

THAIS LEPREVOST DE MEDINA

**FARMACOLOGIA CELULAR: ALGUNS ASPECTOS DAS
MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS PRODUZIDAS NAS RAÍZES DE
Allium ampeloprasum L. QUANDO CRESCIDAS EM CULTURA
HIDROPÔNICA NA PRESENÇA DA DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS)**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universida-
de Estadual de Campinas, para obten-
ção do grau de MESTRE EM FARMACO-
LOGIA.

Orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Neder

PIRACICABA

1982

THAIS LEPREVOST DE MEDINA

**FARMACOLOGIA CELULAR: ALGUNS ASPECTOS DAS
MODIFICAÇÕES MORFOLÓGICAS PRODUZIDAS NAS RAÍZES DE
Allium ampeloprasum L. QUANDO CRESCIDAS EM CULTURA
HIDROPÔNICA NA PRESENÇA DA DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS)**

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, Universida-
de Estadual de Campinas, para obten-
ção do grau de MESTRE EM FARMACO-
LOGIA.

Orientador Prof. Dr. *Antônio Carlos Neder*

P I R A C I C A B A

1 9 8 2

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Farmacologia é definida como a Ciência que estuda a ação das drogas na matéria viva. É evidente que o efeito farmacológico se exerce, em última análise, sobre as células; não existe Farmacologia que não seja celular ...

A Farmacologia celular examina a estrutura, ultra estrutura e as propriedades das células, dos tecidos e dos órgãos, recorre à ultracentrifugação de homogenados a fim de analisar separadamente as diferentes organelas intracelulares.

As células dos meristemas primários, muito se assemelham às células animais, possuem ultra estruturas que se avisinham, por isso, os meristemas radiculares são preferidos e utilizados para estudos farmacológicos, CAMUS & LANCE (1955); LACHARME (1961); NÉTIEN (1960) e GUY DEYSSON (1963).

Ao Professor Doutor *Antonio Carlos Neder*, Profes
sor Titular de Farmacologia da Faculdade de Odon
tologia de Piracicaba, agradecemos a orientação
e a interpretação dos resultados conseguidos du-
rante o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos Professores Doutores *Armando Octávio Ramos*
e *Wílma Pereira Bastos Ramos*, patronos de nos-
sa carreira professoral, nosso sincero agrade-
cimento.

O Autor agradece ao Professor Doutor *Gilberti Moreno*, Digníssimo Diretor do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, o apoio e incentivo prestados ao nosso ideal, o espírito público e universitário com que trata das causas que, embora modestas, contribuam para o engrandecimento do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola.

Agradecemos a Professora Doutora *Ely Carvalho Vasconcellos de Moura*, orientadora do Departamento de Bioquímica, a dedicação demonstrada conduzindo com acêrto os trabalhos por nós realizados.

Aos colegas do Grupo Bioquímico do Departamento de Bioquímica do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, "Campus" de Botucatu, Professores Doutores *Ney Lobato Rodrigues*, *Celso R.ssi*, *Oswaldo Galvão Brasil*, *Alice Marie Muniz Tamburini*; do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Professores Doutores *Samir Tufic Arbex* e *Luiz Valdrigh*; técnicos e auxiliares de ambas as instituições, agradeço a amizade e o apoio que me foram prestados.

Nosso agradecimento ao Departamento de Bioestatística do Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, "Campus" de Botucatu, em especial aos Professores Doutores *Sheila Zambello de Pinho* e *Messias Carlos Galvão Gomes*, o estudo e a interpretação estatística dos resultados que foram conseguidos no presente trabalho.

CONT E Ú D O

INTRODUÇÃO	1
REAGENTE BIOLÓGICO	1
ANTECEDENTES	5
MATERIAL E MÉTODOS	7
1 - REAGENTE BIOLÓGICO	7
2 - DROGAS E CONCENTRAÇÃO	8
3 - TRATAMENTO	10
4 - MORFOLOGIA DAS RAIZES DE <i>Allium</i>	11
5 - MICROTÉCNICA	12
6 - COLORAÇÃO	13
7 - PREPARO DO CLOROCARMINATO	13
8 - COLORAÇÃO PELO CLOROCARMINATO	14
9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA	14
10 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR	15
11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	16
RESULTADOS	18
1 - MODIFICAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS	20
2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	21
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	37
RESUMO	38
BIBLIOGRAFIA	39

LEGENDA DOS QUADROS

QUADRO 1 - Análise de variância dos dados de comprimento de raiz, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)	23
QUADRO 2 - Análise de variância dos dados de comprimento de raiz, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)	24
QUADRO 3 - Crescimento médio das raízes por droga, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)	25
QUADRO 4 - Crescimento médio das raízes por tempo de tratamento, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)	26
QUADRO 5 - Crescimento médio das raízes por droga e tempo de tratamento, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)	27
QUADRO 6 - Equações de regressão por droga e por tempo de tratamento (dados transformados com a média da testemunha correspondentes $\bar{X}_T - X$)	28

INTRODUÇÃO

REAGENTE BIOLÓGICO

O meristema radicular adquiriu real importância como reagente biológico quando WASIELEWSKI (1902) empregou a célula vegetal nas pesquisas farmacológicas. As células dos meristemas radicular e caulicular, a princípio embrionários e não diferenciados, possuem ativo metabolismo; evoluindo, dão origem a tecidos diferenciados, Figura 1, cujos parâmetros normais podem ser alterados sob os efeitos das drogas.

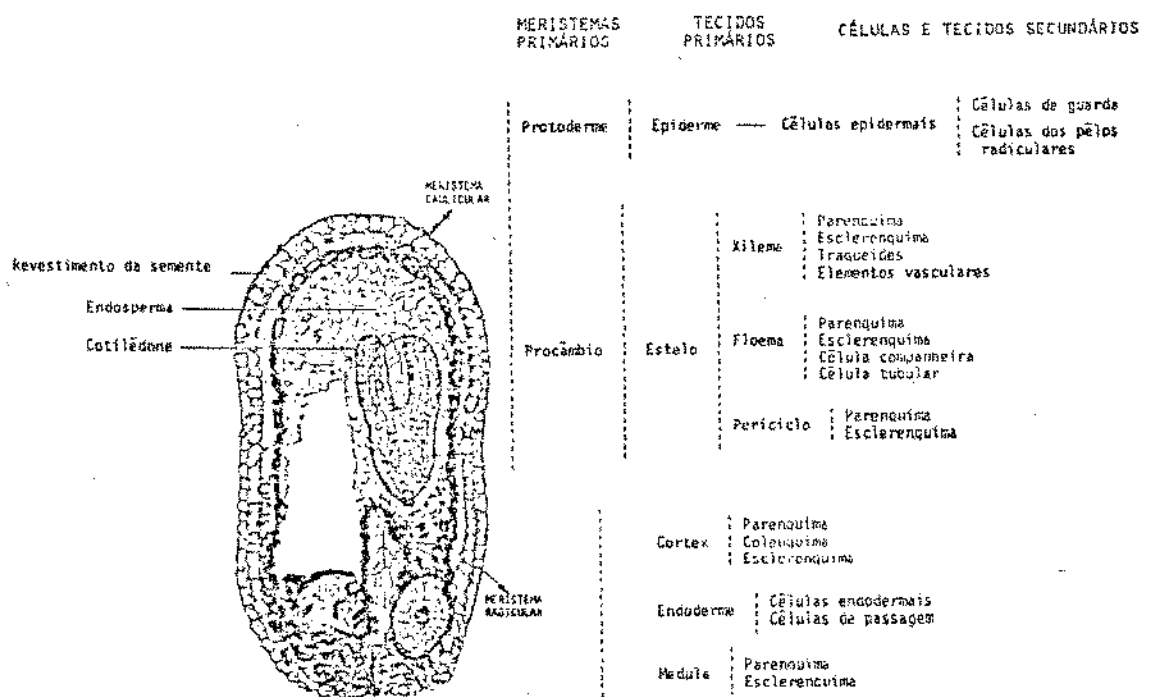


FIGURA 1 - Diagrama mostrando o desenvolvimento inicial de um embrião de Tracheophyta, das células e dos tecidos que se originam dos meristemas caulicular e radicular.

Certo número de funções entre as quais as de nutrição, respiração, as de síntese e outros processos que se associam, participam do metabolismo celular. A nutrição mantém a vida, a respiração proporciona a energia necessária para a síntese dos componentes estruturais da célula ou para preservar-lhe as funções fisiológicas. Perturbação metabólica que se instale no sistema será traduzida em termos de lesão bioquímica; produz modificações morfológicas ou funcionais, retardam o crescimento da raiz ou interferem alterando nas células, o ritmo ou a modalidade das mitoses, Figura 2. O fenômeno poderá ser estudado quantitativamente, de modo bastante preciso, se conhecidas as causas e as condições que lhe deram origem. As variações do crescimento da raiz ou as modificações que se operam nas células do meristema revelam, na realidade, a situação metabólica do reagente biológico; resta conhecer a natureza da perturbação que se instalou ao nível molecular.

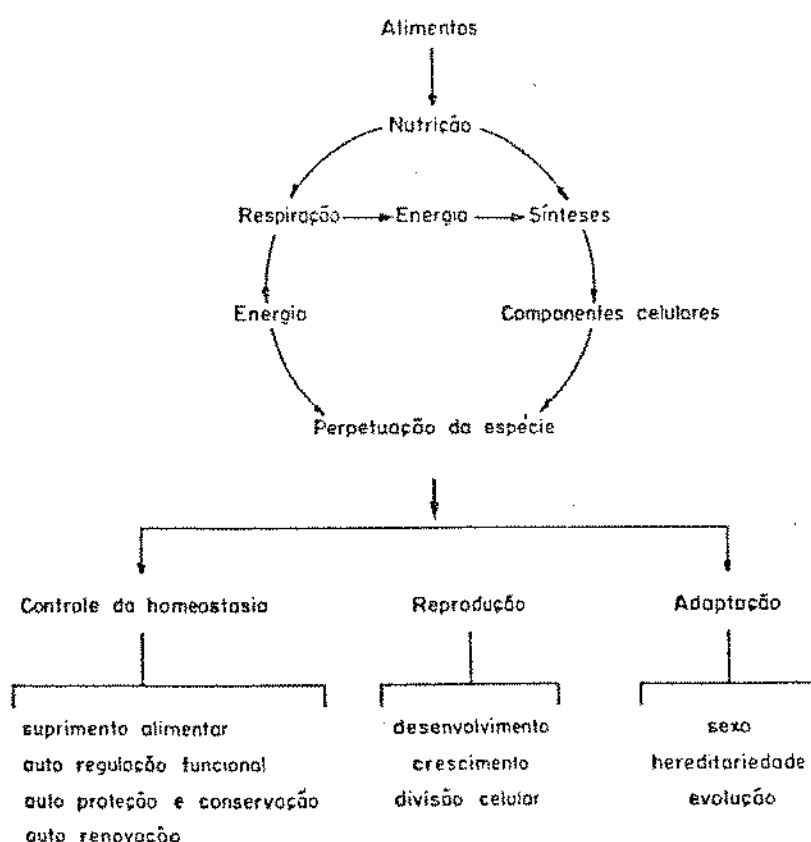


FIGURA 2 - Interrelações entre os principais processos gerais do metabolismo e a influência que exercem sobre o desenvolvimento e adaptação dos vegetais ao meio ambiente.

O estudo dos mecanismos de ação das substâncias que interferem com o desenvolvimento e multiplicação celulares, AMATO (1950); DEYSSON (1943); DEYSSON (1956); GHELARDI-PRIMAVORI (1959); LEVAN (1949); LEVAN (1951); HADDEE & WILSON (1958); LOVELESS (1951) e REVELL (1953) muito se beneficiou com a utilização do meristema radicular como reagente biológico. O emprego da célula vegetal nos estudos farmacológicos permite orientar ou mesmo antever, a grosso modo, possíveis mecanismos de ação de uma série de substâncias quimioterápicas. As células vegetais que participam do meristema radicular são as que melhor respondem em termos de modificações morfológicas ou funcionais aos efeitos produzidos pelas drogas. A lesão bioquímica que resulta da agressão celular pelo fármaco chega a modificar, em certas condições a ultraestrutura e os parâmetros normais do ergastoplasma, das mitocôndrias ou do retículo endoplasmático, bem como das membranas celular ou nuclear, dos cromossomos, da substância cromática ou de outras formações paraplasáticas.

Moléculas mutagênicas são altamente reativas, podem ser úteis para estimular produtividade nos vegetais ou reforçar nelas, características naturais de resistência. Desenvolvendo teratogênese, tais substâncias representam potencial perigo para os animais. A atividade mutagênica de uma droga pode ser facilmente verificada, empregando a raiz do *Allium* como reagente biológico; nos animais, a comprovação é difícil e demorada.

O efeito mutagênico resulta de uma lesão bioquímica que desnatura o DNA dos cromossomos. Quebras cromossômiais presentes nas células do meristema, quando raízes são tratadas com drogas reativas, em cultura hidropônica, levantam suspeita de atividade mutagênica na substância utilizada.

Raízes de *Allium ampeloprasum* L. mantidas em meio líquido nutritivo contendo DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) em solução, apresentam modificações morfológicas na porção distal junto a zona de crescimento, semelhantes às aquelas que as observam quando o mesmo reagente biológico sofre os efeitos de substâncias pertencentes ao grupo das sulfonamidas STOLL (1943), da Colchicina LEVAN (1938) ou da Trifluralina DELCOURT & DEYSSON (1976). É de se acreditar que a dilatação radial que se produz nas raízes tratadas pelas referidas substâncias seja consequência de uma lesão bioquímica, comum às três categorias de drogas; independem da clássica inibição da biosíntese do cofator fólico WOODS (1954).

A simplicidade do método e o controle das influências que poderiam prejudicar o processo "droga/reagente biológico", permite acreditar que as modificações que se observam nas células do meristema radicular do *Allium ampeloprasum* L. representam na realidade consequência direta dos efeitos produzidos pelas drogas experimentadas.

Acresce ainda a circunstância do meristema da raiz do *Allium* utilizar para alimentação os nutrientes elaborados e armazenados no próprio bulbo e ainda, não depender diretamente da composição mineral do meio de cultura; a própria água destilada facultada em substituição ao meio mineral, condições para o bom desenvolvimento e crescimento das raízes.

A cultura do *Allium* em meio líquido facilita os estudos farmacológicos que utilizam o meristema radicular como reagente biológico, possibilita também que se atinja com relativa facilidade, no vegetal, os níveis ultraestruturais cuja organização muito se aproxima e das células animais, CAMUS & LANCE (1955); LACHARME (1961) e NÉTIEN (1960).

ANTECEDENTES

Raízes de *Allium ampeloprasum* L. crescidas em cultura hidropônica, transferidas e mantidas durante vários períodos de tempo numa solução de DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) sofreram modificações estruturais que lhes alterou o aspecto, a conformação e o crescimento. A análise estatística demonstrou que a inibição produzida pela droga sobre o crescimento radicular foi altamente significativa.

A sulfona imitou o comportamento e, em alguns aspectos, reproduziu as imagens histo e citopatológicas que se observam quando raízes se desenvolvem na presença da Colchicina, da Trifluralina e da Sulfanilamida. Resultados preliminares confirmam que as sulfonas alteram os mecanismos e as condições que orientam a histogênese, em especial, durante os períodos iniciais do desenvolvimento e, poderão trazer novas informações sobre o efeito iatrogênico das sulfonas, ou mesmo, perturbador da fisiologia do desenvolvimento celular.

A Chemische Fabrik v. Hayden recomendou em 1925, a paratoluenesulfamida para combater ervas daninhas. O fato estimulou FOURNEAU et alii (1936) estudarem os efeitos que a parabenzene-sulfonamida produz sobre o comportamento de certas espécies de fungos inferiores, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* e *Lichtheimia italica*. Verificaram aqueles autores que a droga exerce atividade impediante sobre o desenvolvimento de tais fungos, bem como, sobre a germinação das sementes de vegetais vasculares, demonstrando que a substância na concentração de 1/1000 impede a germinação das

sementes de agrião.

Com base nos trabalhos de FOURNEAU et alii (1936), MANGENOT & CARPANTIER (1941), estudaram os efeitos morfológicos e funcionais produzidos pela Sulfanilamida nas raízes de *Pisum sativum* mantidas durante diferentes períodos de tempo em contacto com várias concentrações de Sulfanilamida dissolvida numa solução de Knop ao meio. As diferentes concentrações da droga foram efetivas em interferir com o crescimento das raízes de *Pisum* e mostraram que a Sulfanilamida produzia com muita regularidade, inibição do alongamento das raízes e, este efeito, era proporcional à concentração da droga no meio de cultura. As raízes que permaneciam em contacto com a Sulfanilamida sofriam, ainda, modificações significativas, de ordem morfológica e estrutural, muito próximas às produzidas pela Colchicina no *Allium fistulosum* e *Allium cepa*, pela Trifluralina nas raízes de *Zea mays* SCHULTZ, FUNDERBURK & NEGI (1968) e nas raízes de *Allium sativum*, DELCOURT & DEYSSON (1976).

Diante dos resultados, acredita-se que a sulfona bem como outras sulfonamidas interfiram nas raízes de *Allium* com algum processo de fundamental importância para a vida e crescimento do vegetal, ao em vez de unicamente antagonizar a incorporação do ácido para-aminobenzóico ou do ácido N-pteróilglutâmico na biossíntese do ácido fólico, BONNER (1942); STOLL (1943) e BOLL (1955). Os resultados que se conseguiram na presente investigação falam em favor de uma atividade farmacológica comum aos três grupos de drogas e aproxima a Sulfona e a Sulfanilamida da Colchicina e da Trifluralina.

M A T E R I A L E M É T O D O S

1 - REAGENTE BIOLÓGICO

Bulbos de alho, *Allium ampeloprasum* foram deixados germinar em recipientes opacos e adequados para cultura hidropônica, em solução de HOAGLAND & ARNON (1950) ou em água destilada, pH 5,0. A fase líquida do sistema de germinação foi mantida ao abrigo da luz, na temperatura ambiente e sob constante aeração mediante emprego de equipamento injetor de ar atomizado, condições muito próximas daquelas recomendadas por KELLIKOTT (1904) e LAUGHLIN (1919).

Quando as raízes primárias cresceram aproximadamente 3 centímetros de comprimento, os bulbos de alho foram separados em lotes de 10 exemplares, escolhidos entre os que no aspecto e na forma apresentavam raízes mais uniformes. Foram selecionadas em cada um dos bulbos quinze raízes entre as que se apresentavam mais vigorosas; seus comprimentos foram medidos e as raízes excedentes extraídas. Bulbos e raízes voltaram para os líquidos de cultura ou para os que continham DIAMINO DIFENIL SULFONA, Colchicina, Trifluralina e Sulfanilamida, respectivamente, em solução. Os valores das medidas iniciais das raízes testemunhos e das tratadas serviram como termo de comparação para avaliar o alongamento total das raízes que cresceram nas condições normais ou sob os efeitos das drogas empregadas. Em todos os casos foram obedecidas as condições experimentais previamente estabelecidas. Embora já se tivesse verificado

que a DIAMINO DIFENIL SULFONA interfere com o crescimento das raízes de *Allium*, modifica-lhes também o aspecto morfológico quando permanecem em contato com a droga. As anomalias morfológicas e funcionais que se puderam verificar foram comparadas com as que são produzidas pela Colchicina, Trifluralina e Sulfanilamida.

2 - DROGAS E CONCENTRAÇÃO*

O Quadro I relaciona as drogas e as quantidades em miligramas que devem ser dissolvidas na unidade de volume em água destilada para que as concentrações molares das respectivas soluções correspondam à molaridade 4.027×10^{-4} M, calculada para a solução de DIAMINO DIFENIL SULFONA à 10 mg por cento, limite da solubilidade encontrada para a (DDS) em água destilada à temperatura de 25°C. Na referida concentração a droga se mostrou ativa, inibindo o crescimento, alterando o aspecto e a morfologia das raízes de *Allium*.

* Todas as drogas empregadas no presente trabalho foram adquiridas de fontes autorizadas.

QUADRO I - Drogas e concentrações

Drogas	Peso Mol.	$\frac{4.027 \times 10^{-4} \text{ M}}{(\text{mg por cento})}$	Efeitos Produzidos
Colchicina	399,43	16,0	GAVAUDAN et alii (1937) LEVAN (1938) GUINOCHE (1940)
Trifluralina Treflan lote SI6535- "Elanco", Lilly	335,20	13,5	Tipo colchicina, BAYER et alii (1967) DELCOURT & DEYSSON (1976)
Diamino Difenil Sulfona (DDS) *	248,30	10,0	
Sulfanilamida	172,21	7,0	FORNEAU et alii (1936)

Devido se observar certa semelhança entre as modificações que a DIAMINO DIFENIL SULFONA opera no crescimento, morfologia e citologia das raízes de *Allium*, com aquelas que são produzidas pela Colchicina, GUINOCHE (1940) e pela Trifluralina, DELCOURT & DEYSSON (1976), os efeitos que resultaram do tratamento sulfônico foram comparados, não só, com os produzidos pela Colchicina como também com os produzidos pela Trifluralina (α, α, α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N'-dipropil-p-toluidina), herbicida com efeitos tipo Colchicina.

* O autor agradece ao Instituto Butantã, em especial ao Dr. Carlos Perego, a síntese e o fornecimento da DIAMINO DIFENIL SULFONA(DDS).

3 - TRATAMENTO

Raízes de *Allium* permaneceram em cultura durante 4 dias, antes do início da experiência e a seguir de 24 a 240 horas numa das soluções prova nas condições previamente estipuladas: obscuridade, temperatura ambiente (25°C) e aeração contínua das soluções. As raízes testemunho de cada período de tratamento permaneceram no líquido de cultura normal durante o tempo que demorou a experimentação. As modificações que se observaram no crescimento das raízes, variações da forma ou do prolongamento em (cm) foram comparados com os resultados que se obtiveram com as raízes testemunhos, mantidas em cultura nas mesmas condições da experimentação.

Em virtude das modificações morfológicas que a Trifluralina, Sulfona e Sulfanilamida produzem nas raízes muito se assemelham aos produzidos pela Colchicina, os valores das variações do alongamento radicular, foram tomados para termo de comparação entre raízes tratadas e não tratadas.

Mantendo-se constante nos meios de cultura as concentrações molares da Sulfona, Sulfanilamida, Colchicina e da Trifluralina, 4.027×10^{-4} M, a média de crescimento das raízes tratadas se prestou para avaliar a intensidade dos efeitos que sofreu o reagente biológico durante os diferentes períodos de tempo que durou o tratamento. Os parâmetros assim obtidos foram respectivamente comparados com aqueles fornecidos, nas mesmas condições experimentais, pelas raízes testemunho crescidas em meio hidropônico livre de drogas.

As raízes testemunhas e tratadas foram a seguir mantidas em contacto com uma solução aquosa de azul de tetrazólio 0.1 por cento em água destilada ou então retornaram durante 10 dias mais aos meios de cultura, após cada período de tratamento, para comprovar se os efeitos produzidos pelas drogas perturbaram a vitalidade das células do meristema e se nestas condições as raízes se conservam apropriadas para prosseguirem o crescimento. A primeira das provas teve por finalidade avaliar qualitativamente a vitalidade do meristema e a segunda, quantitativa, para medir em comprimento das raízes a capacidade de reprodução das células do meristema.

4 - MORFOLOGIA DAS RAÍZES DE *Allium*

Foi realizado estudo comparativo entre os efeitos produzidos pela DIAMINO DIFENIL SULFONA com aqueles que normalmente se produzem quando raízes de *Allium* são mantidas em contacto com substâncias reconhecidamente herbicidas. Para isso, foram escolhidos bulbos de *Allium* entre os que apresentavam capacidade germinativa satisfatória e que produziram mais de 15 raízes nas primeiras horas da germinação. Os diferentes lotes de raízes permaneceram de 24 a 240 horas em contacto com a água destilada e com as soluções de Colchicina, Trifluralina, Sulfona e Sulfanilamida em água destilada e na concentração molar idêntica ou aproximada a que se obtém quando se dissolve DIAMINO DIFENIL SULFONA a 0.1 por mil em água destilada.

As raízes assim tratadas foram submetidas aos estudos macroscópicos, cito e histopatológicos.

5 - MICROTÉCNICA

As raízes destinadas aos exames histológicos foram fixadas em Bouin-Hollande, e nos fixadores alcoólicos desenvolvidos por CHAMBERLAIN (1935) e por KORODY (1937) e no fixador de Carnoy. Com exceção das raízes fixadas no fixador de Carnoy as demais foram desidratadas na série ascendente dos alcoois, etílico e butílico normal, recomendada por CHAMBERLAIN (1935) e de acordo com as recomendações de JOHANSEN (1940), formuladas no quadro abaixo:

QUADRO II - Desidratação das raízes - Série ascendente dos alcoois
(JOHANSEN, 1940)

Mistura alcoólica (por cento)	50	70	85	95	100
Água (em ml)	50	30	15	-	-
Alcool etílico a 95°C (em ml)	40	50	50	45	-
Alcool butílico normal (em ml)	10	20	35	55	75
Alcool etílico absoluto (em ml)	-	-	-	-	25

Ao atingir a última fase da desidratação, o material passa da mistura alcoólica 100% ao butanol puro, onde permanece durante 12 horas, seis horas de cada vez, em butanol renovado.

A inclusão tem início ao se transferir o material desidratado para a mistura "óleo de parafina: butanol", em partes iguais, durante 12 horas, quando é transferido para a parafina a 25% em óleo de parafina: butanol. Nova transferência do material para as soluções de 25 e 75% de parafina em butanol, seguido de dois banhos em parafina pura, fundida a 56°C, na estufa, completa a inclusão.

6 - COLORAÇÃO

Cortes com 10 micra de espessura, transversais e longitudinais, foram corados pelo clorocarminato de ferro de A. Ch. HOLLANDE (1916), segundo as indicações de MEDINA (1952). Os resultados da análise morfológica foram comparados com os dados normais fornecidos por JENSEN & KAVALJIAN (1958).

7 - PREPARO DO CLOROCARMINATO

Quatorze gramas de carmin de cochonilha foram tratadas com 5 ml de ácido clorídrico concentrado. O carmin em contacto com o ácido toma coloração escura; se liquefaz pelo aquecimento, e termina por adquirir consistência pastosa e reação neutra. Após 24 horas de repouso, o material é dissolvido em 250 ml de água destilada, tomando a solução cor vermelho framboeza. A adição de 5 gramas

de ácido tânico e alguns cristais de timol previne a vegetação de fungos e permite uso imediato do corante.

8 - COLORAÇÃO PELO CLOROCARMINATO

Cortes de material fixado em Bouin-Hollande, foram tratados durante 5 minutos pela solução de clorocarminato. Intensamente corados em vermelho foram os cortes diferenciados ao microscópio ótico, numa solução de álcool clorídrico a 1% ou numa solução de ácido pícrico a 5% em álcool a 70%, até aparecimento dos detalhes. A seguir a coloração sofre viragem ao preto numa solução hidro alcoólica contendo 10% de alume de ferro. Na dependência dos detalhes a coloração pode ser, diferenciada até o ponto desejado, quando a preparação é montada de acordo com os métodos comuns usados em técnica histológica.

9 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA*

Fragmentos de coifa, meristema e região pilífera das raízes que permaneceram durante 24, 48 e 72 horas em contacto com

* O autor agradece aos Professores Dr. DARCY MARTINS DA SILVA do Setor de Microscopia Eletrônica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, e Dr. ADOLFO BRUNNER Jr. do Serviço de Microscopia Eletrônica do Instituto Butantã, São Paulo, a colaboração prestada para desenvolvimento da presente pesquisa.

a solução de DIAMINO DIFENIL SULFONA a 100 miligramas por mil, sofreram pré-fixação em glutaraldeído a 6.5 por cento dissolvido em tampão cacodilato 0.125 M, durante hora e meia, a 4°C.

Após sucessivas lavagens do material em tampão cacodilato 0.125 M foi a seguir submetido a nova fixação durante 1 hora em ácido ôsmico a 2 por cento dissolvido em tampão cacodilato 0.25 M. Novas lavagens do material em tampão cacodilato 0.25 M para retirar o excesso de ácido ôsmico permitiram que se procedesse a pré-coloração com acetato de uranila a 2 por cento dissolvido em acetona a 75 por cento, durante toda uma noite.

Terminado o prazo da pré-coloração todas as peças foram desidratadas na série ascendente das acetonas a 75, 90 e 100 por cento, duas vezes em cada acetona renovada, durante 10 minutos, cada vez.

Isto feito, as peças preparadas foram incluídas em Polylite 8001 de acordo com as recomendações de COIRO et alii (1972) e COIRO & BRUNNER (1972).

10 - AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO RADICULAR

A DIAMINO DIFENIL SULFONA, Trifluralina e Sulfanilamida interferem com o crescimento radicular. Os efeitos que as referidas drogas produzem prejudicando o alongamento das raízes de *Allium*, fizeram, também, que variassem de valor, as médias do crescimento das raízes. O efeito foi caracterizado pela medição direta

de cada raiz pertencente aos diferentes grupos experimentais.

A medição foi feita antes e depois de cada período de ação das drogas, de 24 a 240 horas, bem como, depois que as raízes permaneceram durante 10 dias na água destilada ou na solução nutritiva, após cada período de tratamento.

O alongamento das raízes nas diferentes condições foi determinado mediante o uso de régua delicada e estreita, subdividida em milímetros. Depois de absorvido o excesso de líquidos, com o auxílio de papel de filtro, foram as raízes ainda úmidas, uma após outra, medidas ao longo do comprimento a partir do disco até a extremidade radicular.

Os resultados obtidos foram comparados com os que resultaram das medições feitas nas raízes testemunhas que estiveram sujeitas às mesmas condições experimentais e, a seguir, submetidos à análise estatística.

11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi feita análise de variância conjunta para os dados de comprimento de raiz (X) transformados com a média da testemunha ($\bar{X}_T$) correspondente a cada tratamento acrescidos de 10 unidades ($\bar{X}_T - X + 10$) evitando assim dados negativos.

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Causa de Variação	GL
Drogas (D)	2
Tempo (T)	5
Interação D x T	10
Resíduo	252
T O T A L	269

As diferenças entre médias foram testadas através do teste de Tukey (Δ), ao nível de 5% de probabilidade.

A homogeneidade de variância foi testada pelo teste de BOX (1954).

Foi feito ajustamento de equações de regressão para cada tratamento com os dados de comprimento de raiz medidos antes, após e 10 dias após o tratamento, sendo a significância dos parâmetros verificada através do teste t ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados foram transformados com a média da testemunha correspondente.

RESULTADOS

As modificações estruturais que a DIAMINO DIFENIL SULFONA produz nas raízes do *Allium ampeloprasum* foram comparadas com aquelas que ocorrem quando raízes em crescimento, são tratadas com Colchicina, LEVAN (1938) ou com Trifluralina, BAYER et alii (1967); DELCOURT & DEYSSON (1976).

As drogas em estudo possuem a especial característica de produzirem típica expansão radial da região do meristema próximo ao término da raiz, Estampa 1, Figuras 1 a 4. O fenômeno foi atribuído ao aumento de volume das células do meristema, LEVAN (1938), ou das células que fazem parte da região do máximo alongamento das raízes, BAYER et alii (1967); DELCOURT & DEYSSON (1976).

A expansão radial Estampa 2, Figura 1, das porções proximais do meristema é a primeira modificação macroscópica, inicial, que se observa, a partir das 12 horas, quando raízes de *Allium cepa* L., *Allium sativum* L. e *Allium ampeloprasum* L. são deixadas permanecer durante vários períodos de tempo, com 24 horas de intervalo, numa solução de DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS), $4.027 \times 10^{-4} M$ e nas mesmas condições experimentais.

Quando raízes são submetidas até próximo das 120 horas ao tratamento sulfônico e retornam para a água destilada ou para a solução nutritiva, HOAGLAND & ARNON (1950), continuam crescendo, deixando para trás, as dilatações radiais cada vez menos pronunciadas, Estampa 3, Figuras 1 a 4. Os mesmos efeitos foram observados com as raízes tratadas pela Colchicina e, em menor grau, quando

a droga empregada foi a Trifluralina ou a Sulfanilamida.

As raízes cresceram retorcidas e enredadas, Estampa 4, Figura 1, as quais após diafanização permitiram que se observasse, nos acotovelamentos, ao longo da extensão do xilema a presença de pontos opacos e claros, Estampa 5, Figura 1.

Cortes longitudinais e transversais ao nível das dichas formações revelaram a presença de ninhos de neoformação radicular, Estampa 6, Figuras 1 a 4, cujas células se apresentavam com as características próprias das células poliploides: núcleos hipertróficos, hipercromáticos e células em hemicinese e statmocinese.

Estes aspectos se fizeram acompanhar do aparecimento na zona mediana das raízes, de pequenas saliências que correspondiam na raiz principal aos pontos de emergência das raízes laterais, DELCOURT & DEYSSON (1976).

Foi observado ao longo do xilema de determinadas raízes tratadas pela Sulfona, a presença de ninhos celulares, Estampa 9, Figuras 1 e 2, aparentemente não dependentes do periciclo e sem as características do brotamento de uma raiz lateral; suas células eram uniformes com núcleos hipercromáticos apresentado fases diferentes do ciclo mitótico.

As células do meristema perdem progressivamente a capacidade para reduzir o azul de tetrazólio, o espaço ocupado por elas no ápice da raiz diminui a medida que se prolonga o tempo de tratamento pela sulfona. O aspecto se modifica, o tecido radicular sofre vacuolização e rarefação celulares, mais pronunciadas na zona de alongamento da raiz, Estampa 7, Figuras 1 a 3.

Quando as raízes são deixadas permanecer na solução de Sulfona durante períodos de tempo além das 120 horas, as próprias células do meristema sofrem vacuolização e rarefação celulares, a expansão radial é menos pronunciada, a raiz entumesce e perde gradualmente a capacidade respiratória terminando por não mais se alongar.

Os estudos histopatológicos das raízes de *Allium*, tratadas pela Sulfona, durante períodos mais demorados de tempo, deixam claro que o fármaco interfere com o processo de multiplicação celular; oferecem aspectos citológicos que lembram os efeitos produzidos pela Trifluralina ou os que se fazem presentes na falta de cofatores importantes para a fisiologia da raiz. Neste particular, as modificações estruturais produzidas pela Sulfona, se identificam mais com as lesões produzidas pela Trifluralina e Sulfanilamida do que propriamente com as que a Colchicina produz.

Por outro lado, a atividade mitótica das células do meristema das raízes tratadas com Sulfona, não foi tão afetada como no caso das raízes submetidas aos efeitos da Colchicina. O número de mitoses statmocinéticas ou hemicinéticas, de núcleos hipertrofiados e aberrantes foi maior nos meristemas tratados pela Colchicina, vindo a seguir os efeitos produzidos pela Trifluralina e por fim, os produzidos pela Sulfona, Estampa 8, Figuras 1 a 3.

1 - MODIFICAÇÕES ULTRA-ESTRUTURAIS

A análise ultra-estrutural das raízes, Estampa 10, Figura 1, que sofreram tratamento sulfônico durante 24 e 48 horas

revela discretas alterações, mais pronunciadas na parede celular (Pc) que sofre descolamento da membrana celulósica. Por outro lado, os ribossomos, abundantes no citoplasma fundamental das células não tratadas e em fase de grande atividade metabólica apresentam redução em número a partir das primeiras horas de tratamento. Grande número de mitocôndrias (M) e de dictiossomos (Dt) estavam presentes no citoplasma. Os núcleos (N) apresentam cromatina frouxa (Cr) e bem distribuída, a carioteca (Ct) é bem definida e não apresenta roturas. Os retículos endoplasmáticos (Re) se mostram bem distribuídos, sem anormalidade aparente e com características normais.

2 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise de variância dos dados de comprimento de raiz transformados com a média da testemunha mais 10, é mostrada no Quadro 1. Como se pode aí verificar constatou-se efeito significativo tanto de drogas (D) como de tempo de tratamento a que a raiz foi submetida (T). A interação drogas x tempo de tratamento (D x T) também foi significativa. Os desdobramentos das interações significativas dessas análises estão reunidas no Quadro 2.

Os dados transformados de crescimento médio de raízes por droga e tempo de tratamento estão reunidos nos Quadros 3 e 4.

Os dados transformados de crescimento médio de raízes por droga x tempo de tratamento estão reunidos no Quadro 5.

No Quadro 6 encontram-se as equações ajustadas $C=f(t)$ por droga e por tempo de tratamento. Para esses ajustamentos os

dados foram transformados com a média da respectiva testemunha $(\bar{x}_T - x)$ de forma que as equações traduzem o efeito das diferenças entre a testemunha e o tratamento.

QUADRO 1 - Análise de variância dos dados de comprimento de raiz, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	F		
		ANTES	DEPOIS	10 DIAS DEPOIS
Drogas (D)	2	15,28*	542,68*	994,89*
Tempo (T)	5	41,20*	567,64*	251,54*
Interações D x T	10	26,90*	91,78*	61,87*
Resíduo	252			

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 2 - Análise de variância dos dados de comprimento de raiz antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)

CAUSA DE VARIAÇÃO	GL	F		
		ANTES	DEPOIS	10 DIAS DEPOIS
Drogas d. Tempo (24)	2	11,72*	17,26*	40,29*
Drogas d. Tempo (48)	2	6,76*	11,36*	26,82*
Drogas d. Tempo (96)	2	4,37*	10,79*	206,86*
Drogas d. Tempo (144)	2	21,85*	326,20*	434,34*
Drogas d. Tempo (192)	2	60,69*	137,48*	154,92*
Drogas d. Tempo (240)	2	5,08*	498,50*	441,00*
Tempos d. Sulfona	5	5,10*	101,84*	52,38*
Tempos d. Sulfamida	5	33,12*	146,06*	84,13*
Tempos d. Trifluralina	5	56,78*	503,30*	238,76*

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 3 - Crescimento médio das raízes por droga, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)

D R O G A	COMPRIMENTO MÉDIO		
	ANTES	DEPOIS	10 DIAS DEPOIS
Sulfona	9,42	12,39	13,12
Sulfanilamida	9,00	12,06	12,91
Trifluralina	9,03	15,05	17,19

QUADRO 4 - Crescimento médio das raízes por tempo de tratamento, antes, depois e 10 dias depois do tratamento (dados transformados)

TEMPO DE TRATAMENTO (horas)	COMPRIMENTO MÉDIO		
	ANTES	DEPOIS	10 DIAS DEPOIS
24	8,50	9,09	11,12
48	9,85	11,92	14,00
96	9,31	13,22	15,47
144	9,67	14,60	15,42
192	8,64	15,54	15,59
240	8,94	14,65	14,84

QUADRO 2 - Crescimento médio das raízes por droga e tempo de tratamento, antes, depois e 10

dias depois do tratamento (dados transformados)

TEMPO (H)	A N T E S			D E P O I S			10 DIAS DEPOIS		
	Sulfona	Sulfanilamida	Trifluralina	Sulfona	Sulfanilamida	Trifluralina	Sulfona	Sulfanilamida	Trifluralina
	(+)								
24	9,01bA	8,50cdB	8,00cC	9,68eA	8,29eB	9,29eB	11,05eB	9,97eC	13,35dA
48	9,57abB	9,68abB	10,29aA	11,89cdB	11,35dB	12,51dA	13,59bcB	13,30bcB	15,11cA
96	9,42abB	10,23aA	8,28cC	12,57cB	13,55abA	13,55cA	12,91cdC	15,21aB	18,28bA
144	9,42abB	9,14bcB	10,45aA	13,57bB	12,14cC	18,10bA	13,86bB	12,54dC	19,86aA
192	9,97aA	7,91dB	8,04cB	14,79aB	14,00aC	17,83bA	14,99aB	13,63bC	18,17bA
240	9,15bA	8,56cB	9,12bA	11,84dC	13,06bB	19,03aA	12,34dB	12,81cdB	19,37aA

$\Delta = 0,596$ (dentro da mesma droga)

$\Delta = 0,694$

$\Delta = 0,754$

$\Delta = 0,491$ (dentro do mesmo tempo de tratamento)

$\Delta = 0,572$

$\Delta = 0,622$

(+) Médias seguidas de letras minúsculas iguais não diferem entre si dentro da mesma droga e médias seguidas de letras maiúsculas iguais não diferem entre si, dentro do mesmo tempo de tratamento, ao nível de 5% de probabilidade.

QUADRO 6 - Equações de regressão por droga e por tempo de tratamento (dados transformados com a média da testemunha correspondente $\bar{X}_T - X$)

HORAS	S U L F O N A	COEFICIENTE DE CONCORDÂNCIA
24	$\hat{Y} = -4,62 + 1,10 X - 0,05 X_2^2$	0,615
48	$\hat{Y} = -7,02 + 1,98 X - 0,08 X_2^2$	0,766
96	$\hat{Y} = -5,44 + 1,43 X - 0,05 X_2^2$	0,884
144	$\hat{Y} = -5,01 + 1,27 X - 0,04 X_2^2$	0,943
192	$\hat{Y} = -4,00 + 1,12 X - 0,03 X_2^2$	0,967
240	$\hat{Y} = -2,53 + 0,46 X - 0,01 X^2$	0,916

HORAS	S U L F A N Í L A M I D A	COEFICIENTE DE CONCORDÂNCIA
24	(+) $\hat{Y} = -1,76 + 0,008 X^2$	0,762
48	$\hat{Y} = -4,95 + 1,37 X - 0,05 X_2^2$	0,841
96	$\hat{Y} = -4,61 + 1,40 X - 0,05 X_3^2$	0,941
144	$\hat{Y} = -4,01 + 0,90 X - 0,03 X_2^2$	0,757
192	$\hat{Y} = -7,27 + 1,47 X - 0,04 X_2^2$	0,967
240	$\hat{Y} = -4,57 + 0,88 X - 0,02 X^2$	0,842

HORAS	T R I F L U R A L I N A	COEFICIENTE DE CONCORDÂNCIA
24	$\hat{Y} = -8,97 + 2,10 X - 0,09 X_2^2$	0,835
48	$\hat{Y} = -5,87 + 1,82 X - 0,07 X_2^2$	0,953
96	$\hat{Y} = -8,91 + 2,04 X - 0,06 X_2^2$	0,989
144	$\hat{Y} = -7,39 + 2,24 X - 0,07 X_2^2$	0,946
192	$\hat{Y} = -10,02 + 2,28 X - 0,07 X_3^2$	0,980
240	$\hat{Y} = -7,52 + 1,85 X - 0,05 X^3$	0,968

(+) Único caso em que o efeito do componente linear não foi significativo.

D I S C U S S Ã O

Os efeitos que a DIAMINO DIFENIL SULFONA produz nas raízes de *Allium* se assemelham em muitos dos seus aspectos aos que são produzidos na mesma espécie vegetal pela Trifluralina, Colchicina, Prophan (0-isopropil-N-fenil-carbamato) e Sulfanilamida, STOLL (1943), CHAKRABORTY & BISWAS (1965), GAVAUDAN, GAVAUDAN & POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF (1937), LEVAN (1951), LIGNOWSKI & SCOTT (1972), BAYER et alii (1967), DELCOURT & DEYSSON (1976), modificam a morfologia das raízes e produzem junto ao meristema, na zona de alongamento da raiz, dilatação radial que empresta característica especial às raízes que sofrem os efeitos deste grupo de drogas, Estampa 1, Figuras 1 a 4. Tais efeitos são mais acentuados com a Colchicina e com a Trifluralina, parecem depender da perda de polarização do crescimento celular e a divisão se efetua de maneira isodiamétrica, Estampa 2, Figura 1. Os estudos histológicos revelam que a Sulfona produz na zona de alongamento da raiz, vacuolização progressiva a medida que aumenta o tempo de contacto da droga com as raízes. O meristema sofre retração, ao mesmo tempo suas células vão perdendo a capacidade para reduzir o azul de tetrazólio até o momento que a volta das raízes para as soluções nutritivas não mais proporciona retorno do crescimento, Estampa 3, Figuras 1 a 4. A retomada do crescimento das raízes inibidas foi um fato que se verificou constantemente desde que o processo de vacuolização do meristema não tenha prejudicado a vitalidade do tecido. Neste particular, os efeitos das Sulfonas se diferenciam dos produzidos pela Trifluralina e pela Colchicina porque ao invés de inibir, a Sulfona estimula

nas fases iniciais do tratamento, a formação de ninhos de neoformação radicular, Estampa 5, Figura 1. A capacidade para estimular a neoformação radicular, também é observada quando as raízes são tratadas com Prophan, ENNIS (1948). De maneira geral a Sulfona se comporta como os demais membros do grupo; inibe o crescimento e o alongamento radiculares. Comparativamente, as modificações citopatológicas que a Sulfona produz, são menos drásticas do que as produzidas pela Colchicina ou pela Trifluralina. O aspecto geral dos cortes das raízes quando tratadas pela Trifluralina, mais se assemelha às modificações produzidas pela Sulfona do que propriamente aos que se operam pela Colchicina. A observação da Estampa 7, Figuras 1, 2 e 3, mostra maior predominância de modificações citoplasmáticas, isto é, metabólicas e em menor grau mitóticas quando os efeitos são produzidos pela Sulfona; os produzidos pela Colchicina são mitóticos ao passo que os da Trifluralina, possivelmente serão intermediários entre ambos os extremos. Por outro lado, a rarefação celular é mais intensa nos cortes das raízes tratadas pelas Sulfonas do que nos tratados pela Trifluralina ou pela Colchicina, Estampa 7, Figuras 1, 2 e 3. Inversamente as mitoses são mais atingidas pela Colchicina, em menor grau pela Trifluralina e ainda menor, quando o tratamento é feito pela Sulfona, muito embora se possam observar elementos poliploides nos cortes de raízes tratadas pela Sulfona. A Trifluralina se aproxima da Colchicina pelos efeitos mitoclássicos e por outro lado, se aproxima da Sulfona pelos efeitos sobre o metabolismo geral.

A análise geral e estatística dos resultados obtidos deixa transparecer que os efeitos produzidos pelas drogas em estudo, além de diferirem em muitos dos aspectos farmacodinâmicos foram tam

bem influenciados pelo tempo que durou o tratamento.

Como se verifica pelo exame do Quadro 1, a Sulfona, a Sulfanilamida e a Trifluralina diferiram em sua eficiência sobre o comprimento de raiz pois a análise de variância revelou diferenças significativas: antes, depois e 10 dias depois do tratamento com valores da estatística F sempre crescentes. Esse mesmo quadro nos mostra também influência do tempo de tratamento a que a raiz foi submetida: antes, depois e 10 dias depois do tratamento pois os valores da estatística F foram sempre significativos ao nível de 5% de probabilidade e foram sempre crescentes. Finalmente, o fato de encontrarmos interações entre drogas e tempo de tratamento, significativas ao nível de 5% de probabilidade, evidencia uma dependência entre tais variáveis sugerindo uma análise para cada droga dentro de cada tempo. Consequentemente, foram necessários desdobramentos das interações entre droga e tempo de tratamento, os quais foram apresentados no Quadro 2.

O Quadro 2 permite constatar-se estatisticamente que mesmo dentro de um fixado tempo as drogas tem comportamento diferentes em qualquer fase. Por outro lado, fixada a droga constatarem-se diferenças significativas entre os tempos de tratamento, ao nível de 5% de probabilidade.

Os Quadros 3 e 4 permitem, de uma maneira prática, constatar as variações no crescimento médio das raízes que conduziriam às diferenças significativas nas análises de variância citadas e discutidas. O Quadro 2 permite que se note uma semelhança de ação entre Sulfona e Sulfanilamida quando contrastadas com a Trifluralina ainda que estatisticamente as 3 drogas devam ser consideradas como diferentes em eficiência.

Quanto ao Quadro 4, somente pode ser melhor compreendido quando são mostradas as equações de regressão para cada droga em cada um dos diferentes tempos.

As equações de regressão Quadro 6 encontradas foram todas do 2º grau independentemente da droga e do tempo: $\hat{y} = a + bx + cx^2$. No caso da Sulfona os coeficientes apresentaram valores dentro dos intervalos seguintes: $-7,02 \frac{a}{-2,53}$; $0,46 \frac{b}{1,98}$; $-0,08 \frac{c}{-0,01}$ para a; b e c, respectivamente. O menor coeficiente de concordância foi encontrado para 24 horas e o maior para 192 horas, no caso da Sulfona, sendo seus valores 0,615 e 0,967, respectivamente. No caso da Sulfanilamida os coeficientes variaram dentro dos intervalos seguintes: $-7,27 \frac{a}{-4,01}$; $0,88 \frac{b}{1,47}$; $-0,05 \frac{c}{-0,02}$ para a; b e c, respectivamente, e tempos de 48 horas a 240 horas. Deve ser observado que para o tempo de 24 horas o efeito do componente linear foi não significativo, tendo sido obtida a equação $\hat{y} = -1,76 + 0,008 x^2$. Os coeficientes de concordância variaram de 0,757 a 0,967. Quanto à Trifluralina os intervalos foram os seguintes: $-10,02 \frac{a}{-5,87}$; $1,82 \frac{b}{2,28}$ e $-0,09 \frac{c}{-0,05}$ para a; b e c, respectivamente. Os coeficientes de concordância neste caso variaram de 0,835 a 0,989. Essas equações são apresentadas no Quadro 6. Quanto ao Quadro 5, resume as informações com relação as diferenças significativas no crescimento médio das raízes.

As curvas de regressão para cada droga nos diferentes tempos mostram como variaram as diferenças entre testemunha e tratamento: antes, depois e 10 dias depois do tratamento. Essas curvas permitem uma apreciação visual das equações de 2º grau características do tipo de regressão encontrada.

SCHULTZ et alii (1968), demonstraram que a Trifluralina bloqueia síntese do DNA, do RNA e interfere com a incorporação do P^{32} . Embora a Colchicina perturbe igualmente a síntese do DNA, FITZGERALD & BREHAUT (1970); VASILIEV, GELFAND & GUELSTEIN (1971), seus efeitos parecem estar ligados à desnaturação ou à modificações de grupos sulfidrílicos. Segundo LIGNOWSKI & SCOTT (1971), o dimercaptopropanol (BAL) protege 70% das raízes contra a tumefação radial produzida pela Colchicina. O fato do dimercaptopropanol diminuir a intensidade dos efeitos da Colchicina permite supor que a atividade mitoclásica do alcalóide se deva principalmente à desnaturação de grupos sulfidrílicos impedindo por isso a polimerização das subunidades protéicas formadoras dos microtúbulos do fuso acromático, BORISY & TAYLOR (1967); DUSPIVA (1971). Qualquer que seja o mecanismo de ação, a biossíntese protéica deve estar perturbada nas raízes tratadas pela Colchicina e Trifluralina. A perturbação do metabolismo das proteínas pela Sulfona parece ter confirmação com o achado de carência protéica entre animais nascidos de ratas tratadas com Sulfona durante certo período na fase inicial da prenhez, MEDINA et alii (1978).

Se reconhece que a Sulfanilamida e a Sulfona quando administradas a sistemas biológicos, interferem com o mecanismo que sintetiza o dihidropteroato, inibindo a dihidropteroato síntese, STRULLER (1968) e ALBERT (1971) ou então as Sulfanilamidas se comportam como falso substrato, análogo do ácido para-aminobenzóico dando formação, nas reações a um dihidropteroato-sulfonamida ou um possível falso folato que incorpora a Sulfanilamida, FAHRENBACH et alii (1954); MAREN (1976).

Os estudos qualitativos e quantitativos da biossínte-

se das purinas permitiu reconhecer que as Sulfanilamidas competindo com o PABA na biossíntese do Cofator fólico (CoF) impede a formação dos ácidos nucleicos e por isso, das proteínas e toda uma gama de substâncias derivadas do "pool" do carbono único, MCGILBERY (1970).

Esta última assertiva parece encontrar apoio no fato de além do PABA ou de seus precursores, certas substâncias ligadas ao "pool" do carbono único (metionina, glicina, serina, purinas, pirimidinas, CoF-dependentes), antagonizarem o efeito antibacteriano das Sulfanilamidas, WINKLER & HAAN (1948). Por outro lado, BROWN (1961), não acredita na teoria do falso folato para explicar a atividade inibidora das Sulfanilamidas ou da Sulfona (DDS); semelhante composto não foi ainda identificado. BROWN (1961); MCGILLOUGH & MAREN (1973); JOHNSON, GREEN & PAULI (1944); THIJSSSEN (1974) citados por MAREN (1976), aceitam a inibição da dihidropteroato síntese como ponto da lesão bioquímica produzida pelas Sulfanilamidas e Sulfona, impedindo a assimilação do PABA no ácido fólico.

As Sulfanilamidas inibem no *S. aureus*, a formação do triptofano a partir da glicose e de aminoácidos e verificaram ainda, que o ácido pantotênico e a riboflavina participam da síntese do triptofano, SEVAG & GREEN (1944) citado por SEXTON (1953). SEVAG et alii (1945), verificaram que o Sulfatiazol inibiu a atividade da descarboxilase. A inibição com o Sulfatiazol foi mais completa do que com outras sulfas porque a porção tiazólica do Sulfatiazol é análoga e da co-carboxilase. Nesta situação a semelhança estrutural do Sulfatiazol deslocaria a coenzima, formando uma enzima-análoga ou então, formaria uma união reversível com a proteína, um complexo inativo, droga-proteína-coenzima. Posteriormente, WU & DUBOIS (1970) verificaram que a DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) inibe a oxidação do piruvato interfe-

rindo com o sistema da piruvato desidrogenase e que o cloridrato de tiamina derivado tiazólico antagoniza o efeito inibidor do sistema da piruvato desidrogenase pela Sulfona. Por outro lado, foi verificado por SEVAG et alii (1945) que o acetaldeído, produto de descarboxilação do piruvato exerce poderoso efeito inibidor da atividade de carboxilase das células, não revertida pelo PABA, ao contrário do que faz a tiamina quando a inibição é produzida pelo Sulfatiazol.

Este fato pode justificar as diferenças de ação da Colchicina em comparação com as demais drogas componentes do grupo. Os efeitos metabólicos gerais mais intensos da Sulfona e menos pronunciados da Colchicina e Trifluralina podem ser mais especificamente devidos à inibição da síntese proteica e ao antagonismo antivitamina do grupo B, que se julga serem exercidos diferentemente pelas três drogas. Antimetabólitos análogos estruturais param o alongamento das raízes, impedem o desenvolvimento radicular. A inibição do crescimento radicular produzido pela Sulfanilamida pode ser revertido pela PABA, permitindo a ANKER (1951) considerá-lo como elemento essencial para o alongamento da raiz. BOLL (1955) verificou que o crescimento de raízes de tomate inibido pela Sulfanilamida foi reiniciado pelo PABA. A homotiamina inibe o crescimento das raízes, o efeito pode ser revertido pela tiamina. A administração de 2,4-diamino-9,10-dimetil-pteróil glutâmico inibe o alongamento radicular, a inibição pode ser revertida pelo ácido pteróilglutâmico normal. Outros antimetabólitos como a hidroxiprolina FRIES (1954 e 1955), a canavaina, azaguanina inibem o alongamento radicular; a inibição pode ser revertida pela arginina, guanina ou adenina, respectivamente. Embora não se tenham determinado quadros de avitaminoses nas plantas, nos mesmos moldes como se observa nos ani

mais, o entumescimento radicular produzido pela Colchicina, Trifluralina, Protham (0-isopropil-N-fenil-carbamato), Sulfona, Sulfanilamida poderia representar a consequência de uma lesão bioquímica específica, responsável pelo entumescimento radial submeristemático. DEYSSON & DELAGE (1955) chamam a atenção para a analogia existente entre a Trifluralina e a Colchicina com respeito ao antagonismo entre ambas as drogas com as vitaminas do grupo B, especialmente, ácido nicotínico e riboflavina. Demonstraram atividade anti-desidrogenásica na Trifluralina, a mesma propriedade foi provocada por DEYSSON & DELAGE (1955) existir na Colchicina. TORREY (1953) demonstrou serem as vitaminas do grupo B, especialmente tiamina, ácido nicotínico e riboflavina importantes para o crescimento e alongamento das raízes. CORBETT & JUNQUEIRA (1943) demonstraram que a sulfanilamida acarretava em animais, sinais e sintomas de deficiência de vitamina do grupo B. No grupo de experiências realizadas, ficou demonstrado em animais recém-nascidos de ratas tratadas com Sulfona durante curto período na vigência da prenhez, que a droga produz sinais e sintomas da deficiência vitamínica do grupo B bem como os referidos animais se apresentaram em estado de extrema carência protéica.

CONCLUSÕES

- 1 - A DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) interfere com o crescimento das raízes de *Allium* na fase do desenvolvimento e da diferenciação dos tecidos em formação; altera o aspecto, a conformação e o crescimento radiculares.
- 2 - A DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) imitou e reproduziu as imagens histo e citopatológicas que se observaram quando o mesmo material biológico foi tratado, nas mesmas condições experimentais pela Colchicina, Trifluralina e Sulfanilamida.
- 3 - Os estudos macro e microscópicos das raízes de *Allium* tratadas pela DIAMINO DIFENIL SULFONA, Colchicina, Trifluralina e Sulfanilamida, permitiram concluir que seus efeitos são semelhantes em muito dos seus aspectos e seus resultados são estatisticamente significativos.
- 4 - A DIAMINO DIFENIL SULFONA altera os mecanismos e as condições que orientam o crescimento radicular durante os períodos iniciais do desenvolvimento, perturbando em nível celular a fisiologia do alongamento radicular - se comporta como herbicida.

R E S U M O

O autor descreve as modificações que se observam quando raízes de cebola, *Allium cepa* L. e de alho, *Allium sativum* L. e *Allium ampeloprasum* L. crescidas em cultura hidropônica, são transferidas e mantidas durante vários períodos de tempo nas mesmas condições experimentais, numa solução de DIAMINO DIFENIL SULFONA (DDS) em água destilada.

A DIAMINO DIFENIL SULFONA prejudicou o desenvolvimento radicular dos *Allium* alterando-lhes o aspecto, a conformação e o crescimento das raízes.

A análise estatística demonstrou que os resultados da inibição produzida pela DIAMINO DIFENIL SULFONA sobre o crescimento radicular são altamente significativos.

É de se notar ainda que em alguns dos aspectos, a sulfona imitou o comportamento e reproduziu as imagens histo e citopatológicas que se observam quando raízes se desenvolvem na presença da Colchicina e de certos herbicidas. Os resultados preliminares que se vão obtendo mediante a utilização de outros reagentes biológicos revelam e confirmam que as sulfonas alteram os mecanismos e as condições que orientam a histogênese, em especial, durante os períodos iniciais do desenvolvimento e, poderão trazer novas informações sobre o efeito patrogênico das sulfonas, ou mesmo, perturbador da fisiologia do desenvolvimento celular.

B I B L I O G R A F I A

ALBERT, A. - 1971 - Relations between molecular structure and biological activity: Stages in the evolution of current concepts. Ann. Rev. of Pharmacology, 11:13-36.

ANKER, W. - 1951 - Wirkung von Sulfonamiden und Antisulfonamiden auf das Wachstum Pisumwurzeln in steriler Organkulture. Mitteil. Naturforsch. Ges. Bern., 8:55-122.

BAYER, D.E.; C.L. FOY; T.E. MALLORY; E.G. CUTTER - 1967 - Morphological and histological effects of Trifluralin on root development. An. J. Bot., 54(8):945-952.

BOLL, W.G. - 1955 - Inhibition of excised tomato roots by sulfamylamide and its reversal by p-aminobenzoic acid and N-pteroylglutamic acid. Plant. Physiol., 30:161-168.

BONNER, J. - 1942 - A reversible growth inhibition of isolated tomato roots. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 28:321-324.

BOX, G.E.P. - 1954 - Some theorems on quadratic forms applied in the study of analysis of variance problems, I. Ann. Math. Stat., 25: 290-302.

CAMUS, G. & C. LANCE - 1955 - Action de la penicilline G sur le developement des tissus végétaux. Année biol., 31 263-277.

- CHAKRABORTY, A. & B.B. BISWAS - 1954 - The effect of Colchicine on nucleic acid and protein synthesis. Exper. Cell. Res., 38:57-65.
- CHAMBERLAIN, C.J. - 1935 - Methods in plant histology. Chicago.
- COIRO, J.R.R.; D.R. WEIGL; J. KISIELIUS; H. MENEZES; J.A.T. BILOTA - 1972 - A new embedding medium for biological material (Polylite 8001). Ciência e Cultura, 24(7):660-662.
- COIRO, J.R.R. & A. BRUNNER Jr. - 1972 - Polylite 8001: A new embedding medium for electron microscopy. Rev. Microsc. Elect., 1(1): 12.
- CORBETT, C.E. & L.C. UCHÔA JUNQUEIRA - 1943 - Alguns aspectos da toxicologia da sulfanilamida - Contribuição para o conhecimento de seu modo de ação. São Paulo Médico, abril, pp. 235-245.
- DECLOURT, A. & G. DEYSSON - 1976 - Effects de la Trifluraline sur les méristèmes radiculaires d'*Allium sativum*. Cytologia, 41:75-84.
- DEYSSON, G. - 1948 - Contribution à l'étude du "syndrome mitoclasique". Tese de Doutorado em Farmácia. Paris.
- DEYSSON, G. - 1956 - Les facteurs de la mito-inhibition végétale. Exposé actuels de Biologie cellulaire. Masson Éd. Paris.
- DEYSSON, G. - 1962 - Sur l'utilisation des levures pour l'étude d'effets cytotoxiques. Mise au point d'une technique. Ann. Pharm. fr., 20:682-689.

- DEYSSON, G. & M. DELAGE - 1965 - Étude a l'aide du test *Allium* de l'influence de diverses citamines du groupe B sur l'action mitoclasique de la colchicine. Protection exercés par un melange d'amide nicotinique et de riboflavine. Compt. Rend. Acad. Sc., 261:5187-5190.
- DUSPIVA, F. - 1971 - Biochemie der Mitose, pp. 480-568. In: H.W. ALTMANN (ed.). Der Zellkern. Handb. Allg. Pathol. 2/II/1, Springer, Berlin-Heidelberg - New York.
- ENNIS, W.B. Jr. - 1948 - Some cytological effects of 0-isopropyl-N-phenyl carbamato upon Avena. Am. J. Bot., 35:15-21.
- FAHRENBACH, M.J.; K.H. COLLINS; M.E. ULTQUIST; J.M: SMITH Jr. - 1954 Sulphonamides derivatives of pteridines. Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Pteridines. G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron Ed., pp.173-182.
- FOURNEAU, E.; J. TRÉFOUEL; F. NITTI; D. BOVET - 1936 - Action du para-aminophenyl sulfamide sur moisissures. Compt. Rend. Soc. Biologie, 122:652-654.
- FRIES, N. - 1953 e 1954 - citado por J.G. TORREY (1965). In: Physiology of root elongation. Ann. Rev. Plant Physiol., 7:247.
- FRITZGERALD, P.H. & L.H. BREHAUT - 1970 - Depression of DNA synthesis and mitotic index by colchicine in cultured human lymphocytes. Exp. Cell Res., 59:27-31.

- GAVAUDAN, P.; N. GAVAUDAN; N. POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF - 1937 - Sur l'influence de la colchicine sur la caryocinèse dans les méristèmes radiculaires de l'*Allium cepa*. Compt. Rend. Soc. Biologie, 210:705-708.
- GHELARDI-PRIMAVORI, G. - 1959 - Contributo allo Studio di um saggio biologico su vegetali per la volutazione di Farmaci presumibilmente antineoplastici; notes I e II. Bolletino Chimico Farmaceutico, 98:529. Idem 1961: (100:112):
- GUINOCHET, M. - 1940 - Sur quelques modifications des reactions physicochimiques de la cellule végétale, provoqués par les substances mitoinhibitrices. Compt. Rend. Soc. Biologie, 210:579-580.
- HADDER, J.C. & G.B. WILSON - 1958 - Cytological assay of C- Mitotic and prophase poison action. Chromosoma, 9:91-104.
- HOAGLAND, D.R. & D.I. ARNON - 1950 - The water culture method for growing plants without soil. Calif. Agri. Expt. Sta. Cir., 547.
- HOLLANDE, A. Ch. - 1916 - Coloration noire des coupes histologique par l'emploi du chloro-carmin a l'alume de fer. Compt. Rend. Soc. Biologie, 79(14):662-665.
- JENSEN, W.A. & LEROY G. KAWALJIAN - 1958 - An analysis of cell morphology and the periodicity of division in the root tip of *Allium cepa*. Am. J. Bot., 45:365-372.

- JOHANSEN, D.A. - 1950 - Plant Microtechnique. McGraw.Hill Book Company, New York.
- KELLIKOTT, W.E. - 1904 - The daily periodicity of cell division and the elongation in the root of *Allium*. Bull. Torrey Bot. Club., 31: 529-550.
- KORODY, E. - 1937 - Studien an Spross-Vegetationspunkt von *Abies concolor*; *Picea excelsa* und *Pinus mentana*. Boetr. z. Biol. d. Pflanzen, 25(1):23-29.
- LACHARME, J. - 1961 - Mode d'action des tetraciclins sur les divers métabolismes de Phanérogames. Tese de Doutorado em Ciências Naturais. Lion.
- LAUGHLIN, H.H. - 1919 - Duration of the several mitotic stages in the dividing root tip cell of the common onion. Carnegie Inst. Washington Publ., nº 265.
- LEVAN, A. - 1938 - The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. Hereditas, 24:471-486.
- LEVAN, A. - 1949 - The influence of chromosomes and mitosis of chemicals as studied by the *Allium* test. Hereditas (suppl.):325-337.
- LEVAN, A. - 1951 - Chemically induced chromosome reactions in *Allium cepa* and *Vicia faba*. Symposia on Quantitative Biology, 14:233-243.

- LIGNOWSKI, E.M. & E.G. SCOTT - 1972 - Effect of Trifluralin on mitosis. Weed Science, 20(3):267-270.
- LOVELESS, A. - 1951 - Qualitative aspects of chemistry and biology of radio-mimetic (mutagenic) substances. Nature, 167: 338-342.
- MCGILVERY, R.W. - 1970 - Biochemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia 5, Pa, USA.
- MANGENOT, G. & S. CARPANTIER - 1941 - Action du p-aminophenyl sulfamide et l'acide p-aminobenzoïque sur les végétaux supérieurs. Compt Rend. Soc. Biologie, 135:1053-1056.
- MAREN, T.H. - 1976 - Relations between structure and biological activity of sulfonamides. Ann. Rev. Pharmacol., 16:309-327.
- MEDINA, H. - 1953 - Ensaios de coloração com o clorocarminato de ferro de A. Ch. Hollande (1916). I. Coloração de helmintos comprimidos. Arg. Biol. Tecnol., 7(5):25-28.
- MEDINA, H.S.G.; T.L. MEDINA; S.S. MUNFORD; H.G. TSE - 1978 - Efeito das sulfonas sobre células e tecidos em desenvolvimento. Efeitos da diamino-difenil-sulfona sobre o desenvolvimento de ovos de ouriços do mar, *Lytechinus variegatus* Lamarck, var. atlanticus. Resume do VII Congres. Latinoamericano, pp.229. USP - São Paulo.
- NÉTIEN, G. - 1960 - Action des antibiotiques sur des végétaux. Prod. Pharm., 15:45-53.

- REVELL, S.H. - 1953 - Chromosome breakage by X-rays and radio-mimetic substances in *Vicia*. Heredity, 6(suppl.):107-124.
- SCHULTZ, D.P.; H.H. FUNDERBRUK; N.S. NEGI - 1968 - Effect of Trifluralin on growth, morphology and nucleic acid synthesis. Plant Physiology, 43:265-273.
- SEVAG, M.G.; M. SHELBURNE; S. MUDD - 1942 - The action of sulfonamides on the respiration of bacteria and yeast. Inhibition of bacterial and yeast carboxylases by sulfonamide drugs structurally related to carboxylase. J. Gen. Physiol., 25:805-817.
- SEXTON, W.A. - 1953 - Chemical constitution and biological activity. SPON'S Industrial Chemistry Series. E. & F.N. SPON Ltd. London, Capitulo VIII:L22-136.
- STOOL, R. - 1943 - Actions du para-aminobenzenesulfonamide et de l'acide para-aminobenzoique sur le development d'*Allium cepa*. Compt. Rend. Soc. Biologie, 137:170-171.
- STRULLER, T. - 1968 - citado por KOROLKOVAS (1970), Fundamentos de Farmacologia Molecular. Cap. 6, pp.174-195.
- TORREY, J.G. - 1953 - The role of vitamins and micronutrient elements in the nutrition of the apical meristem of pea-roots. Plant Physiology, 29:279-287.
- TORREY, J.G. - 1965 - Physiology of root elongation. Ann. Rev. of Plant Physiology, 7:237-265.

- VASILIEV, J.M.; I.M. GELFAND; V.I. GUELSTEIN - 1971 - Inhibition of DNA synthesis in cell cultures by colcemid. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68:977-979.
- WASIELEWSKI, W. von - 1902 - Teoretische und experimentelle Beitrüge zur Kenntniss der Amitose. Jahrb f. wiss. Bot., 38:377-420.
- WINKLER, K.C. & P.G. HAAN - 1948 - On the Action of Sulfanilamide. XII. A Set of Noncompetitive Sulfanilamide Antagonists for *Escherichia coli*. Arch. Biochem., 18:97-107.
- WOODS, D.D. - 1954 - Metabolic relation between para-aminobenzoic acid and folic acid in micro-organisms. Ciba Foundation Symposium on Chemistry and Biology of Pteridines, pp. 220-236. G.E.W. Wolstenholme and M.P. Cameron, Ed. Little Brown and Company. Boston.
- WU, D.L. & K.P. DuBOIS - 1970 - Studies on the Mechanism of Toxic Action of Diaminodifenilsulfone (DDS) to Mammals. Arch. int. Pharmacodyn., 183:36-45.

E S T A M P A 1

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raízes de Allium ampeloprasum tratadas com Sulfona* (4.027×10^{-4} M)

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Observar o crescimento radial do meristema e as modificações morfológicas sofridas pelas raízes no fim de cada período de tratamento.

Original: Medina

Classif.	1
Autor	M 469 f
V.	2
Ex.	
Tombo BC/	5552A

CM-00013248-5

ESTAMPA 1

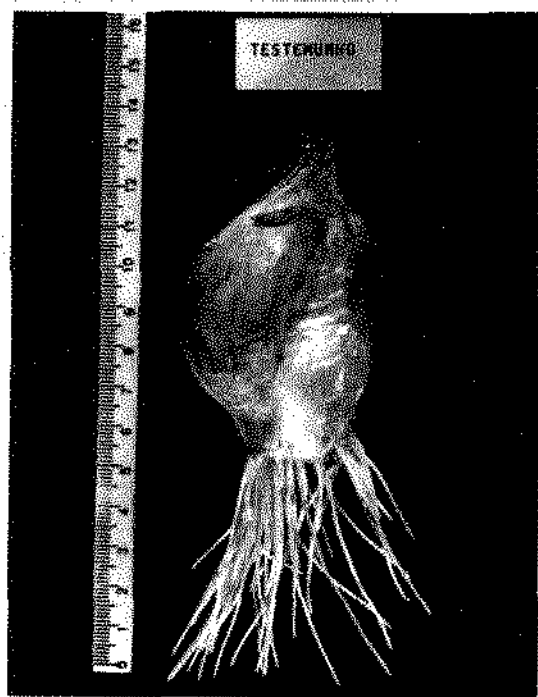


FIGURA 1

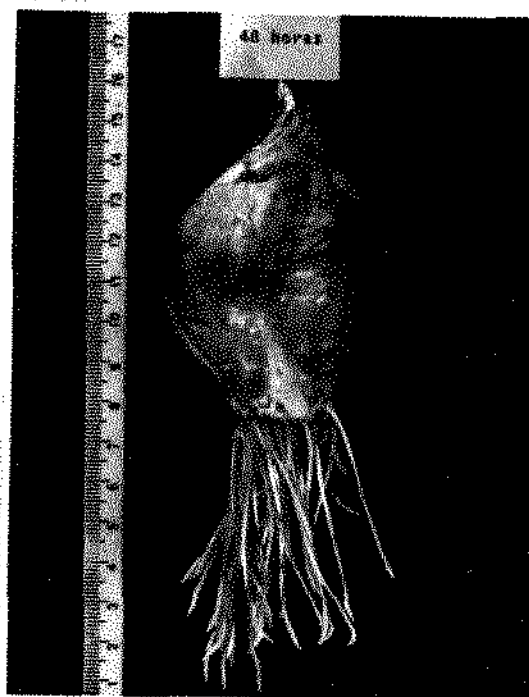


FIGURA 2

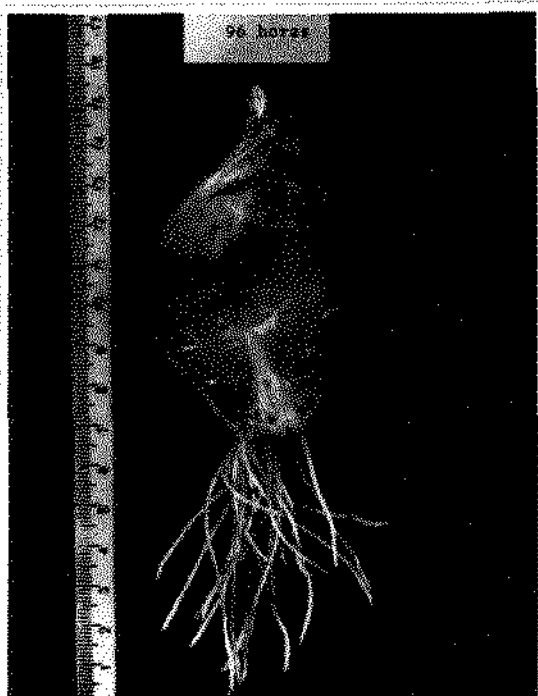


FIGURA 3

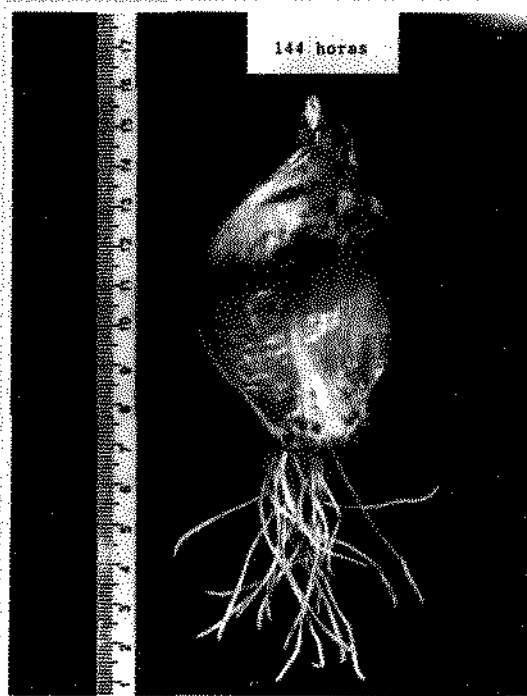


FIGURA 4

E S T A M P A 2

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raiz de Allium cepa L. tratada com Sulfona*
(4.027×10^{-4} M)

DESCRIÇÃO DA FIGURA - Corte longitudinal de raiz de cebola tratada com sulfona durante 48 horas. Observar o crescimento radial, a vacuolização e o aspecto normal das células do meristema ($\pm 30 \times$).

Original: Medina

ESTAMPA 2



FIGURA 1

ESTAMPA 3

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raízes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Sulfona (Figura 1), Sulfanilamida (Figura 2), Colchicina (Figura 3) e Trifluralina (Figura 4) nas concentrações 4.027×10^{-4} M*

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Observar a retomada do crescimento, emaranhado das raízes e o aspecto das dilatações radiais, quando as raízes após 48 a 96 horas de tratamento retornam para a cultura hidropônica.

Original: Medina

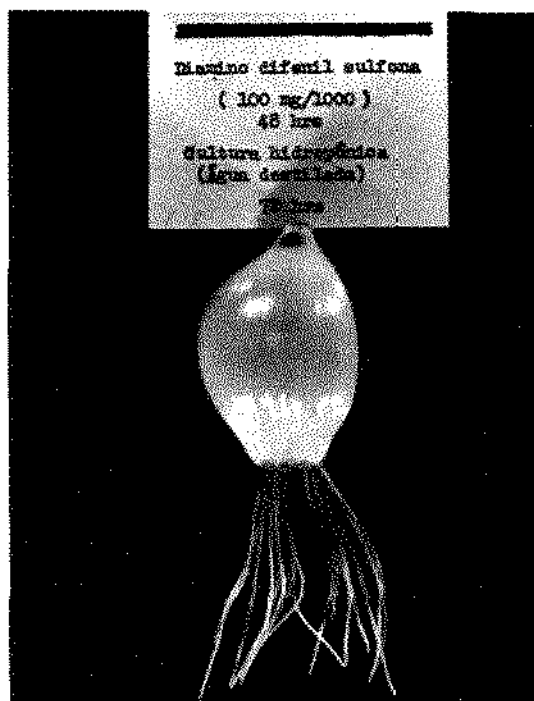


FIGURA 1

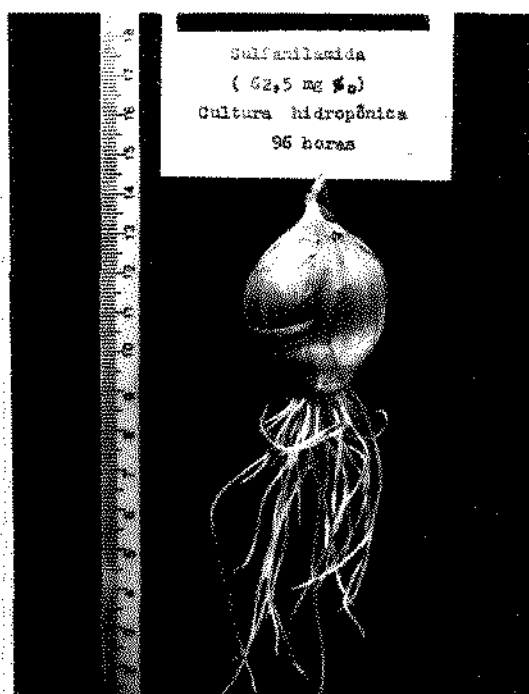


FIGURA 2

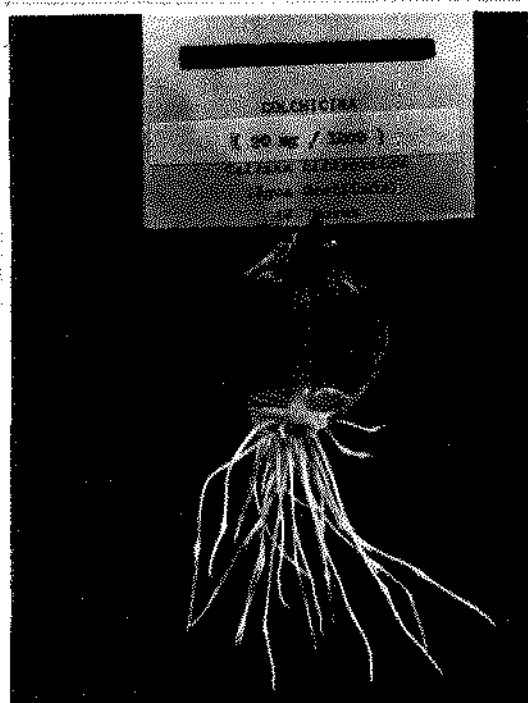


FIGURA 3

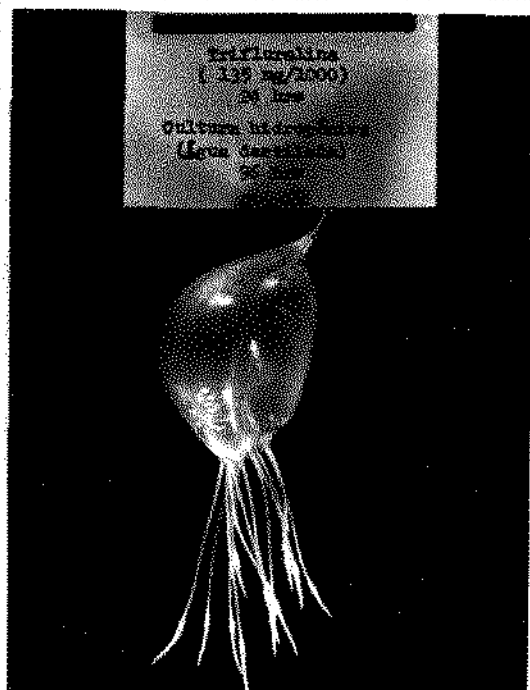


FIGURA 4

E S T A M P A 4

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raízes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Sulfona 4.027×10^{-4} M durante 35 e 40 horas*

DESCRIÇÃO DA FIGURA - Observar o crescimento retorcido e enredado das raízes após 10 dias de permanência na solução nutritiva.

Original: Medina



FIGURA 1

E S T A M P A 5

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raizes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Sulfona 4.027×10^{-4} M, diafanizadas e observadas contra fundo escuro*

DESCRIÇÃO DA FIGURA - A transparência normal permite observar ao longo do xilema pontos de neoformação de raízes laterais.

Original: Medina

ESTAMPA 5

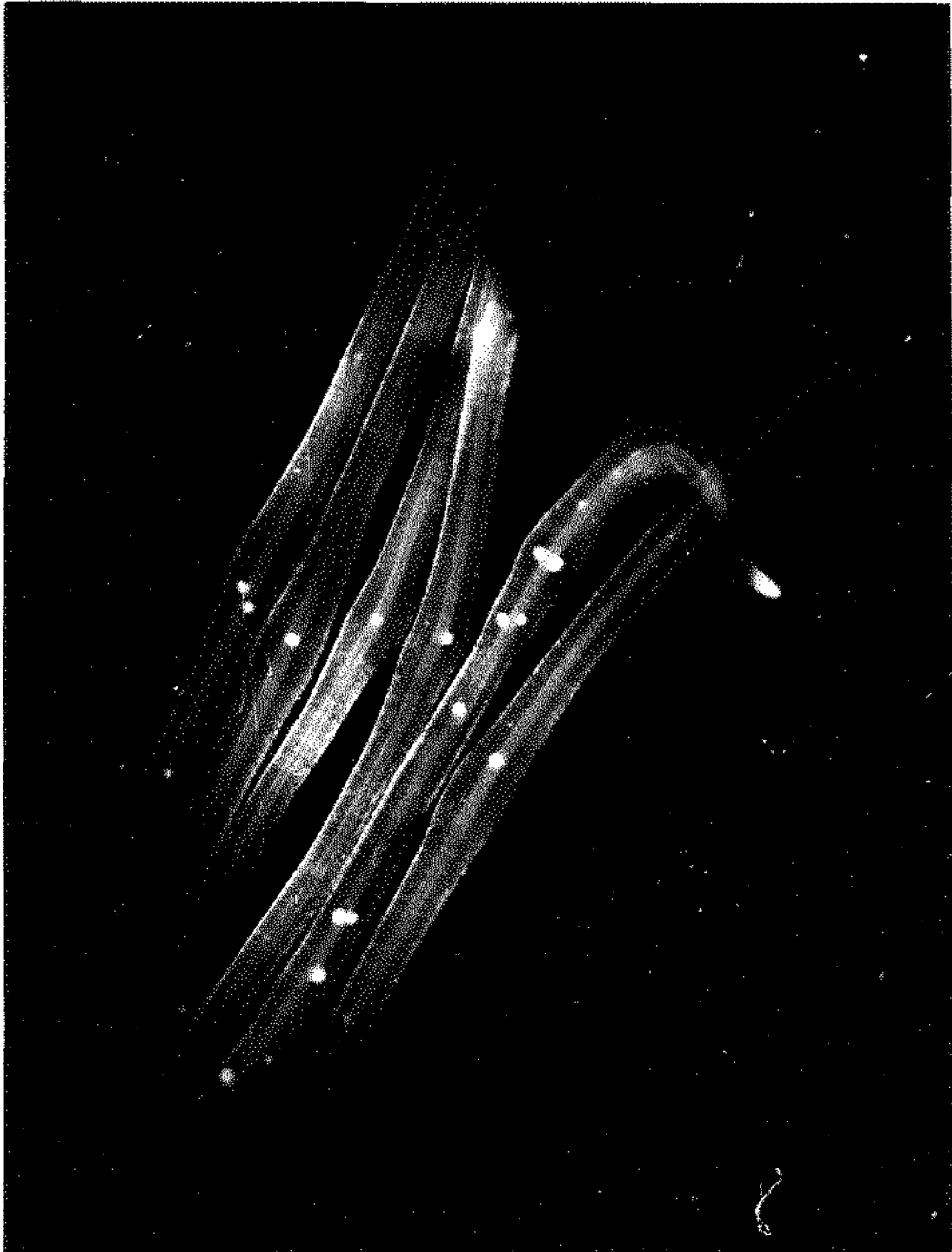


FIGURA 1

E S T A M P A 6

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raizes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Sulfona (4.027×10^{-4} M)*

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Fixação: Bouin-Hollande. Inclusão: Parafina. Coloração: Clorocarminato de ferro.

Focos de neoformação radicular junto ao xilema no periciclo (30 X).

Original: Medina

ESTAMPA 6



FIGURA 1

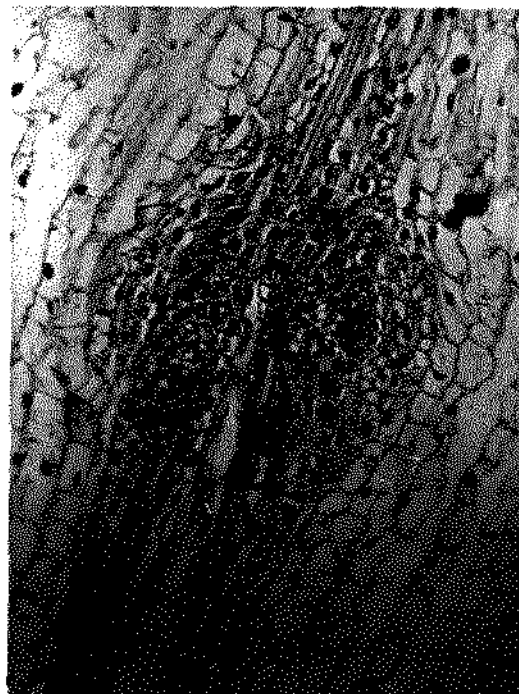


FIGURA 2



FIGURA 3

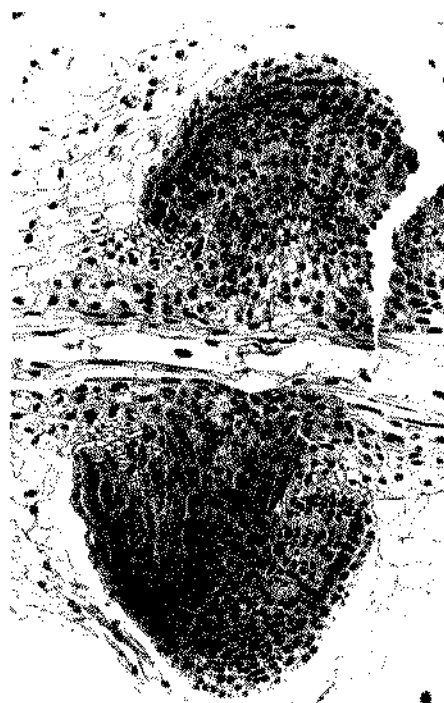


FIGURA 4

E S T A M P A 7

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raizes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Colchicina (Figura 1); Trifluralina (Figura 2) e Sulfona (Figura 3) (4.027×10^{-4} M)*

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Cortes histológicos. Fixação: Bouin-Hollande. Inclusão: Parafina. Coloração: Clorocarminato de ferro.

Observar os efeitos sobre os núcleos, mitoses e sobre o citoplasma fundamental (80 X).

Original: Medina

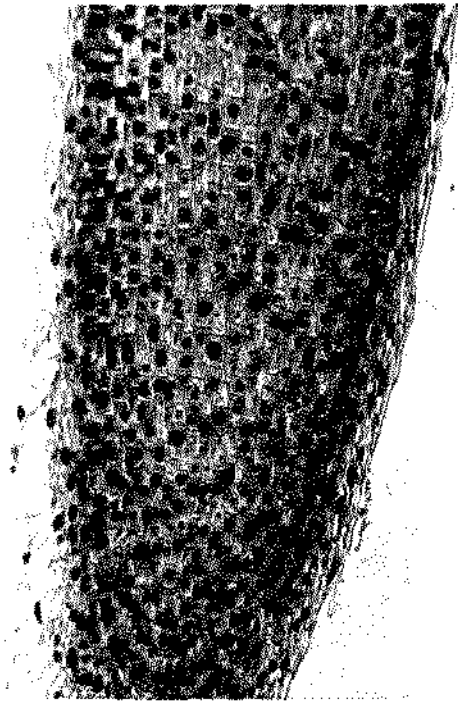


FIGURA 1

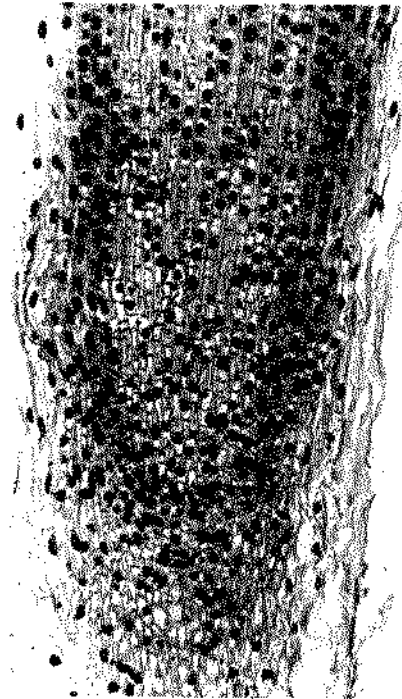


FIGURA 2



FIGURA 3

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raízes de Allium ampeloprasum L. tratadas com Colchicina (Figura 1); Trifluralina (Figura 2) e Sulfona (Figura 3) (4.027×10^{-4} M)*

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Cortes histológicos. Fixação: Bouin-Hollande. Inclusão: Parafina. Coloração: Clorocarminato de ferro.

O número de mitoses statmocinéticas ou hemicinéticas, de núcleos hipertrofiados e aberrantes são mais abundantes nas raízes tratadas com Colchicina, a seguir com a Trifluralina e por último com a Sulfona. Observar polipolidismo em todos os exemplos (200 X).

Original: Medina

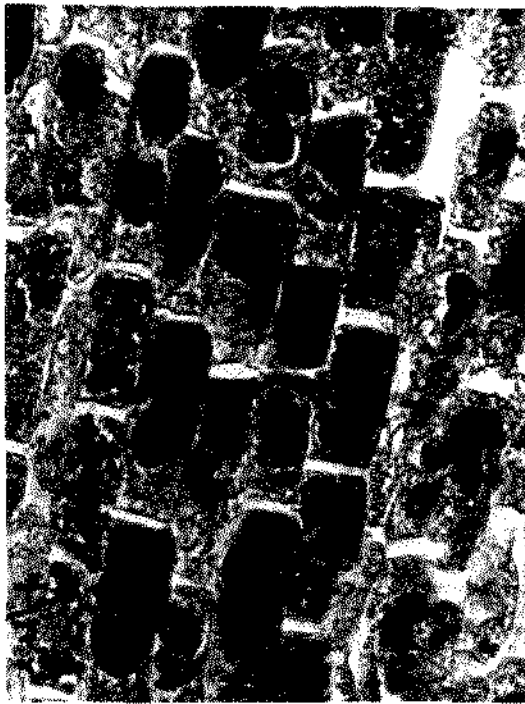


FIGURA 1

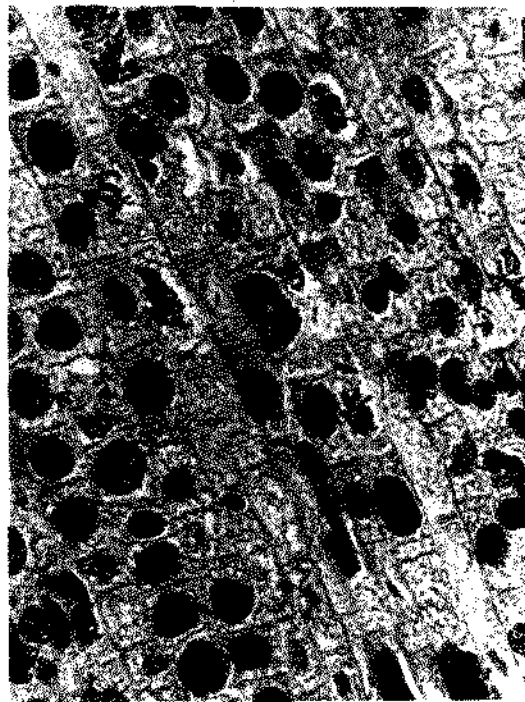


FIGURA 2

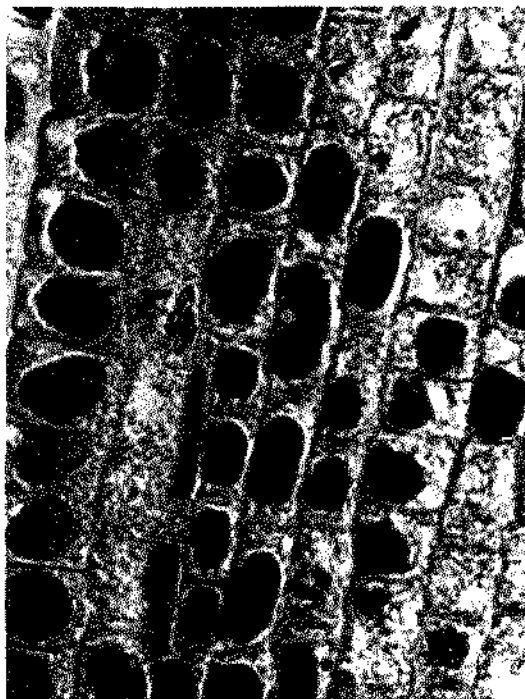


FIGURA 3

E S T A M P A 9

TÍTULO DA ESTAMPA: *Raízes de Allium cepa L. tratadas com Sulfona*
(4.027×10^{-4} M)

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS - Ninho de neoformação de células localizado no xilema, núcleos hipercromáticos apresentando fases diferentes do ciclo mitótico. Na foto ampliada; neoformação radicular. As setas assinalam mitoses anormais (100 X) e (200 X).

Original: Medina



FIGURA 1

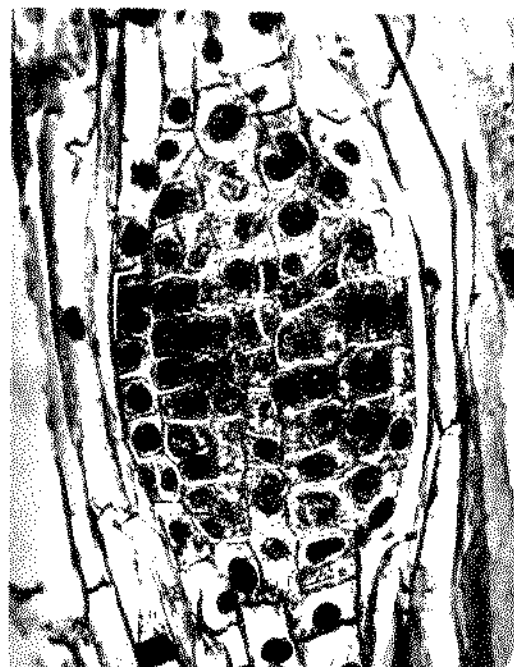


FIGURA 2

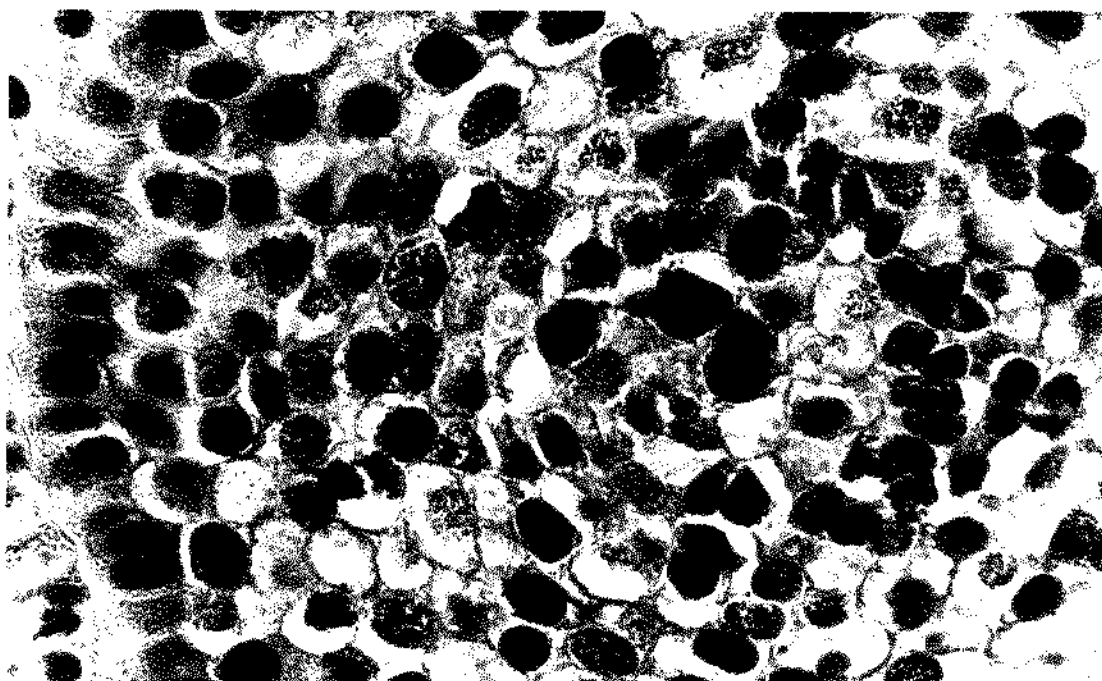


FIGURA 3

TÍTULO DA ESTAMPA: *Eletromicrografia do meristema de raiz de Allium ampeloprasum L. tratada durante 48 horas com Sulfona (4.027×10^{-4} M)*

DESCRIÇÃO DA FIGURA - A análise ultra-estrutural revela discretas alterações da parede celular (Pc) que sofre descolamento da membrana celulósica, pequeno número de ribossomos no citoplasma, aumento do número de mitocôndrios (M) e de dietiossomos (Dt). Núcleos (N), carioteca (Ct), cromatina frouxa (Cr) e retículo endoplasmático de aspecto liso (Re) (11.600 X).

Fixação: Gluteraldeído/ôsmio. Inclusão: Polylite 8001. Coloração: Acetato de uranila

Original: Medina



FIGURA 1