



GRACIELE LURDES SILVEIRA

**MODELOS VEGETAIS APLICADOS A
ESTUDOS DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL:
UMA ABORDAGEM COMPARATIVA ENTRE
Allium cepa L. E *Lactuca sativa* L.**

**LAVRAS-MG
2016**

GRACIELE LURDES SILVEIRA

**MODELOS VEGETAIS APLICADOS A ESTUDOS DE TOXICOLOGIA
AMBIENTAL: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA ENTRE *Allium cepa*
L. E *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica Aplicada, área de
concentração em Botânica
Aplicada, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientadora:

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

Coorientadora:

Dra. Maria Aparecida Marin Morales

**LAVRAS-MG
2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Silveira, Graciele Lurdes.

Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental :
Uma abordagem comparativa entre *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa*
L. / Graciele Lurdes Silveira. – Lavras : UFLA, 2016.

154 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Bibliografia.

1. Ciclo Celular. 2. Ensaio Cometa. 3. Germinação. 4. Teste de
TUNEL. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

GRACIELE LURDES SILVEIRA

**MODELOS VEGETAIS APLICADOS A ESTUDOS DE TOXICOLOGIA
AMBIENTAL: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA ENTRE *Allium cepa*
L. E *Lactuca sativa* L.**

**PLANT MODELS APPLIED TO STUDY ENVIRONMENTAL
TOXICOLOGY: A COMPARISON APPROACH BETWEEN *Allium cepa* L.
AND *Lactuca sativa* L.**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Botânica Aplicada, área de
concentração em Botânica
Aplicada, para a obtenção do
título de Mestre.

Aprovada em 26 de agosto de 2016.

Dra. Lisete Chamma Davide (UFLA)
Dra. Maria Aparecida Marin Morales (UNESP-Rio Claro)
Dra Maria Cristina Mendes Costa (UNILAVRAS)

Orientadora:

Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

Coorientadora:

Dra. Maria Aparecida Marin Morales

**LAVRAS-MG
2016**

*Aos meu pais, irmãos e sobrinhos, por serem
meu apoio e minha maior torcida.
Ao meu noivo, Lucas Alencar, por todo o amor e
carinho nesses anos de convivência.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta vida cheia de oportunidades de aprendizagem.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida para realização deste trabalho.

Aos professores e aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, por todos os ensinamentos e contribuições.

À Professora Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira, por toda dedicação e paciência. Sou grata por toda a sua contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal. Mais que minha orientadora, é minha amiga.

À Professora Dra Maria Aparecida Marin Morales pela coorientação e pelas imagens cedidas por seu grupo de pesquisa do Laboratório de Mutagênese, do Instituto de Biociências (IB) da UNESP, Rio Claro-SP.

À todos os integrantes do nosso grupo de pesquisa, Prospecção de Efeitos Biológicos, pela amizade, pelas reuniões divertidíssimas, pela troca de experiências, pela disponibilidade de ajudar em minha pesquisa em finais de semana, meia noite, feriados, enfim, por esta ótima convivência que tornam os dias mais agradáveis. Em especial à Maria Gabriela, meu braço direito, sem a qual muitos resultados não teriam sido alcançados.

À todos que fazem parte do meu dia-a-dia no Laboratório de Citogenética, pela disponibilidade de ajudar sempre que necessário, pela troca de experiências sobre a vida de pós-graduando e pelas conversas descontraídas. Aos técnicos do laboratório, Iara e Felipe, pela amizade e por toda a ajuda.

Às amigas Dayanne, Ludmila e Quênia, pelo carinho, pelas conversas descontraídas e pelas horas de estudo compartilhadas durante o mestrado.

Às Queridas Cris, Lud, e Gisele, pelas boas risadas e conhecimentos compartilhados, especialmente à Querida Gaby, pelo conhecimento e experiências, profissional e de vida, compartilhadas comigo.

Aos amigos do Mato Grosso, que sempre torceram por mim, desde quando fiz a prova de seleção. Às Flores, Dani, Kamylla e Bia, mesmo estando distantes, por tornarem os dias mais alegres e descontraídos. À Andressa, pela linda amizade que construímos só tenho uma coisa a dizer: “Alemoa, é nós na pós!”.

Aos meus pais, Pedro e Jurema, e aos meus irmãos, Adriane e Ewerson, por todo o amor, carinho e incentivo. À minha segunda família, Helena, Roberto, Felipe, Mariana e Thiago, que me ensinam todo o dia sobre humildade, amor e união, sou muito grata por ter a oportunidade de conviver com vocês. Aos meus sobrinhos, Bianca, André e Joaquim, que tornam meus dias mais leves e alegres.

Ao meu noivo, Lucas Alencar, alma gêmea da minha, por iluminar e colorir meus dias.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher." (Cora Coralina)

RESUMO

Diante da problemática da poluição ambiental se tem reconhecido a importância de levantar todas as informações sobre a composição química e o efeito que os poluentes têm nos organismos vivos. Dentre os bioensaios realizados para tal fim, aqueles que utilizam vegetais como modelo biológico se destacam, pois são de fácil realização e de baixo custo. *Allium cepa* L. (cebola) é o vegetal mundialmente difundido como modelo para estudos citogenotóxicos e *Lactuca sativa* L. (alface) é especialmente utilizada em estudos fitotóxicos. Sabendo que cebola e alface são dois modelos conhecidos entre pesquisadores do mundo inteiro e, tendo em vista que não existem abordagens comparativas da eficiência desses dois vegetais nos bioensaios para fins de avaliação de risco de contaminantes ambientais, o objetivo deste trabalho foi comparar (1) o desenvolvimento inicial da plântula e índice mitótico sem a presença de compostos químicos; (2) o complemento cromossômico das duas espécies modelos e (3) as respostas obtidas entre as duas espécies em testes de crescimento da plântula, alterações cromossômicas e nucleares, morte celular e fragmentação do DNA, após exposição das raízes a diferentes poluentes ambientais. Quanto ao desenvolvimento inicial das plântulas (1) foi observado que a alface possui rápida e padronizada germinação, rápido desenvolvimento inicial das plântulas e alto IM, quando comparado a cebola, se destacando nos estudos em toxicologia ambiental por possibilitar a análise destes parâmetros com rapidez, simplicidade e eficiência. Em uma segunda abordagem (2), o cariótipo destas duas espécies foi revisitado, onde os cromossomos de cebola variaram de 7,13 a 10,54 μm de comprimento quando tratados com Colchicina e 6,26 a 9,18 μm para 8Hq; enquanto em alface o comprimento variou de 3,21 a 6,04 μm (Colchicina) e 1,85 a 3,33 μm (8Hq), tendo sido afirmada a importância deste tipo de dado para os grupos que estudam a prospecção dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais. Em um terceiro momento (3), as raízes de cebola e alface foram expostas ao agente alquilante de DNA, MMS e aos poluentes ambientais: Cádmio, SPL e Atrazina, para análise do crescimento radicular, do ciclo celular e fragmentação do DNA via teste de TUNEL e Cometa. Ambas espécies responderam de forma sensível e eficiente aos testes aplicados. De modo geral, a cebola foi mais eficiente para detecção das alterações provenientes de quebras no DNA, clastogênicas; e alface de alterações relacionadas à segregação dos cromossomos na mitose, aneugênicas. Nas análises de fragmentação do DNA, a cebola apresentou maior sensibilidade no Cometa e no TUNEL. Em conclusão ambos os vegetais são eficientes para fins de avaliação de riscos toxicológicos de poluentes ambientais.

Palavras-chave: Ciclo Celular. Ensaio Cometa. Germinação. Teste de TUNEL.

ABSTRACT

In view of the environmental pollution issue, the importance of raising all information on the chemical composition and the effect of pollutants on living organisms has been recognized. Among the bioassays available for this purpose, those using plants as biological models can be highlighted, owing to their low costs and ease of performance. *Allium cepa* L. (onion) is the plant model most broadly used in cytogenotoxic studies worldwide, while *Lactuca sativa* (lettuce) is especially employed in phytotoxic studies. Because onion and lettuce are models well known among researchers around the world, and given that no approaches exist so far comparing their efficiency in bioassays to assess the risk of environmental pollutants, the present study aimed to compare (1) the early onion and lettuce seedling development and mitotic index without presence of chemical compounds, (2) the chromosome set of these two model species, and (3) the responses of both species in assays of seedling growth, chromosome and nuclear alterations, cell death and DNA fragmentation after exposure of the roots to different environmental pollutants. In the first approach (1), it was observed that lettuce has fast and standardized germination, rapid initial seedling development and high MI in comparison to onion, standing out in studies of environmental toxicology due to enabling simple, rapid and efficient analysis of these parameters. Further, revisiting the karyotypes of both model species (2) revealed length of onion chromosomes ranging from 7.13 to 10.54 μm when treated with colchicine and from 6.26 to 9.18 μm when treated with 8HQ, whereas the length of lettuce chromosomes varied from 3.21 to 6.04 μm with colchicine and 1.85 to 3.33 μm with 8HQ, attesting the importance of such data for research groups investigating the toxic effects of environmental pollutants. In the third experiment (3), onion and lettuce roots were exposed to the DNA-alkylating agent MMS and to environmental pollutants (Cadmium, SPL and Atrazine) for analysis of root growth, cell cycle and DNA fragmentation via TUNEL and comet assays. Both species showed sensitive and efficient response to the tests. Overall, the onion model was more efficient in detecting clastogenic changes, arising from DNA breakage, while the lettuce model rather detected aneugenic alterations, related to chromosome segregation in mitosis. In the DNA fragmentation analysis, onion showed higher sensitivity in the comet assay and in the TUNEL test. In conclusion, both plants are efficient to evaluate toxicological risks of environmental pollutants.

Keywords: Cell Cycle. Comet Assay. Germination. TUNEL assay.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Importância dos Ensaio Biológicos na Toxicologia Ambiental	19
2.2 Vegetais como Modelos em Estudos de Prospecção de Toxicidade de Poluentes Ambientais	21
2.2.1 <i>Allium cepa</i> versus <i>Lactuca sativa</i>	24
2.3 Análises Citogenéticas Aplicadas a Toxicologia Ambiental	48
2.4 Prospecção dos mecanismos de morte celular e de danos ao DNA aplicados a Toxicologia Ambiental	56
2.5 Compostos químicos utilizados no presente estudo para comparar a eficiência de <i>Lactuca sativa</i> L. e <i>Allium cepa</i> L. nos testes propostos.	60
2.5.1 SPL (Spent Pot Liner)	60
2.5.2 Cádmio (Cd)	60
2.5.3 Atrazina (ATZ)	61
2.5.4 MMS (Metil Metano Sulfonato)	61
REFERÊNCIAS	62
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	85
ARTIGO 1.....	85
ARTIGO 2.....	105
ARTIGO 3.....	120

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A problemática da poluição ambiental em decorrência das atividades antrópicas, impulsionadas pelo aumento das indústrias, da população e da necessidade de maior produção de alimentos em menor área, tem sido uma preocupação emergente na sociedade atual. Frente ao problema, tem-se reconhecido nos últimos anos, a importância de levantar todas as informações sobre os resíduos ambientais para assegurar a qualidade e a saúde ambiental, tanto em curto como em longo prazo.

Além das características físico-químicas dos agentes poluidores, o conhecimento sobre os efeitos que eles podem ter nos organismos vivos é de extrema importância (ANDRADE-VIEIRA, 2012). Essa abordagem interdisciplinar de explicar os efeitos tóxicos de determinado complexo químico, ou de uma substância simples qualquer através de bioensaios em modelos biológicos tem sido apontada como excelente ferramenta para complementar os dados físico-químicos conhecidos dos compostos (BADERNA et al., 2011). Além disso, é usada com sucesso na toxicologia e mutagênese ambiental no Brasil e no mundo.

As avaliações ecotoxicológicas que objetivam estudar a ação biológica de compostos químicos (ALTENBURGER e SCHMITT-JANSEM, 2003) são realizadas por meio de bioensaios *in situ* ou *ex situ*, com uso de diferentes organismos-teste (*in vivo* ou *in vitro*). Os bioensaios permitem avaliar o potencial tóxico do agente poluidor, em diferentes aspectos e níveis de organização, tais como: comportamento, fisiologia, anatomia, célula, DNA, etc; sendo que cada tipo de teste apresenta a resposta de um determinado *endpoint* citado.

Dentre os diferentes bioensaios realizados com organismos vivos, aqueles que utilizam plantas como modelos se destacam por serem simples, de baixo custo (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982), por não necessitar de aprovação em comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) e ainda por apresentarem resultados que permitem inferir o real risco que o agente poluidor causa ao ambiente, inclusive mostrando-se tão eficientes quanto aos ensaios realizados em modelos animais (ÇELIK e ÄSLANTURK, 2007), incluindo células humanas (PALMIERI et al., 2016).

Dos ensaios descritos, o teste de *Allium* é, sem dúvida, o mais difundido entre os laboratórios que prospectam a citotoxicidade e genotoxicidade de poluentes ambientais. Fiskesjö (1985) afirma que o teste foi descrito e desenvolvido em 1938 por Levan. Ele consiste na avaliação das alterações nas fases mitóticas das células do meristema radicular de *Allium cepa* L., que são decorrentes da exposição do propágulo vegetal aos agentes potencialmente tóxicos testados (LEME e MARIN-MORALES, 2009; MALUSZYNSKA e JUCHIMIUK, 2005). Os parâmetros citogenéticos avaliados no teste *Allium* podem ser aplicados a qualquer espécie vegetal modelo listada pela US EPA (GRANT, 1994, 1999), dentre elas, a espécie *Lactuca sativa* L., que é amplamente utilizada nos ensaios que avaliam o efeito tóxico de substâncias sobre a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; VALERIO; GARCIA; PEINADO, 2007).

Embora *A. cepa* e *L. sativa* sejam espécies modelo comumente utilizadas para avaliar o efeito tóxico de poluentes ambientais, não há relatos sobre abordagens comparativas entre estes dois vegetais. Portanto este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de comparar o complemento cromossômico das duas espécies e as repostas sem exposição a compostos químicos e após exposição das raízes a compostos químicos com atividade citogenotóxica conhecida, a fim de maximizar a eficiência dos bioensaios propostos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância dos Ensaio Biológicos na Toxicologia Ambiental

O crescimento urbano desordenado ocasiona a formação de cidades sem infraestrutura adequada e muitas vezes, sem a disponibilidade de serviços urbanos essenciais capazes de comportar a população. Neste contexto, os grandes centros urbanos são os que concentram os maiores problemas ambientais, produzindo diversos resíduos que frequentemente são acumulados no ambiente sem o adequado tratamento, impossibilitando sua reciclagem (NASCIMENTO et al., 2004).

Resíduos industriais e domésticos gerados pela atividade humana geralmente contêm misturas complexas de químicos que não são degradados durante o tratamento de efluentes e persistem na natureza, poluindo solo, ar e as fontes de água potável (CHANDRA et al., 2005). São resíduos de composição química variada que podem ser sólidos, gasosos ou líquidos, o que dificulta muito o seu manejo e a implantação de medidas mitigadoras, já que seus mecanismos de ação são altamente diversificados e, às vezes, até desconhecidos (PALMIERI, 2012).

Os agrotóxicos ou agroquímicos são compostos que possuem grande diversidade de substâncias químicas ou produtos biológicos com ação biocida, usados em atividades agropecuárias, com a finalidade de aumentar ou melhorar a produtividade agrícola e pecuária, para controle de pragas. São compostos classificados como tóxicos para os organismos vivos e possuem propriedades genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, mesmo quando em baixas concentrações (BOLOGNESI E MORASSO, 2000; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009), representando, portanto, um grave risco à saúde de muitos organismos, inclusive do homem.

O uso excessivo de agrotóxicos potencializa o risco de contaminação, pois, após aplicados, podem lixiviar e afetar águas superficiais e lençóis freáticos. Como consequência, a biota local também é afetada, o que pode acarretar danos a organismos não alvos destes defensivos. Além disso, traços desses defensivos podem permanecer nos alimentos, mesmo após a colheita, o que pode levar a ingestão humana de substâncias potencialmente tóxicas (CARSON, 2010).

Devido ao potencial tóxico apresentado pelos resíduos industriais, domésticos e agrícolas, nos últimos 20 anos tem se desenvolvido e se tornado cada vez mais importantes técnicas para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos dos mesmos (BADERNA et al., 2011). Essas técnicas envolvem testes tanto biológicos, quanto de determinação da sua composição química, para que se possa ter uma real dimensão dos riscos apresentados ao ambiente (ANDRADE-VIEIRA, 2012; PALMIERI, 2012).

No Brasil as normas federais classificam um resíduo ou composto químico quanto à sua toxicidade, com base nos seus constituintes químicos e em testes de solubilidade e de lixiviação (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 2004). O método de classificação brasileiro descrito é semelhante ao adotado nos Estados Unidos, enquanto a União Europeia adota uma série de diretrizes muito mais complexas, incluindo o potencial ecotoxicológico dos resíduos, para determinar seu risco tóxico (PALMIERI, 2012).

O uso de diferentes organismos em bioensaios para testar a toxicidade de resíduos ambientais pode fornecer informações importantes acerca do mecanismo de ação dos mesmos, sendo uma ferramenta valiosa na identificação dos riscos potenciais aos seres vivos. Os ensaios biológicos, para avaliar efeitos tóxicos e genotóxicos de diferentes resíduos e poluentes ambientais, podem ser realizados em diferentes organismos, tanto procariontes (como bactérias, por exemplo), como eucariontes (linhagens celulares, animais e plantas), o que possibilita

detectar uma amplitude maior de danos, incluindo mutações gênicas, danos cromossômicos estruturais e numéricos (HOUK, 1992).

Os bioensaios disponíveis para fins de prospecção de toxicidade ambiental envolvem avaliações *in vivo* (*in situ* e *ex situ*) e *in vitro*, permitindo avaliar o potencial tóxico do resíduo de forma rápida e eficaz, com custo relativamente reduzido. Esses bioensaios têm sido usados em todo o mundo para a avaliação toxicológica de resíduos e compostos químicos diversos, bem como para avaliar a ação de agroquímicos lançados no meio ambiente (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007, 2009; IVANOVA e UHLIG, 2008; KAMMANN et al., 2005; LEME e MARIN-MORALES, 2008, 2009; MAZZEO et al., 2010, 2011; PLAZA et al., 2005).

Diante da problemática ambiental dos resíduos industriais, domésticos e agrícolas lançados sem tratamento ou com tratamento inadequado no meio ambiente, surgem os estudos de toxicologia ambiental, uma área multidisciplinar que objetiva estudar os efeitos biológicos destes resíduos em organismos testes, denominados de organismos modelos, dentre os quais os vegetais se destacam por apresentarem diversas vantagens, entre elas, como já relatado em trabalhos como de Rank e Nielsen (1997) e Sandhu et al. (1994), possíveis relações com organismos animais.

2.2 Vegetais como Modelos para Estudos de Prospecção de Toxicidade de Poluentes Ambientais

As plantas são sistemas excelentes para indicar os efeitos genotóxicos de misturas complexas, proporcionando vantagens únicas no monitoramento *in situ* e na detecção de possíveis danos genéticos resultantes da exposição a produtos químicos em seu ambiente (GRANT, 1999; MONTEIRO et al., 2007). Elas

compõem um sistema de grande importância como bioindicadoras de poluição e vêm sendo utilizadas há bastante tempo para este fim, uma vez que propiciam a avaliação da toxicidade e mutagenicidade no ambiente natural (*in situ*) (SANDALIO et al., 2001). Além disso, os testes *ex situ*, que são realizados em laboratório com os vegetais, se sobressaem daqueles realizados *in situ*, pois apresentam uma maior facilidade no monitoramento da germinação e crescimento dos vegetais avaliados. Ensaio *ex situ* são também excelentes ferramentas para complementar a análise físico-química de compostos, pois permitem uma confirmação prática da teoria desenvolvida em estudos sobre as propriedades físico-químicas dos materiais potencialmente perigosos (BADERNA et al., 2011; PALMIERI et al., 2014).

Segundo relato de Fiskesjö (1985), o primeiro teste com plantas, que se tem registro, na identificação dos efeitos biológicos de poluidores ambientais foi em 1938, e o responsável foi o cientista Levan, que utilizou as pontas de raízes do gênero *Allium* para identificar os efeitos citológicos da colchicina.

O sistema de teste usando vegetais possui muitas vantagens, sendo uma das principais o seu baixo custo (FISKESJÖ, 1985). Outras vantagens que as caracterizam é que as plantas são eucariotos e apresentam mecanismos que processam moléculas complexas, tendo boa correlação com outros organismos modelos, como o animal (SANDERMANN, 1994), e até mesmo células humanas (PALMIERI et al, 2016). Sendo assim, se uma substância química provoca danos ao DNA de uma planta, esta substância deve ser considerada como tendo o potencial de danificar o DNA de outros organismos (RANK e NIELSEN, 1997).

As instituições internacionais como a United Nations Environmental Program (UNEP), World Health Organization (WHO) e US Environmental Protection Agency (US EPA) aprovam a utilização dos bioensaios com plantas, para a prospecção de efeitos tóxicos de agentes químicos lançados no ambiente (GRANT, 1999). Na década de 90, Grant (1994) apresentou uma relação de

modelos vegetais e os respectivos *endpoints* acessados a partir dos ensaios realizados com cada espécie (Tabela 1), os quais foram relatados no Programa Gene-Tox da US EPA, que tinha por objetivo, avaliar o *status* dos bioensaios na toxicologia genética.

Tabela 1 – Principais modelos vegetais usados na Toxicologia Ambiental até a década de 90 e os respectivos ensaios realizados.

Vegetal modelo	Classificação	Tipo de Ensaio	Referência
<i>Allium cepa</i>	Monocotiledônea	Ensaio de aberração cromossômica	Grant, 1982
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Eudicotiledônea	Ensaio de mutação	Rédei, 1982
<i>Hordeum vulgare</i>	Monocotiledônea	Ensaio de aberração cromossômica	Constantin e Nilan 1982 ^a
		Ensaio de clorofila mutante deficiente	Constantin e Nilan 1982b
<i>Glycine max</i>	Eudicotiledônea	Mutações pontuais de clorofila	Vig, 1982
<i>Tradescantia</i>	Monocotiledônea	Ensaio para agentes mutagênicos gasosos	Van't Hof e Schairer, 1982
<i>Vicia faba</i>	Eudicotiledônea	Testes citogenéticos	Ma, 1982a
<i>Zea mays</i>	Monocotiledônea	Testes citogenéticos	Ma, 1982b
		Ensaio de mutação em locus específico	Plewa, 1982

Fonte: Adaptada de Grant (1994).

Desde então, estudos sobre o efeito de contaminantes ambientais tem sido realizados nestas espécies vegetais listadas por Grant (1994), dentre outras, uma vez que ensaios de aberração cromossômica podem ser realizados em qualquer espécie vegetal de fácil aquisição. Neste sentido, embora *A. cepa* seja a espécie mais comumente utilizada como modelo para avaliações citogenotóxicas, *L. sativa* se destaca em biotestes para a caracterização ecotoxicológica de contaminantes ambientais (FJÄLLBORG e GUSTAFSSON, 2006; PANDARD et al., 2006).

2.2.1 *Allium cepa* versus *Lactuca sativa*

Dentre os modelos utilizados nos bioensaios de citogenotoxicidade destaca-se a espécie *Allium cepa* L. (cebola), uma monocotiledônea pertencente à família Amaryllidaceae.

A. cepa é bastante empregada em estudos de genotoxicidade por apresentar um número reduzido de cromossomos ($2n = 2x = 16$), e a eficiência nos resultados está associada à sua sensibilidade e ao fato de possuir cromossomos grandes, facilitando as análises do ciclo celular e a visualização das alterações cromossômicas (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Além disso, os efeitos observados nas células de *A. cepa* demonstram boa correlação com os efeitos em células de mamíferos, incluindo o homem (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982; MAURO et al., 2014; PALMIERI et al., 2016).

O teste *Allium* pode ser empregado para a avaliação de diversos agentes como metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, resíduos industriais e domésticos, extratos biológicos, entre outros (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Nos últimos seis anos, 132 trabalhos foram publicados na área da toxicologia ambiental, utilizando *A. cepa* como modelo para

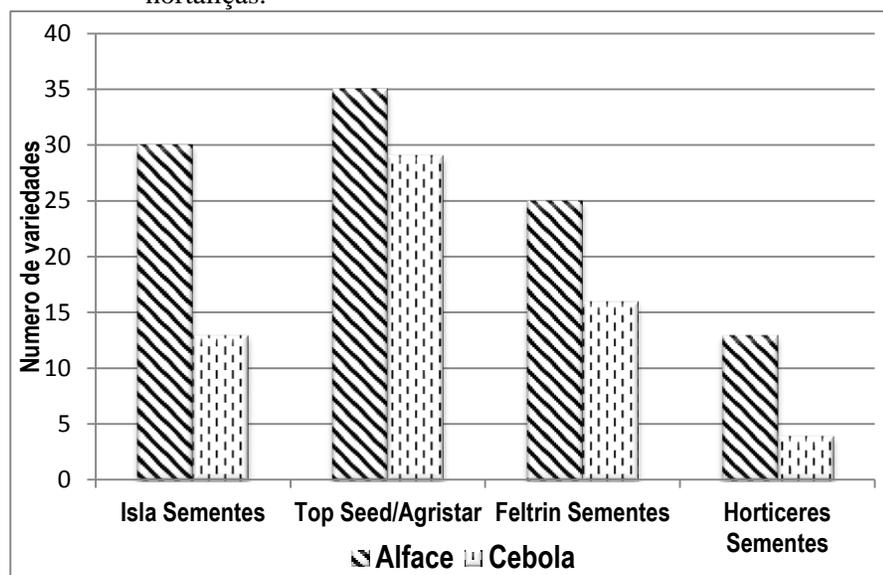
o acesso à toxicidade de compostos químicos diversos e resíduos ambientais (Quadro 1).

A *Lactuca sativa* L. (alface), eudicotiledônea que pertence à família Asteraceae, é um modelo vegetal mais comumente utilizado em análises macroscópicas dos efeitos tóxicos de compostos químicos e resíduos ambientais. Segundo Valerio, Garcia e Peinado (2007), bioensaios de germinação e crescimento da plântula de *L. sativa* são definidos como estáticos e podem ser usados para avaliar a toxicidade aguda de resíduos ambientais. No entanto, sua aplicação destaca-se, principalmente, em estudos de interações alelopáticas, onde o efeito de um composto originado de outra planta ou fungo é investigado sobre o desenvolvimento inicial da plântula (ARAGÃO et al., 2015; BARATELLI et al., 2012; BATISH et al., 2008).

Comparado à cebola, poucos são os trabalhos que utilizam o modelo *L. sativa* para avaliação de efeitos citogenotóxicos de um composto químico ou resíduo ambiental (Quadro 1).

Em relação às características cromossômicas, *L. sativa*, assim como *A. cepa*, apresenta um número pequeno de cromossomos ($2n = 2x = 18$), que variam de 2,8 a 5,5 μm de tamanho (MATOBA et al., 2007) e são facilmente visualizados ao microscópio. Produz um grande número de sementes, as quais são pequenas, o que contribui para uma maior área de superfície de contato com a substância avaliada, apresentando ainda alta sensibilidade, fácil e rápida germinação, (CAMPOS et al., 2008a). Se comparado com outros vegetais modelos, a semente de alface é comercializada por um baixo custo e diversas variedades estão disponíveis no mercado. Em pesquisa realizada nos sites das quatro principais fornecedoras de sementes de hortaliças no Brasil (Isla® Sementes, Top Seed/Agristar®, Feltrin® Sementes e Horticeres® Sementes), foi observado que existe um número maior de variedades de sementes de alface disponíveis para compra do que de cebola (Figura 1).

Figura 1 – Número de variedades de sementes de cebola e alface disponíveis no mercado brasileiro, das quatro principais fornecedoras de sementes de hortaliças.



Legenda: Pesquisa realizada no site das empresas Isla® Sementes, Top Seed/Agristar®, Feltrin® Sementes e Hortiçeres® Sementes, em 10/08/2015. Fonte: Do autor (2016).

A eficiência na utilização da *L. sativa*, para avaliar a genotoxicidade de compostos já vem sendo comprovada em grupos de pesquisa que começaram a utilizar a avaliação do ciclo celular e de suas alterações para complementar a análise de germinação e crescimento da plântula, tanto em estudos sobre a alelopatia como em estudos envolvendo resíduos industriais, tendo resultados tão confiáveis e reproduzíveis quanto os obtidos em testes com *A. cepa*, como por exemplo os trabalhos de Andrade-Viera et al. (2014); Aragão et al. (2015); Campos et al. (2008a); Hou et al. (2014a); Palmieri et al. (2014) e Sousa et al. (2009).

Comparando quatro espécies vegetais modelo quanto às respostas na germinação e crescimento das plântulas, Barbosa (2014) observou que *L. sativa*, sob efeito do tratamento controle (água), possui uma média de sementes

germinadas maior do que *A. cepa*; e sob exposição ao MMS e alumínio, em comparação com o tratamento controle, *L. sativa* foi mais eficiente e sensível que *A. cepa* para os parâmetros avaliados.

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

	Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>				
1	Oxymatine	Análise citogenética	Redução do IM.	Akdeniz e Özmen, 2011
2	Águas de efluentes farmacêuticos	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AN.	Abu e Mba, 2011
3	Efluentes têxteis bruto e tratado	Avaliação do crescimento da raiz, e análise citogenética	Aumento do comprimento radicular; AC; Redução do IM no efluente tratado e aumento do IM no efluente bruto.	Alvim et al., 2011
4	SPL	Análise citogenética, Eletroforese e Teste de TUNEL	Núcleos condensados; fragmentação do DNA; cromatina condensada; núcleos esféricos; formação de corpos apoptóticos.	Andrade-Vieira et al., 2011

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
5	Efeito de efluentes lançados no Rio Monjolinho	Análise citogenética	Redução do IM; AC; MN; morte celular.	Bianchi, Espindola e Marin-Morales, 2011
6	Metabissulfeto de sódio	Avaliação do crescimento da raiz, e análise citogenética	Redução do comprimento radicular; redução do IM.	Carvalho et al., 2011
7	Glifosato	Avaliação da germinação das sementes, crescimento da raiz, e análise citogenética	Alterações na germinação das sementes; redução do comprimento da raiz; aumento na frequência de MN; AC; redução do IM.	Çavuşoğlu et al., 2011
8	Água e sedimento de áreas pós-mineração (Polônia)	Análise citogenética	Aumento na frequência de AC; redução do IM.	Geras'kin et al., 2011
9	Nanopartículas de cobalto e óxido de zinco	Avaliação da germinação das sementes, crescimento da raiz, e análise citogenética	Alterações na germinação das sementes; redução do comprimento da raiz; redução do IM; danos celulares.	Ghodake, Seo e Lee, 2011

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
10	NanoTiO ₂	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Não houve alteração no número e no crescimento das raízes; leve aumento do IM; baixa frequência de AC e MN.	Klančnik et al., 2011
11	Raios gama	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AN; MN.	Kumar et al., 2011
12	Nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO NP)	Análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Redução do IM; AC; AN; MN.	Kumari et al., 2011
13	Fenaminosulf (fungicida e micro-biocida)	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Ensaio Cometa	Inibição do crescimento da raiz; aumento do IM e dos danos no DNA	Liman et al., 2011
14	BTEX	Análise citogenética e Teste de Micronúcleo	BTEX puro: Redução do IM; AC; AN; MN. A biodegradação de BTEX diminuiu a frequência de AC e MN.	Mazzeo, Fernandes e Marin-Morales, 2011
15	Ozonização de águas residuais	Análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Aumento do IM; frequência de MN não significativa.	Mišík et al., 2011

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
16	Água do Rio Paraíba do Sul, Tremembé-SP	Análise citogenética	Não houve alteração significativa do IM; aumento na frequência de MN e AC.	Oliveira, Voltolini e Barbério, 2011
17	Água do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul	Avaliação do crescimento da raiz; análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; MN.	Nunes et al., 2011
18	Curcumina e aloína	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Palanikumar et al., 2011
19	Nanopartículas de prata (AgNP-P)	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Alterações do IM, AM e MN.	Panda et al., 2011
20	Efluente têxtil	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Aumento na frequência de AC e Danos ao DNA	Phugare et al., 2011
21	Corante têxtil Remazol red (RR)	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Morte celular; Inibição do crescimento da raiz; aumento do IM; AC; MN.	Jadhav et al., 2011
22	Cebolas Gombe, Kano, Maiduguri, e Sokoto	Análise citogenética	Gombe: maior IM. Kano e Maiduguri: maiores frequências de AC.	Olorunfemi e Ogunsanwo, 2011
23	Efluentes industriais	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; AC.	Olorunfemi Ogieseri e Akinboro, 2011

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>			
24	Nanopartículas de prata	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AM. Pulate, Ghurde e Deshmukh, 2011
25	Águas residuais industriais e de um rio da Índia	Análise citogenética	Redução do IM; AC. Siddiqui, Tabrez e Ahmad, 2011
26	Águas residuais	Análise citogenética	Alterações no IM; MN; AC Tabrez e Ahmad, 2011
27	Corante Azo (BDPC - Produto Comercial Corante Preto)	Análise citogenética, banda C, banda NOR, bandas de fluorocromo específico-base e FISH	Morte celular; AC; AN; MN; alterações celulares e nucleolares. Ventura-Camargo, Maltempi e Marin-Morales, 2011
28	Águas dos Ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Tabatinga-PR)	Análise citogenética	Não houve alterações significativas no IM. Ferreira et al., 2012
29	Tiametoxam (Inseticida Eforia)	Avaliação da germinação das sementes, crescimento da raiz, e análise citogenética	Alterações na germinação das sementes; redução do comprimento da raiz; aumento na frequência de MN; AC; redução do IM. Çavuşoğlu et al., 2012

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
30	Formulação comercial do fungicida Azzurro® contendo zinebe (70% zinebe)	Análise citogenética; Imudeteccção de tubulina	Redução do IM; Aumento na frequência de AC; interferência na montagem dos microtúbulos durante a mitose.	Andrioli et al., 2012
31	Agropesticidas	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AN.	Asita e Hatane, 2012
32	Amostra de biossólido	Análise citogenética	Aumento do IM; AC; brotos nucleares; MN.	Christofoletti, Francisco e Fontanetti, 2012
33	Água intersticial e extratos orgânicos de sedimentos do Rio Taquari (RS)	Avaliação da germinação das sementes e análise citogenética	Aumento na taxa de germinação das sementes; AC; MN; redução do IM.	Costa et al., 2012
34	Crômio hexavalente [Cr (VI)]	Análise citogenética e microscopia confocal de varredura a laser	Perturbação dos microtúbulos; AC; redução do IM.	Eleftheriou, Adamakis e Melissa, 2012
35	Dióxido de cloro, hipoclorito de sódio e ácido peracético	Análise citogenética e Teste de Micronúcleo	AC; MN; redução do IM.	Feretti et al., 2012
36	Resíduos de mineração de carvão calcinado	Análise citogenética e Eletroforese	Danos no DNA.	Geremias et al., 2012

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
37	Nanopartículas de prata (Ag-np)	Análise citogenética e Ensaio Cometa	AC; fragmentação do DNA.	Ghosh et al., 2012
38	Nanocápsulas de Poly(-caprolactona) contendo ametryn, atrazina, simazina	Análise citogenética	Nanocápsulas contendo os herbicidas foram menos tóxicos do que os herbicidas livres.	Grillo et al., 2012
39	Águas residuais da refinaria Mathura	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Inibição do crescimento da raiz; AC; MN; redução do IM.	Gupta e Ahmad, 2012
40	Hipoclorito de sódio, dióxido de cloro e ácido peracético em diferentes temperaturas	Análise citogenética	AC em temperaturas mais altas (20 e 30 °C)	Gustavino et al., 2012
41	Di(2-etilhexil) ftalato, triclosane propilparabeno	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Inibição do crescimento da raiz; alterações no IM; AC; MN.	Herrero et al., 2012
42	Amostras de solo contaminado com metais pesados	Avaliação do crescimento da raiz e Teste de Micronúcleo	Inibição do crescimento da raiz; alta frequência de MN; AN.	Kataeva et al., 2012

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
43	Fontes de água da planície agrícola Nën-Shkodra, após inundações	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; Redução do IM; indução de AC e AM.	Kopliku e Mesi (Dizdari), 2012
44	Lixiviados aquosos (chorume) de aterro	Análise citogenética	Alterações no IM; MN; AC	Kwasniewska et al., 2012
45	Solo contaminado por derramamento de biodiesel	Análise citogenética	Aumento do IM; AC; leve indução de MN.	Leme et al., 2012
46	Nanofibras de celulose	Análise citogenética	Alterações do IM; AC.	Lima et al., 2012
47	Efluentes de indústria de laticínios	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; AC.	Olorunfemi, Omo-Ataga e Ofomata, 2012
48	Metabissulfito de sódio e benzoato de sódio	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Onyemaobi, Williams e Adekoya, 2012
49	Glicidol	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Panneerselvam, Palanikumar e Gopinathan, 2012
50	Detergentes	Análise citogenética	Alterações no IM; MN	Pedrazzani et al., 2012
51	Efluentes de branqueamento de celulose (ECF)	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; alterações no IM; AC; MN.	Roa, Yeber e Venegas, 2012

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>			
52	Diclorofena e diclorovos	Análise citogenética	Redução do IM; AC.
53	Tricloroetileno (TCE)	Análise citogenética	Redução do IM; AC
54	Clorfenvinfos e fembuconazol	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Redução do IM; AC; MN; AM; danos no DNA.
55	Cádmio (Cd(NO ₃) ₂)	Análise citogenética	Redução do IM; AC;
56	SPL	Análise citogenética, TUNEL e citometria de fluxo	Redução do IM; AC; MN; núcleo condensado; morte celular; fragmentação do DNA.
57	Ozonização de efluente contaminado com Rodamina B	Análise citogenética	AC.
58	Água do Rio Jamari, AM	Teste de Micronúcleo	MN.
59	Glutamato monossódico	Avaliação do crescimento da raiz, e análise citogenética	Inibiu o número e o crescimento das raízes; redução do IM; AC.
60	Furadan e Enodosulphan	Análise citogenética	Redução do IM; aumento na frequência de AC.

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
61	Pesticidas utilizados para o controle de insetos/pragas de produtos armazenados	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Asita e Mokhobo, 2013
62	Compostos endócrino-perturbadores	Avaliação do crescimento da raiz análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Aumentou o crescimento da raiz; não houve alterações significativas no IM e na frequência de MN.	Bertanza et al., 2013
63	Biossólido de ETE após processamento por diplópodos	Avaliação citogenética	AC; MN; alterações do IM.	Christofoletti, Pedro-Escher e Fontanetti, 2013
64	Cr (VI)	Análise citogenética	Redução do IM; aumentou a frequência de AC e MN; redução do volume nuclear e do conteúdo de DNA	Ditika e Anila, 2013
65	Diclofop-metil (herbicida) e lindane (inseticida)	Análise citogenética	Redução do IM; aumento na frequência de AC.	Dizdari e Koplaku, 2013

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
66	Desintoxicação de águas residuais por "LIMNOWET®"	Análise citogenética	Água sem tratamento: alta frequência de AC. Após tratamento: redução da frequência de AC.	Firbas e Amon, 2013
67	Chorume antes e depois de tratamento químico e eletroquímico	Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo	Não houve alterações significativas na frequência de MN ou de danos no DNA	Garaj-Vrhovac et al., 2013
68	Corantes alimentares	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Gomes et al., 2013
69	Efluentes de lavanderia de hospital tratado com ozonização fotocatalítica	Análise citogenética	Normalização do IM e do número de MN após ozonização fotocatalítica dos efluentes	Kern et al., 2013
70	Nanopartículas de óxido de Bismuto (III) - BONPs	Análise citogenética e Teste do Cometa	Aumento do IM; AC; danos no DNA.	Liman, 2013
71	Solos contaminados por curtume	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AN.	Masood e Malik, 2013
72	Íon Sr ²⁺ (Cloreto de estrôncio)	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; AC; AN.	Meena, Singh e Chaudari, 2013

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>			
73	Alprazolam	Análise citogenética	Alterações do IM; AC. Musanovic et al., 2013
74	Acetamipride (Inseticida)	Análise citogenética	Redução do IM; AC. Nag, Dutta e Pal, 2013
75	Drenagem ácida de mina (AMD) de carvão tratada e não tratada	Avaliação do crescimento da raiz e Ensaio Cometa	Inibição do crescimento da raiz e danos no DNA na AMD não tratada. Netto et al., 2013
76	Flusilazol (Fungicida)	Análise citogenética e PCR	Redução do IM; morte celular; AC; danos no DNA. Ozakca e Silah, 2013
77	Cromo hexavalente (Cr(VI))	Análise de crescimento das raízes; Ensaio Cometa; Análise citogenética	Redução no crescimento das raízes; Danos ao DNA; Redução do IM e indução de AC e MN Patnaik, Achary e Panda, 2013
78	Blitox (Fungicida)	Análise citogenética	Redução do IM; AC. Paul, Nag e Sinha, 2013
79	Partículas alfa de plutônio-239 e radiação de telefone móvel GSM 900	Análise citogenética	Aumento do IM; AC; AM; MN. Pesnya e Romanovsky, 2013
80	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH)	Análise citogenética	Alterações do IM; AC; MN. Rainho et al., 2013
81	Fermento em pó e glutamato monossódico	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AM; AN. Renjana, Anjana e Thoppil, 2013

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
82	Solo contaminado tratado com vinhaça de cana de açúcar	Análise citogenética	AC e AM.	Souza et al., 2013
83	Intensificadores de sabor (Glutamatos)	Análise citogenética	Alterações do IM; AM; AC; MN; AN.	Türkoğlu, 2015
84	Chumbo e ácido salicílico	Análise citogenética	Chumbo: aumento do IM. Ácido salicílico: redução do IM. AC nos xenobióticos sozinhos ou juntos.	Trushin et al., 2013
85	Águas residuais de indústria de farinha de mandioca e solução de tiosulfato de sódio	Análise citogenética	Alterações do IM.	Viana, Düsman e Vicentini, 2013
86	β -lapachone e hidroxiiurea	Análise citogenética, Citofotometria, Detecção Imunocitoquímica	Redução do IM; AC AM; MN; morte celular.	Žabka, Trzaskoma e Maszewski, 2013
87	Nanotubos de carbono	Análise citogenética	Não houve indução de efeitos genotóxicos ou mutagênicos.	Andrade et al., 2014

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
88	Formulações farmacêuticas de tiabendazol e griseofulvina	Análise citogenética e Imunofluorescência	Redução do IM; AC; AN; perturbações nos microtúbulos.	Andrioli et al., 2014
89	Águas de superfície em córregos urbanos	Análise citogenética	Aumento na frequência de AC e MN; redução do IM.	Athanásio, Prá e Rieger, 2014
90	Água do Rio Quatorze, Paraná-Brasil	Análise citogenética	Alterações no IM.	Düsman et al., 2014
91	Efluentes tratados com lodo ativado e um filtro emergente de macrófitas flutuantes	Análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Não houve alterações significativas no IM, nem na frequência de MN e AC.	Goldoni et al., 2014
92	Herbicida Sulcotriona e fotopodrutos	Análise citogenética	Redução do IM; AC.	Goujon et al., 2014
93	Chumbo	Análise citogenética; sonda fluorescente, imunofluorescência e Ensaio Cometa	Redução do IM; inibição da segregação e motilidade cromossômica; danos no DNA.	Jiang et al., 2014
94	Efluentes de hospital	Análise citogenética	Alterações do IM; AC.	Magdaleno et al., 2014
95	Compostos inorgânicos de selênio	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; alterações do IM	Michalska-Kacymirow et al., 2014

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>			
96	Drenagem ácida de mina (AMD)	Análise citogenética	Redução do IM; AM; AC. Radić et al., 2014
97	Rodamina B	Análise citogenética	Redução do IM; aumento na frequência de MN, pontes e brotos. Tan et al., 2014
98	Efluentes de estaleiros navais	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Teste de Micronúcleo	Alterações morfológicas nas raízes; redução do IM; AC; MN. Singh et al., 2014
99	Novos complexos de nano-prata com difração de raio-X de sulfamoxole (SMX)	Análise citogenética	Não exibiu efeito citotóxico, nem AC. Velluti et al., 2014
100	Nanopartículas de Dióxido de Titânio (TiO ₂)	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Indução de AC e AN; Danos ao DNA. Pakrashi et al., 2014
101	Corantes têxteis	Análise de crescimento das raízes; Ensaio Cometa; Análise citogenética	Redução no crescimento das raízes; Danos ao DNA; Aumento do IM e indução de AC e MN. Watharkar e Jadhav, 2014
102	Chumbo (Pb)	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Redução do IM; Indução de AC e AN; Danos ao DNA. Kaur et al., 2014

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência
<i>A. cepa</i>			
103	Forskolin	Análise citogenética	Redução do IM; AC; MN. Mohammed et al., 2015
104	Água potável na região Guelma (Argélia)	Análise citogenética	Redução do IM; aumento na frequência de AC. Abda et al., 2015
105	Óxido de indium e estanho	Análise citogenética e Ensaio Cometa	Redução do IM; AC; AN; danos no DNA. Ciğerci et al., 2015
106	Solos contaminados com cinzas volantes de centrais térmicas	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibiu o crescimento da raiz; alterações do IM; AC; MN; AN. Ghosh et al., 2015
107	Imazetapir (Herbicida)	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Ensaio Cometa	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; baixa frequência de AC; danos no DNA. Liman, Ciğerci, Öztürk, 2015
108	Efluentes urbanos	Análise citogenética	Redução do IM; AC. Tabet et al., 2015
109	Águas do Córrego Arara, MS	Análise citogenética	Alterações do IM; AC. Maceda et al., 2015
110	Rio que recebe efluentes urbanos e trifluralina (Herbicida)	Bandeamento AgNOR	AC; AN; MN. Mazzeo e Marin-Morales, 2015

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
111	Difenoconazol e tebuconazol	Avaliação da germinação das sementes, crescimento da raiz, análise citogenética e análises moleculares	Inibição da germinação das sementes e crescimento da raiz; redução do IM; AC; AN; perda e ganho de bandas/alterações no DNA.	Bernardes et al., 2015
112	Efluentes industriais	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	Inibição do crescimento da raiz; redução do IM; AC; MN; AN.	Hemachandra e Pathiratne, 2015
113	Lodo de esgoto	Análise citogenética	Alterações no IM; AC; MN; danos no DNA.	Mazzeo et al., 2015
114	Cobre (Cu)	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética, ensaio cometa e imufluorescência	Inibição do crescimento da raiz; AC; MN; redução do IM; danos no DNA; prejudicou o arranjo dos microtúbulos; redução de α -tubulina.	Qin et al., 2015
115	Nanopartículas de óxido de alumínio	Análise citogenética	Redução do IM; AC; AN.	Rajeshwari et al., 2015
116	Nanopartículas de Zinco	Análise citogenética	Redução do IM; AC	Taranath et al., 2015

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
117	Nanopartículas de óxido de crômio III (Cr2O3)	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC.	Kumar et al., 2015
118	Herbicida Anilofos	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC.	Özkara et al., 2015
119	Agrotóxicos imidaclopride e sulfentrazona e mistura de ambos	Análise citogenética	Alteração do IM; Indução de AC e MN.	Bianchi, Casimiro-Fernandes e Marin-Morales, 2016
120	SPL	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC e NC.	Palmieri et al., 2016
121	CMBA e XDD	Análise citogenética	Redução do IM; indução de MN e AC.	Goujon et al., 2015
122	Amidoamina (hydroxyl- andamine-terminatedpoly)	Cfrescimento radicular e análise citogenética	Redução no crescimento radicular dos bulbos; Redução do IM associado a defeitos na segregação cromossômica.	Freire et al., 2016
123	Tintura para cabelo	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC.	Maiti et al., 2016

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
124	Pesticidas: Endosri-ES (endosulfan), Nuvan-NU (dichlorvos) e Kvistin-KS (carbendazim)	Análise citogenética	Redução do IM; indução de MN e AC.	Kuchy, Wani w Kamili, 2016
125	Fungicida: Benodanil	Análise citogenética	Redução do IM.	Akyil et al., 2016
126	Efluente de esgoto	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC.	Teena, Soumya e Sudha, 2016
127	Nanopartículas de ouro (HAuCl4)	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC.	Rajeshwari et al., 2016
128	Lodo de esgoto	Germinação das sementes e análise citogenética	Sementes não germinaram com o lodo bruto. Redução do IM; indução de AC, AN e MN.	Martins, de Souza e da Silva Souza, 2016
129	Ácido 2, 4-dichlorophenox yacetic (2, 4-D)	Análise citogenética e ensaio Cometa	Redução do IM; indução de AC. Danos ao DNA na maior concentração e maior tempo de exposição.	Özkul et al., 2016
130	Efluente da indústria de bebidas	Avaliação de germinação e crescimento, teste do Micronúcleo	Não afetou a germinação e o crescimento. Indução de MN.	Da Rosa et al., 2015
131	Efluentes de indústria têxtil	Análise citogenética	Redução do IM; indução de AC e AN.	Hemachandra e Pathiratne, 2016

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i>				
132	Azocorante comercial BDCP (Black Dye Commercial Product)	Análise citogenética	Indução de AC e AN.	Ventura-Camargo, de Angelis e Marin-Morales, 2016
<i>A. cepa</i> e <i>L. sativa</i>				
1	Águas residuais do processamento de azeitona	Avaliação da germinação e do crescimento, e análise citogenética	Inibição da germinação e crescimento da raiz em <i>L. sativa</i> ; redução do IM e aumento na frequência de AC em <i>A. cepa</i> .	Pierantozzi et al., 2011
2	Benzofurano (2R) -6-hydroxytremetone	Avaliação da germinação e do crescimento, e análise citogenética	Redução da germinação; inibição do crescimento das raízes; redução do IM.	Romano et al., 2011
3	Avaliação da qualidade da água	Avaliação da germinação e do crescimento, e análise citogenética	Aumento do IM; Aumento na germinação e no crescimento das raízes e da parte aérea. <i>L. sativa</i> apresentou maior sensibilidade.	Cuchiara, Borges e Bobrowski, 2012

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Continua)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa</i> e <i>L. sativa</i>				
4	Efluentes de lavanderia de hospital	Avaliação do crescimento da raiz e análise citogenética	<i>L. sativa</i> : inibição do crescimento da raiz. <i>A. cepa</i> : inibição do crescimento da raiz; redução do IM; AC; MN	Kern et al., 2015
<i>L. sativa</i>				
1	Cd (Cádmio)	Ensaio Cometa e Teste do Micronúcleo	Fragmentação do DNA e indução de MN	Monteiro et al., 2012
2	Chumbo (Pb)	Avaliação da germinação e do crescimento, análise da anatomia radicular e análise citogenética	Inibição da germinação e crescimento da raiz; alterações na anatomia radicular; redução do IM; AC; MN.	Pereira et al., 2013
3	Água e sedimento de córrego urbano	Avaliação da germinação e do crescimento, e análise citogenética	Inibição da germinação e crescimento da raiz; redução do IM; AC.	Rodrigues et al., 2013
4	Cromo (Cr)	Avaliação do crescimento da raiz, análise citogenética e Teste do Micronúcleo	Inibição do crescimento da raiz; alterações do IM; MN.	Hou et al., 2014a

Quadro 1 – Trabalhos publicados entre os anos de 2011 e 2016 que utilizaram análise citogenética para avaliar a toxicidade de compostos químicos e resíduos ambientais nos modelos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L. (Conclusão)

Agente testado	Ensaio	Endpoint	Referência	
<i>A. cepa e L. sativa</i>				
5	Chumbo (Pb)	Avaliação da germinação e do crescimento, análise citogenética e Teste do Micronúcleo	Inibição da germinação das sementes e crescimento da raiz; alterações do IM; MN.	Hou et al., 2014b
6	SPL	Avaliação da germinação e do crescimento, e análise citogenética	Redução da taxa de germinação e do alongamento da raiz; redução do IM; AC; núcleos condensados	Palmieri et al., 2014
7	SPL	Avaliação da germinação e do crescimento, análise citogenética e análises moleculares	Inibição no crescimento das raízes; AM; inibição da fosforilação da Histona H3 na Serina 10.	Freitas et al., 2016

Legenda: IM - Índice Mitótico; AC - Alterações Cromossômicas; AN - Alterações Nucleares; AM - Alterações Mitóticas; MN - Micronúcleo; NC - Núcleo Condensado. Fonte: Do autor (2016).

2.3 Análises Citogenéticas Aplicadas a Toxicologia Ambiental

A primeira parte de um vegetal a ser exposta aos agentes tóxicos dispersos no solo e na água é a raiz, por isso esta parte da planta é muito utilizada em estudos de toxicidade ambiental (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; FISKEJÖ, 1988). É na ponta da raiz que encontramos uma região denominada de meristema, composta por células em intensa divisão celular. Este tecido possibilita as

avaliações do índice mitótico e da frequência de alterações no ciclo celular quando as raízes são expostas a algum composto químico ou resíduo ambiental (GUERRA, 1988).

A avaliação do ciclo celular, que compreende a interfase (G1, S e G2) e a mitose, permite o conhecimento sobre a estrutura organizacional dos cromossomos e como eles se comportam durante a divisão celular, e pode ser empregada para determinar a toxicidade de algum composto químico que possa estar degradando o meio ambiente (GRANT, 1994). O índice mitótico refere-se ao número total de células em divisão durante o ciclo celular, e qualquer alteração neste índice, aumento ou redução, auxilia na determinação do grau de citotoxicidade de um agente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Alterações como esta são utilizadas para prospectar o potencial tóxico de diferentes compostos químicos e resíduos ambientais (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008).

Agentes genotóxicos causam danos no DNA, que podem ser reparados pelos mecanismos de reparo da célula, ou serem fixados levando ao comprometimento celular (ANDRADE-VIEIRA, 2012), as quais podem ser expressas como alterações cromossômicas observadas no ciclo celular (MAURO et al., 2014). Estas alterações podem ter como consequência a formação de células poliploides (Figura 2A e 3A) e a eliminação do material genético, resultando na formação de anomalias nucleares (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Vários compostos químicos são mutagênicos e produzem modificações no material genético, como alterações no número e estrutura do cromossomo, e nas estruturas individuais do gene (CAMPOS et al., 2008b). Segundo Migid, Azab e Ibrahim (2007), vários *endpoints* podem ser monitorados na divisão das células meristemáticas, como aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos. Leme e Marin-Morales (2009) ressaltam que os micronúcleos são considerados

por muitos autores como o mais efetivo e simples *endpoint* para a análise de efeitos mutagênicos provocados por compostos químicos, devido ao fato de resultarem de danos não reparados ou reparados incorretamente nas células parentais, sendo facilmente observados em células filhas como uma estrutura similar ao núcleo principal, mas em tamanho reduzido (Figura 2I, 2J, 3B e 3C).

O fuso mitótico é formado pelos microtúbulos que executam funções celulares importantes durante o ciclo celular (CAMPOS et al., 2008b; JORDAN e WILSON, 1999). Alterações na dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos, bem como a não ligação destes aos cromossomos por problemas na região centromérica (FREITAS et al., 2016), afetam a segregação dos cromossomos para as células filhas e tem como consequência, a formação de células poliploides; a interrupção no ciclo celular em metafase, originando as c-metáfases (Figura 2B e 3D); e anáfase multipolar (Figura 2H e 3E) ou segregação anormal/tardia dos cromossomos/cromátides em anáfase/telófase (Figura 3F) (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; CAMPOS et al., 2008b; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009).

Quando há interferências na polimerização e despolimerização dos microtúbulos, pode ocorrer a paralisação do ciclo celular em metafase e os cromossomos são vistos bem condensados, com o centrômero bem definido e espalhados no interior da célula (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Em laboratório, esta situação é provocada com substâncias denominadas de bloqueadoras de ciclo celular, como é o caso da Colchicina, que é a responsável pelo nome desta alteração. Estes cromossomos extremamente condensados e separados são utilizados para estudos do cariótipo das espécies, pois permitem observar a morfologia de cada cromossomo, individualmente (GUERRA, 1988).

A anáfase multipolar e a segregação anormal das cromátides em anáfase/telófase também é uma consequência da ação de substâncias químicas sobre a organização dos microtúbulos. Essas alterações são observadas como

consequência da ligação incorreta ou não ligação do fuso mitótico ao centrômero dos cromossomos (FREITAS et al., 2016); ou do encurtamento e alongamento de alguns microtúbulos do fuso mitótico, sem sincronia com os demais, o que pode provocar a disjunção desigual de cromossomos (cromossomos não orientados, Figura 3G), originando os micronúcleos (Figura 2I, 2J, 3B e 3C) (ANDRADE-VIEIRA, 2012; CAMPOS et al., 2008b; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009).

A ação de substâncias tóxicas diretamente no cromossomo pode provocar quebras (Figura 2D, 2E, 2F e 3H). Em geral, uma das consequências da quebra é a perda dos telômeros, região na extremidade terminal do cromossomo, que tem como uma das funções garantir a proteção e estabilidade cromossômica (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Com a perda dessa estabilidade, pode ocorrer a fusão da parte terminal de dois cromossomos. Na ocasião da divisão, cromossomos com dois centrômeros, são observados como pontes em anáfase/telófase (Figura 2C, 3I e 3J), onde cada um dos centrômeros que os constitui é ligado ao fuso de um dos polos da célula (CAMPOS et al., 2008b). Ciclos sucessivos de quebra-fusão-ponte podem acarretar irregularidades na células filhas por várias gerações.

A região cromossômica decorrente da quebra que fica sem centrômero, é denominada fragmento acêntrico (Figura 2D, 2E, 2F e 3H). Esses fragmentos cromossômicos, por conterem partes do material genético, são reconhecidos pela célula e envoltos por membrana na ocasião da divisão celular, originando os micronúcleos, que são facilmente observados nas células da geração F1.

Outra evidência da toxicidade de um composto químico ou resíduo ambiental é a formação de núcleos condensados (Figura 3K), os quais apresentam a cromatina heterocromatinizada, e são evidenciados por uma coloração mais intensa, pelo formato arredondado e de tamanho menor que os núcleos interfásicos normais (ANDRADE-VIEIRA et al. 2011; ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS;

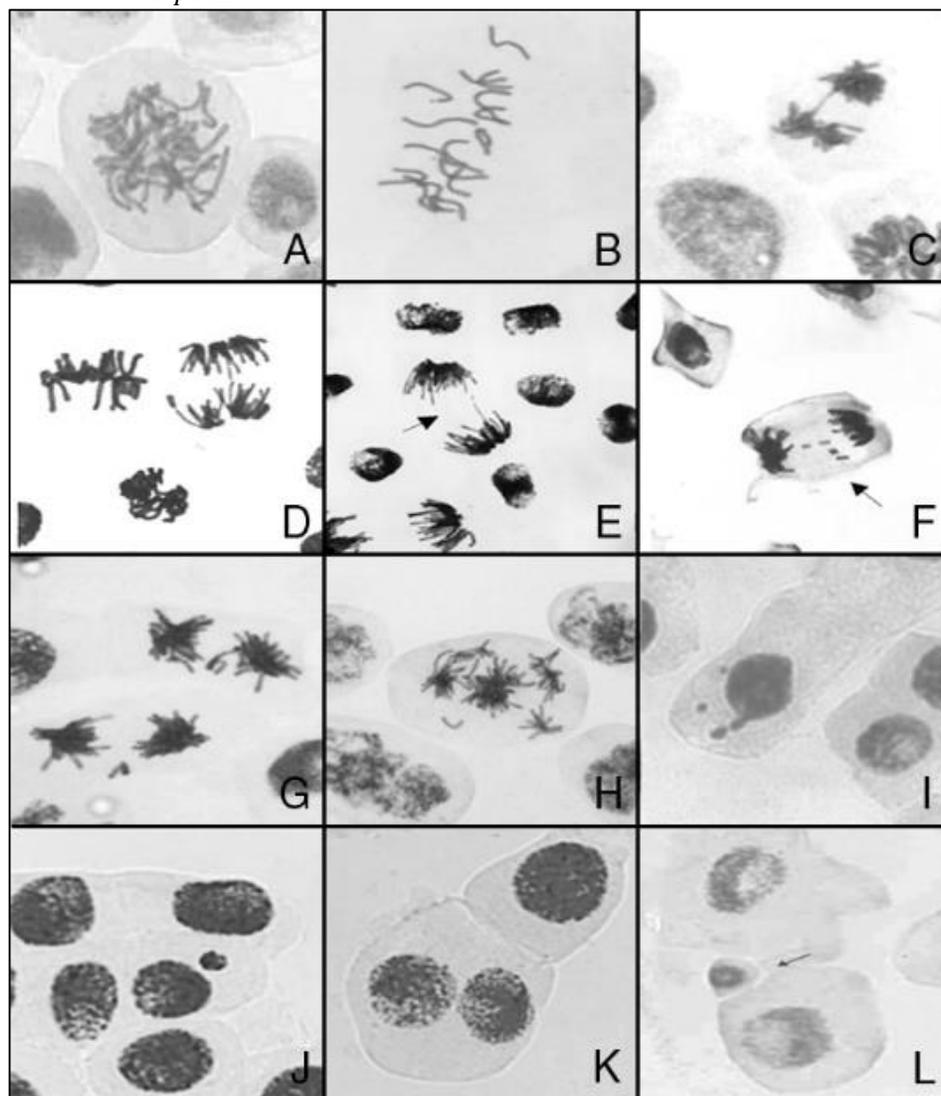
DAVIDE, 2012). A presença de núcleos condensados é um indicativo que as células estão entrando em processo de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al. 2011; ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2012). O processo de morte das células é caracterizado pela condensação da cromatina, redução do citoplasma e alterações nucleares e no citoesqueleto (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; AMEISEN, 2002; BEHBOOD e SAMADI, 2004; SAVILL e FADOK, 2000; UEDA e SHAH, 2000), e pela fragmentação do DNA observado em gel de agarose (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011). Tal mecanismo de morte está relacionado à destruição de células danificadas, a fim de eliminá-las (DANON et al., 2000).

Substâncias tóxicas também podem desencadear a formação de cromossomos aderentes (Figura 3L), que são caracterizados por alterações na estrutura físico-química do DNA, de proteínas ou de ambos, formadas a partir de complexos com grupos fosfato no DNA, ligações inter e intra cromatídicas e condensação do DNA (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; EL-GHAMERY; EL-KHOLY; EL-YOUSER, 2003). Estes fatores promovem a perda das características normais de condensação causando a formação de aglomerados (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; BABICH; SEGALL; FOX, 1997). A aderência cromossômica é considerada uma alteração altamente tóxica (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008), que impede a segregação das cromátides e o prosseguimento normal da divisão celular, o que pode desencadear o processo de morte celular, evitando que o efeito tóxico passe para a geração seguinte.

Todas essas alterações cromossômicas (Figura 2) observadas como consequência da ação de um agente tóxico nas células têm sido avaliadas não apenas para prospectar o efeito genotóxico dos poluentes, mas também para avaliar seus mecanismos de ação. Logo, os agentes podem ser classificados como clastogênicos e aneugênicos em função do(s) tipo(s) de alteração(ões) que induzem com maior frequência (LEME; ANGELIS; MARIN-MORALES, 2008).

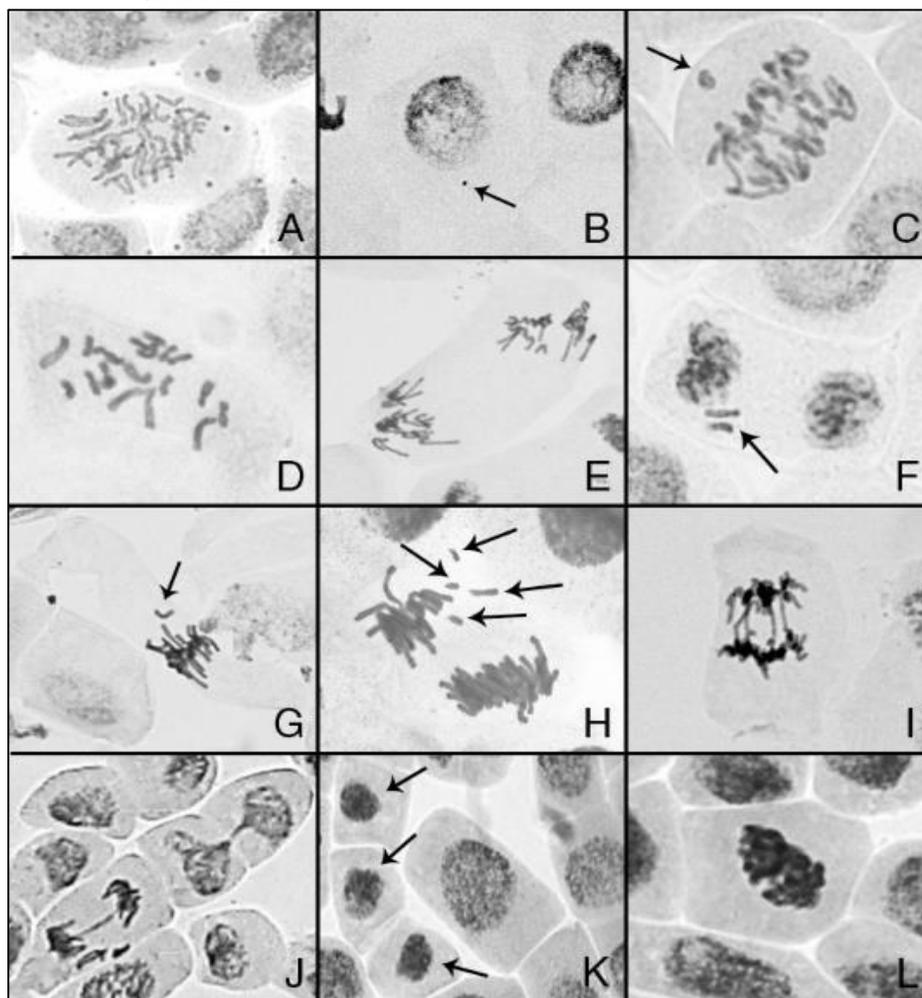
Substâncias classificadas como clastogênicas induzem quebras cromossômicas, enquanto que as aneugênicas inativam a estrutura celular, como por exemplo, o aparato do fuso, levando a perdas cromossômicas (FENECH, 2000) ou a inativação da região centromérica (FREITAS et al., 2016). De um modo geral, as aberrações cromossômicas, como pontes e quebras, indicam ação clastogênica, enquanto que cromossomos não orientados, atrasados, multipolaridade e c-metáfases, são consequência de efeitos aneugênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Figura 2 – Exemplos de alterações que podem ser observadas nas análises citogenéticas aplicadas à toxicologia ambiental no modelo *Allium cepa* L.



Legenda: A: Célula poliplóide; B: C-Metáfase; C: Anáfase tardia com ponte cromossômica; D, E, F: Quebra cromossômica; G: Perda cromossômica; H: Anáfase multipolar com perda cromossômica; I: Broto nuclear e Micronúcleos; J: Micronúcleo; K: Célula binucleada; L: Mini célula Fonte: Imagens capturadas e gentilmente cedidas por estudantes de Iniciação Científica e de Pós-graduação do grupo de pesquisa do Laboratório de Mutagênese-IB-UNESP, Rio Claro-SP, usando como modelo *Allium cepa* L (2015).

Figura 3 – Exemplos de alterações que podem ser observadas nas análises citogenéticas aplicadas à toxicologia ambiental no modelo *Lactuca sativa* L.



Legenda: A: Poliploidia; B, C: Micronúcleo; D: C-metáfase; E: Anáfase multipolar; F: Cromossomo perdido em telófase; G: Cromossomo não orientado em metáfase; H: Fragmentos/quebras em anáfase; I, J: Ponte em anáfase/telófase; K: Núcleo condensado; L: Aderência cromossômica. Fonte: Estudantes de Iniciação Científica integrantes da linha de pesquisa “Prospecção de Efeitos Biológicos” do Laboratório de Citogenética-DBI-UFLA, usando como modelo *Lactuca sativa* L (2015).

2.4 Prospecção dos mecanismos de morte celular e de danos ao DNA aplicados a Toxicologia Ambiental

O teste de TUNEL (TdT-mediated deoxy-uracil nick end labeling) é utilizado para análise da fragmentação do DNA e prospecção dos mecanismos de morte celular. Se baseia na incorporação de nucleotídeos (d-UTP = 2'-desoxiuridina 5' trifosfato) marcados com um fluorocromo (Isotiocianato de fluorescência-FITC) na região livre 3'OH das quebras da cadeia de DNA (ANDRADE-VIEIRA et al., 2011; BEHBOODI E SAMADI, 2004). Esta reação baseia-se na capacidade da enzima "terminal deoxynucleotidyl transferase" (TdT) em acoplar uma desoxi-uracilo-fluoresceína (d-UTP) conjugada ao final 3'OH do DNA quebrado (BEHBOODI E SAMADI, 2004; GAVERIELI; SHERMAN; BEM-SASSON, 1992). A incorporação da fluoresceína-12-dUTP é então amplificada por várias reações enzimáticas secundárias e analisada em microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (MARTINS et al., 2007).

As células analisadas são contra coradas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) de forma que todos os núcleos das células do campo em análise aparece emitem fluorescência azul (Figura 4A) e aqueles marcadas de TUNEL-positivo emitem fluorescência verde (Figura 4B). A sobreposição das imagens obtidas no comprimento de onda de cada fluorocromo do teste (Figura 4C) permite contabilizar a frequência de células com DNA danificado.

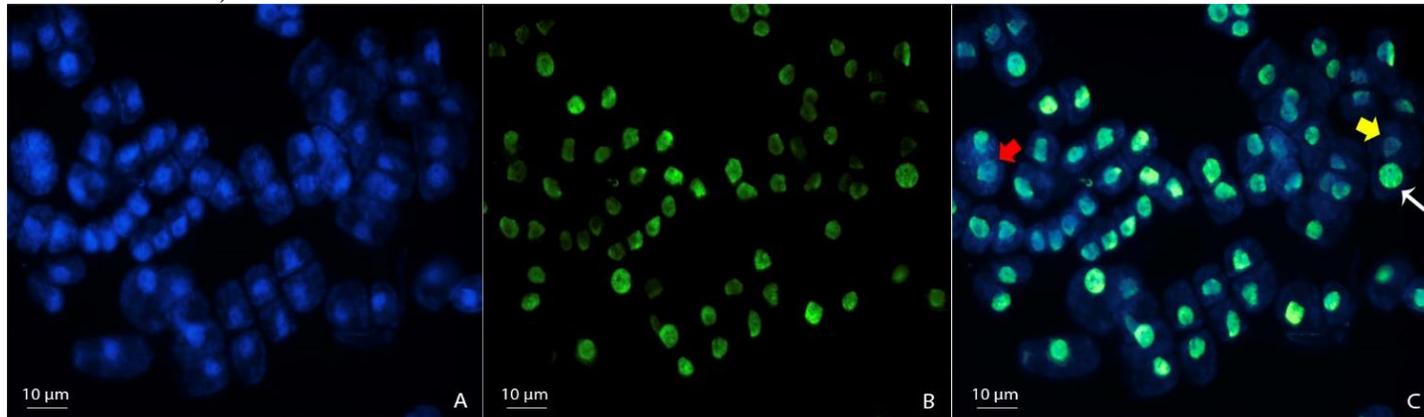
O Ensaio cometa ou eletroforese de gel de célula única, é outra técnica muito útil para detecção de danos ao DNA. Ele é caracterizado por ser um teste altamente sensível além de rápido, econômico e de alta especificidade, que tem sido utilizado para detectar um amplo espectro de danos no material genético (AZQUETA et al. 2011; YILDIZ et al., 2009).

O Ensaio Cometa pode ser utilizado para complementar os dados citogenéticos obtidos com as análises de ciclo celular, pois detecta lesões

genômicas causadas ao DNA em decorrência da ação de mutágenos. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Assim, o ensaio pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000). A técnica consiste na imersão de células viáveis em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos, e posterior eletroforese. Sob condições alcalinas de eletroforese, os DNAs celulares que sofreram danos apresentam maior taxa de migração em direção ao ânodo, devido a quebras de fita simples ou duplas e sítios lábeis alcalinos simulando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (PAVÃO et al., 2007).

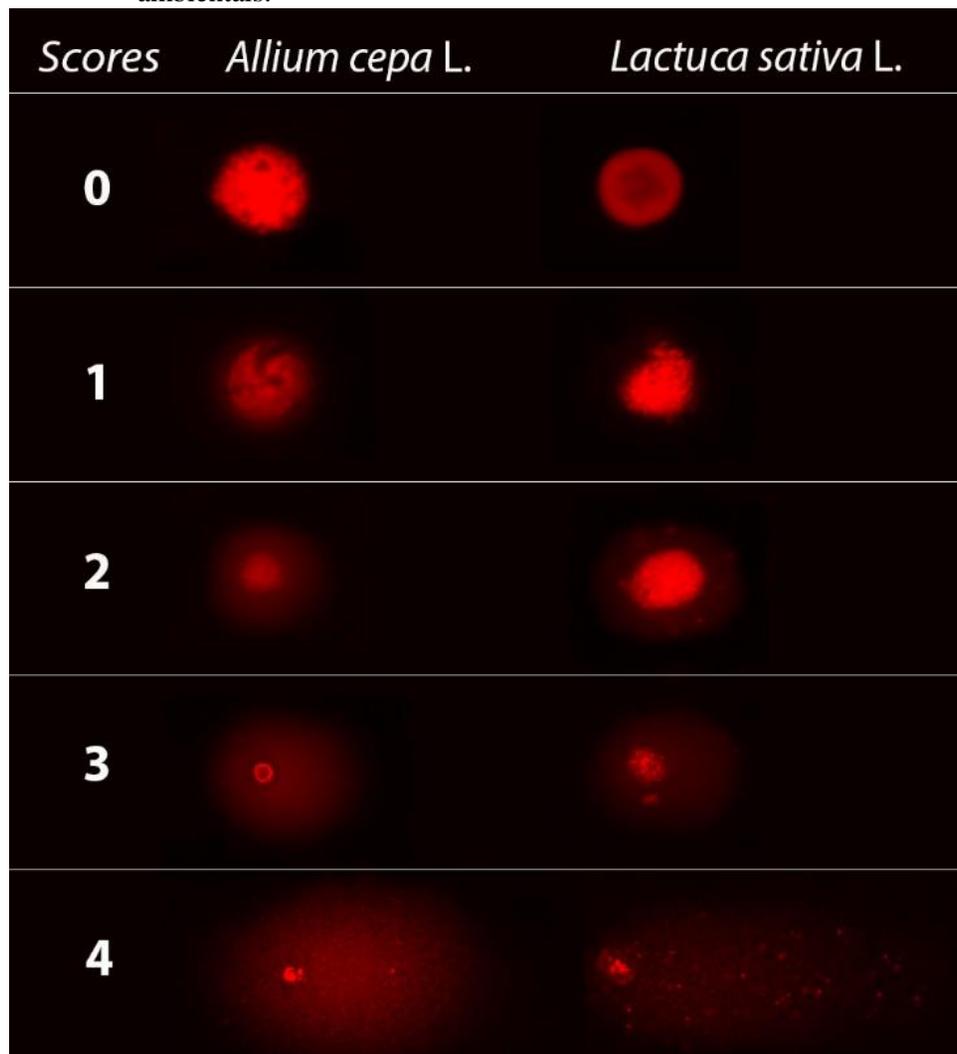
A quantificação da frequência de danos ao DNA se dá por meio da classificação em scores (0 a 4) dos nucleíodes avaliados conforme a Figura 5.

Figura 4 – Células meristemáticas de *L. sativa* tratadas com SPL visualizadas em Microscópio de Fluorescência (Olympus BX 60).



Legenda: A: Núcleos com coloração azul evidenciados apenas no filtro com comprimento de onda para o DAPI (345 a 358 nm). B: Imagem capturada com filtro no comprimento de onda de 488 a 495 nm. C: Resultado da sobreposição das imagens A e B feita através do programa AxioVision. Os núcleos evidenciados em verde (seta fina branca) representam os danos graves (núcleo inteiro TUNEL positivo); os núcleos corados parcialmente em verde (seta larga vermelha) representam os danos leves (núcleo parcialmente TUNEL positivo); e os núcleos sem coloração verde (seta larga amarela) não apresentam danos ao DNA (TUNEL negativo). Fonte: Do autor (2016).

Figura 5 – Scores 0 a 4 segundo análise visual para nucleóides obtidos a partir de células de *A. cepa* (cebola) e *L. sativa* (alface) expostas à poluentes ambientais.



Legenda: Lâminas preparadas com as pontas das raízes de cebola e alface expostas às soluções de MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina). Fonte: Do autor (2016).

2.5 Compostos químicos utilizados no presente estudo para comparar a eficiência de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. nos testes propostos

2.5.1 SPL (Spent Pot Liner)

O Spent Pot Liner (SPL) é um resíduo sólido da produção de alumínio formado por uma série de substâncias que se acumula nas cubas de redução da alumina durante os processos de purificação e refino da bauxita (PALMIERI et al., 2014; SILVEIRA et al., 2002). Esse composto é comprovadamente tóxico, provocando redução significativa no índice mitótico, no crescimento radicular e retardo no enraizamento de sementes de modelos vegetais testados (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008), além de alterações no ciclo celular, tanto em *A. cepa* (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2012) como em *L. sativa* (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; PALMIERI et al., 2014). Palmieri et al. (2014) determinou a concentração de 26,5 g L⁻¹ como a concentração tóxica suficiente para induzir alterações macroscópicas e microscópicas sem inibir completamente o desenvolvimento da plântula exposta, referente ao IC₅₀ (concentração que inibe 50% do crescimento das raízes expostas, em comparação com o controle negativo).

2.5.2 Cádmio (Cd)

O Cádmio (Cd) é um metal pesado e um poluente industrial, que é absorvido rapidamente pelas raízes das plantas e armazenado em apoplastos ou vacúolos, inibindo o crescimento da raiz, além de poder induzir a fragmentação da cromatina e provocar alterações no nucléolo (BEHBOODI e SAMADI, 2004). No estudo realizado por Behboodi e Samadi (2004), uma solução preparada com

25 μM de Cd ocasionou fragmentação do DNA (eletroforese em gel de agarose) e apresentou características de morte celular (Teste de TUNEL) em células meristemáticas da raiz de *A. cepa* L., concentrações menores não apresentaram danos ao DNA e concentrações maiores ocasionaram alta fragmentação do DNA e uma maior porcentagem de morte celular.

2.5.3 Atrazina (ATZ)

O herbicida conhecido comercialmente como Atrazina, faz parte de uma classe de herbicidas denominada triazinas, a qual é largamente utilizada no controle pré-emergente de ervas daninhas; esses herbicidas são tóxicos, persistentes no ambiente e potencialmente carcinogênicos para o homem, sendo também importantes contaminadores dos corpos d'água e já foram detectados inclusive na água de abastecimento público (BESPLUG et al., 2004; PATUSSI e BÜNDCHEN, 2013). Em estudos realizados pelos participantes da linha de pesquisa “Prospecção de efeitos biológicos” do Laboratório de Citogenética-DBI-UFLA, foi observado que a Atrazina, numa concentração de 0,003 g L⁻¹, ocasionou várias alterações no ciclo celular de *Lactuca sativa* L. (VENCESLAU, 2016).

2.5.4 MMS (Metil Metano Sulfonato)

O Metil Metano Sulfonato (MMS) é utilizado como controle positivo em alguns testes de citotoxicidade, o qual pode induzir alterações nucleares como observado por Tan et al. (2014). Segundo Mauro et al. (2014), o MMS é um agente indutor de danos no DNA porque atua como um agente alquilante de DNA, provocando uma série de lesões, incluindo rupturas na cadeia do DNA. Essas alterações podem ser observadas como *endpoints* no ciclo celular.

REFERÊNCIAS

- ABDA, A. et al. Mutagenicity and genotoxicity of drinking water in Guelma region, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**. Bangor, v. 187, n. 2, p. 1-15, 2015.
- ABU, N. E.; MBA, K. C.; Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**. Nairobi, v. 3, n. 2, p. 44-51, 2011.
- ADEYEMO, O. A.; FARINMADE, A. E. Genotoxic and cytotoxic effects of food flavor enhancer, monosodium glutamate (MSG) using *Allium cepa* assay. **African Journal of Biotechnology**. Abraka, v. 12, n. 13, p. 1459–1466, 2013.
- AKDENIZ, D.; ÖZMEN, A. Antimitotic effects of the biopesticide oxymatrine. **Caryologia**. Florence, v. 64, n. 1, p. 117–120, 2011.
- AKYIL, D. et al. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of Benodanil by using *Allium* and Micronucleus assays. **Drug and chemical toxicology**. Auburn, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2016.
- ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.
- ALTENBURGER, R.; SCHMITT-JANSEN, M. Chapter 5: Predicting toxic effects of contaminants in ecosystems using single species investigations. In: MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. (Org.). **Bioindicators & Biomonitoring: Principles, Concepts and Applications. Trace Metals and other Contaminants in the Environment**. First edition. Oxford: Elsevier, 2003. v. 6, p. 153-198.
- ALVIM, L. B. et al. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**. Taubaté, v. 6, n. 12, p. 255–265, 2011.
- AMEISEN, J. C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. **Cell Death and Differentiation**. London, v. 9, n. 4, p. 367-393, 2002.
- ANANTHAKRISHNAN, M.; KUMARASAMY, K.; ANTONY, A. S. Genotoxic effects of furadan and endosulphan on (*Allium cepa*) root tips. **Asian**

Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. Madhya Pradesh, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2013.

ANDRADE, L. R. et al. Absence of mutagenic and recombinogenic activity of multi-walled carbon nanotubes in the *Drosophila* wing-spot test and *Allium cepa* test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 99, p. 92–97, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of Landfills Assessed by Plant Cytogenetic Approaches. In: CABRAL, G. B. C.; BOTELHO, B. A. E. (Org.). **Landfills: Waste Management, Regional Practices and Environmental Impact**. New York: Nova Publishers, 2012. v. 1, p. 319-330.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**. Sint-Katelijne-Waver, v. 107, p. 140-146, 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. In: PRATISSOLI, D. et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal III**. 1. ed. Alegre: UFES, 2012. v. 3, p. 39-79.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 74, n. 4, p. 882–888, 2011.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, n. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 706–710, 2008.

ANDRIOLI, N. B. et al. Induction of microtubule damage in *Allium cepa* meristematic cells by pharmaceutical formulations of thiabendazole and griseofulvin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 772, p. 1–5, 2014.

ANDRIOLI, N. B. et al. Cytogenetic and microtubule array effects of the zineb-containing commercial fungicide formulation Azzurro® on meristematic root cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 742, n.1, p. 48-53, 2012.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ASITA, A. O.; HATANE, B. H. Cytotoxicity and genotoxicity of some agropesticides used in Southern Africa. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**. Nairobi, v. 4, n. 10, p. 175-184, 2012.

ASITA, A. O.; MOKHOBHO, M. M. Clastogenic and Cytotoxic Effects of Four Pesticides Used to Control Insect Pests of Stored Products on Root Meristems of *Allium cepa*. **Environment and Natural Resources Research**. Toronto, v. 3, n. 2, p. 133–145, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Resíduos sólidos: classificação. Rio de Janeiro, 2004.

ATHANÁSIO, C. G.; PRÁ, D.; RIEGER, A. Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **The Scientific World Journal**. Cairo, v. 2014, 2014.

AZQUETA, K. B. et al. Towards a more reliable comet assay: Optimizing agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 724, n. 1, p. 41-45, 2011.

BABICH, H.; SEGALL, M. A.; FOX, K. D. The *Allium* test – A simple, eukaryote genotoxicity assay. **The American Biology Teacher**. Reston, v. 59, n. 9, p. 580-583, 1997.

BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environ. Res**. San Diego, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

BARATELLI, T. G. et al. Phytochemical and allelopathic studies of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. Kew, v. 41, p. 119-125, 2012.

BARBOSA, R. M. **Padronização de Bioensaios Vegetais Para Estudo de Prospecção de Poluição Ambiental**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas (Licenciatura)) – Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2014.

BATISH, D. R. et al. *Eucalyptus* essential oil as natural pesticide. **Forest Ecology and Management**. Eveleigh, v. 256, n. 12, p. 2166-2174, 2008.

BEHBOODI, B. SH.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**. Clare, v. 167, n.3, p. 411–416, 2004.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollution**. Amsterdam, v. 226, n.207, p. 1-11, 2015.

BERTANZA, G. et al. EDCs, estrogenicity and genotoxicity reduction in a mixed (domestic + textile) secondary effluent by means of ozonation: A full-scale experience. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 458, p. 160–168, 2013.

BESPLUG, J. et al. Atrazina Induces Homologous Recombination But Not Point Mutation in the Transgenic Plant-Based Biomonitoring Assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 46, n. 3, p. 296-300, 2004.

BIANCHI, J.; CASIMIRO-FERNANDES, T. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**. Oxford, v. 144, p. 475-483, 2016.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 74, n. 4, p. 826–833, 2011.

BOLOGNESI, C.; MORASSO, G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers. **Trends in Food Science and Technology**, Amsterdam v. 11, n. 4, p. 182-187, 2000.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 22, n.1, p. 143-152, 2008a.

CAMPOS, J. M. S. et al. Chapter 5: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. In: NARWAL et al. (Org.). **Plant Bioassays**. Texas: Studium Press Houston, p. 81-96, 2008b.

CAMPOS, J. M. S., VICCINI, L. F. Cytotoxicity of aluminum on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. **Caryologia**. Florence, v. 56, n. 1, p. 65-73, 2003.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**. Oxford, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CARSON, R. **Primavera silenciosa** (Traduzido por Cláudia Sant'Anna Martins), São Paulo: Gaia, 2010.

CARVALHO, I. M. C. M. et al. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**. Oxford, v. 82, n. 7, p. 1056-1061, 2011.

CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 46-52, 2005.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, and Soil Pollution**. Amsterdam, v. 224, n. 4, p. 1-14, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid Soil Application: Toxicity Tests under Laboratory Conditions. **Applied and Environmental Soil Science**. Nasr City, v. 2012, p. 1-9, 2012.

CIĞERCI, I. H. et al. Genotoxicity of indium tin oxide by *Allium* and Comet tests. **Cytotechnology**. Berlin, v. 67, n. 1, p. 157–163, 2015.

COSTA, T. C. et al. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 75, p. 63–72, 2012.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**. Florianópolis: UFSC, v. 25, n. 3, p. 19-27, 2012.

ÇAVUŞOĞLU, K. et al. Physiological, Anatomical, Biochemical, and Cytogenetic Effects of Thiamethoxam Treatment on *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L. **Environmental Toxicology**. New York, v. 27, n. 11, p. 635-643, 2012.

ÇAVUŞOĞLU, K. et al. Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. **Journal of Agricultural Sciences – Tarım Bilimleri Dergisi**. Diskapi-Ankara, v. 17, p. 131-142. 2011.

ÇELİK, T.A., ÄSLANTURK, Ö.S. Cytotoxic 323 and genotoxic effects of *Lavandula stoechas* aqueous extracts. **Biologia**. Berlin, v. 62, n. 3, p. 292-296, 2007.

DANON, A. et al. Review plant programmed cell death: a common way to die. **Nature**, New York, v. 38, p. 647-655, 2000.

DA ROSA, M. et al. Potencial citogenotóxico de efluente de indústria de bebidas não alcoólicas em cebola. **Disciplinarum Scientia – Naturais e Tecnológicas**. Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 459-466, 2015.

DITIKA, K.; ANILA, M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potency of cr(vi)-doped river water of nen-shkodra lowland, Albania, on *Allium cepa* L. **Journal of Environmental Research And Development**. Bhopal, v. 7, n. 4, p. 1322–1332, 2013.

DIZDARI, A. M.; KOPLIKU, D. Cytotoxic and Genotoxic Potency Screening of Two Pesticides on *Allium cepa* L. **Procedia Technology**. Amsterdam, v. 8, p. 19–26, 2013.

DÜSMAN, E. et al. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná,

Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**. Bangor, v. 186, n. 3, p. 1793–1800, 2014.

ELEFThERIOU, E. P.; ADAMAKIS, I. D. S.; MELISSA, P. Effects of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. **Protoplasma**. Vienna, v. 249, n. 2, p. 401–416, 2012.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

FENECH, M., The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FERETTI, D. et al. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity using plant tests. **Journal of Public Health Research**. Pavia, v. 1, n. 1, p. 31-37, 2012.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 72, n. 6, p. 1680–1686, 2009.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FERREIRA, C. F. et al. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**. Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 46-54, 2012.

FIRBAS, P.; AMON, T. *Allium* Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**. Westlake, v. 4, n. 4, p. 189-193, 2013.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FJÄLLBORG, B; GUSTAFSSON, N. Short-Term Bioassay Responses to Sludge Products and Leachate. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 51, n. 3, p. 367–376, 2006.

FREIRE, P. F. et al. Toxicological assessment of third generation (G3) poly (amidoamine) dendrimers using the *Allium cepa* test. **Science of The Total Environment**. Amsterdam, v. 563, p. 899-903, 2016.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 124, p. 426-434, 2016.

GARAJ-VRHOVAC, V. et al. Toxicological characterization of the landfill leachate prior/after chemical and electrochemical treatment: A study on human and plant cells. **Chemosphere**. Oxford, v. 93, n. 6, p. 939-945, 2013.

GAVERIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S. A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, **The Journal of Cell Biology**. New York, v. 119, n. 3, p. 493-501, 1992.

GERAS’KIN, S. et al. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia postmining areas, Poland by means of *Allium*-test. **Chemosphere**. Oxford, v. 83, n. 8, p. 1133-1146, 2011.

GEREMIAS, R. et al. Efficacy assessment of acid mine drainage treatment with coal mining waste using *Allium cepa* L. as a bioindicator. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 79, p. 116–121, 2012.

GHODAKE, G.; SEO, Y.D.; LEE, D.S. Hazardous phytotoxic nature of cobalt and zinc oxide nanoparticles assessed using *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v.186, n. 1, p. 952–955, 2011.

GHOSH, M. et al. Use of the grass, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash for detoxification and phytoremediation of soils contaminated with fly ash from thermal power plants. **Ecological Engineering**. Amsterdam, v. 74, p. 258–265, 2015.

GHOSH, M. et al. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 749, n. 1, p. 60–69, 2012.

GOLDONI, A. et al. Cytotoxic and genotoxic evaluation and chemical characterization of sewage treated using activated sludge and a floating emergent macrophyte filter in a municipal wastewater treatment plant: a case study in Southern Brazil. **Environmental Earth Sciences**. Berlin, v. 72, n. 5, p. 1503–1509, 2014.

GOMES, K. M. S. et al. Citotoxicity of food dyes Sunset Yellow (E-110), Bordeaux Red (E-123), and Tartrazine Yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 33, n. 1, p. 218-223, 2013.

GOUJON, E. et al. Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotriene photoproducts, xanthene-1, 9-dione-3, 4-dihydro-6-methylsulphonyl and 2-chloro-4-methylbenzoic acid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 124, p. 37-42, 2015.

GOUJON, E. et al. Genotoxicity of sulcotriene pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 113, p. 47–54, 2014.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*, A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 99, n. 3, 273-291, 1982.

- GRILLO, R. et al. Poly(-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 231, p. 1– 9, 2012.
- GUERRA, M. S. Os Cromossomos Metafásicos e o Ciclo Celular. In: GUERRA, M. dos S. (Ed.) **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 8-12, 1988.
- GUPTA, A. K.; AHMAD, M. Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 201, p. 92–99, 2012.
- GUSTAVINO, B. et al. Influence of Temperature on Mutagenicity in Plants Exposed to Surface Disinfected Drinking Water. **Journal of Water Resource and Protection**. New York, v. 4, n. 8, p. 638–647, 2012.
- HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 131, p. 54-64, 2016.
- HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Assessing Toxicity of Copper, Cadmium and Chromium Levels Relevant to Discharge Limits of Industrial Effluents into Inland Surface Waters Using Common Onion, *Allium cepa* Bioassay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 94, n. 2, p. 199–203, 2015.
- HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 743, n. 1, p. 20–24, 2012.
- HOU, J. et al. Seed germination, root elongation, root-tip mitosis, and micronucleus induction of five crop plants exposed to chromium in fluvo-aquic soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Malden, v. 33, n. 3, p. 671–676, 2014a.
- HOU, J. et al. Sensitive crop species and appropriate bioassays for potential use in phytotoxicity assessment of Pb-contaminated soils. **Chemistry and Ecology**. Ancona, v. 30, n. 5, p. 463-472, 2014b.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents - a review. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

IVANOVA, L.; UHLIG, S. A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. **Analytical Biochemistry**. Bethesda, v. 379, n. 1, p. 16–19, 2008.

JADHAV, S. B. et al. Biochemical degradation pathway of textile dye Remazol red and subsequent toxicological evaluation by cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Suitland, v. 65, n. 6, p. 733-743, 2011.

JIANG, Z. et al. Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescent probe, microtubular immunofluorescence and comet assay. **Plant Soil**. Dordrecht, v. 383, n. 1-2, p. 357–372, 2014.

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

KAMMANN, U. et al. Bioassay-directed Fractionation of Organic Extracts of Marine Surface Sediments from the North and Baltic Sea-Part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index. **Journal of Soils and Sediments**. Berlin, v. 5, n. 4, p. 225–232, 2005.

KATAEVA, M. et al. *Allium* Root-Micronucleus (*Allium*-MCN) Test on the Genotoxicity of Soil Samples Contaminated with Heavy Metals. **World Applied Sciences Journal**. Dubai, v. 17, n. 8, p. 992-1000, 2012.

KAUR, G. et al. Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. **Ecotoxicology**. Berlin, v. 23, n. 7, p. 1292-1304, 2014.

KERN, D. I. et al. Ecotoxicological and Genotoxic Assessment of Hospital Laundry Wastewaters. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 68, n. 1, p. 64–73, 2015.

KERN, D. I. et al. Toxicity and genotoxicity of hospital laundry wastewaters treated with photocatalytic ozonation. **Science of the Total Environment**. Amsterdam v. 443, p. 566–572, 2013.

KLANČNIK, K.; DROBNE, D.; VALANT, J.; KOCE, J. D. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 74, p. 85–92, 2011.

KOPLIKU, K.; MESI (DIZDARI), A. Toxicity Screening of Water Sources in Flooded Agricultural Areas of Nën-Shkodra Lowland Using *Allium cepa* L. Assay. **Journal of Environmental Science and Engineering**. El Monte, A v. 1, n. 10A, p. 1197-1202, 2012.

KUCHY, A. H.; WANI, A. A.; KAMILI, A. N. Cytogenetic effects of three commercially formulated pesticides on somatic and germ cells of *Allium cepa*. **Environmental Science and Pollution Research**. Landsberg, v. 23, n. 7, p. 6895-6906, 2016.

KUMAR, D. et al. Cytogenetic studies of chromium (III) oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip cells. **Journal of Environmental Sciences**. Beijing, v. 38, p. 150-157, 2015.

KUMAR, D. S. et al. Gamma ray induced chromosomal aberrations and enzyme related defense mechanism in *Allium cepa* L. **Caryologia**. Florence, v. 64, n. 4, p. 388-397, 2011.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 190, n. 1, p. 613–621, 2011.

KWASNIEWSKA, J. et al. An assessment of the genotoxic effects of landfill leachates using bacterial and plant tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 75, p. 55–62, 2012.

LEME, D. M. et al. An overview of biodiesel soil pollution: Data based on cytotoxicity and genotoxicity assessments. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 199, p. 343–349, 2012.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**. Turku, v. 88, n. 4, p. 214–219, 2008.

LIMA, R. et al. Evaluation of the genotoxicity of cellulose nanofibers. **International Journal of Nanomedicine**. Boston, v. 7, p. 3555–3565, 2012.

LIMAN, R.; CIĞERCI, Í. H.; ÖZTÜRK, N. S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 118, p. 38-42, 2015.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. **Chemosphere**. Oxford, v. 93, n. 2, p. 269-273, 2013.

LIMAN, R. et al. Determination of genotoxicity of Fenaminosulf by *Allium* and Comet tests. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 99, n. 1, p. 61–64, 2011.

MACEDA, E. B. et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente e Água**. Taubaté, v. 10, n. 1, p. 117-129, 2015.

MACHADO, Ê. L. et al. Use of Ozonization for the Treatment of Dye Wastewaters Containing Rhodamine B in the Agate Industry. **Water, Air, Soil Pollution**. Amsterdam, v. 223, n. 4, p. 1753–1764, 2012.

MAGDALENO, A. et al. Ecotoxicological and Genotoxic Evaluation of Buenos Aires City (Argentina) Hospital Wastewater. **Journal of Toxicology**. Nasr City, v. 2014, p. 1–10, 2014.

MAITI, S. et al. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity on *E. coli*, human blood cells and *Allium cepa* suggests a greater toxic potential of hair dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 124, p. 248-254, 2016.

MALUSZYNSKA, J., JUCHIMIUK, J. Plant Genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Plant Genotoxicity**. Katowice, v. 56, p. 177-184, 2005.

MARTINS, M. N. C.; DE SOUZA, V. V.; DA SILVA SOUZA, T. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**. Oxford, v. 148, p. 481-486, 2016.

MARTINS, C. F. et al. **Método de TUNEL: uma ferramenta alternativa para avaliar a integridade do DNA de espermatozoides bovinos**. Documentos 192. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007.

MASOOD, F.; MALIK, A. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 444, p. 153–160, 2013.

MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, p. 4808-4819, 2014.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES; M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**. Landsberg, v. 22, n. 13, p. 9796-9806, 2015.

MAZZEO, D. E. C. et al. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**. Coimbra, v. 56, p. 60–69, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M.A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**. Oxford, v. 85, p. 13-18, 2011.

MAZZEO, D. E. C. et al. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 408, n. 20, p. 4334-4340, 2010.

MEENA, D.; SINGH, S. K.; CHAUDARI, S. K. Effect of Sr²⁺ on Mitotic Activity and Chromosomal Behavior in Root Meristem of *Allium cepa* L. **International Journal of Agriculture, Environment & Biotechnology**. Daryaganj, v. 6, n. 2, p. 197-201, 2013.

MENEGUETTI, D. U. O. et al. Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**. Harbin, v. 2, n. 2, 2012.

MICHALSKA-KACYMIROW, M. et al. Biological and chemical investigation of *Allium cepa* L. response to selenium inorganic compounds. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, v. 406, n. 15, p. 3717-3722, 2014.

MIGID, H. M. A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 66, p. 57-64, 2007.

MIŠÍK, M. et al. Impact of ozonation on the genotoxic activity of tertiary treated municipal wastewater. **Water Research**. Delft, v. 45, n. 12, p. 3681-3691, 2011.

MOHAMMED, K. P. et al. Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 777, p. 29-32, 2015.

MONTEIRO, C. et al. Cadmium-induced cyto-and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. **Chemical Research in Toxicology**. Washington, v. 25, n. 7, p. 1423-1434, 2012.

MONTEIRO, M. et al. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**. Oxford, v. 60, p. 421-427, 2007.

MUSANOVIC, J. et al. Chromosome aberration and irregular cell cycle in *Allium cepa* root cells caused by different concentrations of Alprazolam. **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine & Public Health**. Pittsburgh, v. 5, n. 6, p. 407-418, 2013.

NAG, S.; DUTTA, R.; PAL, K. K. Chromosomal aberrations induced by acetamiprid in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**. Jaipur, v. 3, n. 2, p. 1-5, 2013.

NASCIMENTO, C. W. A. et al. Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 28, n. 2, p. 385-392, 2004.

NETTO, E. et al. Evaluation of the toxic and genotoxic potential of acid mine drainage using physicochemical parameters and bioassays. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 511–516, 2013.

NUNES, E. A. et al. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**. Oxford, v. 84, p. 47–53, 2011.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambiente & Água**. Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011.

OLORUNFEMI, D. I.; OMO-ATAGA, S. O.; OFOMATA, R. C. Studies on the physicochemical properties and genotoxicity of effluents from a dairy industry. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**. Kano v. 5, n. 2, p. 11-18, 2012.

OLORUNFEMI, D. I.; OGIESERI, U. M.; AKINBORO, A. Genotoxicity screening of industrial effluents using onion bulbs (*Allium cepa* L.). **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**. Port Harcourt, v. 15, n. 1, p. 211-216, 2011.

OLORUNFEMI, D. I.; OGUNSANWO, M. W. Evaluation of the differential growth conditions, heavy metal composition and cytogenetics of *Allium cepa* by the use of chromosome aberration bioassay. **Science World Journal**. Kaduna, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

ONYEMAABI, O. I.; WILLIAMS, G. O.; ADEKOYA, K. O. Cytogenetic effects of two food preservatives, sodium metabisulphite and sodium benzoate on the root tips of *Allium cepa* Linn. **Ife Journal of Science**. Ifé, v. 14, n. 1, p. 155-165, 2012.

OZAKCA, D. U.; SILAH, H. Genotoxicity effects of Flusilazole on the somatic cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 107, p. 38–43, 2013.

ÖZKARA, A. et al. Potential cytotoxic effect of Anilofos by using *Allium cepa* assay. **Cytotechnology**. Berlin, v. 67, n. 5, p. 783-791, 2015.

ÖZKUL, M. et al. Does 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) induce genotoxic effects in tissue cultured *Allium* roots? **Cytotechnology**. Berlin, p. 1-11, 2016.

PAKRASHI, S. et al. In vivo genotoxicity assessment of titanium dioxide nanoparticles by *Allium cepa* root tip assay at high exposure concentrations. **PLoS One**. San Francisco, v. 9, n. 2, p. e87789, 2014.

PALANIKUMAR, L.; RAGUNATHAN, I.; PANNEERSELVAM, N. Chromosome aberrations induced by curcumin and aloin in *Allium cepa* L. root meristem cells. **Turkish Journal of Biology**, Ankara, v. 35, n. 2, p. 145-152, 2011.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut**. Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30–35, 2014.

PALMIERI, M. J. **Análise comparativa do efeito citotóxico do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes fracionais em células vegetais e humanas**. 2012. 119 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

PANDA, K. K. et al. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. **Toxicology in Vitro**. Oxford, v. 25, p. 1097–1105, 2011.

PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 363, p. 114–125, 2006.

PANNEERSELVAM, N.; PALANIKUMAR, L.; GOPINATHAN, S. Chromosomal aberrations induced by Glycidol in *Allium cepa* L root meristem cells. **International Journal of Pharma Sciences and Research**. Singapore, v. 3, n. 2, p. 300–304, 2012.

PATNAIK, A. R.; ACHARY, V. M. M.; PANDA, B. B. Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. **Plant Growth Regulation**. Dordrecht, v. 71, n. 2, p. 157-170, 2013.

PATUSSI, C; BÜNDCHEN, M. Avaliação *in situ* da genotoxicidade de triazinas utilizando o biensaio Trad-SHM de *Tradescantia* clone 4430. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v. 18, n. 4, 2013.

PAUL, A.; NAG, S.; SINHA, K. Cytological Effects of Blitox on Root Mitosis of *Allium cepa* L. **International Journal of Scientific and Research Publications**. Gurgaon, v. 3, n. 5, p. 1-7, 2013.

PAVÃO, P. R. G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteroides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.** São Paulo, v. 21, n. 1, p. 5-10, 2007.

PEDRAZZANI, R. et al. Biodegradability, toxicity and mutagenicity of detergents: Integrated experimental evaluations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 84, p. 274–281, 2012.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente On-line**. Boa Vista, v. 7, n. 1, p.36-43, 2013.

PESNYA, D. S.; ROMANOVSKY, A. V. Comparison of cytotoxic and genotoxic effects of plutonium-239 alpha particles and mobile phone GSM 900 radiation in the *Allium cepa* test. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 750, p. 27– 33, 2013.

PHUGARE, S. S. et al. Ecofriendly degradation, decolorization and detoxification of textile effluent by a developed bacterial consortium. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 74, n. 5, p. 1288-1296, 2011.

PIERANTOZZI, P. et al. Physico-chemical and toxicological assessment of liquid wastes from olive processing-related industries. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Malden, v. 92, p. 216–223, 2011.

PLAZA, G. et al. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 62, p. 415-420, 2005.

PULATE, P. V.; GHURDE, M. U.; DESHMUKH, V. R. Cytological effect of the biological and chemical silver-nano particle in *Allium cepa* (L). **International Journal of Innovations in Bio-Sciences**. Washim, v. 1, p. 32-35, 2011.

QIN, R. et al. Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. involves disturbances in cell division and DNA damage. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Malden, v. 34, n. 5, p. 1045–1055, 2015.

RADIĆ, S. et al. The efficiency of combined CaO/electrochemical treatment in removal of acid mine drainage induced toxicity and genotoxicity. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 466, p. 84–89, 2014.

RAINHO, C. R. et al. Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Nitro-Derived in Respirable Airborne Particulate Matter Collected from Urban Areas of Rio de Janeiro (Brazil). **BioMed Research International**. Nasr City, v. 2013, p. 1-9, 2013.

RAJESHWARI, A. et al. Toxicity evaluation of gold nanoparticles using an *Allium cepa* bioassay. **RSC Advances**. Cambridge, v. 6, n. 29, p. 24000-24009, 2016.

RAJESHWARI, A. et al. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip—effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and Pollution Research**. Landsberg, v. 22, n. 14, p. 11057-11066, 2015.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, 1997.

RENJANA, P. K.; ANJANA, S.; THOPPIL, J. E. Evaluation of genotoxic effects of baking powder and monosodium glutamate using *Allium cepa* assay. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. Sagar, v. 5, n. 2, p. 311-316, 2013.

ROA, O.; YEBER, M. C.; VENEGAS, W. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. Test. **Brazilian Journal of Biology**. São Carlos, v. 72, n. 3, p. 471–477, 2012.

RODRIGUES, L. C. A. et al. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**. Campina Grande, v.17, n.10, p.1099–1108, 2013.

- ROMANO, E. et al. Phytotoxic activities of (2R)-6-hydroxytremetone. **Plant Physiology and Biochemistry**. Bari, v. 49, p. 671-675, 2011.
- SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.
- SANDERMANN, H. J. R. Higher plant metabolism of xenobiotics: the 'green liver' concept. **Pharmacogenetics and Genomics**. Philadelphia, v. 4, n. 5, p. 225-241, 1994.
- SANDHU, S. S. et al. Results and recommendations, **Mutation Research**. Amsterdam, v. 310, p. 257–263, 1994.
- SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**. London, v. 407, n. 6805, p. 784-788, 2000.
- SHAIKH, S. et al. Dichlorophen and Dichlorovos mediated genotoxic and cytotoxic assessment on root meristem cells of *Allium cepa*. **Science Diliman**. Quezon City, v. 24, n. 1, p. 13-22, 2012.
- SIDDIQUI, A. H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. **Environmental Monitoring and Assessment**. Bangor, v. 179, p. 241–253, 2011.
- SILVEIRA, B. I. et al. Characterization of inorganic fraction of spent potliners: evaluation of the cyanides and fluorides content. **Journal of hazardous materials**. Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 177-183, 2002.
- SINGH, M. et al. High genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**. Dordrecht, v. 12, np. 321–327, 2014.
- SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. Florence, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.
- SOUZA, T. S. et al. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**. Bangor, v. 185, p. 1627–1636, 2013.

TABET, M. et al. A. Mutagenic and genotoxic effects of Guelma's urban wastewater, Algeria. **Environmental Monitoring and Assessment**. Bangor, v. 187, n. 2, p. 1-13, 2015.

TABREZ, S.; AHMAD, M. Genotoxicity of trichloroethylene in the natural milieu. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. Bochum, v. 215, p. 333–338, 2012.

TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 726, p. 15–20, 2011.

TAN, D. et al. Rhodamine B induces long nucleoplasmic bridges and other nuclear anomalies in *Allium cepa* root tip cells. **Environ Sci Pollut Res** 21: 3363–3370, 2014.

TARANATH, T. C. et al. Cytotoxicity of zinc nanoparticles fabricated by *Justicia adhatoda* L. on root tips of *Allium cepa* L. — a model approach. **Environmental Science and Pollution Research**. Landsberg, v. 22, p. 8611–8617, 2015.

TEENA, M. T.; SOUMYA, K. R.; SUDHA, K. S. Cytotoxic effect of sewage effluent on root tip cells of *Allium cepa* L. **South Indian J. Biol. Sci.** Kanyakumari, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2016.

TRUSHIN, M. V. et al. Genetic Alterations Revealed in *Allium cepa*-Test System under the Action of Some Xenobiotics. **World Applied Sciences Journal**. Dubai, v. 22, n. 3, p. 342-344, 2013.

TÜRKOĞLU, S. Evaluation of genotoxic effects of five flavour enhancers (glutamates) on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Toxicology and Industrial Health**. Little Rock, v. 31, n. 9, p. 792-801, 2015.

TÜRKOĞLU, S. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 103, p. 224–230, 2012.

UEDA, N.; SHAH, S. V. Tubular cell damage in acute renal failure—apoptosis, necrosis, or both. **Nephrology Dialysis Transplantation**. Oxford, v. 15, n. 3, p. 318-323, 2000.

- VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 378, p. 63–66, 2007.
- VELLUTI, F. et al. Synthesis, characterization, microbiological evaluation, genotoxicity and synergism tests of new nano silver complexes with sulfamoxole X-ray diffraction of $[Ag_2(SMX)_2] \cdot DMSO$. **Journal of Inorganic Biochemistry**. Columbia, v. 141, p. 58–69, 2014.
- VENCESLAU, A. de F. A. **Formação e caracterização de complexos de inclusão entre atrazina e ciclodextrinas suportadas em sílica**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**. Oxford, v. 161, p. 325-332, 2016.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; MALTEMPI, P. P. P; MARIN-MORALES, M. A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**. Harbin, v. 1, n. 3, p. 1–12, 2011.
- VIANA, L. Á.; DÜSMAN, E.; VICENTINI, V. E. P. Mutagenicity and cytotoxicity of liquid waste, press water and pond water, produced in the cassava flour industry, and of antitoxic sodium thiosulfate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Malden, v. 94, p. 453–458, 2013.
- WATHARKAR, A. D.; JADHAV, J. P. Detoxification and decolorization of a simulated textile dye mixture by phytoremediation using *Petunia grandiflora* and *Gailardia grandiflora*: a plant–plant consortial strategy. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 103, p. 1-8, 2014.
- YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**. Oxford, v. 75, p. 934–938, 2009.
- ŽABKA, A.; TRZASKOMA, P.; MASZEWSKI, J. Dissimilar effects of β -lapachone- and hydroxyurea-induced DNA replication stress in root meristem

cells of *Allium cepa*. **Plant Physiology and Biochemistry**. Bari, v. 73, p. 282-293, 2013.

ZOU, J. et al. Effects of Cadmium Stress on Root Tip Cells and Some Physiological Indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**. Cracovia, v. 54, n. 1, p. 129–141, 2012.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

**DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS E ATIVIDADE MITÓTICA DE
Lactuca sativa L. E *Allium cepa* L.: UMA ABORDAGEM COMPARATIVA
DE DUAS ESPÉCIES MODELO PARA ESTUDOS DE TOXICOLOGIA
AMBIENTAL**

**SEEDLING DEVELOPMENT AND MITOTIC ACTIVITY OF *Lactuca
sativa* L. AND *Allium cepa* L.: A COMPARATIVE APPROACH FROM
TWO MODEL SPECIES FOR ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY
RESEARCHES**

RESUMO

Devido ao potencial tóxico apresentado pelos resíduos industriais, domésticos e agrícolas, estudos que objetivam prospectar o efeito destes poluentes ambientais nos seres vivos, são de extrema importância. Dentre os testes disponíveis para este fim, aqueles que utilizam vegetais como organismo modelo se destacam: são rápidos, confiáveis e de baixo custo. *Allium cepa* L. é um vegetal modelo utilizado mundialmente em análises microscópicas, enquanto que *Lactuca sativa* L. é amplamente empregada em análises macroscópicas, em especial nos estudos de alelopatia. O objetivo do presente estudo foi comparar a germinação e o desenvolvimento inicial de *A. cepa* e *L. sativa* e determinar o melhor horário de coleta das raízes para análises microscópicas, importante para obtenção de células com intensa divisão, permitindo uma adequada avaliação do ciclo celular. Para isso, sementes das duas espécies foram dispostas em placas de Petri e levadas a BOD. Durante 120h foi acompanhada a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas. Também foram coletadas raízes em cinco diferentes horários do dia (10h às 14h) para se determinar o melhor horário para coleta em relação ao índice mitótico (IM). *L. sativa* apresentou uma rápida e padronizada germinação, um rápido desenvolvimento inicial da plântula e IM superior quando comparado a *A. cepa*. Esses resultados demonstram que *L. sativa* é um modelo mais eficiente para fins de ensaios macroscópicos e microscópicos, pois permite a análise destes parâmetros em conjunto, com rapidez, simplicidade e eficiência.

Palavras Chave: Análise macroscópica. Índice Mitótico. Bioensaios vegetais

ABSTRACT

Due the toxic potential presented by industrial, household and agricultural waste, studies that aimed exploring the effect of these environmental pollutants in living organisms are extremely important. Among the available tests, those that have used plant as a model organism stand out once they are fast, reliable and low cost. *Allium cepa* L. is a worldwide plant model used in microscopic analysis, while *Lactuca sativa* L. stands out in macroscopic analysis, especially in studies of allelopathy. The aim of this study was to compare the germination and early development of *A. cepa* and *L. sativa* and to determine the best time to collect the roots for microscopic analysis, which is important to obtain cells with intense division, allowing a quick and proper assessment of the cell cycle. For this, seeds of both species were placed in Petri dishes and carried to the BOD, in order to monitor the germination and early seedling development. Roots were also collected at five different times to determine the best time for collecting. *L. sativa* showed a rapid and standard germination, early seedling development and a high MI, when compared to *A. cepa*. These results demonstrate that *L. sativa* is a more efficient model for the purpose of macroscopic and microscopic tests, because it allows the analysis of these parameters together with speed, simplicity and efficiency.

Keywords: Macroscopic analysis. Mitotic Index. Plant bioassays.

1 INTRODUÇÃO

Devido ao potencial tóxico apresentado pelos resíduos industriais, domésticos e agrícolas, nos últimos 20 anos tem se desenvolvido e se tornado cada vez mais importantes técnicas para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e toxicológicos dos mesmos (BADERNA et al., 2011), envolvendo testes tanto biológicos, quanto de determinação da composição química destes resíduos (ANDRADE-VIEIRA, 2012; PALMIERI et al., 2014).

Os bioensaios utilizados para avaliar os efeitos tóxicos e genotóxicos de diferentes compostos químicos podem ser realizados em diferentes organismos: desde de procariontes (como bactérias) a eucariontes (como leveduras, linhagens celulares, células e tecidos de animais e vegetais) (ANDRADE-VIERA et al., 2012). Dentre os organismos apresentados, as plantas se destacam como modelos em bioensaios para prospecção de toxicidade por serem sensíveis, de fácil acesso e os bioensaios serem simples e de baixo custo (FISKESJÖ, 1985). Rank e Nielsen (1997) também afirmam que se uma substância química que é capaz de provocar danos ao DNA de uma planta, também apresenta potencial de danificar o DNA de outros organismos. Neste sentido, tem sido demonstrado que os ensaios com vegetais são tão eficientes quanto os ensaios realizados em modelos animais, corroborando ainda com os resultados encontrados para células humanas (MAURO et al., 2014; PALMIERI et al., 2016).

Adicionalmente, os testes realizados em laboratório com vegetais são excelentes ferramentas para complementar a análise físico-química dos compostos ou misturas em estudo. Eles permitem uma confirmação prática da teoria desenvolvida em estudos sobre as propriedades físico-químicas dos materiais potencialmente perigosos (BADERNA et al., 2011; PALMIERI et al., 2014), e são validados como eficientes na identificação de poluentes ambientais

por agências como a US EPA (United State Environmental Protection Agency) (GRANT, 1999).

Comumente os bioensaios com vegetais compreendem testes macroscópicos, que envolvem avaliações de germinação e desenvolvimento inicial da plântula (crescimento radicular e da parte aérea) e avaliações microscópicas, que envolvem a observação do ciclo celular (BERNARDES et al., 2015).

Ademais, a raiz é o órgão vegetal comumente utilizado para os testes toxicológicos, pois é a primeira parte da planta a ser exposta a poluentes ambientais tanto na água como no solo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Logo, a observação do seu crescimento é um método rápido e sensível para o monitoramento ambiental (FISKEJÖ, 1988). Além disso as células meristemáticas, as quais apresentam intensa divisão mitótica, são utilizadas para avaliação do ciclo celular.

Dentre os vegetais modelos utilizados em bioensaios de prospecção de efeitos biológicos de poluentes ambientais a hortaliça *Allium cepa* L. (cebola) se destaca por apresentar um pequeno número cromossômico ($2n=16$) e por estes serem grandes, além de exibir alta sensibilidade nos testes, facilitando as análises do ciclo celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Recentemente, outra hortaliça, *Lactuca sativa* L. (alface) tem se destacado como modelo para bioensaios de prospecção de efeitos de poluentes ambientais (PALMIERI et al., 2014). Historicamente, a espécie é utilizada como modelo em ensaios que avaliam a germinação e o desenvolvimento inicial da plântula (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; VALERIO; GARCIA; PEINADO, 2007), particularmente sob efeitos de compostos de origem vegetal ou fúngica, determinando a fitotoxicidade de compostos naturais (ARAGÃO et al., 2015), caracterizando a alelopatia. *L. sativa* também tem sido utilizada, como modelo por alguns grupos de pesquisa que prospectam atividade alelopática através de

testes microscópicos (CAMPOS et al., 2008; SOUSA et al., 2009) uma vez que, assim como a cebola, apresenta um pequeno número cromossômico ($2n=18$), cujo tamanho varia de 2,8 a 5,5 μm (MATOBA et al. 2007) sendo considerados de tamanho adequado para observação das alterações decorrentes de agentes tóxicos.

Não há relatos de trabalhos que comparem as características importantes destas duas hortaliças modelo (*A. cepa* e *L. sativa*), como facilidade de acesso à materiais de propágulos e prolificidade, as quais são premissas para escolha de um vegetal modelo para bioensaios de toxicidade, bem como de procedimentos protocolares (por exemplo, horário de coleta do material vegetal a ser analisado) que maximizem a eficiência dos bioensaios aplicados. Neste sentido, o presente estudo surgiu como uma proposta para comparar a germinação e o desenvolvimento inicial destas duas espécies modelos, e determinar o melhor horário de coleta de raízes para avaliações microscópicas das mesmas, a fim de auxiliar o pesquisador na escolha do material vegetal para uso nos bioensaios de prospecção de toxicidade de poluentes ambientais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

Sementes de *Allium cepa* L. var. *baia periforme* (cebola), da Isla® Sementes, e *Lactuca sativa* L. var. *verônica* (alface), foram usadas como material biológico.

As sementes foram dispostas em placas de Petri de polietileno de 9 cm de diâmetro contendo papel filtro embebido em 3 mL água destilada. As placas de Petri foram acondicionadas em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) à 24 °C, no escuro (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009), durante o período necessário para cada metodologia aplicada.

2.2 Testes Macroscópicos

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com cinco repetições. Para cada espécie os dados (germinação e desenvolvimento inicial) foram coletados a partir de 5 placas de Petri (repetição), cada placa contendo 30 sementes da espécie modelo. A germinação das sementes das duas espécies vegetais foi avaliada anotando o número de sementes germinadas (que tiveram a protrusão da raiz) a cada 8 h até completar um total de 96 h. Concomitantemente, a cada 24 h, até um total de 120 h o comprimento das raízes e da parte aérea emitidas foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital.

2.3 Teste Microscópico

Para determinação do melhor horário para coleta das raízes de cebola e alface, a fim de obter um índice mitótico (IM) ótimo para estudos de ciclo celular, as raízes de cada espécie foram coletadas após 48 h da protrusão da raiz, nos horários de 10 h, 11 h, 12 h, 13 h e 14 h. Após coleta, as raízes foram fixadas em solução de Álcool: Ácido Acético (3:1) e armazenadas a -4 °C, por pelo menos 24 h. Para cada horário de coleta de cada espécie foram preparadas e avaliadas 6 lâminas. As lâminas foram preparadas utilizando hidrólise com HCl 1N a 60 °C e a técnica de esmagamento (BELLING, 1921) com Orceína acética 2%. As análises foram realizadas em Microscópio de luz, na objetiva de 40X sendo que cerca de 1000 células por lâmina foram contabilizadas. Foi registrado o número de células em cada fase do ciclo celular (Intérfase, Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase), obtendo-se o IM (razão entre número total de células em divisão pelo número total de células observadas).

2.4 Análise Estatística

Os dados obtidos nas análises macroscópicas e microscópicas foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ou de *t*-Student ao nível de 5% de significância, seguindo o melhor teste para cada parâmetro. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

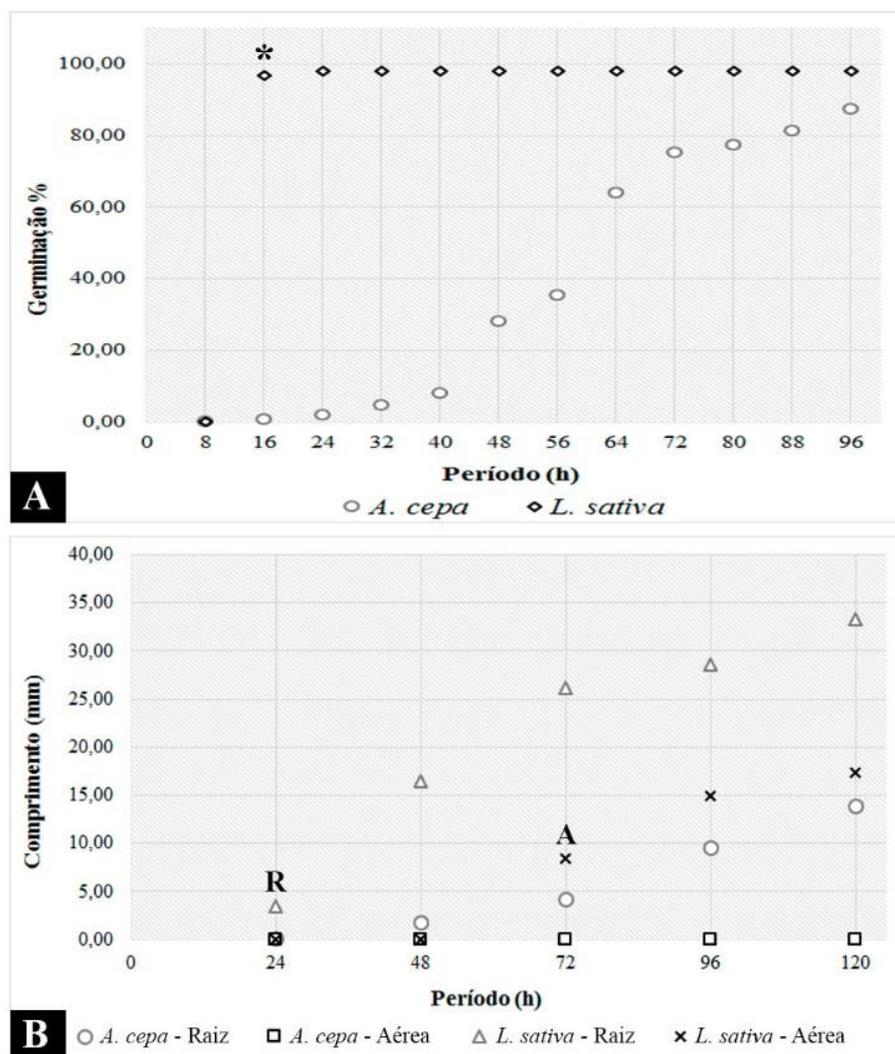
A temperatura de 24 °C foi escolhida para o acondicionamento das sementes durante o período do experimento com base em informações da literatura. Embora nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) a temperatura indicada como ótima para a germinação de sementes de cebola e alface seja de 20 °C, Narwal, Sampietro e Catalán (2009), descrevendo o teste de germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de alface, indicam a temperatura de 25 °C para o ensaio, enquanto que trabalhos de pesquisadores da EMBRAPA (NASCIMENTO e CANTLIFFE, 2002; PINHEIRO et al., 2014) mostram que temperaturas logo acima de 20 °C são as mais favoráveis para de ambas as espécies.

No presente estudo a cebola exibiu uma germinação lenta e gradual, alcançando 27,97% de germinação com 48 horas e 87,25% com 96 horas, enquanto que a alface apresentou uma germinação rápida e homogênea, tendo protrusão de raiz em 98% das sementes com apenas 24 horas após o início dos experimentos (Figura 1A). Tal homogeneidade para germinação das sementes de alface já é relatada na literatura. Tigre et al. (2012) afirmam que o modelo é amplamente utilizado em estudos de alelopatia por apresentar uma germinação rápida e uniforme.

Após 120 horas, plântulas de cebola apresentaram raízes com um comprimento médio de 13,93 mm e não exibiram desenvolvimento da parte aérea, enquanto que para alface foi observado raízes com um comprimento médio de 33,35 mm e parte aérea com 17,41 mm (Figura 1B). Estes dados demonstram que a alface apresenta um desenvolvimento inicial da plântula de 2,39 vezes mais rápido que a cebola. Na área de prospecção de toxicidade de poluentes ambientais, esta característica é considerada vantajosa, pois possibilita a determinação de compostos tóxicos, em curto espaço de tempo, não necessitando exceder 72h.

À semelhança do que é observado sobre a germinação, há relatos que para testes de fitotoxicidade, onde o desenvolvimento inicial da plântula é considerado, que o modelo alface é eficiente. Valério, Garcia e Peinado (2009), afirmam que a alface é sensível a contaminantes ambientais, principalmente os relacionados ao solo, e que o teste de fitotoxicidade tem vantagens por ser rápido uma vez que os resultados são obtidos nas primeiras 120 h de desenvolvimento da plântula.

Figura 1 – Germinação e desenvolvimento inicial das plântulas de *A. cepa* e *L. sativa*.



Legenda: A: Germinação das sementes de *A. cepa* e *L. sativa* monitoradas de 8 em 8 h, durante 96 h; B: desenvolvimento inicial das plântulas de cebola e alface mensuradas de 24 em 24 h, até 120 h. O asterisco (*) indica diferença estatística (T-Student, $p < 0,05$) na porcentagem de germinação das sementes de cebola e alface a partir de 16 h. As letras indicam diferença estatística (T-Student, $p < 0,05$) entre cebola e alface em relação ao desenvolvimento da raiz (R) após 24 h e da parte aérea (A) após 72 h. Fonte: Do autor (2016)

Neste sentido, observa-se, dentre trabalhos realizados com alface, que a porcentagem de germinação das sementes é superior a 90% após 24h de embebição em água (PEREIRA et al., 2013), e as plântulas tem um rápido crescimento, podendo atingir, após 72 h, 12 mm (PEREIRA et al., 2013), 25 mm, como observado no presente trabalho e até 30 mm (SOUSA e VICCINI, 2011), dados estes que dependem da cultivar utilizada. Outras características que podem influenciar neste parâmetro de velocidade de crescimento é o tempo de armazenamento das sementes. Recomenda-se utilizar lotes cuja data de análise apresentada pelo fabricante seja inferior a 6 meses da data de utilização das mesmas nos experimentos.

Ensaio de germinação e crescimento utilizando a cebola como modelo vegetal são pouco comuns. Geralmente o material de propágulo utilizado para os testes toxicológicos é o bulbo da cebola, impossibilitando a análise de germinação e dificultando as medições para fins de obtenção de taxas de crescimento das raízes. Alvim et al. (2011), utilizando sementes de cebola, demonstraram que após 5 dias, o crescimento médio das raízes quando expostas a água foi de 3 cm. Outro exemplo de estudo utilizando sementes de cebola é o de Da Rosa et al. (2015), que observaram uma germinação de 37% das sementes após 5 dias de exposição a água.

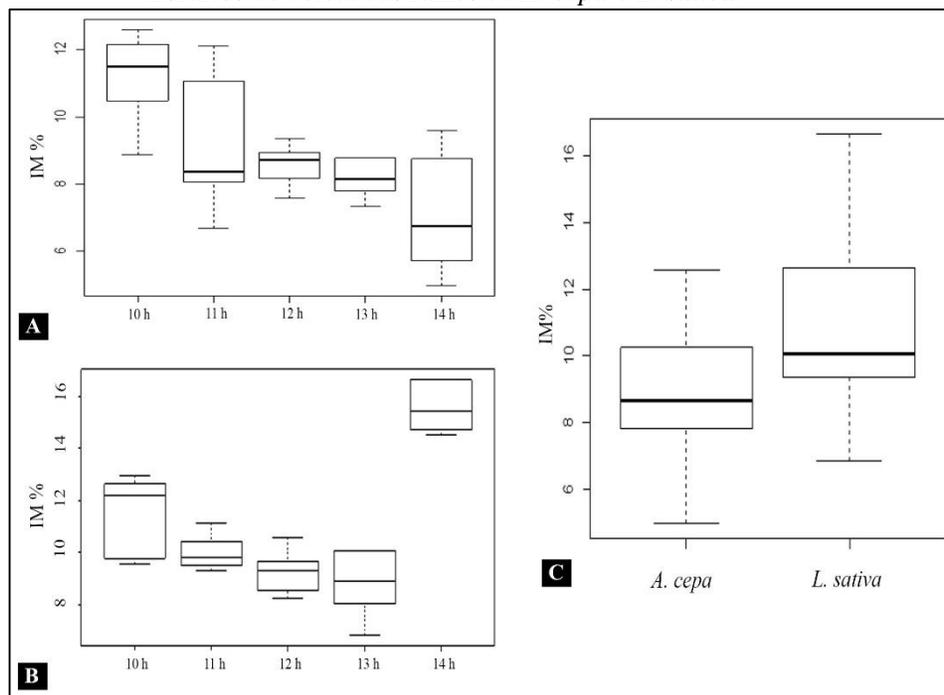
Diante do exposto, tanto os trabalhos da literatura quanto com os resultados apresentados no presente trabalho (Figura 1A e 1B) demonstram que a alface apresenta vantagens em relação à cebola quanto ao rápido desenvolvimento e taxa de germinação superior.

A avaliação microscópica foi realizada para determinar qual o melhor horário de coleta de raízes, visto que os testes para detecção de alterações cromossômicas, para determinação da cigenotoxicidade de determinado composto, requerem taxas de divisões celulares maiores possíveis. Em cebola, o horário de coleta é relatado em alguns trabalhos em torno de meio dia (MAURO

et al., 2014). Dentre os cinco tempos de coleta (10, 11, 12, 13 e 14 h) testados, foi demonstrado que a cebola possui maior índice mitótico às 10 horas, com média de 11,17% (Figura 2A), e a alface às 14 horas, com média de 15,55% (Figura 2B), sendo estes valores estatisticamente diferentes e maiores dos demais segundo teste de Duncan ($p < 0.05$).

Ao se comparar todas as médias do IM obtidas em todos os horários avaliados para as duas espécies, é possível observar que a alface apresenta um IM com média de 11,03%, sendo estatisticamente maior (teste de Duncan ($p < 0,05$)) que a média do IM da cebola, de 8,87% (Figura 2C).

Figura 2 – Gráficos do tipo *box plot* demonstrando o IM observado nos cinco horários de coleta das raízes de *A. cepa* e *L. sativa*.



Legenda: A: IM observado nos cinco horários de coleta das raízes de *A. cepa*; B: IM observado nos cinco horários de coleta das raízes de *L. sativa*; C: Média do IM observado para *A. cepa* e *L. sativa*. Fonte: Do autor (2016).

A maior sensibilidade do alface em relação à cebola quando considerados os parâmetros germinação, crescimento das raízes e o IM foi relatada por Cuchiara, Borges e Bobrowski (2012). Os autores compararam as respostas a tais parâmetros em sementes, raízes e células de cebola e de alface expostas a água destilada (controle negativo) e amostras de água do Arroio do Padre Doutor (Capão do Leão-RS), e observaram maior sensibilidade do alface em relação à cebola para os parâmetros analisados.

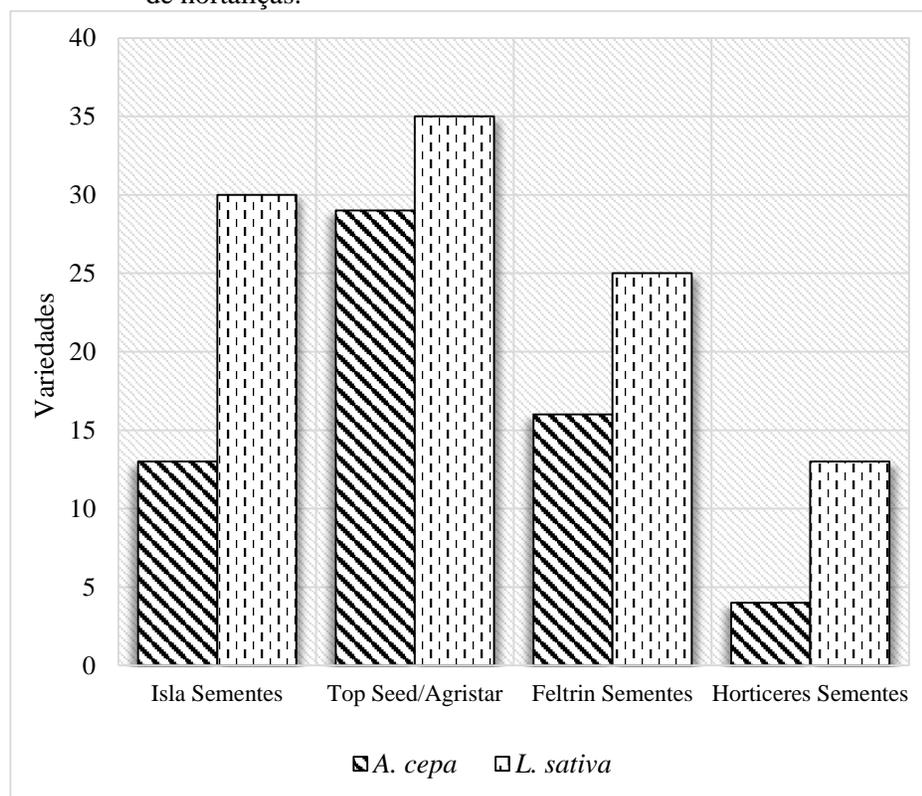
As avaliações macroscópicas e microscópicas são importantes no contexto das análises de toxicologia ambiental uma vez que o uso destas

avaliações, em conjunto, possibilita explicar melhor os mecanismos de ação da substância testado no vegetal modelo, pois os resultados de um teste complementam e justificam os resultados do outro (ARAGÃO et al., 2015). O IM que reflete a proliferação celular e é um parâmetro importante na determinação da taxa de crescimento da raiz (BARBÉRIO, VOLTOLINI E MELLO, 2011; LIU, JIANG E LI, 1992). Além disso, em plantas o aumento do número de células a cada ciclo mitótico é um dos fatores que contribui para o crescimento de um dado órgão (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Logo, esses dois parâmetros (crescimento e divisão celular) estão intimamente relacionados (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010).

Todo o conhecimento aqui apresentado sobre a germinação, o desenvolvimento inicial da plântula e o IM da espécie vegetal modelo que se pretende trabalhar em estudos de prospecção de toxicidade de poluentes ambientais é importante. Estes fatores podem influenciar no delineamento do experimento e na rapidez com que os resultados serão obtidos. Neste sentido faz-se recomendação de antes de iniciar os experimentos na área, realizar uma previa pesquisa das variedades do modelo a ser utilizado no mercado local, ou via internet. Dependendo da região, do clima e da época do ano, as sementes e número de variedades de algumas espécies se tornam difíceis de adquirir ou tem sua taxa de germinação mais baixa que a usual.

Dentro deste contexto, além dos testes aqui apresentados, foi realizada uma rápida pesquisa nos sites das quatro principais fornecedoras de sementes de hortaliças no Brasil (Isla® Sementes, Top Seed/Agristar®, Feltrin® Sementes e Hortices® Sementes), e foi observado um número maior de variedades de sementes de alface disponíveis para compra do que de cebola (Figura 3).

Figura 3 – Número de variedades de sementes de *A. cepa* e *L. sativa* disponíveis no mercado brasileiro, das quatro principais fornecedoras de sementes de hortaliças.



Legenda: Pesquisa realizada no site das empresas Isla® Sementes, Top Seed/Agristar®, Feltrin® Sementes e Hortiçeres® Sementes, em 10/08/2015. Fonte: Do autor (2016).

Sendo assim, nas condições experimentais descritas, é possível concluir que a alface é um vegetal modelo mais eficiente que a cebola para testes aplicados à toxicologia ambiental, pois além de ter um material de propágulo com um número maior de variedades disponível para aquisição no mercado, apresenta uma germinação rápida e de forma padronizada, com um rápido desenvolvimento inicial da plântula, e um IM alto, permitindo a análise destes parâmetros em conjunto com rapidez, simplicidade e eficiência.

4 CONCLUSÃO

De acordo com as condições adotadas no experimento, a alface apresenta uma germinação rápida e homogênea, bem como um crescimento rápido, demonstrando uma maior eficiência em relação a estes parâmetros do que a cebola.

Células de alface apresentaram um IM maior em relação às células de cebola. A avaliação do IM permitiu determinar o melhor horário para coleta das raízes de cebola (10 h) e de alface (14 h).

A alface é mais indicada em relação à cebola para testes aplicados a Toxicologia Ambiental, principalmente quando se considera o uso de compostos voláteis, pois este modelo permite o delineamento e a execução de experimentos em um menor período de tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de Iniciação Científica e Mestrado aos autores Maria Gabriela Franco de Lima e Graciele Lurdes Silveira.

Ao Professor Luiz Antônio Augusto Gomes, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ceder as sementes de *Lactuca sativa* L. que foram utilizadas para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, L. B. et al. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**. Taubaté, v. 6, n. 12, p. 255–265, 2011.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **An. Acad. Bras. Ciênc.** Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxicity of Landfills Assessed by Plant Cytogenetic Approaches. In: CABRAL, G. B. C.; BOTELHO, B. A. E. (Org.). **Landfills: Waste Management, Regional Practices and Environmental Impact**. New York: Nova Publishers, 2012. v. 1, p. 319-330.
- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. In: PRATISSOLI, D. et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal III**. 1. ed. Alegre: UFES, 2012. v. 3, p. 39-79.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, n. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.
- ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.
- BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environ. Res.** San Diego, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.
- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**. Berlin, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011.
- BELLING, J. On Counting Chromosomes in Pollen-Mother Cells. **The American Naturalist**. Chicago, v. 55, p. 573-574, 1921.
- BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollution**. Amsterdam, v. 226, n.207, p. 1-11, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.

CAMPOS, J. M. S. et al. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 22, n.1, p. 143-152, 2008.

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. **Biotemas**. Florianópolis: UFSC, v. 25, n. 3, p. 19-27, 2012.

DA ROSA, M. et al. Potencial citogenotóxico de efluente de indústria de bebidas não alcoólicas em cebola. **Disciplinarum Scientia – Naturais e Tecnológicas**. Santa Maria, v. 16, n. 3, p. 459-466, 2015.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**. Saint Louis, v. 13, p. 66–74, 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**. Lund, v. 117, n. 1, p. 23-29, 1992.

MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, p. 4808-4819, 2014.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: NARWAL et al. (Org.). **Plant Bioassays**. Texas: Studium Press Houston, p. 3-20, 2009.

NASCIMENTO, W. M.; CANTLIFFE, D. J. Germinação de sementes de alface sob altas temperaturas. **Horticultura Brasileira**. Brasília, v. 20, n. 1, p. 103-106, 2002.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut**. Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30-35, 2014.

PEREIRA, M. P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@ambiente On-line**. Boa Vista, v. 7, n. 1, p.36-43, 2013.

PINHEIRO, G. S. et al. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena**. Aracaju, v. 10, n. 11, 2014.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. Amsterdam, v. 390, n. 1, p. 121-127, 1997.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2014.

SOUSA, S. M.; VICCINI, L. F. Cytotoxic and genotoxic activity of *Achillea millefolium* L., Asteraceae, aqueous extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. Curitiba, v. 21, n. 1, p. 98-104, 2011.

SOUSA, S. M. et al. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**. Florence, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 84, p. 125-132, 2012.

VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 378, p. 63-66, 2007.

ARTIGO 2

**REVISITANDO O CARIÓTIPO DE *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.:
DUAS ESPÉCIES MODELO PARA ESTUDOS DE TOXICOLOGIA
AMBIENTAL**

**REVISITING THE KARYOTYPE OF *Allium cepa* L. AND *Lactuca sativa*
L.: TWO MODEL PLANTS FOR ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY
RESEARCHES**

RESUMO

O conhecimento do complemento cromossômico da espécie modelo utilizada em estudos aplicados a toxicologia ambiental é importante para a identificação e classificação das alterações que podem ser visualizadas. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo revisar o complemento cromossômico de *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L., duas espécies vegetais modelo utilizadas em estudos de prospecção de risco de poluentes ambientais. Para obtenção das c-metáfases, sementes de *A. cepa* e *L. sativa* foram germinadas em temperatura controlada, sem fotoperíodo, e suas raízes foram tratadas com os antimitóticos Colchicina ou 8-hidroxiquinoleína (8Hq). Imagens de c-metáfases com cromossomos bem individualizados e com centrômero bem definido, para cada espécie, foram capturadas e submetidas a análise morfométrica. Os cromossomos de *A. cepa* variaram o tamanho de 7,13 a 10,54 μm (Colchicina) e 6,26 a 9,18 μm (8Hq) e de *L. sativa* de 3,21 a 6,04 μm (Colchicina) e 1,85 a 3,33 μm (8Hq). Sabendo que informações sobre o complemento cromossômico destas duas espécies são pouco exploradas e publicadas, trabalhos como este são guias importantes para os grupos que estudam a prospecção dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais.

Palavras-chave: Complemento cromossômico. Modelos vegetais. Análise morfométrica. Prospecção de efeitos tóxicos.

ABSTRACT

The knowledge of the chromosome complement of the model species used in applied environmental toxicology studies is important for the identification and classification of the changes that can be observed. Therefore, this study aimed to revisit the chromosome complement of *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L., two species model used in research studies of risk of environmental pollutants. To obtain the c-metaphases, seeds of *A. cepa* and *L. sativa* were germinated under controlled temperature without photoperiod, and their roots were treated with antimetabolic colchicine or 8-hydroxyquinoline (8HQ). C-metaphase images with well-individualized chromosomes and well-defined centromere, for each species were captured and subjected to morphometric analysis. The chromosomes of *A. cepa* strain varied size from 7.13 to 10.54 micrometre (Colchicine) and 6.26 to 9.18 micrometre (8HQ) and *L. sativa* 3.21 to 6.04 micrometre (Colchicine) and 1.85 to 3.33 micrometre (8HQ). Knowing that information on the chromosome complement of these two species are poorly explored and published, works such as this are important guides for groups studying the prospect of the toxic effects of environmental pollutants.

Keywords: Chromosome complement. Plant models. Morphometric analysis. Prospecting for toxic effects.

1 INTRODUÇÃO

A avaliação de riscos de poluentes ambientais requer a aplicação de testes eficientes para determinar a ação dos tóxicos nos seres vivos (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Dentre os ensaios disponíveis para este fim, destaca-se a avaliação de alterações no ciclo celular de espécies vegetais modelo (FISKEJÖ, 1985; GRANT, 1994; LEME e MARIN-MORALES, 2009). Para tanto, o conhecimento do complemento cromossômico da espécie modelo é importante para a identificação e classificação das alterações que podem estar relacionadas com a incorreta orientação dos cromossomos na placa metafásica, atrasos na segregação dos cromossomos em anáfase e telófase, indução de c-metáfases e fragmentos cromossômicos.

Allium cepa L., a “cebola de cabeça”, é uma monocotiledônea da família Amaryllidaceae e uma espécie modelo amplamente utilizada em análises dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais sobre o ciclo celular, desde a década de 1930. Dentre as vantagens apontadas para o uso da cebola no teste de aberração cromossômica, destaca-se a característica de seu complemento cromossômico, que, segundo Fiskesjö (1985), apresenta cromossomos de “bom tamanho”, e em pequeno número ($2n = 2x = 16$ cromossomos). Seu cariótipo foi descrito por Sato (1981), consistindo de seis pares metacêntricos, um par submetacêntrico e um par subteloentrico ($1M+1sm+2m+1M+1st+1M+1m$).

Lactuca sativa L., alface, é uma eudicotiledônea da família Asteraceae, e é uma espécie modelo muito utilizada em estudos tanto macroscópicos, que envolvem análises de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, como os microscópicos, que envolvem a avaliação dos efeitos citogenotóxicos dos poluentes ambientais. Matoba et al. (2007) descreveram o complemento cromossômico da espécie, a qual possui $2n = 2x = 18$ cromossomos, que variam de 2,8 a 5,5 μm de tamanho, consistindo de quatro pares submetacêntricos, um

par submetacêntrico/subtelocêntrico, um par metacêntrico/submetacêntrico e três pares metacênticos (2sm + 1sm/st + 2sm + 1m/sm + 3m).

Estudos sobre as características do complemento cromossômico de *A. cepa* e *L. sativa* são pouco publicados, e trabalhos neste sentido são importantes para auxiliar grupos de pesquisa na busca por um vegetal modelo mais adequado para as avaliações citogenotóxicas.

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo revisar o complemento cromossômico de *A. cepa* L. e *L. sativa* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de *A. cepa* L. var. *baia periforme* (cebola) e *L. sativa* L. var. *verônica* (alface), foram colocadas para germinar em placas de Petri umedecidas com 3 mL de água destilada, e mantidas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à 24 °C, sem fotoperíodo, até as raízes atingirem de 1 a 2 cm de comprimento. As raízes de cebola foram coletadas às 10 h e as de alface às 14 h, conforme descrito por Silveira (2016 – Artigo 1), como sendo o horário que estas espécies apresentam o maior IM. As raízes foram tratadas, no escuro, por 3 h com Colchicina 0,01%, a 10 °C ou por 24 h com 8Hq 2 mM, a 10 °C. As raízes foram lavadas e fixadas em Carnoy (Álcool: Ácido Acético, 3:1), por 48 horas em temperatura ambiente, seguindo lavagem e fixação em álcool 70%, tendo sido armazenadas a -4 °C.

Para preparo das lâminas, as raízes foram hidrolisadas com HCl 1N durante 9-10 min a 60° (Banho-Maria) e expostas ao Reativo de Shiff, no escuro, por 1 h e 30 min. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921), montadas com Carmim Acético 2%, e a lamínula foi retirada em nitrogênio líquido. Após secarem, foram preparadas lâminas permanentes

adicionando Enttlan® sobre a preparação microscópica, cobrindo com uma nova lamínula.

As lâminas foram avaliadas em Microscópio de campo claro (Carl Zeiss, Axio Lab A1), na objetiva de 100X, e imagens das c-metáfases foram capturadas com a micro-câmera (AxioCam ERc 5s) acoplada ao microscópio, através do programa AxioVision.

A avaliação morfométrica foi realizada em 15 c-metáfases selecionadas (5 com Colchicina e 10 com 8Hq) para cada espécie, com cromossomos espalhados e centrômero bem definido. As medições dos comprimentos dos braços dos cromossomos foram realizadas no programa livre MicroMeasure 3.3. A partir das medidas do braço longo (BL) e braço curto (BC) obtidas, foram calculados o Comprimento Total ($CTi = BL + BC$) dos cromossomos, o Comprimento Total do Lote Haploide ($CTLH = \sum CTi$), o Comprimento Relativo ($CR = Cti / CTLH \times 100$), a Relação entre Braços ($RB = BL / BC$) e o Índice Centromérico ($IC = BC \times 100 / CTi$).

A morfologia dos cromossomos foi definida segundo a classificação de Levan, Fredga e Sandberg (1964). Cariogramas representativos de cada substância antimitótica aplicada, foram construídos usando o programa Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated). Os idiogramas foram obtidos a partir das médias de cada par de cromossomos das c-metáfases avaliadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CTLH médio dos 16 cromossomos da cebola foi de 146,30 μm para os cromossomos tratados com Colchicina e 124,82 μm para os cromossomos tratados com 8Hq (Tabela 1). Para os pares cromossômicos de cebola tratados com Colchicina foi observado um CTi médio que variou de 7,13 a 10,54 μm , enquanto que com 8Hq o CTi médio variou de 6,26 a 9,18 μm (Tabela 1), podendo ser

considerados de tamanho médio a grande (Tipo L), segundo a categoria cromossômica descrita por Fukui (1996): cromossomos grandes, tipo L, com tamanho variando de 8 a 10 μm ; e cromossomos pequenos, tipo S, com tamanho variando de 2 a 3 μm ; espécies com cromossomos entre esses intervalos, têm cromossomos com tamanho mediano.

Para ambos antimitóticos, observou-se a presença de satélite apenas no sexto par cromossômico (Figura 1), corroborando o trabalho de Sato (1981). Este autor obteve cromossomos de quatro bulbos de cebola, e descreve em seu estudo a ocorrência de um bulbo com satélite em apenas um cromossomo do sexto par e a presença de satélite no oitavo par do complemento cromossômico de dois bulbos, sugerindo que este polimorfismo é devido a duplicação, seguida de deleção e translocação do satélite. Em nosso estudo, c-metáfase obtida com 8Hq apresentou polimorfismo do satélite no sexto par cromossômico (Figura 1) concordando com as observações de Sato (1981).

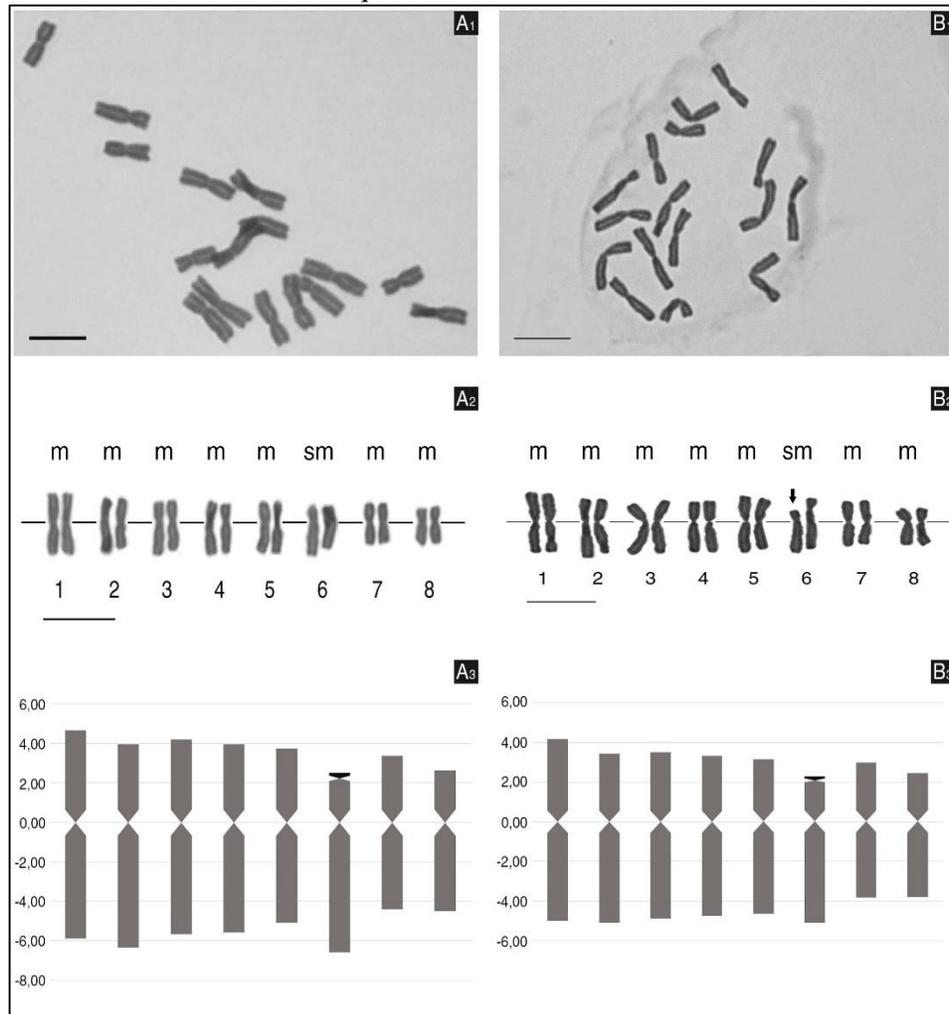
Sato (1981) obteve cromossomos de raízes de bulbos de cebola tratadas com Colchicina na concentração de 0,05% durante 3 h e 30 min, a 20 °C, e descreveu o complemento cromossômico da cebola como consistindo de seis pares metacêntricos, um par submetacêntrico e um par subtelocêntrico (1M+1sm+2m+1M+1st+1M+1m), seguindo a classificação de Levan, Fredga e Sandberg (1964). No presente estudo, a partir de medidas consistentes dos braços longo e curto de cada cromossomo, foi obtida a relação entre braços (RB) e o complemento cromossômico foi classificado, também de acordo com Levan, Fredga e Sandberg (1964), sendo observado sete pares metacêntricos e um par submetacêntrico (5m+1sm+2m) nas metáfases tratadas com Colchicina e com 8Hq (Tabela 1).

Tabela 1 – Medições cromossômicas de *A. cepa*. (Continua)

Colchicina						
Pares	Cti	BL	BC	RB	IC%	Tipo
1	10,54 ± 8,55	5,88 ± 4,46	4,67 ± 4,10	1,39 ± 0,19	42,79 ± 0,03	m
2	10,35 ± 8,25	6,37 ± 5,23	3,98 ± 3,03	1,58 ± 0,09	39,06 ± 0,02	m
3	9,88 ± 7,95	5,67 ± 4,04	4,21 ± 3,93	1,66 ± 0,61	39,73 ± 0,06	m
4	9,57 ± 7,81	5,60 ± 4,71	3,97 ± 3,12	1,42 ± 0,18	41,63 ± 0,03	m
5	8,82 ± 6,88	5,07 ± 3,91	3,75 ± 3,00	1,35 ± 0,16	42,85 ± 0,03	m
6	9,09 ± 7,86	6,58 ± 5,66	2,51 ± 2,21	2,65 ± 0,35	28,00 ± 0,03	sm*
7	7,77 ± 6,96	4,40 ± 3,61	3,36 ± 3,40	1,45 ± 0,45	41,99 ± 0,07	m
8	7,13 ± 5,82	4,48 ± 4,00	2,66 ± 1,86	1,61 ± 0,32	39,01 ± 0,05	m
CTLH	146,30					
8Hq						
Pares	Cti	BL	BC	RB	IC%	Tipo
1	9,18 ± 0,85	5,00 ± 0,50	4,18 ± 0,54	1,21 ± 0,18	45,25 ± 0,03	m
2	8,51 ± 1,13	5,07 ± 0,73	3,44 ± 0,51	1,49 ± 0,19	40,40 ± 0,03	m
3	8,38 ± 0,99	4,88 ± 0,74	3,49 ± 0,50	1,42 ± 0,26	41,73 ± 0,04	m
4	8,07 ± 0,57	4,76 ± 0,56	3,31 ± 0,39	1,47 ± 0,28	41,08 ± 0,05	m
5	7,79 ± 0,98	4,66 ± 0,70	3,13 ± 0,54	1,52 ± 0,31	40,24 ± 0,04	m
6	7,40 ± 0,83	5,10 ± 0,68	2,30 ± 0,54	2,32 ± 0,64	31,19 ± 0,06	sm*
7	6,82 ± 0,81	3,83 ± 0,48	3,00 ± 0,48	1,29 ± 0,20	43,73 ± 0,04	m
8	6,26 ± 0,69	3,80 ± 0,51	2,46 ± 0,37	1,58 ± 0,32	39,20 ± 0,05	m
CTLH	124,82					

Legenda: Média seguida do desvio padrão. O asterisco (*) na coluna “Tipo”, indica a presença de satélite no par cromossômico. CTLH: Comprimento total do lote haploide; Cti: Comprimento do par cromossômico; BL: Braço longo; BC: Braço curto; RB: Relação entre braços; IC: Índice centromérico; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico. Fonte: Do autor (2016).

Figura 1 – C-metáfases de *A. cepa* obtidas através do uso dos bloqueadores Colchicina e 8Hq.



Legenda: A: C-metáfase de cebola obtida com o uso do bloqueador Colchicina; B: C-metáfase de cebola obtida com o uso do bloqueador 8Hq (A1/B1: Imagens de c-metáfase ou cariótipo de cebola obtidas através de micro-câmera acoplada ao microscópio de campo claro (objetiva de 100X); A2/B2: Cariograma de cebola feito através do uso do programa Photoshop CS6, dispostos em ordem crescente do par cromossômico da esquerda para a direita, alinhados pela região centromérica (Seta em B2 indica o polimorfismo observado no satélite do sexto par cromossômico); A3/B3: Idiograma feito a partir do comprimento médio dos pares cromossômicos, em ordem crescente do par cromossômico da esquerda para a direita, alinhados pela região centromérica). Barra: 10 μ m. Fonte: Do autor (2016).

Alface também possui cromossomos de fácil visualização com CTLH médio observado de 79,86 μm para os cromossomos tratados com Colchicina, e 44,36 μm para os cromossomos tratados com 8Hq (Tabela 2).

O CTi dos pares cromossômicos de alface tratados com Colchicina variou de 3,21 a 6,04 μm , enquanto que para os pares cromossômicos tratados com 8Hq o CTi variou de 1,85 a 3,33 μm (Tabela 2). Matoba et al. (2007) descreve que os cromossomos de alface, tratados com 8Hq 2 mM durante 3 h, em temperatura ambiente, possuem CTi de 2,8 a 5,5 μm , sem considerar a média do par cromossômico. Levando em consideração as categorias cromossômicas descritas por Fukui (1996), os cromossomos de alface podem ser classificados como de tamanho pequeno a médio (Tipo S).

Nos cromossomos de alface tratados com Colchicina e com 8Hq foi observada a ocorrência de satélite no terceiro e no quinto par cromossômico (Figura 2). A ocorrência de satélites está de acordo com Matoba et al. (2007), que através da utilização de citogenética clássica e da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH, sigla em inglês), com sondas de rDNA 5S e 18S, observou que os pares três e cinco que possuem satélites também são portadores dos genes de rDNA 18S.

Seguindo a classificação de Levan, Fredga e Sandberg (1964), foi observado que os complementos cromossômicos de alface tratados com Colchicina e com 8 Hq, consistem de seis pares submetacêntricos e dois pares metacêntricos (6sm + 2m) (Tabela 2).

Os resultados observados para o complemento cromossômico de alface diferiram de Matoba et al. (2007), que classificaram os cromossomos, segundo Levan, Fredga e Sandberg (1964), como consistindo de quatro pares submetacêntricos, um par submetacêntrico/subtelocêntrico, um par metacêntrico/submetacêntrico e três pares metacêntricos (2sm + 1sm/st + 2sm + 1m/sm + 3m). No presente estudo, em ambos antimitóticos, o par 7 ficou com

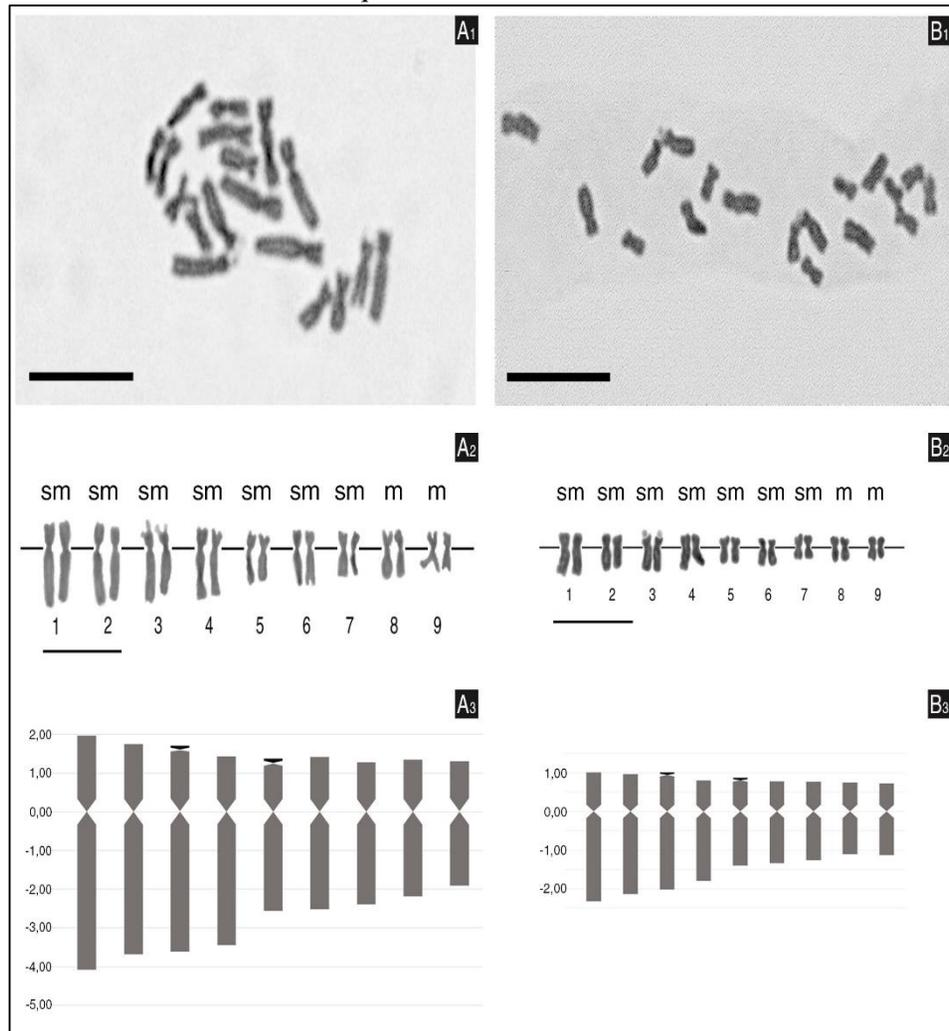
classificação diferente da feita por Matoba et al. (2007), porque o valor obtido para RB, ficou próximo da zona de transição entre metacêntrico e submetacêntrico (Tabela 2).

Tabela 2 – Medições cromossômicas de *L. sativa*.

Colchicina						
Pares	Cti	BL	BC	RB	IC%	Tipo
1	6,04 ± 2,37	4,08 ± 1,65	1,97 ± 0,73	2,08 ± 0,24	32,76 ± 0,02	sm
2	5,43 ± 2,39	3,68 ± 1,60	1,74 ± 0,83	2,21 ± 0,57	32,19 ± 0,06	sm
3	5,32 ± 1,92	3,61 ± 1,18	1,71 ± 0,75	2,22 ± 0,34	31,49 ± 0,03	sm*
4	4,87 ± 1,76	3,44 ± 1,08	1,43 ± 0,60	2,57 ± 0,38	28,96 ± 0,02	sm
5	3,94 ± 1,36	2,56 ± 0,81	1,38 ± 0,59	2,03 ± 0,52	34,78 ± 0,05	sm*
6	3,94 ± 1,28	2,52 ± 0,78	1,42 ± 0,51	1,81 ± 0,18	35,87 ± 0,02	sm
7	3,66 ± 1,11	2,30 ± 0,61	1,27 ± 0,56	2,12 ± 0,77	34,08 ± 0,06	sm
8	3,52 ± 1,06	2,18 ± 0,61	1,35 ± 0,50	1,69 ± 0,43	38,02 ± 0,05	m
9	3,21 ± 1,00	1,91 ± 0,69	1,30 ± 0,33	1,45 ± 0,18	41,01 ± 0,03	m
CTLH	79,86					
8Hq						
Pares	Cti	BL	BC	RB	IC%	Tipo
1	3,33 ± 1,13	2,32 ± 0,76	1,01 ± 0,39	2,36 ± 0,29	30,30 ± 0,02	sm
2	3,10 ± 1,03	2,14 ± 0,62	0,96 ± 0,43	2,37 ± 0,38	30,60 ± 0,03	sm
3	3,03 ± 0,90	2,02 ± 0,72	1,01 ± 0,24	1,96 ± 0,50	35,04 ± 0,05	sm*
4	2,59 ± 1,07	1,79 ± 0,86	0,80 ± 0,23	2,11 ± 0,50	33,39 ± 0,05	sm
5	2,27 ± 0,46	1,40 ± 0,29	0,87 ± 0,24	1,89 ± 0,55	36,21 ± 0,06	sm*
6	2,12 ± 0,62	1,34 ± 0,42	0,78 ± 0,22	1,94 ± 0,62	35,57 ± 0,06	sm
7	2,04 ± 0,69	1,26 ± 0,42	0,77 ± 0,31	1,89 ± 0,68	36,48 ± 0,07	sm
8	1,85 ± 0,63	1,11 ± 0,30	0,75 ± 0,34	1,67 ± 0,33	38,16 ± 0,04	m
9	1,85 ± 0,59	1,13 ± 0,35	0,72 ± 0,27	1,62 ± 0,32	38,94 ± 0,05	m
CTLH	44,36					

Legenda: Média seguida do desvio padrão. O asterisco (*) na coluna “Tipo”, indica a presença de satélite no par cromossômico. CTLH: Comprimento total do lote haploide; Cti: Comprimento do par cromossômico; BL: Braço longo; BC: Braço curto; RB: Relação entre braços; IC: Índice centromérico; m: metacêntrico; sm: submetacêntrico; sm/m: submetacêntrico/metacêntrico. Fonte: Do autor (2016).

Figura 2 – C-metáfases de *L. sativa* obtidas através do uso dos bloqueadores Colchicina e 8Hq.



Legenda: A: C-metáfase de alface obtida com o uso do bloqueador Colchicina; B: C-metáfase de alface obtida com o uso do bloqueador 8Hq (A1/B1: Imagens de c-metáfase ou cariótipo de alface obtidas através de micro-câmera acoplada ao microscópio de campo claro (objetiva de 100X); A2/B2: Cariograma de alface feito através do uso do programa Photoshop CS6, dispostos em ordem crescente do par cromossômico da esquerda para a direita, alinhados pela região centromérica; A3/B3: Idiograma feito a partir do comprimento médio dos pares cromossômicos, em ordem crescente do par cromossômico da esquerda para a direita, alinhados pela região centromérica). Barra: 10 µm. Fonte: Do autor (2016).

Em relação ao uso das substâncias antimitóticas, assim como relatado por Tjio, Levan e Stålfelt (1950), foi observado, nas condições experimentais descritas, para os dois vegetais modelo, que o 8Hq em relação a Colchicina, possibilitou uma maior condensação dos cromossomos e conseqüentemente, uma melhor definição da sua morfologia e do centrômero, o que facilitou as medições dos braços curto e longo.

A cebola se destacou em relação ao alface por possuir uma simetria morfológica em seus cromossomos, permitindo uma margem de erro menor ao se classificar alterações como fragmentos, cromossomos não orientados, atrasados ou perdidos. No entanto, quando se tem o conhecimento adequado do cariótipo de alface, é possível distinguir fragmentos de cromossomos inteiros com confiabilidade.

Trabalhos como este são importantes guias para grupos de pesquisas da área de prospecção de efeitos biológicos através de bioensaios de aberrações cromossômicas, pois informações sobre o complemento cromossômico de cebola são escassos, e há poucas publicações explorando o complemento cromossômico de alface.

4 CONCLUSÃO

O número de cromossomos da cebola é $2n = 2x = 16$ cromossomos que variam em tamanho de 7,13 a 10,54 μm (Colchicina) e 6,26 a 9,18 μm (8Hq) e de alface é $2n = 2x = 18$ cromossomos que variam em tamanho de 3,21 a 6,04 μm (Colchicina) e 1,85 a 3,33 μm (8Hq).

O complemento cromossômico da cebola é composto por cromossomos de tamanho médio a grande (Tipo L), com simetria morfológica e de fácil visualização, enquanto que a alface possui cromossomos pequenos a médios (Tipo

S) e de fácil visualização, mas que não possuem uma simetria, tendo o primeiro par cromossômico quase o dobro do tamanho do último par.

Considerando apenas o complemento cromossômico, a cebola se destaca em estudos citogenotóxicos por possibilitar uma melhor e mais rápida distinção entre um cromossomo quebrado e um cromossomo desalinhado/perdido ou mesmo um micronúcleo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de Iniciação Científica e Mestrado aos autores deste trabalho.

Ao Professor Luiz Antônio Augusto Gomes, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ceder as sementes de *Lactuca sativa* L. que foram utilizadas para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Toxicidade de Agrotóxicos: Uma abordagem Citogenética e Molecular. In: PRATISSOLI, D. et al. (Org.). **Tópicos Especiais em Produção Vegetal III**. 1. ed. Alegre: UFES, 2012. v. 3, p. 39-79.
- BELLING, J. On Counting Chromosomes in Pollen-Mother Cells. **The American Naturalist**. Chicago, v. 55, p. 573, 574, 1921.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- FUKUI, K. Plant Chromosome at Mitosis. In: FUKUI, K; NAKAYAMA, S. (Org.). **Plant Chromosomes: Laboratory Methods**. New York: CRC Press. Cap. 1, p. 1-17, 1996.
- GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**. Lund, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.
- MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.
- SATO, S. Cytological studies on the satellited chromosomes of *Allium cepa*. **Caryologia**. Florence, v. 34, n. 4, p. 431-440, 1981.
- TJIO, J. H.; LEVAN, A.; STÅLFELT, M. G. **The use of oxyquinoline in chromosome analysis**. With appendix: The effect of oxyquinoline on protoplasmic viscosity. 1950.

ARTIGO 3

**TOXICIDADE DE POLUENTES AMBIENTAIS: ANÁLISE
COMPARATIVA ENTRE *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.**

**TOXIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS:
COMPARATIVE INVESTIGATION WITH *Allium cepa* L. AND *Lactuca
sativa* L.**

RESUMO

Estudos que auxiliam na compreensão dos mecanismos de ação de poluentes ambientais são de extrema importância dentro da toxicologia ambiental. Neste contexto, os ensaios que utilizam vegetais como modelos se destacam pela simplicidade e baixo custo na sua realização. Dentre os vegetais utilizados *Allium cepa* L. é o modelo mais difundido para testes citogenotóxicos, e *Lactuca sativa* L., apesar de ser amplamente utilizada em testes fitotóxicos, vem se destacando em análises citotóxicas. O presente estudo teve o objetivo de comparar as respostas de *A. cepa* e *L. sativa* através de análises macroscópicas (crescimento radicular) e microscópicas (análise do ciclo celular e fragmentação do DNA via teste de TUNEL e ensaio Cometa) após exposição das raízes dos modelos em questão a poluentes ambientais com mecanismos citogenotóxicos conhecidos. Ambas espécies responderam de forma sensível e eficiente aos testes aplicados após exposição ao agente alquilante de DNA, MMS (Metil Metano Sulfonato); ao metal pesado, Cádmio; ao resíduo da indústria de alumínio, SPL (Spent Pot Linner); e ao herbicida Atrazina. No entanto, diferiram quanto às respostas aos endpoints avaliados. De modo geral, *A. cepa* foi mais eficiente em detectar alterações provenientes de quebras no DNA, clastogênicas; e *L. sativa* de alterações relacionadas à segregação dos cromossomos na mitose, aneugênicas. Para os testes aplicados para verificar fragmentação no DNA, Cometa e TUNEL, *A. cepa* apresentou maior sensibilidade. Em conclusão ambos os modelos são eficientes para fins de avaliação de riscos toxicológicos de poluentes ambientais.

Palavras-chave: Cádmio. SPL. Atrazina. Ciclo Celular. Teste de TUNEL. Ensaio Cometa.

ABSTRACT

Studies that help understand the mechanisms of action of environmental pollutants are extremely important in environmental toxicology. In this context, assays using plants as models stand out for their simplicity and low performance cost. Among the used plants, *Allium cepa* L. is the model most commonly used for cytogenotoxic tests, while *Lactuca sativa* L., already widely used in phytotoxic investigations, has been gaining prominence in cytotoxic analyses. The present study aimed to compare the responses of *A. cepa* and *L. sativa* via macroscopic (root growth) and microscopic analyses (cell cycle and DNA fragmentation via TUNEL and comet assays) after exposure of their roots to environmental pollutants with known cytogenotoxic mechanisms. Both species presented sensitive and efficient response to the applied tests after exposure to the DNA-alkylating agent MMS (Methyl Methanesulfonate), the heavy metal Cadmium, the aluminum industry waste SPL (Spent Potliner) and the herbicide Atrazine. However, they differed regarding the responses to the evaluated endpoints. Overall, *A. cepa* was more efficient in detecting clastogenic changes, arising from DNA breakage, while *L. sativa* rather detected aneugenic alterations, related to chromosome segregation in mitosis. In the tests applied to verify DNA fragmentation (comet and TUNEL assays), *A. cepa* presented higher sensitivity. In conclusion, both models are efficient to evaluate toxicological risks of environmental pollutants.

Keywords: Cadmium. SPL. Atrazine. TUNEL test. Comet assay.

1 INTRODUÇÃO

Resíduos industriais, agrícolas e domésticos, decorrentes do crescimento urbano desordenado, contêm misturas complexas de químicos que não são degradados pelo processo de tratamento de efluentes, persistindo na natureza, poluindo o solo, o ar e as fontes de água potável (CHANDRA et al., 2005). Neste sentido, estudos que auxiliam no entendimento sobre os mecanismos de toxicidade desses poluentes nos seres vivos são de extrema importância (BIANCHI et al., 2015a).

Logo, nos últimos anos tem se desenvolvido e dado mais atenção às técnicas disponíveis para avaliação dos efeitos ecotoxicológicos de poluentes ambientais (BADERNA et al., 2011). Dentre os ensaios biológicos propostos para prospecção da toxicidade de poluentes ambientais, aqueles que utilizam vegetais como modelos se destacam por serem simples, baratos (GRANT, 1999), apresentarem correlação com outros modelos e sistemas de teste, incluindo modelos animais (BIANCHI et al., 2015b), e até mesmo células humanas (PALMIERI et al., 2016).

Dos ensaios descritos por Grant (1999), o teste de aberrações em *Allium cepa* L. (cebola) é o mais difundido entre os laboratórios que prospectam a citotoxicidade e genotoxicidade de compostos químicos e poluentes ambientais. O teste foi descrito e desenvolvido em 1938 por Levan (FISKESJÖ, 1985) e consiste na avaliação das alterações nas fases mitóticas em células do meristema radicular expostos aos agentes potencialmente tóxicos (LEME & MARIN-MORALES, 2009; MALUSZYNSKA e JUCHIMIUK, 2005). Além da observação de alterações cromossômicas o teste de micronúcleo (MA et al., 1995) para detecção de mutágenos ambientais também é aplicado

Adicionalmente outros vegetais têm sido utilizados como modelo para realização do teste de aberração cromossômica ou micronúcleo descrito para *A.*

cepa, dentre esses modelos pode-se destacar a *Lactuca sativa* L. (alface). Historicamente a espécie é modelo em estudos de efeitos alelopáticos em função da rápida germinação, uniformidade e sensibilidade (TIGRE et al., 2012).

No que diz respeito às características cariotípicas, tanto *A. cepa* como *L. sativa* apresentam cromossomos de fácil visualização ao microscópio e em pequeno número que permitem identificar facilmente as alterações cromossômicas decorrentes da exposição à agentes tóxicos. Logo, *L. sativa* tem sido utilizada, assim como *A. cepa*, em estudos de prospecção de efeitos de substâncias no ciclo celular. Esses trabalhos têm demonstrado a possibilidade de realização de ensaios macroscópico (germinação e desenvolvimento inicial da plântula) e microscópicos (análises de alterações no ciclo celular, no arcabouço proteico cromossômico e no núcleo, de forma geral) simultaneamente, o que amplia o entendimento dos mecanismos de ação das substâncias, misturas ou resíduos estudados (ANDRADE et al., 2010; ARAGÃO et al., 2015; FREITAS et al, 2016; PALMIERI et al, 2014).

Diante do exposto o presente estudo foi delineado para comparar as respostas obtidas em *A. cepa* e *L. sativa* através dos testes de desenvolvimento inicial das plântulas, alterações cromossômicas e nucleares, morte celular e fragmentação do DNA, após exposição a poluentes ambientais com mecanismos citogenéticos conhecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Poluentes testados

Foram utilizados compostos químicos com ação conhecidamente tóxica e mutagênica, oriundos de diferentes fontes de poluição ambiental: SPL (Spent Pot Liner) (na concentração de 26,5 g L⁻¹, segundo Palmieri et al. (2014)), um resíduo

sólido formado por uma mistura de substâncias que se acumula nas cubas de redução da alumina durante os processos de purificação e refino da bauxita na indústria de produção do alumínio (PALMIERI et al., 2014; SILVEIRA et al., 2002); Cádmi (Cd) (solução preparada a partir do sal $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ na concentração de $25 \mu\text{M}$, segundo Behboodi e Samadi (2004)), um metal pesado presente em efluentes industriais e domésticos; Atrazina (ATZ) (na concentração de $0,003 \text{ g L}^{-1}$), um herbicida amplamente empregado em atividades agrícolas, considerado poluente emergente; e MMS (Metil Metano Sulfonato) (na concentração de $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ segundo Caritá e Marin-Morales (2008)), um composto químico simples, que atua como agente alquilante no DNA, induzindo quebras e rupturas na molécula (MAURO, et al. 2014), utilizado como controle positivo nos testes de citogenotoxicidade.

A água destilada foi usada como controle negativo para fins de comparação dos efeitos dos poluentes aplicados.

2.2 Exposição dos modelos aos compostos químicos

Sementes de *Allium cepa* L. var. *baia periforme* (cebola) e *Lactuca sativa* L. var. *veronica* (alface) foram dispostas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo papel filtro embebido em 3 mL de água destilada. As placas foram acondicionadas à temperatura controlada de $24 \text{ }^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo, em Estufa Incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

O experimento foi montado em delineamento experimental inteiramente ao acaso, com cinco repetições (placas de Petri) de cada poluente para cada modelo (cebola e alface).

2.3 Comparação das espécies modelo através de análise macroscópica

Para comparar o desenvolvimento inicial das plântulas de cebola e alface, 30 sementes germinadas, de cada modelo, com raízes de 1 a 2 mm, foram tratadas com 3 mL das soluções teste (item 2.1). As raízes e a parte aérea foram medidas com auxílio de um paquímetro digital, a cada 24 h, num período de 5 dias (120 h).

2.4 Comparação das espécies modelo através de análise microscópica

Para a análise microscópica, as raízes emitidas de sementes germinadas em água destilada (1-2 mm), foram tratadas com as soluções teste (item 2.1), por 48 h. As raízes de cebola e alface foram coletadas as 10 e 14 h, respectivamente, fixadas em Carnoy (Etanol: Ácido Acético, 3:1), e armazenadas em freezer (-4 °C) por um período mínimo de 24 horas.

As raízes foram hidrolisadas em HCl 1N durante 9-10 min a 60 °C e expostas ao Reativo de Schiff, no escuro, por 1 h e 30 min. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921) e coradas com Carmim Acético 2%. A lamínula foi retirada em nitrogênio líquido. Após secarem, adicionou-se Enttalan® às lâminas, cobrindo com lamínula, obtendo-se lâminas permanentes.

Foram avaliadas 1.000 células meristemáticas por lâmina, e 10 lâminas por tratamento (item 2.1), totalizando 10.000 células. As diferentes fases da divisão mitótica, possíveis alterações cromossômicas e nucleares observadas foram anotadas. Com os dados obtidos foi calculado o índice mitótico (IM), razão entre o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e total de células avaliadas em cada tratamento; a frequência de alterações cromossômicas (AC) e de núcleos condensados, micronúcleos e brotos a cada mil células observadas.

Imagens representativas das AC (pontes, fragmentos, c-metáfases, aderências, cromossomos perdidos em telófase, atrasados em anáfase e não orientados em metáfase) e núcleos condensados, micronúcleos e brotos observadas em cada espécie modelo, foram capturadas na objetiva de 100x com óleo de imersão no Microscópio de campo claro Carl Zeiss, Axio Lab A1, equipado com a micro-câmera AxioCam ERc 5s, através do software AxioVision.

2.5 Teste de TUNEL

Após 48h de exposição aos poluentes (item 2.1) as raízes foram coletadas e hidrolisadas em HCl 1N a 60 °C por 9-10 min.

Foram preparadas três lâminas de cada tratamento separando os meristemas das raízes em uma gota do tampão PBS 1X (Tampão fosfato-salino), e utilizando a técnica de esmagamento (BELLING, 1921). A lamínula foi removida em nitrogênio líquido e as lâminas foram secas ao ar.

O preparo da reação de marcação e detecção de fragmentos com extremidades 3'OH livres foi conduzido de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do kit aplicado: DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega®).

As lâminas preparadas receberam uma alíquota de Vectashield® com 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), foram cobertas com lamínula de vidro e analisadas em Microscópio de Fluorescência (Olympux BX 60), sob o comprimento de onda de 488 a 495 nm para a fluoresceína e de 345 a 358 nm para o DAPI. Imagens representativas de cada tratamento foram capturadas na micro-câmera (AxioCam HRm – ZEISS) acoplada ao microscópio através do programa AxioVision.

Foram contabilizados 100 núcleos por lâmina, que foram classificados em danos graves (núcleo inteiro TUNEL positivo - verde), danos leves (núcleo

parcialmente TUNEL positivo – parcialmente verde) e sem danos (núcleo TUNEL negativo - azul).

2.6 Ensaio Cometa

Após 48 h de exposição às soluções teste (item 2.1), as raízes foram coletadas e seguiu-se o protocolo descrito por Jovtchev et al. (2008), com algumas adaptações.

Foram preparadas 3 lâminas por tratamento a partir das pontas (5-10 mm) das raízes tratadas. Elas foram picotadas em 300 μL de tampão PBS 1X a 4°C com auxílio de uma lâmina de barbear nova, e os núcleos foram filtrados em uma rede de nylon com poros de 50 μm .

Lâminas para microscopia cobertas com uma camada de 1% de gel de agarose de ponto de fusão normal receberam 30 μL da mistura (1:1) da suspensão nuclear com 1% de agarose de baixo ponto de fusão. A gota foi espalhada com auxílio de uma lamínula e as lâminas foram mantidas sob refrigeração por 5 min.

As lâminas foram cuidadosamente colocadas em uma cuba vertical com solução de lise (30 mM NaOH, 0,5 mM EDTA, pH 11,8) por 10 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas em TBE 1X (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA, pH 8.4) gelado, durante 5 min, por 3 vezes e dispostas em cuba de eletroforese horizontal, preenchida com solução de corrida (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13). A eletroforese foi conduzida por 15 min em uma corrente de 25 V (15-17 mA), em temperatura ambiente.

Após corrida, as lâminas foram desidratadas em álcool 96% durante 5 min e secas ao ar. Foi acrescentada uma alíquota (15 μL) de iodeto de propídio sobre cada lâmina, cobrindo-as com lamínula de vidro.

As lâminas foram avaliadas em Microscópio de Fluorescência (Olympus BX 60) sob comprimento de onda de 520 a 560 nm. Imagens representativas de

cada tratamento foram capturadas na micro-câmera AxioCam HRm (ZEISS) acoplada ao microscópio através do programa AxioVision.

Foram avaliados 300 nucleóides por tratamento, e classificados com *score* visual, de 0 a 4, de acordo com o grau de danos do DNA, considerando o tamanho da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. A porcentagem de danos e os valores de Unidade Arbitrária (UA) de cada tratamento em cada modelo, foram calculados de acordo com Colins (2004).

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos itens 2.3 a 2.6 foram submetidos à análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito fitotóxico e mitodepressivo de MMS, SPL, Cádmio, e Atrazina

Após 24 h de exposição aos poluentes testados reduções significativas no crescimento da raiz, em relação ao controle (água destilada), foram observadas para plântulas de cebola expostas ao SPL e de alface expostas ao Cd (Tabela 1). Para o período máximo de exposição avaliado (120 h), reduções significativas no comprimento das raízes em relação ao controle foram observadas para os tratamentos com SPL e Cd, em alface; e, SPL e ATZ, em cebola (Figura 1). A ATZ em alface aumentou significativamente o tamanho das raízes (Figura 1).

O MMS apresentou reduções significativas em relação ao controle apenas para as raízes de cebola após 96 h de exposição (Tabela 1). O efeito conhecido do

MMS está relacionado à indução de quebras no DNA (MAURO et al., 2014), não havendo relatos de inibição de crescimento da raiz. Segundo Harashima e Schnittger (2010), em plantas, o crescimento de um órgão está intimamente relacionado com sucessivos ciclos de divisão celular. Neste sentido, se o agente não interfere na transição das fases do ciclo mitótico, a proliferação celular ocorre normalmente, não afetando o comprimento da raiz. Tal fato está em consonância com o que foi observado para o MMS, já que este não apresentou efeito mitodepressivo nas células de cebola e alface expostas (Figura 1). Para cebola, o MMS apresentou aumento da frequência de células em divisão, fato que não está relacionado ao crescimento da raiz propriamente e será discutido mais adiante.

Por outro lado, poluentes ambientais como SPL, que é composto por uma mistura de substâncias, apresenta efeitos conhecidos de inibição do desenvolvimento radicular (ANDRADE et al., 2008 e 2010), o qual é explicado pelo seu efeito mitodepressivo dentre outros fatores. No presente trabalho, o SPL reduziu significativamente o comprimento das raízes de cebola, em todos os tempos avaliados, e de alface a partir de 48h de exposição (Tabela 1). Dentre os tratamentos avaliados, para ambos os modelos, raízes tratadas com SPL apresentaram as maiores reduções para os dois modelos. Segundo as análises microscópicas, o SPL apresentou efeito mitodepressivo em alface (Figura 1), enquanto para cebola, apresentou um aumento no IM. Efeitos do SPL em relação a redução na frequência de células no ciclo mitótico foi relatado por Palmieri et al. (2014) em células de alface, enquanto que o aumento do IM observado em células de cebola, corrobora os resultados observados por Andrade-Vieira et al. (2012) em células provenientes de bulbos de cebola expostos ao SPL.

O Cd, escolhido como poluente representante dos metais pesados, reduziu significativamente, em relação ao controle, o crescimento radicular apenas de plântulas de alface, para todos os tempos avaliados (Tabela 1). Tal fato corrobora o efeito mitodepressivo observado em células de alface expostas ao Cd (Figura 1).

Para cebola, não foi observada fitotoxicidade do Cd, estando em consonância com o IM, o qual não diferiu do controle. Efeitos fitotóxicos do Cd ocasionando redução significativa no desenvolvimento das raízes e da parte aérea da alface foi observada por Monteiro et al. (2010). Além disso, dentre as três espécies modelos utilizadas no estudo (*L. sativa* L., *Thlaspi caerulescens* J. Presl & C. Presl, e *T. arvense* L.) a alface mostrou-se mais sensível.

O herbicida atrazina (ATZ) induziu respostas diferentes nos dois modelos avaliados. Enquanto que em cebola foi observada inibição do crescimento radicular, para alface, na mesma proporção (próxima a 20%), foi observado aumento no tamanho da raiz (Figura 1). Em relação a análise microscópica, o IM de células de cebola expostas a ATZ não diferiu do controle, enquanto que, para alface foi observado efeito mitodepressivo da ATZ. Segundo o que foi apresentado anteriormente sobre a relação entre a proliferação celular e o crescimento da raiz, era de se esperar um aumento no número de células em divisão para as raízes de alface tratadas com ATZ. No entanto, o crescimento da raiz não envolve simplesmente a proliferação celular, mas é função também do alongamento das células (HARASHIMA E SCHNITTGER, 2010), o qual depende da ativação de enzimas que promovem o alongamento e afrouxamento da parede celular no processo de diferenciação.

Durante o período de observação (até 120 h) a cebola não exibiu desenvolvimento de parte aérea, nem mesmo para o controle, enquanto que as plântulas de alface, mesmo tratadas, exibiram a parte aérea (Tabela 1). Tal fato pode estar relacionado com uma maior sensibilidade da cebola em relação aos agentes testados, no entanto, como a parte aérea não é observada nem mesmo no tratamento controle e há relatos que a cebola possui um crescimento mais lento em relação a alface (dados não publicados), podemos atribuir a ausência da parte aérea a uma característica fisiológica do desenvolvimento das plântulas de cebola.

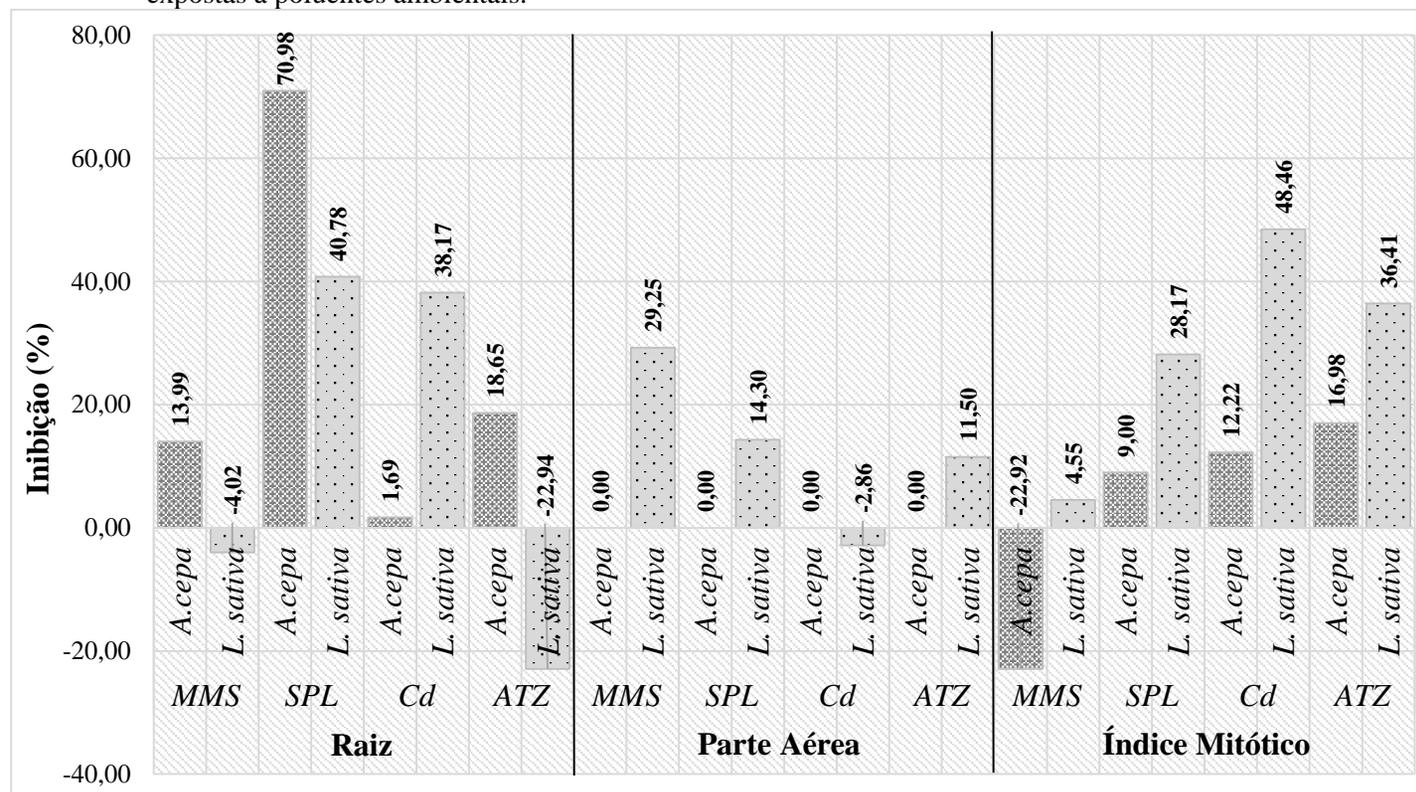
Neste sentido, analisando as respostas obtidas após 120 h de exposição às soluções teste, verifica-se que as plântulas de alface apresentaram sensibilidade significativa a um maior número de compostos químicos do que as plântulas de cebola (Figura 1). A maior eficiência, neste caso, da alface para demonstrar a fitotoxicidade de poluentes ambientais está em consonância com a afirmação de Tigre et al. (2012) sobre a sensibilidade da alface na detecção de fitotoxicidade de compostos derivados de plantas. Na área da toxicidade de poluentes ambientais também há relatos da sensibilidade da alface em relação a outros quatro modelos, couve (*Brassica oleracea* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), e milho (*Zea mays* L.), utilizados por Hou et al. (2014), em um estudo sobre os efeitos de solo contaminado com crômio (Cr).

Tabela 1 – Desenvolvimento das plântulas de *A. cepa* e *L. sativa* expostas à poluentes ambientais.

		Espécie	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	
Crescimento da Raiz (mm)	Água	<i>A. cepa</i>	5,36 ± 0,99 _{c1}	10,74 ± 0,59 _{c1}	16,47 ± 1,26 _{c1}	24,62 ± 2,95 _{c1}	29,60 ± 3,82 _{c1}	
		<i>L. sativa</i>	12,81 ± 0,99 _{a1}	20,11 ± 2,96 _{a1}	22,97 ± 3,49 _{a1}	24,82 ± 3,36 _{a1}	24,89 ± 3,53 _{a1}	
	MM _τ	<i>A. cepa</i>	5,02 ± 0,75 _{c1}	10,22 ± 0,96 _{c1}	15,03 ± 2,44 _{c1}	19,35 ± 2,54 _{c2}	25,46 ± 2,41 _{c1}	
		<i>L. sativa</i>	12,05 ± 1,17 _{a1}	19,12 ± 1,68 _{a1}	24,40 ± 3,19 _{a1}	25,21 ± 3,32 _{a1}	25,89 ± 3,19 _{a1}	
	SPL	<i>A. cepa</i>	3,79 ± 0,87 _{c2}	6,32 ± 1,31 _{c2}	7,74 ± 2,22 _{c2}	8,30 ± 2,12 _{c2}	8,59 ± 2,08 _{c2*}	
		<i>L. sativa</i>	10,42 ± 1,18 _{a1}	11,65 ± 0,29 _{a2}	13,31 ± 1,18 _{a2}	14,02 ± 1,74 _{a2}	14,74 ± 1,78 _{a2}	
	Cd	<i>A. cepa</i>	5,38 ± 0,84 _{c1}	10,93 ± 1,14 _{c1}	16,24 ± 1,67 _{c1}	22,96 ± 2,14 _{c1}	29,10 ± 3,11 _{c1}	
		<i>L. sativa</i>	9,80 ± 1,14 _{a2}	13,00 ± 0,89 _{a2}	14,57 ± 1,80 _{a2}	15,04 ± 1,94 _{a2}	15,39 ± 1,93 _{a2}	
	ATZ	<i>A. cepa</i>	4,86 ± 0,42 _{c1}	9,95 ± 0,98 _{c1}	14,66 ± 2,18 _{c1}	19,05 ± 2,84 _{c2}	24,08 ± 4,48 _{c1}	
		<i>L. sativa</i>	15,58 ± 2,17 _{a2}	23,60 ± 2,65 _{a1}	27,66 ± 2,28 _{a1}	28,85 ± 2,57 _{a1}	30,60 ± 2,80 _{a3}	
	Crescimento da Parte Aérea (mm)	Água	<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-
			<i>L. sativa</i>	-	7,64 ± 1,52 _{a1}	11,3 ± 1,43 _{a1}	15,18 ± 2,72 _{a1}	17,13 ± 2,95 _{a1}
MM _τ		<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	
		<i>L. sativa</i>	-	6,23 ± 1,23 _{a1}	8,79 ± 1,25 _{a2}	11,84 ± 0,90 _{a1}	12,12 ± 0,98 _{a2}	
SPL		<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	
		<i>L. sativa</i>	-	5,65 ± 1,34 _{a1}	10,65 ± 0,60 _{a1}	13,95 ± 1,99 _{a1}	14,68 ± 2,08 _{a1}	
Cd		<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	
		<i>L. sativa</i>	-	7,15 ± 0,96 _{a1}	12,06 ± 1,76 _{a1}	15,59 ± 1,30 _{a1}	17,62 ± 1,02 _{a1}	
ATZ		<i>A. cepa</i>	-	-	-	-	-	
		<i>L. sativa</i>	-	7,52 ± 1,01 _{a1}	10,72 ± 1,11 _{a1}	13,78 ± 2,48 _{a1}	15,16 ± 1,56 _{a1}	

Legenda: Média seguida do desvio padrão. Médias com traço (-): ausência de parte aérea. Médias seguidas de asterisco (*) referem-se a diferenças estatísticas (Tukey $p < 0,05$) entre cebola e alface. Médias seguidas de letra “a” referem-se a diferenças dentro da espécie alface e médias seguidas de letra “c” para diferenças dentro de cebola, ambas para um mesmo tempo de exposição. Letras acompanhadas de número diferente, indica diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos com MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina), de uma mesma espécie em relação ao controle negativo (água). Fonte: Do autor (2016).

Figura 1 – Inibição do desenvolvimento radicular, da parte aérea e do índice mitótico das plântulas de *A. cepa* e *L. sativa* expostas à poluentes ambientais.



Legenda: plântulas expostas por 120h às soluções de MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina). Barras positivas indicam inibição em relação ao controle negativo (água) e negativas aumento. Fonte: Do autor (2016).

3.2 Alterações no ciclo celular observadas em decorrência à exposição aos poluentes

Dentre as alterações cromossômicas (AC) induzidas pela exposição das células de alface e cebola aos poluentes testados, observou-se a presença de cromossomos não orientados em metáfase (Figura 2A), atrasados em anáfase (Figura 2B), perdidos em telófase (Figura 2C), anáfase multipolar (Figura 2D), c-metáfase (Figura 2E) e poliploidia (Figura 2F), todas elas relacionadas a problemas na segregação dos cromossomos na mitose em função da ação dos poluentes; caracterizadas como aneugênicas (FERNANDES et al., 2009). Além disso, foram observadas pontes (Figura 2G) e fragmentos (Figura 2H), decorrentes da ação dos poluentes sobre o DNA; ambas AC classificadas como clastogênicas, segundo Fernandes et al. (2009). A aderência cromossômica (Figura 2I) também foi observada entre as células tratadas, tendo sido considerada tanto aneugênica, em função de ser relacionada a poliploidia, como relatado por Fernandes et al., (2009), como clastogênica, pela possibilidade de estar associada a pontes e ligações inter- ou intracromatídicas, segundo El-Ghamery et al. (2003). A soma de todas essas alterações observadas está relacionada a frequência total de AC, apresentada na tabela 2.

O controle negativo apresentou AC em ambos os modelos. As frequências de AC total neste caso foram baixas e não diferiram entre os modelos (Tabela 2). Diferenças significativas para AC entre a cebola e o alface foram observadas nas células expostas ao MMS, SPL e Cd (Tabela 2).

Raízes de cebola e de alface tratadas com SPL apresentaram aderência cromossômica como a AC mais frequente (Tabela 2). Segundo Andrade et al (2008) este tipo de AC pode acionar os mecanismos de morte das células. Logo, as células entram em divisão, mas não concluem o ciclo mitótico, já que a aderência não é passível de reparo, tendo como consequência a

heterocromatinização do núcleo, uma evidência da ocorrência de morte celular em observações citológicas (ANDRADE et al., 2011). A indução da morte das células expostas explica a redução no crescimento das raízes de cebola e alface expostas ao SPL. Estes resultados estão em consonância com trabalhos de Andrade-Vieira et al. (2011, 2012a) e de Andrade et al. (2010), que observaram em células de cebola e alface, respectivamente, expostas à solução de 25% de SPL, redução do IM e a ocorrência de AC, dentre elas, aderência cromossômica.

Células de cebola tratadas com Cd, não apresentaram efeito mitodepressivo (Figura 1) e exibiram a maior frequência de AC (Tabela 2), dentre as quais aderência cromossômica, ponte e c-metáfase foram as mais frequentes (Tabela 2). Os resultados observados estão em consonância com o estudo de Hemachandra e Pathiratne (2015), onde bulbos de cebola foram utilizados para avaliar os efeitos tóxicos de três metais pesados (Cu, Cr e Cd) comumente encontrados em efluentes industriais. Estes autores observaram que a exposição ao Cd reduziu o crescimento das raízes, sem apresentar efeito mitodepressivo, mas induzindo alta frequência de AC.

As células de alface expostas ao Cd apresentaram redução do IM e alta frequência de c-metáfase e aderência cromossômica (Tabela 2). Considerando o estudo de Andrade et al. (2008) e o que foi explicado para o SPL anteriormente, a alta frequência de aderência cromossômica pode ativar os mecanismos de morte celular, explicando a redução no crescimento das raízes de alface tratadas com Cd, pois isso demonstra que as células não estão concluindo o ciclo mitótico.

No presente estudo, apesar do IM não ter sido reduzido em células de cebola tratadas com ATZ, a frequência de AC foi alta em relação ao controle negativo, sendo aderência cromossômica e ponte as AC mais frequentes (Tabela 2). Grillo et al. (2012) trataram raízes de cebola obtidas a partir de sementes durante 24 h com diferentes concentrações de ATZ (1, 10, e 100 mg L⁻¹), e observaram reduções no IM e indução de AC.

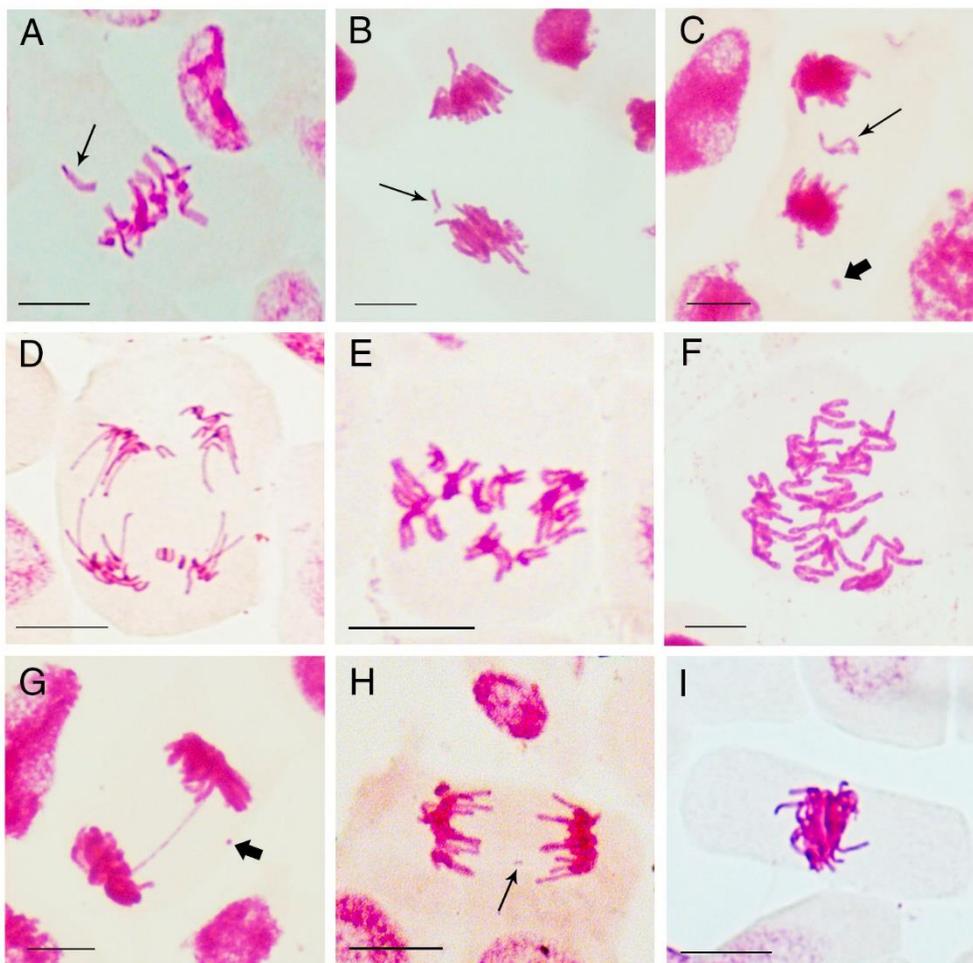
O tratamento com ATZ induziu a maior frequência de AC em células de alface (Tabela 2), sendo aderência cromossômica, cromossomo atrasado em anáfase e c-metáfase as AC mais frequentes (Tabela 2). Resultados semelhantes foram descritos por Grillo et al. (2010) ao tratarem raízes de alface com três concentrações de ATZ (1, 5 e 10%), durante 24 h, tendo observado redução significativa no IM e indução de AC, como pontes, fragmentos e cromossomos atrasados.

Para o tratamento com MMS, foi observada a maior frequência de fragmento e a ocorrência de ponte em células de cebola, e alta frequência de ponte e c-metáfase em células de alface (Tabela 2), comprovando que este agente alquilante apresenta efeito clastogênico, induzindo quebras no DNA (MAURO et al. (2014). Além disso, as quebras não diminuem o número de células em divisão o que explica a não observação de efeito mitodepressivo nas células dos dois vegetais modelo (Tabela 2). Estes resultados estão de acordo com Caritá e Marin-Morales (2008), que não observaram efeito mitodepressivo em células de cebola tratadas com MMS, mas observaram a ocorrência de quebras cromossômicas.

Diante dos resultados expostos, é possível observar que ambos os vegetais responderam de forma sensível ao agente alquilante de DNA, MMS, e aos poluentes ambientais, SPL, Cd e ATZ, comprovando que são excelentes modelos para testar a citotoxicidade de compostos químicos diversos.

Considerando que as AC observadas indicam os efeitos aneugênicos e clastogênicos que as substâncias testadas induzem no ciclo celular, a cebola foi mais sensível as substâncias com efeito clastogênico (fragmentações e pontes), enquanto a alface tendeu a ser mais sensível aos efeitos aneugênicos (cromossomos não orientados, atrasados, perdidos, c-metáfases e multipolaridades) (Tabela 2).

Figura 2 – Alterações cromossômicas observadas em células de *A. cepa* e *L. sativa* expostas ao MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina).



Legenda: A: Célula de alface em metáfase com cromossomo não orientado (seta fina); B: Célula de cebola em anáfase com cromossomo atrasado (seta fina); C: Célula de cebola em telófase com cromossomo perdido (seta fina) e micronúcleo (seta grossa); D: Célula de alface com anáfase multipolar; E: Célula de alface com c-metáfase; F: Célula de cebola com poliploidia; G: Célula de cebola em anáfase com ponte e micronúcleo (seta grossa); H: Célula de alface em anáfase com fragmento (seta fina); I: Célula de alface com aderência. Imagens capturadas em microscópio de campo claro com a objetiva de 100X. Barras: 10 μ m. Fonte: Do autor (2016).

Tabela 2 – Alterações cromossômicas (AC) observadas através de análise citogenética clássica realizada nas células meristemáticas de *Lactuca sativa* L. e *Allium cepa* L. tratadas durante 48 h com as soluções teste.

	Espécie	Frequência de AC	C. não orientado	C. atrasado	C. perdido	C-met.	Poli.	Multi.	Frag.	Ponte	Ade.
Água	<i>A. cepa</i>	0,80 ± 1,25 _{c1}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,50	0,30
	<i>L. sativa</i>	1,90 ± 0,55 _{a1}	0,30	0,10	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50
MMS	<i>A. cepa</i>	6,30 ± 4,16* _{c2}	0,20	0,50	0,10	0,00	0,00	0,00	3,30	2,20	0,40
	<i>L. sativa</i>	9,80 ± 2,86 _{a2}	1,90	0,10	0,40	2,50	0,20	0,10	0,40	2,70	1,50
SPL	<i>A. cepa</i>	13,70 ± 4,60* _{c2}	0,30	0,30	0,10	0,70	0,20	0,00	0,40	1,00	11,20
	<i>L. sativa</i>	6,80 ± 4,09 _{a2}	0,40	0,10	0,10	0,80	0,00	0,00	0,30	2,00	3,10
Cd	<i>A. cepa</i>	18,60 ± 4,44* _{c2}	0,20	0,00	0,10	1,10	0,10	0,50	0,30	1,80	14,50
	<i>L. sativa</i>	8,00 ± 2,47 _{a2}	0,60	0,60	0,10	3,40	0,00	0,00	0,10	0,30	2,90
ATZ	<i>A. cepa</i>	10,80 ± 2,86 _{c2}	0,10	0,10	0,00	0,90	0,30	0,20	0,50	3,00	5,70
	<i>L. sativa</i>	14,90 ± 6,92 _{a3}	1,10	2,70	0,30	2,50	0,00	0,50	0,10	1,20	6,50

Legenda: Frequência média de AC seguida do desvio padrão. Médias seguidas de asterisco (*) referem-se a diferenças estatísticas (Tukey p<0,05) entre cebola e alface. Médias seguidas de letra “a” referem-se a diferenças dentro da espécie alface e médias seguidas de letra “c” para diferenças dentro de cebola, ambas para um mesmo tempo de exposição. Letras acompanhadas de número diferente, indicam diferenças estatísticas (Tukey, p<0,05) entre os tratamentos de uma mesma espécie em relação ao controle negativo (água). Média das alterações visualizadas a cada 1.000 células analisadas. MMS: Metil Metano Sulfonato; SPL: Spent Pot Liner; Cd: Cádmio; ATZ: Atrazina; Frag.: Fragmento; Ade.: Aderência; C-met.: C-metáfase; Multi.: Multipolar; Poli.: Poliploidia. Fonte: Do autor (2016).

3.3 Prospecção de morte celular e de danos ao DNA

No presente estudo, o processo de morte nas células expostas aos diferentes poluentes e/ou substâncias testadas foi verificado através da observação de núcleos condensados (NC), picnóticos e heterocromáticos (Figura 3) e também do teste de TUNEL (Figura 4), o qual tem sido utilizado na prospecção dos mecanismos de morte celular (BREHODDI e SAMADI, 2004).

Os NC ocorreram com maior frequência em células de cebola tratadas com ATZ, e alface tratadas com Cd (Figura 3), enquanto que as células TUNEL positivo foram mais frequentes em células de cebola tratadas com MMS e alface expostas à ATZ (Figura 4). No presente trabalho foram consideradas três classes de células no teste de TUNEL, em função da intensidade da marcação observada após a reação (Figura 4). Com base nos resultados as células de cebola são mais sensíveis que a alface dentre os tratamentos testados uma vez que a cebola demonstrou maior frequência de danos leves em todos os tratamentos (com variação de 47,67% para SPL a 51% para MMS), enquanto a alface demonstrou maior sensibilidade apenas aos danos graves (com variação de 44,33% para Cd a 62,67% para MMS) (Figura 4),

Ao se comparar um vegetal modelo com o outro, os tratamentos que apresentaram as maiores frequências de aderência cromossômica e NC, observadas pela análise citogenética, tiveram uma tendência a apresentar as maiores porcentagens de danos (danos leves + danos graves) aos núcleos, observada pelo teste de TUNEL (Figura 5A). A comparação destas alterações juntamente com as porcentagens de danos observadas pelo teste de TUNEL, está de acordo com o estudo de Andrade-Vieira et al. (2011, 2012a), onde foi observada a ocorrência de NC em células de cebola tratadas com uma solução de 25% de SPL durante 36 h, bem como uma alta frequência de núcleos marcados como TUNEL positivo, mesmo após o tratamento de recuperação de 24 h.

A morte celular está associada também com danos não reparados à molécula de DNA das células expostas. Em observações citológicas a presença de cromossomos perdidos e fragmentos associados à brotos (Figura 3) e micronúcleos (Figura 3) demonstram a indução de danos ao DNA pelos agentes testados, enquanto que o ensaio Cometa demonstra a instabilidade do DNA exposto através da quantificação da fragmentação.

Os brotos, observados em maior frequência em células de cebola tratadas com ATZ e SPL (Figura 3), são explicados por Serrano e Monteiro-Montoya (2001) como sendo originados por cromossomos atrasados que são envoltos por membrana nuclear antes de serem incorporados aos cromossomos que já estão no polo. Autores como Fenech et al. (2011), relatam que os brotos são consequência da poliploidização, originada da amplificação do material genético, que são eliminados do núcleo e ficam ligados a membrana nuclear. De acordo com Fernandes et al. (2009), esta alteração nuclear não constitui uma anormalidade, pois o envelope nuclear ainda pode se reconstituir e englobar o broto.

Os MCN, que foram observados com maior frequência em células de cebola e alface tratadas com MMS (Figura 3), são visualizados em diferentes tamanhos na célula, e podem ser originados de cromossomos perdidos (inteiros), de fragmentos cromossômicos acêntricos (FENECHI et al., 2011; FERNANDES et al., 2007), ou assim como os brotos, de material genético que foi amplificado e eliminado do núcleo (FENECH et al., 2011).

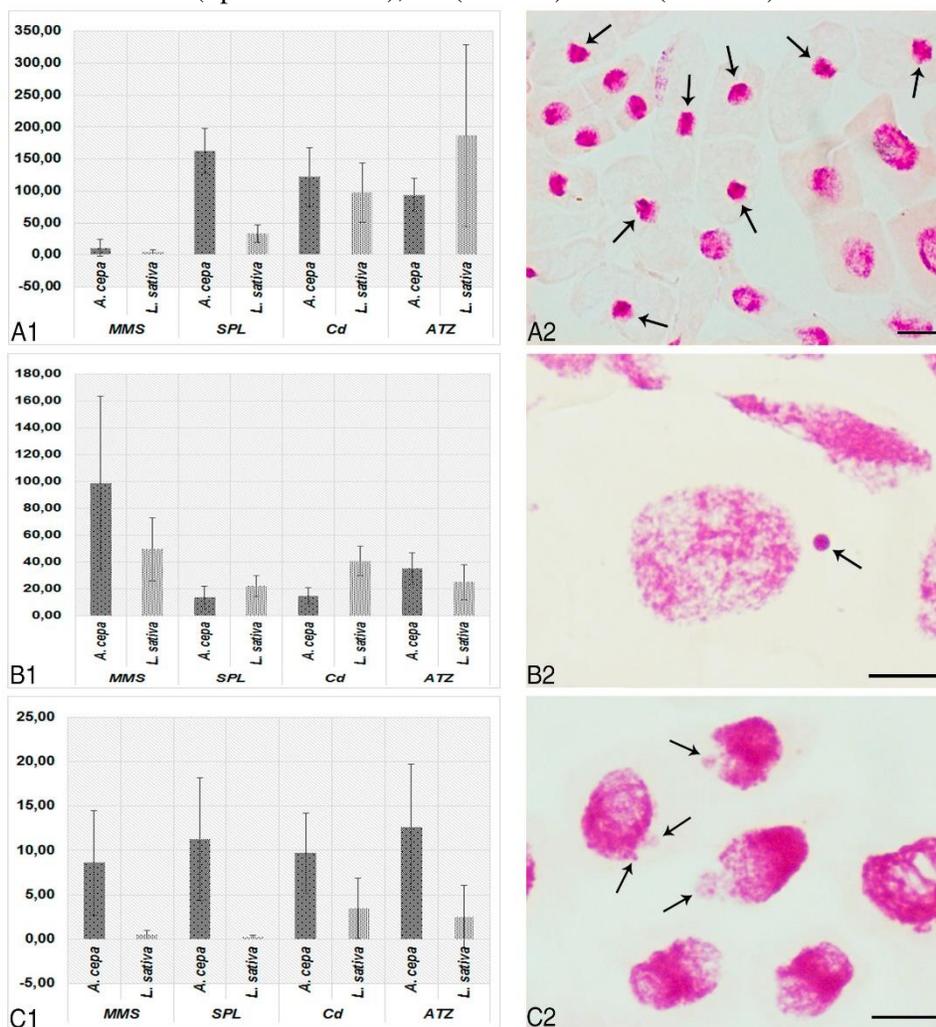
No ensaio cometa os valores de Unidade Arbitrária (UA), propostos por Collins et al (2004) são considerados mais sensíveis em detectar as diferenças entre os tratamentos, pois considera ponderadamente a frequência de danos ao DNA em relação a gravidade do mesmo, enquanto a porcentagem de danos considera todos os danos na mesma proporção. No presente estudo, a cebola apresentou uma maior sensibilidade em relação ao alface para os danos ao DNA observados pelo ensaio Cometa, tanto para a porcentagem de danos como para os

valores de UA (Tabela 3), pois, como observado na tabela 3, nucleoides classificados como *score* 3 e 4 foram mais frequentes em cebola do que em alface.

Os tratamentos que provocaram os maiores danos ao DNA observados pelo ensaio Cometa, tanto em relação à porcentagem de danos como aos valores de UA obtidos, apresentaram uma tendência em induzir as maiores frequências de perdas cromossômicas (cromossomos não orientados, atrasados e perdidos, juntamente com os fragmentos, brotos e MCN) observadas através da análise citogenética em células de ambos os modelos (Figura 5B).

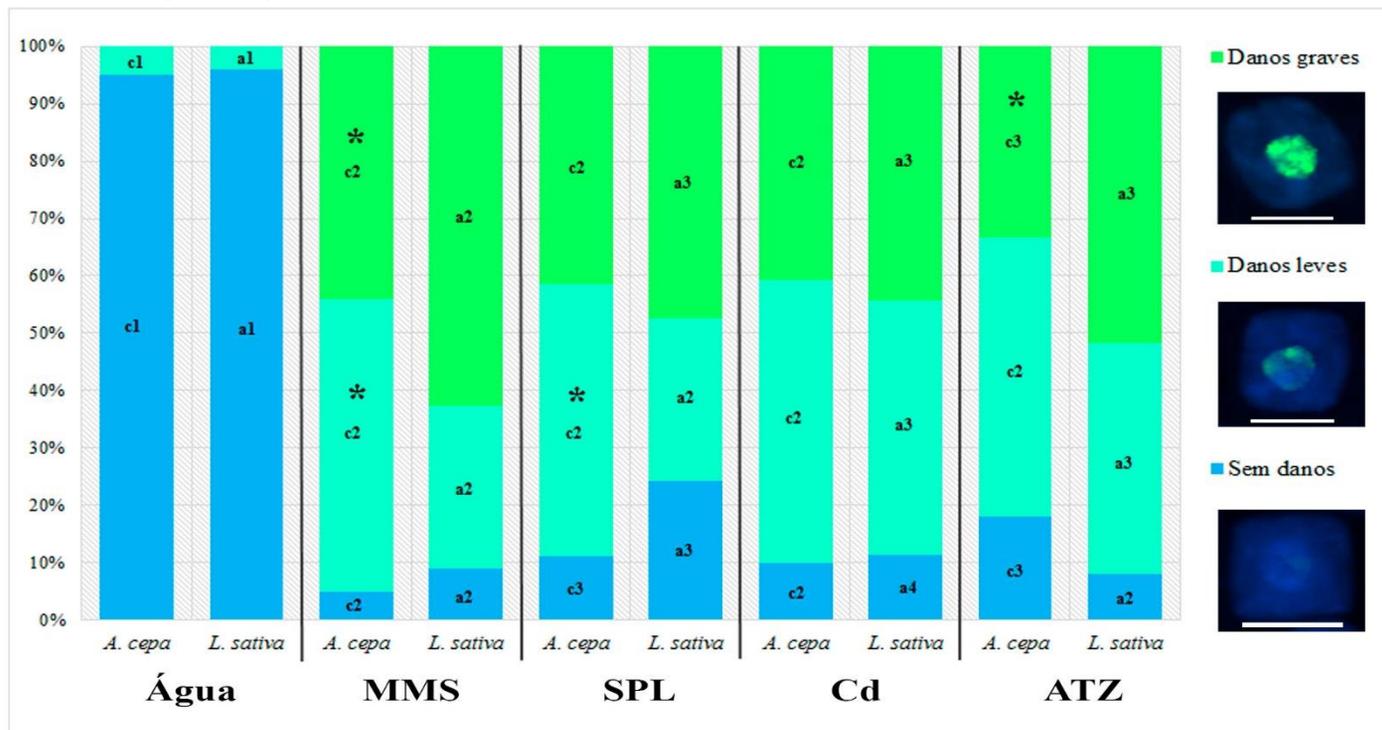
A relação do presente estudo entre a ocorrência de perdas cromossômicas com os danos ao DNA está de acordo com Reis et al. (2016), que ao estudar a instabilidade genômica provocada pela micronucleação de híbridos interespecíficos sintéticos de *Pennisetum purpureum* (capim elefante) e *Pennisetum glaucum* (milheto) observaram uma alta frequência de formação de micronúcleos e de valores de UA para os híbridos que tendem a eliminar cromossomos. No trabalho de Monteiro et al. (2012) com folhas e raízes de alface tratadas com Cd (0, 1, 10 e 50 μM) também foi estabelecida a comparação entre a observação de MCN em análise microscópica e de danos ao DNA pelo ensaio Cometa. Estes autores observaram para as raízes, além de reduções no seu desenvolvimento, alta frequência de MCN nas concentrações de 10 e 50 μM , e alta porcentagem de danos ao DNA na concentração de 10 μM . O que mostra mais uma vez que a comparação realizada no presente estudo é de grande valia para a análise dos efeitos tóxicos de poluentes ambientais. Adicionalmente, em modelos animais, os testes de MCN e Cometa são amplamente utilizados em conjunto para a detecção de mutagenicidade de poluentes ambientais (BIANCHI et al., 2015).

Figura 3 – Núcleos condensados, Micronúcleos e Brotos observados em células de *A. cepa* e *L. sativa* expostas ao MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina).



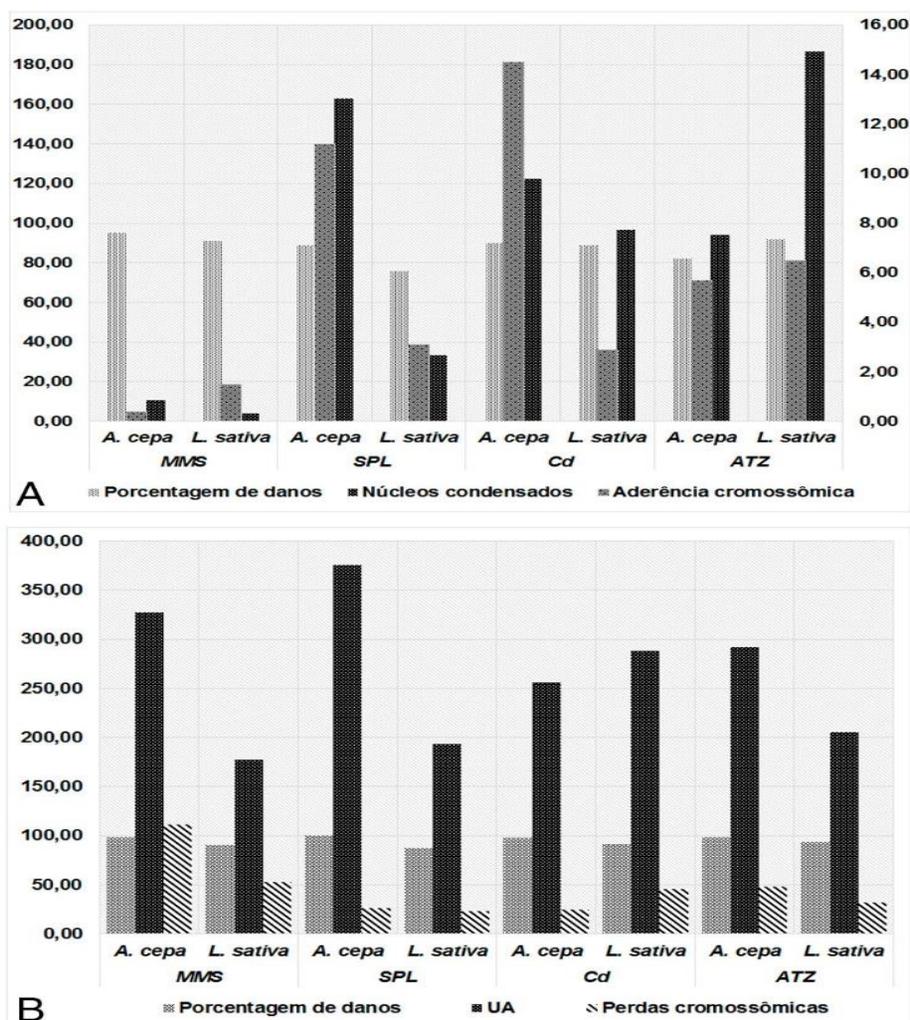
Legenda: A1: Gráfico mostrando a frequência de núcleos condensados observados em células de cebola e alface; A2: Núcleos condensados observados em células de alface, imagem capturada em microscópio de campo claro com a objetiva de 40X; B1: Gráfico mostrando a frequência de micronúcleos observados em células de cebola e alface; B2: Micronúcleo observado em célula de cebola, imagem capturada em microscópio de campo claro com a objetiva de 100X; C1: Gráfico mostrando a frequência de brotos observados em células de cebola e alface; C2: Brotos observado em células de cebola, imagem capturada em microscópio de campo claro com a objetiva de 100X. Barras: 10 μ m. Fonte: Do autor (2016).

Figura 4 – Danos ao DNA observados através da marcação positiva pelo de TUNEL em células de *A. cepa* e *L. sativa* expostas à poluentes ambientais.



Legenda: Células de cebola e alface expostas às soluções de MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina). Os asteriscos (*) referem-se a diferenças estatísticas (Tukey $p < 0,05$) entre alface e cebola. Letra “a” refere-se a espécie alface e letra “c” a espécie cebola. Letras acompanhadas de número diferente, indica diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos de uma mesma espécie em relação ao controle negativo (água). Fonte: Do autor (2016).

Figura 5 – Danos ao DNA em células de *A. cepa* e *L. sativa* expostas às soluções teste, observados pelo teste de TUNEL e ensaio Cometa comparados às alterações observadas pela análise citogenética.



Legenda: A: Danos ao DNA observados através do teste de TUNEL (porcentagem de danos: danos graves + danos leves) comparados aos resultados da análise citogenética (frequência média de aderência cromossômica e núcleo condensado e visualizados a cada 1000 células analisadas); B: Danos ao DNA observados através do ensaio Cometa (porcentagem de danos e UA: unidade arbitrária) comparados aos resultados da análise citogenética (perdas cromossômicas: frequência média de cromossomos não orientados, atrasados e perdidos, fragmentos, brotos e MCN visualizados a cada 1000 células analisadas). MMS (Metil Metano Sulfonato), SPL (Spent Pot Liner), Cd (Cádmio) e ATZ (Atrazina). Fonte: do autor (2016).

Tabela 3 – Danos observados através do ensaio Cometa em células de cebola e alface tratadas durante 48 h com as soluções teste.

	Espécie	Scores					Porcentagem de danos (%)	UA
		0	1	2	3	4		
Água	<i>A. cepa</i>	84,33	15,67	0,00	0,00	0,00	15,67 ± 4,04 _{c1}	15,67 ± 4,04 _{c1}
	<i>L. sativa</i>	86,67	9,67	1,67	2,33	0,00	13,67 ± 3,06 _{a1}	20,00 ± 6,56 _{a1}
MMS	<i>A. cepa</i>	1,67	4,67	12,00	29,33	52,67	98,67 ± 1,53 _{c2}	327,33 ± 64,50* _{c2}
	<i>L. sativa</i>	10,00	31,00	34,67	21,67	3,00	90,33 ± 3,06 _{a2}	177,33 ± 17,56 _{a2}
SPL	<i>A. cepa</i>	0,00	2,33	4,33	8,67	84,67	100,00 ± 0,00* _{c3}	375,67 ± 32,62* _{c3}
	<i>L. sativa</i>	12,67	18,00	37,33	27,67	4,33	87,33 ± 3,79 _{a3}	193,00 ± 20,66 _{a2}
Cd	<i>A. cepa</i>	2,67	4,00	51,00	20,33	22,33	97,67 ± 2,52 _{c2}	256,33 ± 25,93 _{c4}
	<i>L. sativa</i>	8,33	8,00	16,33	21,67	45,67	91,67 ± 5,03 _{a2}	288,33 ± 29,74 _{a3}
ATZ	<i>A. cepa</i>	1,67	10,00	14,67	44,67	29,67	99,00 ± 2,65 _{c2}	292,00 ± 8,72* _{c5}
	<i>L. sativa</i>	6,67	15,33	52,33	19,67	6,67	94,00 ± 2,65 _{a2}	205,67 ± 13,65 _{a2}

Legenda: Média seguida do desvio padrão. Médias seguidas de asterisco (*) referem-se a diferenças estatísticas (Tukey $p < 0,05$) entre cebola e alface. Médias seguidas de letra “a” referem-se a diferenças dentro da espécie alface e médias seguidas de letra “c” para diferenças dentro de cebola, ambas para um mesmo tempo de exposição. Letras acompanhadas de número diferente, indica diferenças estatísticas (Tukey, $p < 0,05$) entre os tratamentos de uma mesma espécie em relação ao controle negativo (água). UA: Unidade Arbitrária. MMS: Metil Metano Sulfonato; SPL: Spent Pot Liner; Cd: Cádmio; ATZ: Atrazina. Fonte: Do autor (2016).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com o ensaio Cometa e o teste de TUNEL estão de acordo com as observações das análises microscópicas, que por sua vez, estão de acordo com os resultados encontrados na análise macroscópica, mostrando que a realização destes testes em conjunto são de grande valia, pois ajudam na comprovação e melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na ação tóxica das substâncias testadas.

O rápido desenvolvimento inicial das plântulas e alto IM observado para as plântulas de alface, são quesitos que deixam este vegetal a frente da cebola, no entanto, nos testes aplicados para avaliar morte celular e fragmentação do DNA (teste de TUNEL e ensaio Cometa), a cebola apresentou maior sensibilidade aos efeitos tóxicos das substâncias testadas.

As respostas obtidas com as substâncias testadas e as diferentes análises propostas neste estudo, permitem concluir que cebola e alface são excelentes modelos vegetais, pois permitem a análise de diferentes parâmetros em conjunto de forma simples com rapidez e eficiência na obtenção dos resultados.

Diante disso, é possível concluir que a escolha entre um destes vegetais modelo para a realização de testes aplicados à toxicologia ambiental vai depender principalmente do *endpoint* avaliado.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsas de Iniciação Científica e Mestrado aos autores deste trabalho. Ao Professor Luiz Antônio Augusto Gomes, do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), por ceder as sementes de *Lactuca sativa* L. que foram utilizadas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**. Sint-Katelijne-Waver, v. 107, p. 140-146, 2012.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 74, n. 4, p. 882–888, 2011.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, n. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 706–710, 2008.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on *Lactuca sativa* L. **Allelopathy Journal**. Haryana, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environ. Res.** San Diego, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

BEHBOODI, B. SH.; SAMADI, L. Detection of apoptotic bodies and oligonucleosomal DNA fragments in cadmium-treated root apical cells of *Allium cepa* Linnaeus. **Plant Science**. Clare, v. 167, n.3, p. 411–416, 2004.

BELLING, J. On Counting Chromosomes in Pollen-Mother Cells. **The American Naturalist**. Chicago, v. 55, p. 573-574, 1921.

BIANCHI, J.; MANTOVANI, M. S.; MARIN-MORALES, M. A. Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture. **Journal of Environmental Sciences**. Beijing, v. 36, p. 102-111, 2015a.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D. C.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 120, p. 174-183, 2015b.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**. Oxford, v. 72, n. 5, p. 722-725, 2008.

CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**. Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 46-52, 2005.

COLLINS, A. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**. New York, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; EL-YOUSER, M. A. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. Oxford, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. San Diego, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. Lund, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FREITAS, A. S. et al. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca*

sativa L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 124, p. 426-434, 2016.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRILLO, R. et al. Poly(-caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. **Journal of Hazardous Materials**. Amsterdam, v. 231, p. 1–9, 2012.

GRILLO, R. et al. Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres. **Journal of Polymers and the Environment**. Heidelberg, v. 18, n. 1, p. 26-32, 2010.

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**. Saint Louis, v. 13, p. 66-74, 2010.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Assessing Toxicity of Copper, Cadmium and Chromium Levels Relevant to Discharge Limits of Industrial Effluents into Inland Surface Waters Using Common Onion, *Allium cepa* Bioassay. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. New York, v. 94, n. 2, p. 199–203, 2015.

HOU, J. et al. Seed germination, root elongation, root-tip mitosis, and micronucleus induction of five crop plants exposed to chromium in fluvo-aquic soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**. Malden, v. 33, n. 3, p. 671–676, 2014.

JOVTCHEV, G.; MENKE, M.; SCHUBERT, I. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 493, p. 95–100, 2001.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

MALUSZYNSKA, J., JUCHIMIUK, J. Plant Genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. **Plant Genotoxicity**. Katowice, v. 56, p. 177-184, 2005.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**. Ribeirão Preto, p. 4808-4819, 2014.

MONTEIRO, C. et al. Cadmium-induced cyto-and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. **Chemical Research in Toxicology**. Washington, v. 25, n. 7, p. 1423-1434, 2012.

MONTEIRO, M. S. et al. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 73, n. 6, p. 1231-1237, 2010.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, Soil Pollut**. Amsterdam, v. 227, n. 5, p. 1-10, 2016.

PALMIERI, M. J. et al. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research**. Amsterdam, v. 763, p. 30-35, 2014.

R Development Core Team. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. 2014.

REIS, G. B. et al. Tissue-specific genome instability in synthetic interspecific hybrids of *Pennisetum purpureum* (Napier grass) and *Pennisetum glaucum* (pearl millet) is caused by micronucleation. **Chromosome Research**. Heidelberg, p. 1-13, 2016.

SERRANO, L.; MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. Malden, v. 38, p. 38-45, 2001.

TIGRE, R. C. et al. Allelopathic and bioherbicidal potential of *Cladonia verticillaris* on the germination and growth of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 84, p. 125-132, 2012.