EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO HERBICIDA TEBUTIUROM EM CONCENTRAÇÕES DE CAMPO NO MODELO *ALLIUM CEPA*

Lucas Rodrigues Fraga[1], Victor Ventura de Souza[1], Rodrigo Alves Catein[1], Ludmila da Silva Figueira Barone[2], Enrico Mendes Saggioro[2], Tatiana da Silva Souza[1]

[1]Universidade Federal do Espírito Santo, Campus de Alegre, Alto Universitário, s/n, Bairro Guararema – 29500-000 – Alegre-ES, Brasil, lucas.r.fraga@edu.ufes.br, victor.ventura@ufpe.br, rodrigo.catein@edu.ufes.br, tatianas.souza@hotmail.com.
[2]Fundação Oswaldo Cruz, Campus Manguinhos, Avenida Brasil, número 4365, Bairro Manguinhos – 21040-900 – Rio de Janeiro – RJ, Brasil, ludmila.fbarone@gmail.com, enrico.saggioro@fiocruz.br

Resumo

O tebutiurom é um herbicida amplamente utilizado na agricultura, porém há uma notável escassez de estudos sobre seus impactos genéticos em organismos não-alvo. Este estudo teve como objetivo avaliar a citogenotoxicidade do tebutiurom utilizando o sistema-teste *Allium cepa*. Raízes foram expostas a diferentes concentrações do agrotóxico, tendo como referência a dose de campo recomendada (2,38 mg/kg). A análise do índice mitótico e das aberrações cromossômicas revelou um forte potencial tóxico do composto. Observou-se uma inibição severa da proliferação celular e a indução de danos críticos no DNA a partir da concentração de campo. A alteração predominante em todos os tratamentos foi a formação de pontes cromossômicas, indicando falhas graves na separação das cromátides. Conclui-se que o tebutiurom apresenta elevada citogenotoxicidade mesmo nas concentrações de uso agrícola, alertando para os riscos ecológicos e a necessidade de reavaliação de seus impactos ambientais.
Palavras-chave: Agrotóxico, Ecotoxicologia Terrestre, Genotoxicidade.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas - Genética

Introdução

O tebutiurom (do inglês *tebutiurom*; 1-(5-tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilureia; CAS nº 34014-18-1) é um herbicida da classe química das uréias substituídas, amplamente utilizado para o controle de plantas daninhas em culturas de cana-de-açúcar e em pastagens (MAPA, 2020). Seu mecanismo de ação consiste no bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II, o que resulta na formação de moléculas de clorofila em estado altamente energético. Essas moléculas reagem com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que interagem com os lipídios das membranas celulares. Esse processo promove a peroxidação lipídica e, consequentemente, causa danos severos aos organismos-alvo (Bernardes; Dorta, 2016; Hess, 2000; Kruse et al., 2001).

Apesar de seu amplo uso e do conhecimento sobre seu mecanismo de ação, os estudos sobre o comportamento e os impactos do tebutiurom no ambiente terrestre concentram-se, majoritariamente, na avaliação da fitotoxicidade (Bicalho; Langenbach, 2013; Dam et al., 2004; Olson; Whitson, 2002; Wang et al., 2019). Consequentemente, há uma notável escassez de pesquisas que investiguem seus efeitos em nível celular e genético, evidenciando uma lacuna na literatura sobre sua citogenotoxicidade.

Para preencher essa lacuna, a utilização de bioensaios com espécies de plantas-modelo apresenta-se como uma estratégia recomendada e eficaz para a investigação da toxicidade de agrotóxicos (US EPA, 1996; OECD, 2006). Dentre as metodologias disponíveis, os ensaios de citogenotoxicidade destacam-se por serem rápidos, sensíveis e confiáveis, respondendo à ação de substâncias químicas de maneira preditiva e similar a outros sistemas-teste (WHO, 1985).

Nesse contexto, o sistema-teste *Allium cepa* tornou-se um dos bioindicadores vegetais mais utilizados devido à sua alta sensibilidade e adequação para avaliações citogenotóxicas (Leme; Marin-Morales, 2009; Pantano et al., 2021; Camilo-Cotrim et al., 2022; Souza et al., 2023; Braga et al., 2024). Com base nisso, o presente estudo utilizou esse modelo para investigar os efeitos do tebutiurom, avaliando o agrotóxico na concentração de campo recomendada para a cultura da cana-de-açúcar.

Metodologia

Agrotóxico e concentrações

Foi utilizada a formulação comercial Combine 500 SC®, composta por 50% do ingrediente ativo (i.a.) tebutiurom. A escolha das concentrações de teste baseou-se na dosagem recomendada para aplicação na cultura de cana-de-açúcar, correspondente a 2,4 L do produto comercial por hectare (2,4 p.c./ha), equivalente a 1200 g de ingrediente ativo por hectare (1200 g i.a./ha). A concentração de 2,72 mg/kg foi testada como a concentração de campo recomendada. Duas concentrações abaixo (1,19 e 2,38 mg/kg) e uma concentração acima desta (4,76 mg/kg) também foram investigadas.

Bioensaios com *Allium cepa*

Sementes de *A. cepa* (2n = 16), variedade Baia Periforme, livres de tratamento prévio com produtos fitossanitários, foram obtidas da Top Seed Blueline®. As sementes foram distribuídas em placas de Petri (90x15 mm) contendo 40 gramas de solo por placa, sendo realizado em triplicata. Para o controle negativo foi utilizado água mineral Ingá®. A CRA (capacidade máxima de retenção de água) foi ajustada para 60%, sendo 11 ml para cada 120 gramas de solo. As placas foram mantidas a 25,0 ± 1,0 °C no escuro até que as raízes atingissem aproximadamente 2,0 cm, o que ocorreu após cerca de 92 h. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy I (etanol:ácido acético, 3:1) e armazenadas a −20 °C. Para a análise, os meristemas radiculares foram hidrolisados em HCl 1 N por 20 min e corados com reativo de Schiff por 2 h no escuro. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e analisadas em microscópio óptico com aumento de 400×.

Foi analisado um total de 6.000 células por tratamento, distribuídas em 6 lâminas avaliando 1000 células por réplica. A citotoxicidade foi avaliada por meio do índice mitótico (IM) e dos índices de fase. O IM foi calculado como:

$$\mathrm{IM}(\%) = \frac{\textit{número de células em mitose}}{\textit{número total de células analisadas}} \times 100$$

Os índices de fase foram calculados como:

$$IF(\%) = \frac{\textit{número de células em uma fase mitótica específica}}{\textit{número total de células em mitose}} \times 100$$

A porcentagem de células com anormalidades cromossômicas foi calculada como:

$$AC(\%) = \frac{\textit{número de células com anormalidades cromossômicas}}{\textit{número total de células analisadas}} \times 100$$

Como as observações microscópicas foram provenientes de uma placa por tratamento, as células e lâminas individuais foram tratadas como subamostras, em vez de réplicas biológicas independentes.

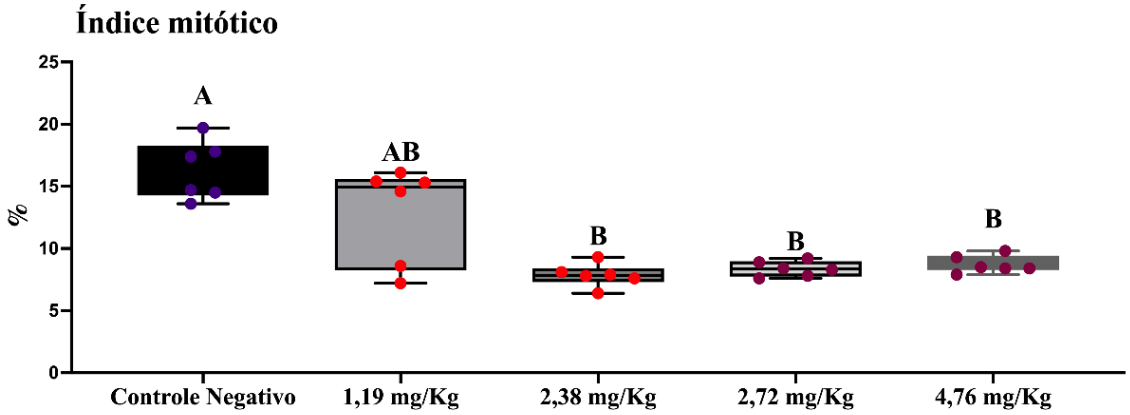
Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos nos ensaios com *A. cepa* foi iniciada com o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade das distribuições. Como os dados apresentaram normalidade e homogeneidade de variância, aplicou-se a análise de variância de via única (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$). A análise foi conduzida comparando todos os grupos experimentais entre si e, adicionalmente, comparando cada concentração testada com seu respectivo grupo controle, com o objetivo de identificar diferenças estatisticamente significativas. Todas as análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism, versão 9.5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

A avaliação citotóxica revelou que o agrotóxico reduziu significativamente o índice mitótico a partir da concentração de campo (2,72 mg/kg) até a maior dose testada (4,76 mg/kg), diferindo estatisticamente do controle negativo. A menor concentração (1,19 mg/kg) apresentou uma tendência de queda, mas não diferiu estatisticamente do controle para este parâmetro (Figura 1).

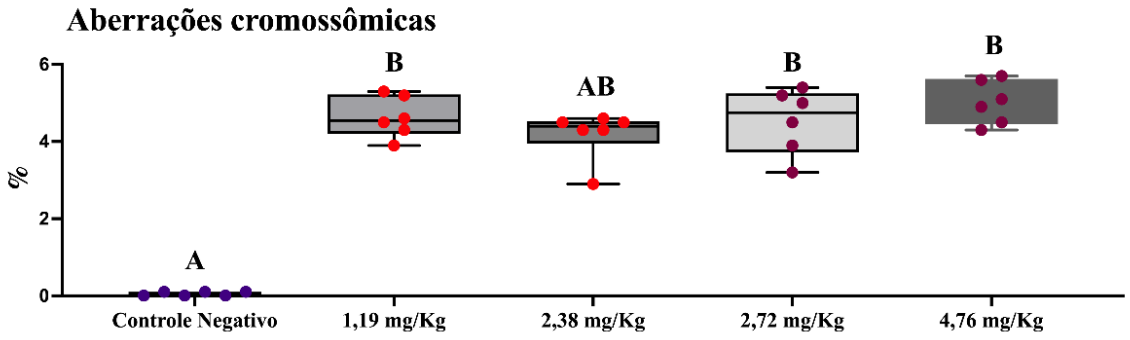
Figura 1. Efeito de diferentes concentrações do agrotóxico sobre o índice mitótico (%) em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. A concentração de 2,38 mg/kg corresponde à dose recomendada para o campo. Letras distintas sobre os gráficos indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Em relação à genotoxicidade, as concentrações de 1,19, 2,72 e 4,76 mg/kg induziram um aumento significativo nas aberrações cromossômicas totais em comparação ao controle negativo, que exibiu taxas de dano próximas a zero. A concentração de 2,38 mg/kg apresentou um perfil estatístico intermediário para as aberrações totais, não diferindo significativamente do controle nem das demais concentrações (Figura 2).

Figura 2. Frequência total de aberrações cromossômicas (%) em células de *A. cepa* expostas ao controle negativo e a concentrações crescentes do agrotóxico. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

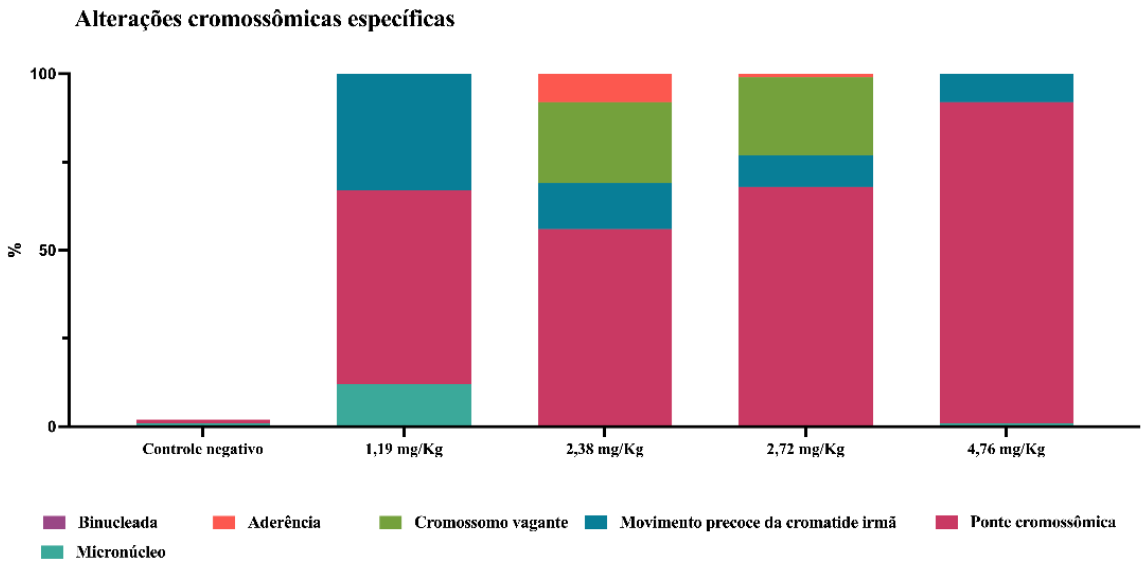


Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A análise qualitativa demonstrou um forte contraste com a integridade do DNA observada no controle negativo, todos os tratamentos induziram alterações. A ponte cromossômica foi o dano predominante em todas as concentrações expostas, incluindo a de campo. Adicionalmente, observou-se a indução de cromossomos vagrantes, movimento precoce da cromátide irmã, micronúcleos e

aderência cromossômica, com a maior concentração (4,76 mg/kg) resultando em um perfil quase exclusivamente dominado por pontes cromossômicas (Figura 3).

Figura 3. Proporção das alterações cromossômicas específicas (%) observadas nas células de *A. cepa* após exposição ao controle negativo e às diferentes concentrações do agrotóxico. As cores nas barras representam os diferentes tipos de anomalias identificadas em cada tratamento.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Discussão

A redução significativa do índice mitótico a partir da concentração de 2,38 mg/kg evidencia o potencial citotóxico do agrotóxico, sugerindo a indução de parada do ciclo celular como resposta a danos no DNA ou estresse nas vias regulatórias da divisão tais como CDK/Ciclinas (Adams et al., 2024). Em paralelo, o aumento das aberrações cromossômicas totais confirma a ação genotóxica do herbicida. A predominância absoluta de pontes cromossômicas em todos os tratamentos culminando em um perfil quase exclusivo na maior dose (4,76 mg/kg) indica falhas críticas na separação das cromátides irmãs durante a anáfase. Mecanisticamente, essas pontes refletem catenação persistente do DNA associada a falhas na topoisomerase II (Lin et al., 2024), além de quebras seguidas de religação incorreta ou recombinação mitótica (Chu et al., 2022; Ray et al., 2025). A indução simultânea de cromossomos vagantes, movimento precoce da cromátide irmã e aderência cromossômica aponta para a desestabilização dos microtúbulos e erros durante o *checkpoint* (Makrakis, 2023; Stolz et al., 2023). Por fim, a falha nesse controle permite a progressão celular com ligações cromossômicas instáveis (Qu et al., 2021), o que, somado à presença de micronúcleos, corrobora um cenário de alterações cromossômicas (Nuha, 2022; Adams et al., 2024).

Conclusão

Em síntese, este estudo demonstra que o herbicida tebutiurom apresenta elevado potencial citotóxico e genotóxico, mesmo nas concentrações recomendadas para aplicação em campo. A exposição ao agrotóxico induziu a inibição severa da proliferação celular e provocou danos críticos no DNA, evidenciados pela alta frequência de pontes cromossômicas no modelo *A. cepa*. A relevância desta pesquisa reside no preenchimento de uma lacuna crítica na literatura científica, que até então se concentrava majoritariamente na fitotoxicidade do composto. O impacto destes achados acende um alerta direto para as práticas agrícolas e para o monitoramento ambiental. A comprovação de que a dose de campo é suficiente para desencadear toxicidade genética em organismos não-alvo ressalta a necessidade urgente de reavaliar os riscos ecológicos, os limites de segurança e as políticas de uso deste herbicida.

Referências

ADAMS, D. J. et al. Genetic determinants of micronucleus formation *in vivo*. **Nature**, v. 627, p. 130-136, 2024. DOI: 10.1038/s41586-023-07009-0.

BERNARDES, M. F. F.; DORTA, D. J. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiurom e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular. 2016. 2016. Disponível em: https://repositorio.usp.br/item/002780265. Acesso em: 26 mai. 2025.

BICALHO, S. T. T.; LANGENBACH, T. The fate of tebuthiuron in microcosm with riparian forest seedlings. **GEODERMA**, Web of Science ID: WOS:000322751700008, Amsterdam, v. 207, p. 66–70, out. 2013.

BRAGA, A. P. A.; SOUZA, L. R. de; LIMA, M. G. F.; GONÇALVES, M. de M. C.; MARIN-MORALES, M. A. A study on phytogenotoxicity induced by biogenic amines: cadaverine and putrescine. **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**, v. 31, p. 30902-30913, 2024. Disponível em: doi.org/10.1007/s11356-024-33328-4. Acesso em: 25 ago. 2026.

CAMILO-COTRIM, C. F.; BAILÃO, E. F. L. C.; ONDEI, L. S.; CARNEIRO, F. M.; ALMEIDA, L. M. What can the *Allium cepa* Test say about pesticide safety? A review. **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH INTERNATIONAL**, v. 29, p. 48088-48104, 2022. Disponível em: doi.org/10.1007/s11356-022-20695-z. Acesso em: 25 ago. 2026.

CHU, L. et al. Sister chromatids separate during anaphase in a three stage program as directed by interaxis bridges. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 119, e2123363119, 2022. DOI: 10.1073/pnas.2123363119.

DAM, R. A. et al. Ecological Risk Assessment of Tebuthiuron Following Application on Tropical Australian Wetlands. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 1069–1097, dez. 2004.

HESS, F. D. Light-dependent herbicides: an overview. **Weed Science**, [S. l.], v. 48, n. 2, p. 160–170, abr. 2000.

KRUSE, N. D. et al. Sinergismo potencial entre herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. **Ciência Rural**, [S. l.], v. 31, p. 569–575, ago. 2001.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* Test in environmental monitoring: a review on its application. **MUTATION RESEARCH/REVIEWS IN MUTATION RESEARCH**, v. 682, p. 71-81, 2009. Disponível em: doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002. Acesso em: 25 ago. 2026.

LIN, H. C. et al. *Drosophila* Ring Chromosomes Interact with Sisters and Homologs to Produce Anaphase Bridges in Mitosis. **bioRxiv**, 2024. DOI: 10.1101/2024.08.08.607186.

MAKRAKIS, L. R. Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. **Cancer Research Supplement**, 2023. DOI: 10.1158/0008-5472.c.6499536.v1.

MAPA. Combine 500 SC - Bula completa Agrofit. [S. l.: s. n.], 2020.

NUHA, U. Cytokinesis blocked micronuclei aberration analysis. **Methods in Molecular Biology**, v. 2540, p. 161-174, 2022. DOI: 10.1007/978-1-0716-2433-3_9.

OLSON, R. A.; WHITSON, T. D. Restoring structure in late-successional sagebrush communities by thinning with tebuthiuron. **RESTORATION ECOLOGY**, Web of Science ID: WOS:000174646200017, Malden, v. 10, n. 1, p. 146–155, mar. 2002.

PANTANO, G.; AQUINO, F. W. B.; PEREIRA FILHO, E. R.; MOZETO, A. A.; FADINI, P. S. Toxicity of the sawdust used for phosphorus recovery in a eutrophic reservoir: experiments with *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**, v. 28, p. 18276-18283, 2021. Disponível em: doi.org/10.1007/s11356-020-11868-9. Acesso em: 25 ago. 2026.

QU, L. et al. Plant casein kinases phosphorylate and destabilize a cyclin-dependent kinase inhibitor to promote cell division. **Plant Physiology**, v. 187, p. 917-930, 2021. DOI: 10.1093/plphys/kiab284.

RAY, K. K. et al. The ultrafine-bridge-associated endonuclease ANKLE1 is stimulated by tension in DNA to process branch-points. **bioRxiv**, 2025. DOI: 10.1101/2025.07.17.664873.

SOUZA, V. V. de; SOUZA, T. da S.; CAMPOS, J. M. S. de; OLIVEIRA, L. A. de; RIBEIRO, Y. M.; HOYOS, D. C. de M.; LACERDA, S. M. D. S. N. Ecogenotoxicity of environmentally relevant atrazine concentrations: a threat to aquatic bioindicators. **PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY**, v. 189, p. 105297, 2023. Disponível em: doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105297. Acesso em: 25 ago. 2026.

STOLZ, A. et al. Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole efficiently kills cancer cells. **Cancer Research Supplement**, 2023. DOI: 10.1158/0008-5472.c.6499536.

US EPA. Seed germination/root Elongation Toxicity Test. OPPTS 850.4200, EPA 712/C-96/154. Ecological Effects Test Guidelines. Washington, DC: US Environmental Protection Agency, 1996.

WANG, J. et al. Tests of Hexazinone and Tebuthiuron for Control of Exotic Plants in Kauai, Hawaii. **FORESTS**, Web of Science ID: WOS:000482080800033, Basel, v. 10, n. 7, p. 576, jul. 2019.