

# Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo

## Cytological analysis of Deltamethrin insecticide using the Micronucleus Test

Luciane Gomes de Carvalho<sup>1</sup>; Flávio Flores Britto<sup>1</sup>; Maria Aparecida Marin-Morales<sup>2</sup>; Eliane Mariza Dortas Maffei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciências Naturais/Laboratório de Citogenética, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45083-900, Vitória da Conquista-Bahia, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia/Instituto de Biociências/Universidade Estadual Paulista "Júlio de MesquitaFilho", CEP 13506-900, Rio Claro-São Paulo, Brasil.

\*Contato: elianemaffei@yahoo.com.br

**Resumo.** O teste do micronúcleo (MN) é um ensaio *in vivo* utilizado para a detecção de agentes clastogênicos e aneugênicos. Nesse trabalho, avaliamos os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por diferentes concentrações do inseticida Deltametrina em cebola (*Allium cepa*) pelo teste de MN. No tratamento controle negativo a divisão mitótica foi normal. No entanto, em todos os tratamentos testados com as diferentes concentrações do inseticida foram observadas AC (aberrações cromossômicas) e formação de MN. Para a análise estatística foi feito o teste não paramétrico de Correlação de Spearman. O valor de  $r = 0,968$  evidencia que a correlação foi perfeitamente positiva, ou seja, quanto maior a concentração, maior foi o número de MN, confirmando que o efeito é dependente da dose do inseticida.

**Palavras-chaves.** *Allium cepa*, micronúcleo, broken-egg

**Abstract.** The micronucleus test (MN) is a widely used *in vivo* screening test to detect clastogens and aneugens. In the present work, the genotoxic and mutagenic effects induced by different concentrations of the insecticide Deltamethrin by applying the MN test in onion (*Allium cepa*) were assessed. Cells in the negative control treatment exhibited normal mitotic division. However, CAs (chromosome aberrations) and micronuclei formation were observed at all tested concentrations of the insecticide. The statistical analysis was performed using the Spearman nonparametric correlation test. The  $r = 0.968$  value showed that the correlation was strongly positive, i.e., the number of micronuclei increased as the concentration of insecticide increased, confirming that the effect was dose-dependent.

**Keywords.** *Allium cepa*, micronucleus, broken-egg

### Introdução

Agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossômicas) ou aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) podem ser detectados, em uma primeira abordagem, pelo Teste do Micronúcleo (Heddle, 1973). Este teste é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Os micronúcleos são formações globulares de DNA, originados a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, não incorporados ao núcleo da célula filha ao final do processo de divisão celular (Fenech *et al.*, 1999). O Teste de Micronúcleos foi desenvolvido inicialmente em eritrócitos de medula óssea de camundongos (Takahashi *et al.*, 2004). A espécie *Allium cepa*

(cebola) tem sido utilizada como organismo teste em diversos trabalhos, com o objetivo de identificar químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos (Matsumoto *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007; Caritá e Marin-Morales, 2008; Leme e Marin-Morales, 2008). As células dos meristemas radiculares dessa espécie apresentam características que as tornam um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de mutações cromossômicas induzidas por poluentes ambientais (Ateeq *et al.*, 2002).

O inseticida Deltametrina é um biocida sintético, pertencente ao grupo químico piretroide, amplamente utilizado no Brasil, destacando-se o uso na agricultura, em produtos veterinários, no controle de insetos domésticos, e em saúde pública, principalmente no controle de vetores. Apresenta um amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose, baixo poder residual e, adicionalmen-

Recebido:  
14dez2015  
Aceito:  
16ago2016  
Publicado:  
25ago2017

Editado por Carlos  
Vilela e revisado  
por Anônimo

te, é praticamente atóxico para mamíferos, quando comparado a outros inseticidas. Embora a literatura relate baixa toxicidade para mamíferos, as pesquisas toxicológicas recentes, apontam que os piretroides estão entre os pesticidas mais tóxicos para organismos aquáticos, tais como peixes, crustáceos e insetos como abelhas (Santos *et al.*, 2007). No entanto, o uso indiscriminado de piretroides pode afetar drasticamente o equilíbrio já precário do meio ambiente, requerendo seu monitoramento pelas análises de seus resíduos e de seus efeitos (Barrionuevo e Lancas, 2001).

O objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por diferentes concentrações do inseticida Deltametrina, grupo químico piretroide sintético, avaliando células meristemáticas de *A. cepa* pelo Teste de Micronúcleos (MN). Investigamos também o efeito dose-resposta do inseticida Deltametrina na indução de micronúcleos.

## Material e Métodos

Os ensaios foram realizados no laboratório de Citogenética da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foram utilizadas sementes de *A. cepa* variedade Baia Periforme que foram acondicionadas em placas de Petri e forradas com papel filtro de germinação. O experimento foi conduzido contendo cinco tratamentos com três repetições cada. O tratamento T1 foi o controle negativo montado com água destilada e 10 sementes em cada placa de petri, totalizando 30 sementes por tratamento. Os outros tratamentos foram realizados com diferentes concentrações de Deltametrina: T2 a 0,4%; T3 a 0,8% (dose recomendada); T4 a 1,6% e T5 a 3,2% e adicionou-se as 10 sementes em cada placa de petri. A germinação se deu em temperatura de

25°C, as raízes foram coletadas com 1 cm de comprimento, fixadas em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) e armazenadas a 2°C. As pontas das raízes foram coradas pelo método de Feulgen (Mello e Vidal, 1978). As lâminas foram preparadas para análise microscópica por esmagamento das pontas de raiz com carmim acético 2% e montadas permanentes com bálsamo do Canadá. A análise dos MN foi feita contando 1.000 células interfásicas por indivíduo, totalizando 3.000 células por tratamento e 15.000 células em todo o experimento. Como critério de inclusão para a análise consideramos as células com as membranas citoplasmáticas intactas. Os micronúcleos não excederam mais do que 1/3 do tamanho do núcleo. Para análise estatística utilizou-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences for Windows*, versão 11.0. As variáveis quantitativas foram descritas por meio das médias. Para verificar a normalidade dos dados foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov, considerando  $p \leq 0,05$ . Para verificar a correlação entre as variáveis em estudo foi aplicado o teste não-paramétrico de Spearman. O nível de significância adotado foi de 1%, sendo considerados significativos valores de  $p \leq 0,01$ . As variáveis qualitativas foram apresentadas por meio de frequências absolutas e relativas.

## Resultados

O estudo citogenético pelo teste de MN com *A. cepa* em contato com diferentes dosagens de inseticida piretroide (deltametrina) apresentou os resultados detalhados na Tabela 1.

No T1 que foi o controle negativo não foram observadas células com MN. No entanto, em T2 já foi observado células com MN. Pode-se observar que a frequência média de micronúcleos por tratamento teve um aumento gradual na indução de micronúcleo, desde o T2 (0,6%) até o T5 (3,6%). No entanto,

**Tabela 1.** Total de micronúcleos (MN), média e frequência (em %) de MN em diferentes concentrações de Deltametrina. TM = Total de MN: T1= Controle negativo; T2= 0,4%; T3=0,8%-dose recomendada; T4=1,6% e T5=3,2%.

Tratamento	TM	Média	%
T1	0,0	-0,0	-
T2	18	6,0	0,6%
T3	28	9,3	0,9%
T4	32	10,6	1%
T5	109	36,3	3,6%

como se pode observar na Tabela 01, as médias de micronúcleos nos tratamentos T2, T3 e T4 apresentaram proximidade de valores, diferente do que foi observado no T5.

Antes de verificarmos a correlação, aplicamos o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade das amostras. Não seguimos esse pressuposto ( $p < 0,05$ ), devido ao pequeno tamanho da amostra. Aplicamos o teste não paramétrico Correlação de Spearman. O valor de  $r = 0,968$  nos mostra que a correlação foi perfeitamente positiva, ou seja, a medida que se aumentou a concentração maior foi o número de micronúcleos, confirmando que o efeito é dependente da dose do inseticida. O valor  $p = 0,007$  significa que a correlação foi estatisticamente significativa (Fig. 1).

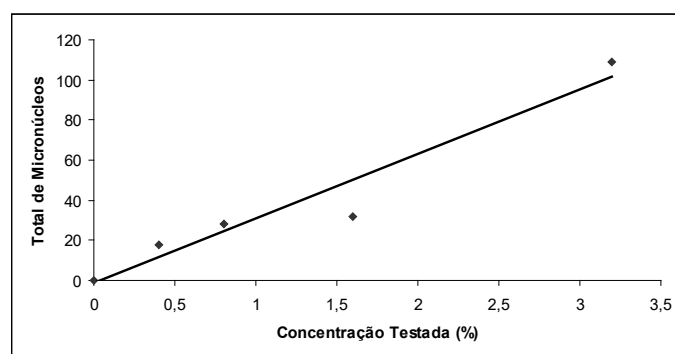
### Análise qualitativa do experimento pelo teste de MN

No tratamento controle negativo não foram observadas células com MN nem com outras AC. A análise das lâminas evidenciou a presença de AC em todos os tratamentos com o inseticida. Foram observadas quebras cromossômicas, alteração na estrutu-

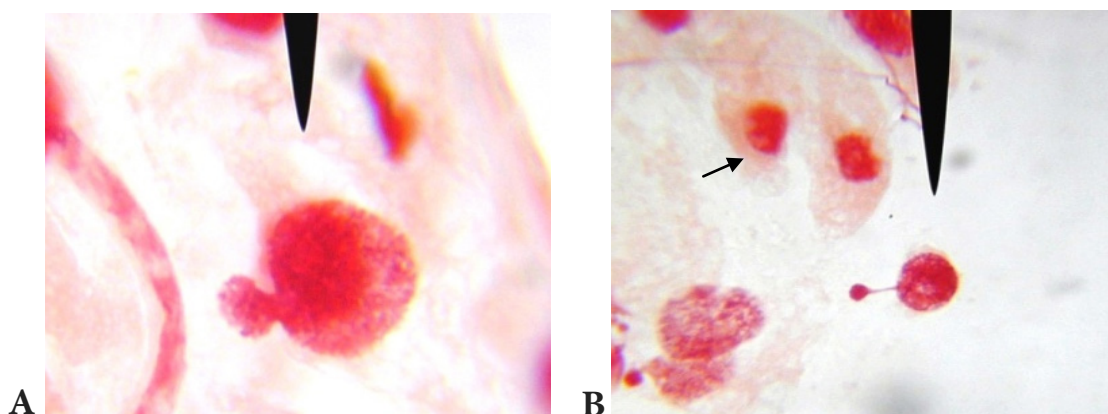
ra dos cromossomos como cromátides distendidas, pontes anafásicas (com variação no número de pontes), perda de cromossomos inteiros, c-metáfases (*colchicine metaphases*), células binucleadas, com maior ocorrência no tratamento T5 (Fig. 3). Nos testes realizados no presente trabalho, utilizamos algumas concentrações acima da dose recomendada e encontramos outros tipos celulares não descritos em bioensaios com *A. cepa*, como broto nuclear e MN ainda ligado por filamento cromático ao núcleo, semelhantes a *broken-eggs* (Fig. 2).

### Discussão

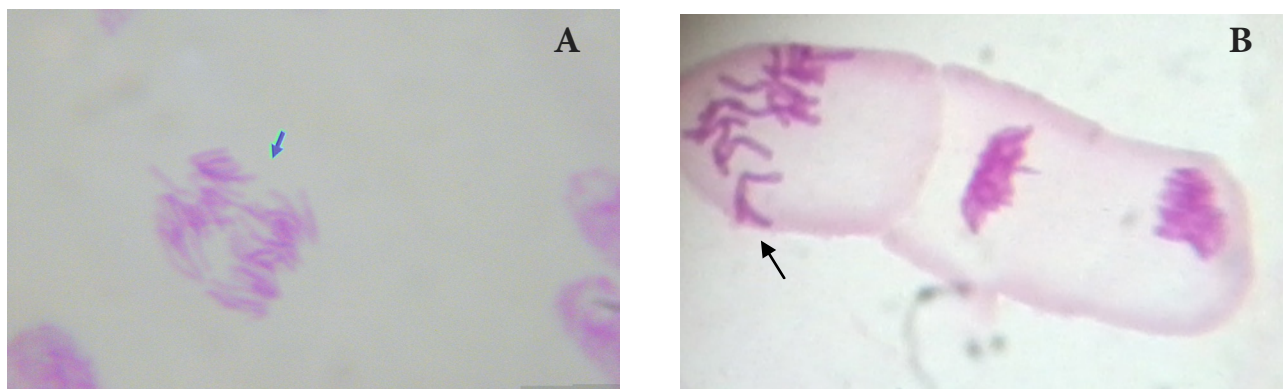
No experimento não se detectou células micronucleadas no controle negativo, embora a literatura científica aponte que a taxa espontânea de MN é na ordem de 3/1000 células analisadas (Mélo *et al.*, 2008). Nos resultados do experimento, partindo da premissa que a frequência normal é de até três MN por 1.000 células (0,3%) estabelecida por Rabello-Gay *et al.* (1991), observamos a ocorrência de atividade mutagênica com sementes de *A. cepa* tratadas em todas as concentrações testadas com o inseticida piretroide (deltametrina). O índice observado de mi-



**Figura 1.** Teste de Correlação de Spearman,  $r = 0,968$ . Quanto maior a concentração de Deltametrina maior foi o número de MN.



**Figura 2.** T5. A seta maior aponta, em A, um broto nuclear (100X) e, em B, um *Broken-egg* (40X). A seta menor aponta, em B, uma célula normal.



**Figura 3.** T5. A seta aponta, em A, pontes na anáfase (40X). A seta aponta, em B, uma c-metáfase (*colchicine metaphase*) (40X).

cronúcleo no T2 (concentração 0,4%) demonstrou que o deltametrina pode causar danos ao DNA. O resultado está de acordo com a literatura (Tice *et al.*, 2000). A deltametrina é muito utilizada em culturas vegetais, no combate a ectoparasitas e insetos, sendo que foi encontrado resíduo em vários vegetais, leite bovino, dejetos de suínos e aves. É um pesticida que pode causar danos ao meio ambiente e ao homem, principalmente se os resíduos se encontram acima dos limites toleráveis (Winston, 1991).

O efeito citológico do inseticida deltametrina foi relatado por Karnopp *et al.* (1999) em cevada (*Hordeum vulgare* L.), como agente provocador de aberrações cromossômicas. Além disto, os autores relataram que os agroquímicos parecem atuar negativamente sobre as células, pois o material tratado apresenta células vazias e cromossomos desnaturados, bem diferentes daqueles encontrados no material testemunha. Também têm sido descrita, por diversos autores que em várias espécies tratadas com agentes químicos, como no fungo *Rhizoclonium* sp. (vide Verma e Jha, 1988) e milho (*Zea mays*) (vide Athanasiou e Heddle, 1980) a ocorrência de alterações cromossômicas estruturais e numéricas.

Embora os tipos celulares descritos neste Bioensaio com *A. cepa*, como brotos nucleares e *broken-eggs* não tenham sido relatados anteriormente, a ocorrência é frequente nos animais principalmente em peixes (Maschio, 2009). Estes resultados reforçam a boa correlação deste sistema-teste com outros sistemas, inclusive com mamíferos, estando de acordo com Grant (1982). Sugerem ainda um aumento no potencial genotóxico e carcinogênico do inseticida testado quando utilizado de forma inadequada melhantes a *broken-eggs* (Fig. 2).

### Referências Bibliográficas

Ateeq B, Farah A, Niamat A., Ahmad A. 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by

- Allium root tip test. Mutation Research 514: 105-113, Athanasiou K, Hedlle JAEMS. 1980. Induced mutation rates and their relation to genome size. Can. J. Gen. Cytol. 22: 455. Barrionuevo WR, Lancas FM. 2001. Extração em fase sólida e micro extração em fase sólida de piretróides em água. Quim. Nova. 2: 172-175. Caritá R, Marin-Morales MA. 2008. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. Chemosphere 72: 722-725. Fenech M, Holland N, Wushou PC, Zeiger E, Bonassi S. 1999. The Human Micronucleus Project – an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutation Research 428: 271-283. Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology 88: 252-259. Grant W. 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. Mutation Research 281: 89-92. Hedlle JA. 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research 18: 187-190. Karnopp L, Costa FLC, Loeck AE, Amaral CO. 1999. Efeitos citológicos do inseticida piretróide deltametrina em cevada (*Hordeum vulgare* L.). Rev. Bras. de Agrociência 5: 131-134. Leme DM, Marin-Morales MA. 2008. Chromosome aberration and Micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. Mutation Research 650: 80-86. Maschio LR. 2009. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP. Tese de Doutorado em Genética. IBILCE- UNESP, 208p. Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genetics and Molecular Biology 29: 148-158. Mello MLS, Vidal BC. 1978. A reação de Feulgen. Ciência e Cultura 30: 665-676. Mélo MEB, Merlo KC, Fernandes RRC, Luna CF, Diniz GTN, Catanho MTJA, Regis L. 2008. Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula

- óssea de camundongos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67: 196-201.
- Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. (Eds). 1991. *Mutagenese, carcinogenese e teratogenese: métodos e critérios de avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 246 p.
- Santos MAT, Areas MA, Reyes FGR. 2007. Pyrethroids: a review. *Alim. Nutr.* 18: 339-349.
- Takahashi CS, et al Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo. Disponível: <http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>. Acesso em 10 de dezembro de 2009.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Myamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35: 206-221.
- Verma BN, Jha CN. 1988. Effect of diethyl sulphate on *Rhizoclonium Kuetz*. *Cytologia* 53:283-286.
- Winston GW. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100: 173-176.