H. B. Environmental fate of trifluralin. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** v. 153, p. 1-64, 1997.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium cepa* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 469, p. 183-18. 1999.

GULATI, A.; PRAKASH, S.; GUPTA, S. P. Genotoxicity testing for relative efficiency of selected pesticides on *Allium cepa*. **J. Environ. Biol.**, [S.I.], v.15, n.2, p. 89-95. 1994.

GUSTAVINO, B.; DEGRASSI, F.; FILIPPONI, R.; MODESTI, D.; TANZARELLA C. AND RIZZONI, M. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinine-stimulated human lymphocytes. **Mutagenesis**, New York, v.9, p. 17–21. 1994.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of north-america. **Science of the total environment**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 1-32. 1990.

HAYASHI, M.; TICE, R. R.; MacGREGOR, J. T.; ANDERSON, D.; BLAKEY, D. H.; KIRSCH-VOLDES, M.; OLESON, F. B. Jr.; PACCHIEROTTI, F.; ROMAGNA, F.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; VANNIER, B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.312, p.293-304, 1994.

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, K.; TANAKA, N.; TAKAI, A.; SASAKI, Y. F.; ASANO, N.; SOFUNI, T.; OJIMA, Y. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, n. 2, p. 125-133. 1998.

HAYES, H.; TARONE, R. E.; CANTOR, K. On the association between canine malignant lymphoma and opportunity for exposure to 2,4- dichlorophenoxyacetic acid. **Environmental Research**, Amsterdam, v. 70, p. 113-118, 1995.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; IRKHART, B.; MACGREGOR, J. T. E.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118. 1983.

HOOFTMAN, R. N.; DE RAAT, W. K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 104, n. 1-3, p. 147-152. 1982.

HOSE, J. R.; HANNAH, J. B.; PUFLER, H. W.; LANDOLT, M. L. Histologic and skeletal abnormalities in benzo[a]pyrene treated rainbow trout alevins. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 104, p. 104-152. 1982.

HOSE, J. R.; CROSS, J. N.; SMITH, S. G.; DIEHL, D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of Southern California. **Marine Environmental Research**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 167-176. 1987.

HUGHES, J. B.; HEBERT, A. T. Erythrocyte micronuclei in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) results of field surveys during 1980-1988 from Virginia to Nova Scotia and in Long Island Sound. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 20, p. 474-479, 1991.

KHORS, S. S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Genotoxicity of tetrodotoxin from buffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa*. **Mutagenesis**, New York, v. 12, p. 265-9. 1997.

KOPPEN, G.; TONCELLI, L. M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mechanisms of Ageing and Development**, Limerick, v. 110, n. 1-2, p.13-24. 1999.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, K. The “comet” assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia biologica**, Kraków, v. 45, n. 3-4, p.153-156. 1997.

KOVALCHUCK, O.; KOVALCHUCK, I.; ARKHIPOV, A.; TELYUK, P.; HOHN, B., KOVALCHUCK, I. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soil of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 415, n. 20, p. 47-57. 1998.

KRAMER, J.; SCHAICH-WALCH, G.; NÜSSE, M. DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti-BrdU antibodies. **Mutagenesis**, Amsterdam, v.5, p.491-495. 1990.

LANDOLT, M. L.; KOCAN, R. M. Fish cell cytogenetics: a measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 4, p. 336-353, 1983.

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

LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions. **Nature**, New York, 156 (2973): 751-752. 1945.

LEVAN, A. Chemically induced chromosome reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Biol.**, London, v. 16, p. 233-243. 1951.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAI, L. Evaluation of metal ion toxicity on root tip cells by the *Allium cepa* test. **Israel Journal of Plant Science**, Northern Greece, v. 43, p. 125-133, 1995.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, H.; ZHANG, H. An improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 334, p. 185-195. 1995.

MAcGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. R. Clastogen induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental mutagenesis**, New York, v. 2, n. 4, p. 509-514. 1980.

MAcGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HIT,E M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.198, p.103-112. 1987.

MCCARTHY, J.F.; JACOBSON, D. N.; SHUGART, L.R.; JIMENEZ, B. D. Preexposure to 3-methylcholanthrene increases benzo[A] pyrene adducts on \DNA of bluegill sunfish. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 28, n.1-4, p. 323-328. 1989.

MCNAMEE, J. P.; MCLEAN, J. R. N.; FERRAROTTO, C. L; BELLIER, P. V. Comet assay: rapid processing of multiple samples. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 466, p. 63-69, 2000.

MALLET, C.; MALLET, V. N. Conversion of a conventional packed-column gas chromatograph to accommodate megabore columns. Determination of organophosphorus pesticides in environmental waters. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.481, p.37-44. 1989.

MATSUMOTO, S. T. (2003) **Efeitos tóxicos e genotóxicos de metais pesados, especificamente do cromo trivalente e hexavalente**. Monografia (doutorado) Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto-SP, 2003.

MATSUMOTO, S. T. (2004) **Estudo sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP**. Tese de doutorado Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto-SP, 2004.

MATSUMOTO, S. T; MARIN-MORALES, M. A. .Mutagenic potencial evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tokyo, v. 69, n. 4, p. 399-408. 2004.

MATSUMOTO, S. T.; MALAGUTI, M.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxic potencial due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures, , **Caryologia**, v. 58, n. 1, p. 40-46. 2005.

MENKE, M.; CHEN, I. P.; ANGELIS, K. J.; SCHUBERT, I. DNA damage and repair in *Arabodopsi thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 493, p. 87-93. 2001.

METCALFE, D. D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows and brow bulheads. **Bulletim Environmental Contam Toxicology**, [S.I.], v. 40, p. 317-321. 1988.

METCALFE, C. D. Tests for predicting carcinogenicity in fish. **CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences**,[S.I.] v. 1, p. 111-129. 1989

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**, Amsterdam, v. 44, p. 191-208. 1987.

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. .K. Detection of DNA strand breaks in brown trout *Salmo trutta* hepatocytes and blood cells using the single-gel electrophoresis comet assay. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 41, p. 161-182, 1998.

MONTEITH, D. K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 345, n. 3-4, p. 97-103. 1995.

NATARAJAN, A. T.; OBE, G. **Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Citogenetic Assay in Mutagenecity New Horizons in Genetic Toxicology**. Ed. By J.A. Heddle. Academic Press, New York, 1982, 213p.

NIELSEN, M. N.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of *Allium* test. **Hereditas**, lund, v. 121, p. 249-254. 1994.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Chemosphere, 1985. p. 335-373.

OBE G.; BEEK B. **Premature Chromosome Condensation in Micronuclei**. New York: Academic Press, 1982.

OHYAMA, T.; JIN, K.; KATAH, Y.; CHIPA, Y.; INOVE, K. 1,3,5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) in water, sediments, and shellfish of the Ishikari river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v. 37, p 344-349. 1986.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. **Factors influencing DNA and repair in human tissues**. New York: Plenum, 1990, p. 291-301.

OLIVE, P. L.; WLODEK D.; BANÁTH, J. P. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis, *Cancer Res.*, Baltimore, v. 51, p. 4671-4676. 1991.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis, *Exp. Cell Res.*, New York, v. 198, p. 259-267. 1992.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microeletrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v. 123, p. 291-298. 1984.

PARKINSON, C.; AGIUS, C. Acute toxicity of DDT to tilapia (*Oreochromis spilurus* Gunther) in vivo and vitro. *Atlas*, Paris, v. 15, p. 298-302. 1988.

PARSON, B.; WITT, J. M. Pesticides in groundwater in the USA. A report of a 1988 survey of US States. EM8406, Oregon State University Extension Service. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, [S.I], v. 18, p. 734-747. 1989.

PAVLICA, M.; BESENDORFER.V.; ROSA, J.; PAES, D. The cytotoxic effect of wastewater from the phosphoric gypsum depot on common oak (*Quercus robur* L) and shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*). *Chemosphere*, Oxford, v. 41, p. 409-414. 2000.

PEÑA, L. F. M. **Uso do teste de micronúcleo em eritrócitos circulantes de peixes para monitorização de um local do rio Tibagi e avaliação da genotoxicidade de agrotóxicos**

em bioensaios. 1996. 199 f. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v. 246, n. 4928, p.352-358, 1989.

QUINZANI - JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Complutense, Madrid.

RAND, G. .M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications*, New York: **Chemosphere**, 1985. p.1-28.

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

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberrations assay on N-methyl-N-nitrosurea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-127. 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418, c. 3, p. 113-9. 1998.

RANK, J.; LOPEZ, L. C.; NIELSEN, M. H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v.136, p. 13-18. 2002.

RIBAS, G.; FRENZILLI, G.; BARALE, R.; MARCOS, R. Herbicide-induced damage in human lymphocytes evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 344, p. 41-54. 1995.

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.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. 355p.

RODRIGUES, R. **Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 CE (Metolachlor) sobre a Comunidade Bentônica da Zona Litoral, no Sítio São José, Município Embu-Guaçu, Estado de São Paulo.** 1993. 98p. Dissertação (Mestrado) - Depto. de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Univ. de São Paulo, São Paulo, 1993.

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S. MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 393, n. 1-2, p. 133-139. 1997.

SCHMIDT, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: **Principles and Methods for Their Detection** (Hollanender, A., ed.). New York: Plenum Press, v. 4, p31-53. 1976.

SCHULTZ, N.; NORRGREN, L.; GRAWE, J.; JOHANNISSON, A. MEDHAGE, O. Micronuclei frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) subjected to radiation, an image analysis and flow cytometric study. **Comp. Biochem. Physiol.**, New York, v. 105C, p. 207-211. 1993.

SHARMA, C. B. S. R.; PANNEERSELVAN, N. Genetic toxicology of pesticides in higher plant systems. **Crit. Ver. Plant. Sci.**, [S.I.], v. 9, pp 409-442. 1990.

SHEAFF, R.; ILSLEY, D.; KUCHTA, R.; Mechanism of DNA polymerase a inhibition by aphidicolin. **Biochemistry**, New York, v.30, p. 8590-8597. 1991.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **J. Cell. Biol.**, New York, v.140, 1307-1320p., 1998.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 175, n. 1, p. 184-191. 1988.

SINGH, J.; BRIDGEWATER, L. C.; PATIERNO, S. R. Differential sensitivity of chromium-mediated DNA interstrand crosslinks and DNA-protein crosslinks to disruption by alkali and EDTA. **Toxicology sciences** [S.I.], v. 45, n. 1, p. 72-76. 1998.

SHUGART, L., BICKMAN, J. JACKIM, G. MACMAHON, G. RIDLEY, W. STAIN, J. STEINART, S. DNA Alterations. In: Huggett, R., R. Kimerle, P. Mehrle and H. Bergman (eds.), **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**, Ann Arbor: Lewis Publ., 1992, p. 125-154.

SIKKA, H. C.; RUTKOWSKI, J. P.; KANDASWAMI, C.; KUMAR, S.; EARLEY, K.; GUPTA R. C. Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo[a]pyrene. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 49, p. 81-87. 1990.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 368, p. 171-179. 1996.

SMAKA - KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOUKAM, T. M. A. M. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research: Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 38, c. 3-4, p. 171-9. 1997.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. In: RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: **Hemisphere**, 1985. p.495-525.

STEIN, J. E.; REICHERT, W. L.; FRENCH, B.; VARANASI U. ³²P-postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in English sole exposed to benzo[a]pyrene and 7H-dibenzo(c,g)-carbazole. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v. 88, p. 55-69. 1993.

STEINERT, S. A. Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. **Marine Environmental Research**, Barking, v. 42, p.253-259, 1996.

STOPPER H.; MÜLLER S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 11, p. 661-667. 1997

TICE R. R.; ANDREWS, P. W.; SINGH, N. P. The single cell gel assay. A sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. In: B.M. Suntherland and A.D. Wordhead (Eds) **DNA damage and repair in human tissues**. New York: Plenum, 1990.

TIMBRELL, J.A. Introduction to Toxicology. 2. ed. Taylor & Francis Ed, 1999, p.167.

TUNDISI, H. S. F. **Estudo dos possíveis efeitos dos resíduos do herbicida Dual-720 CE (Metolachlor) sobre a População de Copépodos Ciclopóides, no Açude do Sítio São José, Município Embu-Guaçu, Estado de São Paulo.** 1990. 86p. Dissertação (Mestrado) - Depto. de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Univ. São Paulo, São Paulo, 1990.

UEDA, T.; HAYASHI, M.; OHTSUKA, Y.; NAKAMURA, T.; KOBAYASHI, J.; SOFUNI, T. A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. **Water Sci. Tech.**, [S.I.], v. 25, n.11, p. 235-240. 1992.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e Biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, Madri, v. 1, p. 10-13. 1998.

VEIGA, A. B. **O uso do teste de *Allium cepa* para detectar a toxicidade do inseticida Nuvacron.** 1995, 58 f. Monografia (Conclusão do curso de Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

VIDAKOVIĆ-CIFREK Z, PAVLICA M, REGULA I. PAPERS D. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p. 284-291. 2002.

VIDAKOVIC, Z.; PAPER, D.; TOMIC, M. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, Canada, v. 69, p. 413-423, 1993.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food deprivation affects sewer acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal Experimental Biology**, [S.I.], v. 199, p. 2467-2475. 1996.

VON-HOFF, D. D.; MCGILL, J. R.; FORSETH, B. J.; DAVIDSON, K. K.; BRADLEY, T. P. R. V. D. D.; WAHL, G. M. Elimination of extrachromosomally amplified Myc genes from human tumor cells reduces their tumorigenicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, [S.I.], v. 89, p. 8165-8169. 1992.

WALKER, J. A.; BOREHAM, D. R.; UNRAU, P.; DUNCAN, A. M. V. Chromosome content and ultrastructure of radiation-induced micronuclei, **Mutagenesis**, New York, v. 11, p. 419-424. 1996.

WEIRICH-SCHWAIGER, H.; WEIRICH, H. G.; GRUBER, B.; SCHWEIGER, M.; HIRSCH-KAUFMANN, M. Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 316, p. 37-8-48. 1994.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B.; BLAISE, C. Comparing the presence, potency, and potential hazard of genotoxins extracted from a broad range of industrial effluents. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 27, p. 116-39. 1996.

WÜRGLER, F. E.; VOGEL, E. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster*. In: **Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection** (De Serres, F.J., ed.). Plenum Press, New York, v. 10, pp.1-72. 1986.

YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, K.; AKIYAMA, K.; MORITA, M.; NAKAGAWA, J.; HORII, S.; KANEKO, S. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in commercial diphenyl ether herbicides, and in freshwater fish collected from the application area. **Chemosphere**, Oxford, v.10, p. 1137-1144. 1981.