

Evaluación toxicológica de glifosato y de su formulación comercial glifosato Atanor II® mediante el test de *Allium cepa*

Toxicological Assessment of Glyphosate and its Commercial Formulation Glyphosate Atanor II®
using the *Allium cepa* Test

DOI: <https://doi.org/10.63207/ai.v8i15.131>

Dardo Andrés Roma ¹, María Paula Tonini², Delia Elba Aiassa ¹, Fernando Javier Mañas ^{*2}

1. Laboratorio de Genética y Mutagénesis Ambiental (GeMA), Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto.
2. Laboratorio de Farmacología, Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

Resumen. El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo y de acción sistémica. Se evaluó la citotoxicidad y genotoxicidad de este compuesto y de su formulación comercial Glifosato Atanor II®, mediante el test de *Allium cepa*. Se trabajó con 3 concentraciones de glifosato grado analítico y 3 de la formulación comercial, disueltas en medio acuoso: 480, 1440 y 2400 µg/l. La longitud de las raíces mostró una disminución dosis-respuesta, estadísticamente significativa, a medida que se incrementó la concentración tanto del principio activo como de la formulación. El índice mitótico evidenció una reducción de la división celular a medida que aumentó la concentración de glifosato y de su formulación comercial, encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones 1440 µg/l ($p \leq 0,05$) y 2400 µg/l ($p \leq 0,001$). Además, se observó una correlación estadísticamente significativa entre la reducción del índice mitótico y la disminución en la longitud de las raíces de los bulbos expuestos a estos 2 compuestos. El índice de aberraciones totales en anafase/telofase demostró un incremento de aberraciones a medida que aumentó la concentración de glifosato y de su formulación, encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones de 1440 µg/l ($p \leq 0,01$ para ambos compuestos) y de 2400 µg/l ($p \leq 0,01$ para el principio activo y $p \leq 0,05$ para la formulación). Estos resultados ponen de manifiesto los efectos citotóxicos y genotóxicos que glifosato, tanto en principio activo como en formulación comercial, pueden causar al ambiente y a los organismos expuestos.

Palabras clave: glifosato, Glifosato Atanor II®, Test *Allium cepa*, citotoxicidad, genotoxicidad

Abstract. Glyphosate is a broad-spectrum, non-selective, and systemic herbicide. The cytotoxicity and genotoxicity of this compound and its commercial formulation, Glyphosate Atanor II®, were evaluated using the *Allium cepa* test. Three concentrations of analytical-grade glyphosate and three of the commercial formulation, dissolved in aqueous medium, were used: 480, 1440, and 2400 µg/L. Root length showed a statistically significant dose-response decrease as the concentration of both the active ingredient and the formulation increased. The mitotic index revealed a reduction in cell division as the concentration of glyphosate and its commercial formulation increased, with differences from the control observed at concentrations of 1440 µg/L ($p \leq 0.05$) and 2400 µg/L ($p \leq 0.001$) in both cases. Additionally, a statistically significant correlation was observed between the reduction in the mitotic index and the decrease in root length in bulbs exposed to these two compounds. The total aberration index in anaphase/telophase showed an increase in aberrations as the concentration of glyphosate and its formulation increased, with differences from the control at concentrations of 1440 µg/L ($p \leq 0.01$ for both compounds) and 2400 µg/L ($p \leq 0.01$ for the active ingredient and $p \leq 0.05$ for the formulation). These results highlight the cytotoxic and genotoxic effects that glyphosate, both as an active ingredient and in its commercial formulation, can cause to the environment and exposed organisms.

Key words: Glyphosate, Glyphosate Atanor II®, *Allium cepa* test, cytotoxicity, genotoxicity

Artículo recibido: 20 de febrero de 2024. Artículo aceptado: 2 de julio de 2025.

*Autor para correspondencia: Fernando Javier Mañas, Ruta 36, km 601, Río Cuarto. 0358-4676168. fmanas@ayv.unrc.edu.ar.
Financiamiento: Secretaría de Ciencia y Técnica-Universidad Nacional de Río Cuarto.

INTRODUCCIÓN

El glifosato es un ácido orgánico débil, que consiste en un grupo glicina y un grupo fosfonometilo y recibe el nombre químico de N-fosfonometilglicina (Agrofit, 2009). En las formulaciones comerciales, el glifosato es combinado con una base orgánica, isopropilamina, para dar lugar a la formación de una sal con mayor solubilidad. Esta sal combinada con agua y coadyuvantes, son los componentes de mayor proporción del producto comercial (Williams *et al.*, 2000; Mañas *et al.*, 2006). Estos coadyuvantes ayudan a mejorar la eficiencia de aplicación del producto e incluyen a surfactantes, y otros compuestos como antiespumantes, colorantes, iones inorgánicos y reguladores de pH.

El herbicida es utilizado en tratamientos post-emergencia para el control de malezas anuales y/o perennes en ambientes agrícolas, forestales y paisajísticos (Durán Merás, *et al.*, 2005). Controla eficazmente una amplia variedad de gramíneas y plantas dicotiledóneas, interfiriendo en la formación del ácido corísmico, principal intermediario de los tres aminoácidos aromáticos esenciales para la vida de las mismas, como fenilalanina, tirosina y triptófano, ya que es un inhibidor altamente selectivo de la actividad de la enzima 5-Enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (Williams *et al.*, 2000) (Salazar Mercado & Caleño, 2020). Esta vía metabólica del ácido corísmico es exclusiva y esencial en el metabolismo de plantas, hongos y bacterias e inexistente en animales debido a que carecen de esta enzima (Isenring, 2004; Monroy *et al.*, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó la clasificación del glifosato de acuerdo con su peligrosidad como de clase III: Poco peligroso en relación a la exposición aguda (es decir, el riesgo resultante de una exposición única o repetida durante un periodo relativamente breve) (OMS, 2020). En marzo del año 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), agencia intergubernamental que forma parte de la OMS clasificó al glifosato en el grupo **2A**, como un agente probablemente cancerígeno para humanos (IARC, 2015).

La especificidad del mecanismo de acción de este herbicida sobre las plantas ha sido empleada reiteradamente para defender la supuesta inocuidad del glifosato para los organismos no blanco, sobre la base del mecanismo de acción, la inhibición de una enzima que no está presente en animales y por tanto tampoco en el ser humano (Solomon *et al.*, 2007). Sin embargo, esto no implica *a priori* que este compuesto no pueda generar toxicidad por otros

mecanismos no relacionados a su actividad como herbicida, como lo señalan diversas investigaciones realizadas, que demuestran que el glifosato no es tan seguro como inicialmente se pensaba (Mañas *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2017; Oláh *et al.*, 2022). La capacidad de glifosato de interactuar con el material genético ha sido reportada por una gran cantidad de investigadores en todo el mundo por medio de distintas técnicas en diversos diseños experimentales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Mañas *et al.*, 2009a; Mañas *et al.*, 2009b; Woźniak *et al.*, 2018; Roma *et al.*, 2023; Vakhterova *et al.*, 2023). Sin embargo, en nuestro país continúa empleándose en grandes cantidades con pocas o nulas restricciones, determinando que poblaciones animales y humanas estén sometidas a una situación de riesgo que puede afectar su salud, así como a las futuras generaciones. La citotoxicidad y genotoxicidad de los diferentes compuestos que son esparcidos en el ambiente pueden ser evidenciadas a través de la utilización de bioensayos. El test de *Allium cepa* ha sido considerado como un excelente bioindicador de los efectos genotóxicos y mutagénicos de los contaminantes ambientales. Es un bioensayo establecido y validado por el Programa Internacional de Seguridad Química, la OMS, el Programa de la Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la EPA, como una prueba eficaz para evaluar *in vivo* la toxicidad como la genotoxicidad de diferentes contaminantes ambientales, incluyendo plaguicidas, metales pesados y contaminantes emergentes (Andrioli *et al.*, 2006; Datta *et al.*, 2018; Gallego & Olivero-Verbel, 2021), debido al rápido crecimiento de sus raíces y a la respuesta de su material genético a la presencia de sustancias citotóxicas y genotóxicas en los líquidos de ensayo (Moreno Palacio *et al.*, 2005). En el presente estudio, nos proponemos evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad del glifosato y de su formulación comercial Glifosato Atanor II® mediante el test de *Allium cepa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Compuestos a analizar

Se analizó glifosato grado analítico (N-fosfonometilglicina 99% pureza Sigma-Aldrich®) y Glifosato Atanor II® (43,8 g. de sal monopotásica de glifosato, equivalente en ácido N-fosfonometilglicina a 35,6 g. e ingredientes inertes y coadyuvantes cantidad suficiente para 100 ml).

Ensayo de *Allium cepa*

Se desarrolló el test de *A. cepa*, descrito inicialmente por Fiskesjö (1985) con las modificaciones realizadas posteriormente por Rank y Nielsen (1993). A cada bulbo se le quitaron las vainas externas hasta la primera vaina blanca, se desechó el brote apical y las porciones necrosadas del disco inferior. Se seleccionaron 35 bulbos de tamaño uniforme y de la misma variedad comercial (*Allium cepa* -Liliaceae-) obtenidos de una huerta orgánica, que se dividieron en 7 grupos, para los 6 diferentes tratamientos a evaluar y el control negativo. Se trabajó con 3 concentraciones de glifosato grado analítico disueltas en agua potable y 3 concentraciones de la formulación comercial Glifosato Atanor II® diluidas también en medio acuoso. En ambos casos, las concentraciones analizadas fueron de 480, 1440 y 2400 µg/l. Como control negativo se utilizó agua potable. Se colocaron los bulbos sobre la boca de los vasos cuidando que la zona radical quedara inmersa en el líquido.

La experiencia se completó a las 120 horas (5 días) de exposición de los bulbos a las soluciones a evaluar, renovándose las soluciones de prueba y la del control cada 24 horas. Durante este período, los bulbos se mantuvieron en oscuridad, con aireación constante y a una temperatura de entre 20 y 24° C. A las 48 horas de iniciado el ensayo, se cortaron 3 raíces por bulbo, que fueron sumergidas en Carnoy durante 15 horas a 5° C, para ser finalmente conservadas en etanol al 70% hasta el momento del estudio citogenético.

Determinación de la Toxicidad Aguda

Se retiraron todos los bulbos de las diferentes soluciones y del control, luego de 120 horas de exposición, y se cortaron por su base todas las raíces de los mismos para analizar la toxicidad aguda. El parámetro macroscópico evaluado que se utilizó como indicador para observar el efecto tóxico de los compuestos ensayados fue la longitud de las raíces. Cada tratamiento se comparó con el control negativo y la ocurrencia de toxicidad se consideró cuando la diferencia entre ellos fue significativa.

Determinación de la Citotoxicidad y Genotoxicidad

Se retiró cada raíz del etanol para realizar la extracción de la cofia y el corte de la zona meristemática. Se llevó a cabo la hidrólisis con 30 µl de HCl 1N durante 7 minutos y posteriormente, en un portaobjeto, se realizó la coloración con 30 µl de Orceína acetoclorhídrica al 2% durante 5 minutos. Finalmente se colocó el cubreobjetos y se realizó el squash durante 2 minutos.

Se analizaron 1.000 células por portaobjeto, con un aumento de 400X, totalizando 3.000 células para cada grupo de tratamiento a los fines de realizar el cálculo del índice mitótico. Se cuantificaron y tipificaron las aberraciones cromosómicas aneugénicas (incluyen cromosomas vagabundos y rezagados) y clastogénicas (incluyen puentes cromosómicos) en 100 células en anafase/telofase por preparado, con un aumento de 1.000X, totalizando 300 células en dichos estadios de división para cada grupo experimental.

Los parámetros microscópicos analizados se calcularon del siguiente modo:

$$\bullet \text{ Índice mitótico\%} = \frac{\text{Número de células en mitosis}}{\text{Número de células totales observadas}} \times 100$$

(IM)

$$\bullet \text{ Índice de aberraciones\%} = \frac{\text{Número de aberraciones totales}}{\text{Número de células en anafase/telofase}} \times 100$$

totales (IAT)

Análisis estadístico

Se realizó el test de Kolmogorov-Smirnov a los fines de verificar si los datos obtenidos siguieron una distribución normal. Se compararon las medias de cada tratamiento mediante el Análisis Unidireccional de la Varianza (ANOVA), empleando el test de comparación múltiple de Dunnett como post test. Finalmente se evaluó la existencia de una relación dosis-respuesta para los diferentes tratamientos a través de un análisis de correlación, utilizando el test de Pearson. En todos los casos, se consideró como significativo un $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

En la figura 1 se muestra la longitud promedio de las raíces de *A. cepa* (en mm) expuestas a diferentes tratamientos de glifosato y de la formulación comercial Glifosato Atanor II. Se observa una disminución no significativa en la longitud de las raíces en todos los tratamientos respecto del control. Sin embargo, se halló una disminución dosis-respuesta ($p \leq 0,05$) en este parámetro, a medida que se incrementó la concentración tanto del principio activo, glifosato, como de la formulación comercial ($r = -0,9117$ y $-0,9506$, respectivamente) (figuras 2a y 2b).

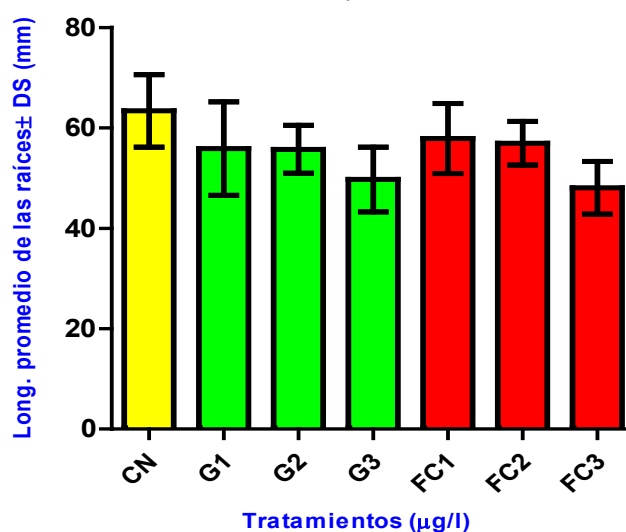


Figura 1: Longitud promedio de las raíces de *A. cepa* (en mm) expuestas a diferentes tratamientos de glifosato y de la formulación comercial Glifosato Atanor II®. Los datos se expresan como la media \pm DE. N=5. CN: Control negativo. G1: Glifosato 480 µg/l. G2: Glifosato 1440 µg/l. G3: Glifosato 2400 µg/l. FC1: Glifosato Atanor II® 480 µg/l. FC2: Glifosato Atanor II® 1440 µg/l. FC3: Glifosato Atanor II® 2400 µg/l.

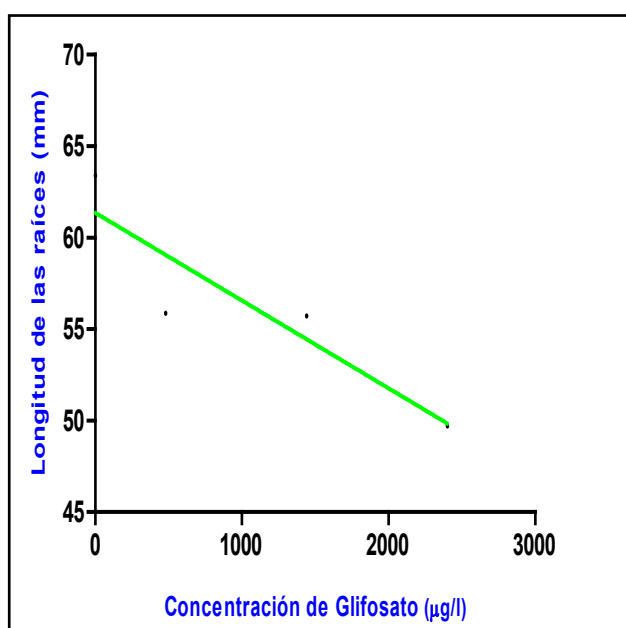


Figura 2a. Relación dosis-respuesta entre la concentración de glifosato (µg/l) y la longitud de las raíces (mm). $r = -0,9117$, $p \leq 0,05$.

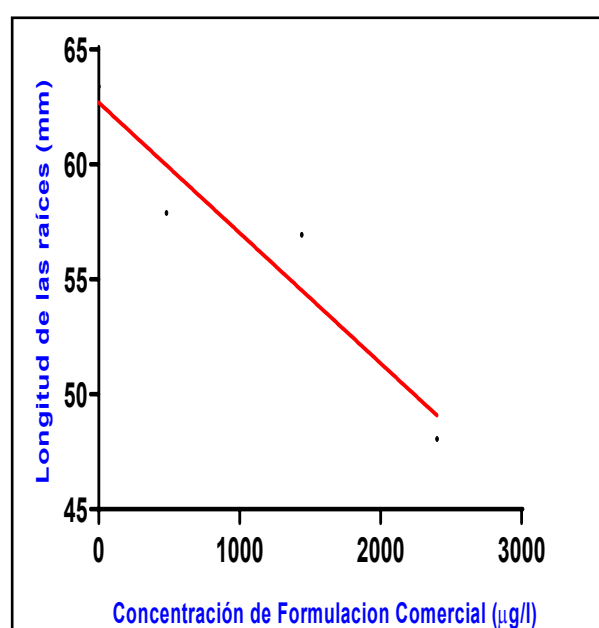


Figura 2b. Relación dosis-respuesta entre la concentración de la formulación comercial: Glifosato Atanor II® (µg/l) y la longitud de las raíces (mm). $r = -0,9506$, $p \leq 0,05$.

Los resultados del índice mitótico mostraron una reducción de la división celular a medida que aumentó la concentración de glifosato y de su formulación comercial, encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones de 1440 $\mu\text{g/l}$ ($p \leq 0,05$) y de 2400 $\mu\text{g/l}$ ($p \leq 0,001$) en ambos casos, como se presenta en la figura 3.

Se observó una reducción del índice mitótico que se correlaciona con la disminución en la longitud de las raíces de los bulbos expuestos a estos 2 compuestos. Esta correlación fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$), arrojando un valor de $r = 0,9926$ y $r = 0,9833$, para el principio activo y para la formulación comercial respectivamente, como puede observarse en las figuras 4a y 4b.

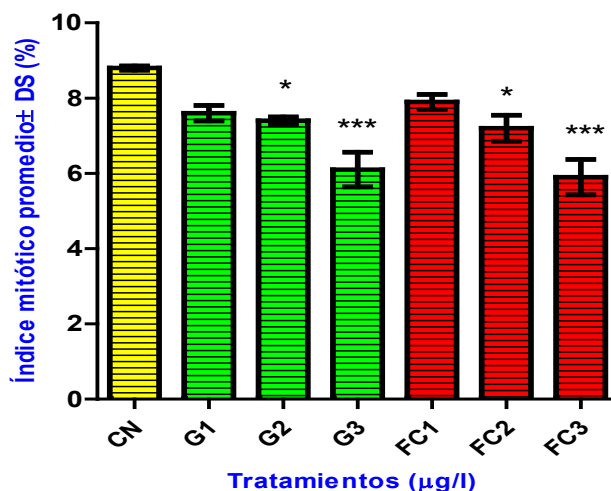


Figura 3. Índice mitótico promedio de las raíces de *A. cepa* (en %) expuestas a diferentes tratamientos de glifosato y de la formulación comercial Glifosato Atanor II®. Los datos se expresan como la media \pm DE. N= 3000 células. CN: Control negativo. G1: Glifosato 480 $\mu\text{g/l}$. G2: Glifosato 1440 $\mu\text{g/l}$. G3: Glifosato 2400 $\mu\text{g/l}$. FC1: Glifosato Atanor II® 480 $\mu\text{g/l}$. FC2: Glifosato Atanor II® 1440 $\mu\text{g/l}$. FC3: Glifosato Atanor II® 2400 $\mu\text{g/l}$.

* $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

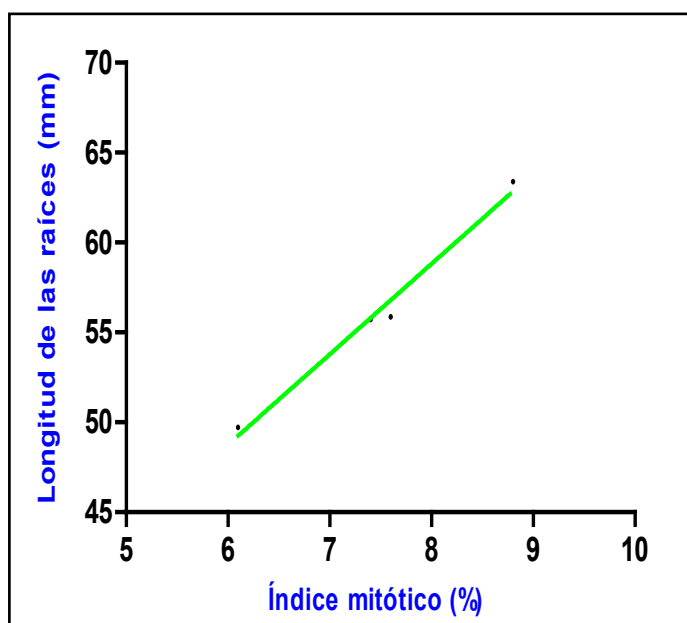


Figura 4a: Relación entre el índice mitótico (%) y la longitud de las raíces (mm) para glifosato. $r = 0,9926$, $p \leq 0,05$.

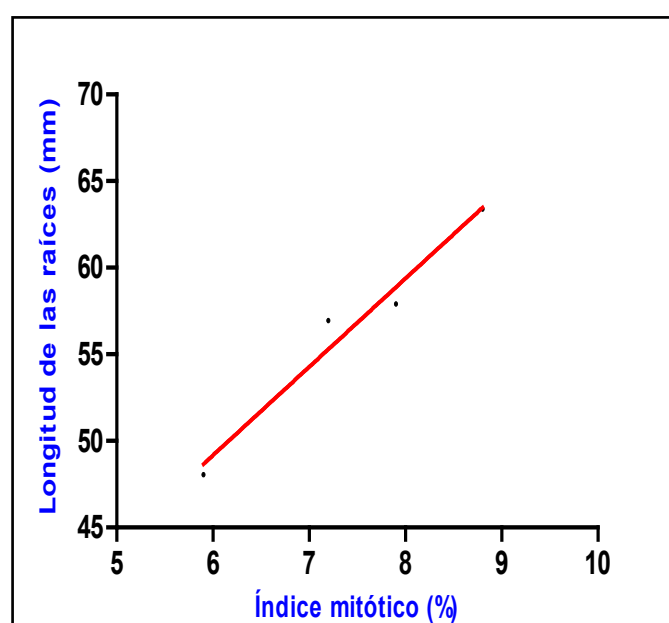


Figura 4b: Relación entre el índice mitótico (%) y la longitud de las raíces (mm) para Glifosato Atanor II®. $r = 0,9833$; $p \leq 0,05$.

La observación de las células de ápices radiculares

de bulbos expuestos a diferentes tratamientos de glifosato y de la formulación Atanor II®, evidenciaron la aparición de anomalías cromosómicas aneugénicas y clastogénicas en anafase/telofase. Entre las aberraciones aneugénicas se encontraron cromosomas vagabundos (figura 5a) y rezagados, mientras que entre las clastogénicas se encontraron puentes cromosómicos (figura 5b).

Con respecto al índice de aberraciones totales

en anafase/telofase los resultados mostraron un aumento tanto de aberraciones aneugénicas como clastogénicas a medida que aumentó la concentración de glifosato y de su formulación comercial; encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones de 1440 µg/l ($p \leq 0,01$ para ambos compuestos) y de 2400 µg/l ($p \leq 0,01$ para el principio activo y $p \leq 0,05$ para la formulación) (figura 6).



Figura 5a. Anafase con cromosomas vagabundos (adelantados) observada con una magnificación de 1000x indicando "efecto aneugénico". Barra: 10 µm

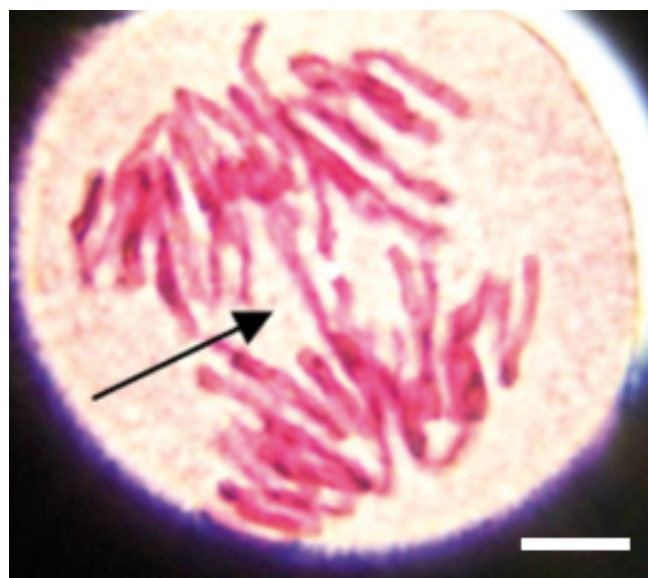


Figura 5b: Anafase con puente cromosómico observada con una magnificación de 1000x indicando "efecto clastogénico". Barra: 10 µm

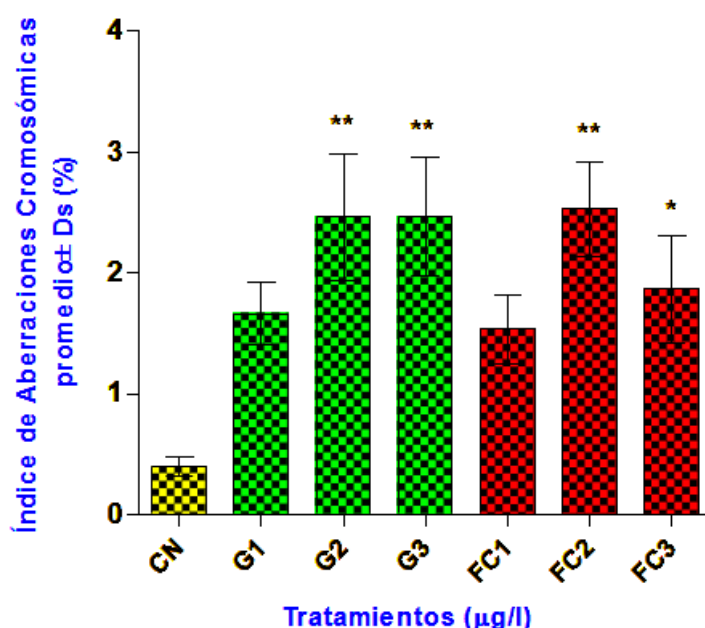


Figura 6: Índice de aberraciones cromosómicas totales promedio de las raíces de *A. cepa* (en %) expuestas a diferentes tratamientos de glifosato y de la formulación comercial Glifosato Atanor II®. Los datos se expresan como la media ± DE. N= 300 células. CN: Control negativo. G1: Glifosato 480 µg/l. G2: Glifosato 1440 µg/l. G3: Glifosato 2400 µg/l. FC1: Glifosato Atanor II® 480 µg/l. FC2: Glifosato Atanor II® 1440 µg/l. FC3: Glifosato Atanor II® 2400 µg/l. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

DISCUSIÓN

El test de *A. cepa* permite evaluar efectos tóxicos agudos como cambios en la longitud de las raíces; efectos citotóxicos a través de la disminución del índice mitótico; así como también efectos genotóxicos mediante el análisis de aberraciones cromosómicas que son documentadas por el estudio microscópico de los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz (Fiskesjö y Levan, 1994). El test de *A. cepa* se considera un modelo experimental y bioindicador valioso, gracias a su amplio tamaño de genoma (>15000 Mbp) y a su reducido número de cromosomas (2n= 16). Estas características facilitan el análisis de una variedad de parámetros, como el índice mitótico, micronúcleos y aberraciones cromosómicas. Además, los cromosomas del *A. cepa* presentan similitudes morfológicas con los cromosomas de mamíferos, lo que proporciona una correlación sólida entre los sistemas celulares vegetales y los de mamíferos. Por estas razones, el programa internacional de bioensayos de plantas ha adoptado el test de *A. cepa* para el monitoreo ambiental desde finales de la década de 1990 (Cabrería y Rodríguez, 1999). Este método sigue siendo ampliamente utilizado para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad del suelo y el agua contaminados por pesticidas, herbicidas y medicamentos veterinarios entre otros. Debido a su eficacia y fiabilidad, muchos autores han propuesto el test de *A. cepa* como un estándar en los estudios ambientales a lo largo de las décadas (Salazar Mercado y Caleño, 2020).

La longitud de las raíces para cada concentración de glifosato y del formulado Atanor II®, fue menor respecto del control, aunque no se hallaron diferencias significativas. Sin embargo, se observó una disminución dosis-respuesta estadísticamente significativa en este parámetro a medida que se incrementaron las concentraciones tanto del principio activo como de la formulación comercial. Estos resultados concuerdan, en parte, con los obtenidos por Krüger (2009), que reportó diferencias estadísticamente significativas para todas las concentraciones (480, 1440 y 2400 µg/l) de la formulación comercial Glifosato Atanor® con respecto al control, cuando analizó el parámetro longitud de las raíces. En un estudio reciente, Salazar Mercado & Caleño (2020), evaluaron la citotoxicidad y genotoxicidad de cinco concentraciones de una formulación comercial de glifosato (5, 10, 15, 25 y 30 mg/l) y hallaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las concentraciones y el control, a las 72 horas de exposición. Cabe destacar que la concentración más baja ensayada por estos autores, es más del doble de la más baja ensayada en el presente trabajo.

Con respecto al índice mitótico, los resultados obtenidos mostraron una reducción de la división celular a medida que aumentó la concentración de glifosato y del formulado Glifosato Atanor II®, encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones de 1440 µg/l ($p \leq 0,05$) y de 2400 µg/l ($p \leq 0,001$) para ambos casos. Los datos de este estudio concuerdan con los resultados de Çavuşoğlu *et al.* (2011) para otra formulación (Roundup UltraMax®) que reportaron diferencias estadísticamente significativas respecto del control a medida que aumentó la concentración del herbicida. Sin embargo, hay que observar que estos autores utilizaron concentraciones 100 veces más altas que las de este estudio. Rank *et al.* (1993) utilizando Roundup® también hallaron una disminución del índice mitótico en todas las concentraciones analizadas, pero no encontraron diferencias significativas respecto del control. Salazar Mercado & Caleño (2020), reportaron una disminución estadísticamente significativa del índice mitótico en todas las concentraciones ensayadas, entre 5 y 30 mg/l.

Según Hoshina (2002) un índice mitótico significativamente menor que el control negativo puede indicar alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los organismos expuestos. Smackin *et al.* (1996) evidenciaron que la disminución del índice mitótico en células meristemáticas de *A. cepa* es un método fiable para determinar la presencia de agentes citotóxicos en el medio ambiente y, por lo tanto, se puede considerar como una prueba sensible para estimar los niveles de contaminación.

En la especie *A. cepa*, cada vez que hay una inhibición del crecimiento de la raíz, siempre hay reducción en el número de células que se dividen (Babatunde y Bakare, 2006; Salazar Mercado & Caleño, 2020). En el presente estudio, todas las concentraciones de glifosato y de la formulación comercial analizadas, evidenciaron una reducción del índice mitótico que se relacionó con la disminución en la longitud de las raíces de los bulbos expuestos a estos compuestos, por lo que se podría inferir que la reducción de la longitud de la raíz se debería principalmente a una disminución de la división celular en la zona meristemática (Fattah & Omer, 2021). Esto podría indicar que el efecto tóxico evidenciado por la inhibición en el crecimiento de la raíz involucraría algún mecanismo relacionado con la cinética de la división celular. El índice mitótico es un parámetro que no solo refleja la velocidad de crecimiento, sino también la frecuencia de la división celular, por lo que cualquier agente capaz de causar alteración en este, es considerado mitotóxico (Wierzbicka, 1999). Este efecto mitotóxico ha sido confirmado también

por Finkler et al. (2022), quienes documentaron que formulaciones comerciales de glifosato y combinaciones con otros herbicidas, como 2,4-D, inducen una disminución dosis-dependiente del índice mitótico y un incremento de aberraciones cromosómicas en células meristemáticas de *A. cepa*.

El estudio de las aberraciones cromosómicas se caracteriza por evaluar cambios tanto en la estructura cromosómica como en el número total de cromosomas y es importante ya que permite determinar los efectos genotóxicos involucrados evaluando el mecanismo de acción de los agentes probados, es decir, si producen efectos aneugénicos o clastogénicos (Russel, 2002; Das & Ray, 2024).

Las células de ápices radiculares de bulbos expuestos a diferentes concentraciones de glifosato y de la formulación Atanor II®, evidenciaron la aparición de anormalidades cromosómicas en anafase/telofase. Entre las aberraciones aneugénicas se observaron cromosomas vagabundos y rezagados, mientras que entre las aberraciones clastogénicas se encontraron puentes cromosómicos. Los puentes cromosómicos también llamados conexiones intercromátidas, se forman por fibras de cromatina que se unen a las cromátidas hermanas en la metafase, y las sostienen juntas hasta anafase tardía o telofase. Sin embargo, si estas conexiones se vuelven demasiado fuertes, las cromátidas pueden romperse en o cerca de los puntos de conexión en la anafase produciendo así un efecto clastogénico. Esto podría deberse al hecho de que el glifosato interviene en la formación o función del complejo promotor de anafase/ciclosoma o APC/C, el cual es responsable de la destrucción de las proteínas que mantienen unidas las cromátidas hermanas y les permite separarse en la anafase y moverse hacia los polos opuestos de la célula, permitiendo que ocurra la telofase (Salazar Mercado & Caleño, 2020). En cambio, los cromosomas rezagados en anafase son el resultado debido a la falla o a la insuficiencia de los mismos para moverse a cualquiera de los polos (Turkoglu, 2008). La presencia de cromosomas rezagados se considera una aberración importante desde el punto de vista de la genotoxicidad, ya que conduce a la aneuploidía, debido a la separación desigual del número de cromosomas en los núcleos hijos y, posteriormente, la formación de células hijas con núcleos de tamaño desiguales o de forma irregular en la interfase (El-Ghamery et al., 2003). El deterioro del huso mitótico conduce a la formación de aberraciones aneugénicas que es un efecto frecuente en las células vegetales, causado por varios herbicidas estudiados (Hess, 1983; Chauhan et al., 1986). Los resultados del presente trabajo indicarían que tanto glifosato como la formulación comercial, Glifosato Atanor II®, tienen

la capacidad de interactuar con el ADN y producir rupturas cromosómicas durante la división celular, como lo reportó Krüger (2009), que empleando el test *A. cepa* informó un aumento significativo en el número de aberraciones cromosómicas clastogénicas en células meristemáticas expuestas a Glifosato Atanor®. Del mismo modo, Rank et al. (1993) empleando el mismo test en células de raíces de cebolla hallaron un elevado número de aberraciones cromosómicas en células expuestas a Roundup®, pero no así para el caso de glifosato puro con el que obtuvieron resultados negativos. (Salazar Mercado & Caleño, 2020), hallaron también un incremento en la frecuencia de anormalidades cromosómicas relacionado con el incremento de las concentraciones testeadas. Una de las anormalidades más frecuentemente hallada por estos autores, al igual que en el presente trabajo, fueron los puentes cromosómicos.

Con respecto al índice de aberraciones cromosómicas totales en anafase/telofase, los resultados mostraron un aumento de aberraciones en todos los tratamientos de glifosato analizados, encontrándose diferencias respecto del control en las concentraciones de 1440 µg/l y de 2400 µg/l ($p \leq 0,01$). Si bien la formulación comercial se comportó de manera similar al principio activo, cabe destacar que se observó una disminución del número de aberraciones totales en la concentración de 2400 µg/l ($p \leq 0,05$) en relación a la de 1440 µg/l ($p \leq 0,01$), a pesar de ser también significativas respecto del control. Al analizar la formulación comercial se observa que hasta 1440 µg/l de Glifosato Atanor II® había una relación positiva entre la concentración y el índice de aberraciones cromosómicas totales, mientras que a concentraciones mayores de 1440 µg/l esta relación se invirtió y el índice de aberraciones cromosómicas totales disminuyó. Estos resultados se explicarían analizando el porcentaje de células en división (expresado como índice mitótico) y el efecto tóxico de dicho formulado. Se podría inferir que Glifosato Atanor II® a bajas concentraciones (480 µg/l) ejerce un efecto tóxico, que no incide drásticamente sobre el índice mitótico y permite observar un gran número de células en división, en las que puede observarse un incremento en el número de aberraciones cromosómicas. A una concentración intermedia (1440 µg/l) si bien se observa una disminución del índice mitótico, el mayor efecto se percibe en el aumento de anormalidades cromosómicas. Pero al aumentar la concentración de la formulación (2400 µg/l), el efecto tóxico incidió mayoritariamente sobre la división celular por lo que se interpreta que el bajo número de células en división genera también una disminución en la cantidad de alteraciones observables. Estos resultados difieren

de los obtenidos por Krüger (2009) y por Çavuşoğlu *et al.* (2011), quienes hallaron un aumento significativo de aberraciones totales a medida que aumentaron las concentraciones analizadas de los diferentes formulados comerciales utilizados. Por otra parte, los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos por Rank *et al.* (1993), quienes no hallaron una relación positiva entre la frecuencia de aberraciones y las concentraciones, debido a que observaron un menor número de aberraciones en la mayor concentración de Roundup® estudiada, de 2880 µg/l, respecto a una concentración menor de 1440 µg/l. Los autores concluyeron que los resultados podrían deberse a los efectos tóxicos del formulado evaluado, ya que encontraron una disminución significativa en el índice mitótico de la mayor concentración de Roundup®.

En este trabajo se observaron efectos citotóxicos y genotóxicos concentración dependiente, tanto de glifosato en principio activo como en formulación comercial Atanor II®, que coincide con Krüger (2009), quien reportó que los herbicidas que contienen glifosato son significativamente citotóxicos y genotóxicos, incluso a concentraciones mucho más bajas que las utilizadas en el campo.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo señalan que glifosato, principio activo, como en formulación comercial Atanor II®, causa alteraciones no solo en el funcionamiento normal del ciclo celular, sino también en el material genético de las células expuestas a este herbicida en concentraciones entre 2000 y 12000 veces más bajas que las utilizadas en el campo para las pulverizaciones aéreas, generando una gran preocupación por los efectos que este compuesto pudiera causar al ambiente y principalmente a los organismos directa o indirectamente expuestos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrofit (2009). Sistema de Agrotóxicos Fitosanitarios. São Paulo.1-2.

Andrioli, N.B., Wulff, A.F., Mudry, M.D. (2006). *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. *Theoria*. 15, 9-16.

Alvarez-Moya, C., Silva, M., Arámbula, A., Sandoval, A., Vasquez, H., Gonzáles Montes, R. (2011). Evaluation of genetic damage induced by glyphosate isopropylamine salt using *Tradescantia* bioassays. *Genetics and Molecular Biology*. 34 (1), 127-130.

Alvarez-Moya, C., Silva, M., Ramírez, C., Gallardo, D., Sánchez, R., Aguirre, A. (2014). Comparison of the *in vivo* and *in vitro* genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genetics and Molecular Biology*. 37 (1), 105-110.

Babatunde, B.B., Bakare, A.A. (2006). Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara Industrial estate Nigeria evaluated with the *Allium* test. *Pollution Research*. 25, 227-234.

Barbosa, M.C., Aiassa, D. y Mañas, F. (2017). Evaluación de daño al adn en leucocitos de sangre periférica humana expuestos al herbicida glifosato. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3), 403-410.

Bolognesi, C., Bonatti, S., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggeri, P., Abbondandolo, A. (1997). Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 1957-1962.

Cabrera, G. y Rodriguez, D. (1999). Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research*. 426, 211-214.

Çavuşoğlu, K., Yalçın, E., Türkmen, Z., Yapar, K., Çavuşoğlu, K., Çiçek, F. (2011). Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. *Journal of Agricultural Sciences*.17, 131-142.

Chauhan, L.K.S., Dikshith, T.S.S., Sundararaman, V. (1986). Effect of deltamethrin on plant cells.I.Cytological effect on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Mutation Research*.17, 25-30.

Das, R., & Ray, S. (2024). *Allium cepa* tests: Exploring bleomycin induced cyto-genotoxicity and altered cell cycle kinetics in root tips meristematic cells. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 828, 111851. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2024.111851>

Datta, S., Singh, J., Singh, J., Singh, S., & Singh, S. (2018). Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. *Sustainable Environment Research*, 28(4), 171-178. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.005>

Durán Merás, I., Galeano Díaz, T., Alexandre Franco, M. (2005). Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*. 65, 7-14.

- El-Ghamery, A.A., El-Kholy, M.A., El-Yousser, A. (2003). Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research*. 537, 29-41.
- Fattah, Y. M., & Omer, A. H. (2021). Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Glyphosate on *Allium cepa*. *Technium BioChemMed*, 2(1), 131-140. <https://doi.org/10.47577/biochemmed.v2i1.3332>
- Finkler M. et al. (2022). Cytotoxic and genotoxic effects induced by associated commercial glyphosate and 2,4-D formulations using the *Allium cepa* bioassay. *J Environmental Science Health B*, 57(2), 133-141.
- Fiskesjö, G. (1985). The *Allium* test as standard in environmental monitoring. *Hereditas*. 102, 99-12.
- Fiskesjö, G.; Levan, A. (1994). Evaluation of the First ten MEIC Chemicals in the *Allium cepa*. Atlas, New York. 21, 139-149.
- Gallego, J. L., Olivero-Verbel, J. (2021). Cytogenetic toxicity from pesticide and trace element mixtures in soils used for conventional and organic crops of *Allium cepa* L. *Environmental Pollution*, 276, 116558.
- Hess, F.D. (1983). Mode of action of herbicides that affect the cell division, in: J. Miyamoto, P.C. Kearney (Eds.), *Pesticide Chemistry: Human Welfare and Environment*. Pergmon Press Ltd., Headington, Hill Hall Oxfor, 420-425.
- Hoshina, M. (2002). Evaluation of a Possible Contamination of the Waters of the Claro River-Municipality of Rio Claro, Part of the Corumbatai River Basin, with the Mutagenicity Tests Using *Allium cepa*, State University of Sao Paulo, Rio Claro, SP, (in Portuguese).
- IARC (International Agency for Research on Cancer). (2015). WHO, IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides.
- Krüger, R. A. (2009) Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. Dissertação de mestrado a em 27 conferindo ao autor o título de mestre em Qualidade Ambiental.
- Mañas, F., González Cid Urroz, M., García Ovando, H., Weyers Anchordoqui, I., Ugnia Vera, L., Larripa Hand, I., Gorla Abrate, N. (2006). La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*. 15 (2), 53-60.
- Mañas, F., Ovando, H., Peralta, L., Larripa, I., Gonzalez Cid, M., Ugnia, L., Weyers, A., Raviolo, J., Gorla, N. (2009a). Genotoxicity of AMPA, environmental metabolite of Glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 834-837.
- Mañas, F., Peralta, L., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., Larripa, I., Gonzalez Cid, M., Gorla, N. (2009b). Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28, 37-41.
- Salazar Mercado, S., Caleño, J. D. Q. (2020). Cytotoxic evaluation of glyphosate, using *Allium cepa* L. as bioindicator. *Science of the Total Environment*, 700, 134452.
- Monroy, C., Cortés, A., Sicard, D., Groot de Restrepo, H. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*. 25, 335-345.
- Moreno Palacio, S., Espinoza-Quiñones, F.R., Manozzo Galante, R., Zenatti, D.C., Seolatto, A.A., Kleber Lorenz, E., Zacarkim, C.E., Rossi, N., Almeida Rizzutto, M., Tabacniks, M.H. (2005). Correlation between heavy metal ions (copper, zinc, lead) concentrations and root length of *Allium cepa* L. in polluted river water. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 46,191-196.
- Moreno, N., Sofia, S., Martinez, C. (2014). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37(1), 448-454.
- Oláh, M., Farkas, E., Székács, I., Horvath, R., Székács, A. (2022). Cytotoxic effects of Roundup Classic and its components on NE-4C and MC3T3-E1 cell lines determined by biochemical and flow cytometric assays. *Toxicology Reports*, 9, 914-926.
- Paz-y-Miño, C., Sánchez, M., Aréval, M., Muñoz, M., Witte, T., De-la-Carrera, G. (2007). Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet. Mol. Biol*. 30 (2), 456-460.
- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., Parodi, S. (1998). “³²P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup”. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 31, 55-59.

- Rank, J., Jensen, A., Skov, B., Pedersen, L., Jensen, K. (1993). Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutation Research*. 300, 29-36.
- Rank, J., Nielsen, M.H. (1993). A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*. 118, 49-53.
- Roma, D., Cecchini, M. E., Tonini, M. P., Capella, V., Aiassa, D., Rodriguez, N., & Mañas, F. (2023). Toxicity assessment and DNA repair kinetics in HEK293 cells exposed to environmentally relevant concentrations of Glyphosate (Roundup® Control Max). *Toxicology Research*. 12(5), 970-978.
- OMS. Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019 [WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 2020. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Roustan, A., Aye, M., De Meo, M., Di Giorgio, C. (2014). Genotoxicity of mixtures of glyphosate and atrazine and their environmental transformation products before and after photoactivation. *Chemosphere*. 108, 93-100.
- Russel, P.J. (2002). Chromosomal mutation, in: B. Cummings (Ed.), *Genetics*, Pearson Education Inc., San Francisco. 595-621.
- Smaka-Kincl, V., Stegnar, P., Lovka, M., Toman, M.J. (1996). The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*. 368, 171-179.
- Solomon, K., Anadón, A., Carrasquilla, G., Cerdeira, A., Marshall, J., Sanin L. (2007). Coca and Poppy Eradication in Colombia: Environmental and Human Health Assessment of Aerially Applied Glyphosate. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 190, 43-125.
- Turkoglu, S. (2008). Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food and Chemical Toxicology*. 46, 2035-2041.
- Vakhterova, Y. V., Avdeeva, L. V., Zimens, M. E., Shvydkii, V. O., Machigov, E. A., Lebedev, A. T., Shtamm, E. V., Cheremnykh, E. G., Aibilev, S. K., & Saratovskikh, E. A. (2023). Roundup (glyphosate): Products of photochemical decomposition and their toxicity and genotoxicity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*. 32 (February 2022), 100957.
- Wierzbicka, M. (1999). Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Poland Environmental Pollution*. 104, 41-52.
- Williams, G., Kroes, R., Munro, I. (2000). Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 31, 117-165.
- Woźniak, E., Sicińska, P., Michałowicz, J., Woźniak, K., Reszka, E., Huras, B., Zakrzewski, J., & Bukowska, B. (2018). The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 120, 510-522.