



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA –CITA**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA E
CITOTÓXICA DA ÁGUA DO IGARAPÉ SÃO FRANCISCO,
RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

SERGIO LUIZ PROLO JÚNIOR

RIO BRANCO, AC
MARÇO/2020

SERGIO LUIZ PROLO JÚNIOR

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA E
CITOTÓXICA DA ÁGUA DO IGARAPÉ SÃO FRANCISCO,
RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

Co-orientadores: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva

Profa. Dra. Cydia de Menezes Furtado

RIO BRANCO, AC
MARÇO/2020

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

- P964a Prolo Júnior, Sergio Luiz, 1985 -
Avaliação genotóxica, mutagênica e citotóxica da água do igarapé São Francisco, Rio Branco, Acre, Brasil / Sergio Luiz Prolo Júnior; orientador: Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti e co-orientador: Dr. Romeu Paulo Martins Silva. – 2020.
87 f.: il.; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, 2020.
- Inclui referências bibliográficas e anexo.
1. Ecotoxicologia. 2. *Allium cepa*. 3. Poluição ambiental. I. Meneguetti, Dionatas Ulises de Oliveira (Orientador). II Silva, Romeu Paulo Martins (Orientador). III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA E
CITOTÓXICA DA ÁGUA DO IGARAPÉ SÃO FRANCISCO,
RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

SERGIO LUIZ PROLO JÚNIOR

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 30/03/2020

Prof. Dr. Dionatas Ulises, de Oliveira Meneguetti
Presidente da Banca - Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. Tiago Lucena da Silva
Membro Externo - Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. Francisco Carlos da Silva
Membro Externo – Centro Universitário São Lucas

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, na pessoa da Dra. Clarice Maia Carvalho e demais docentes, a oportunidade de qualificar-me e assim contribuir para o desenvolvimento científico na Amazônia.

Ao Centro Multidisciplinar na pessoa do professor Dr. Reginaldo Assêncio Machado, por possibilitar aos docentes e técnicos a oportunidade de qualificação profissional.

Ao professor Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, pela paciência e sabedoria compartilhada no desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grato pela vossa orientação e parceria que espero que seja longínqua.

À minha colega de mestrado Hémilly Caroline da Silva Paixão, que nos momentos mais difíceis me ajudou com conselhos e desenvolvimento metodológicos.

Ao meu co-orientador professor Dr. Romeu Paulo Martins Silva pelos conselhos e parcerias estabelecidas.

À minha co-orientadora Dra. Cydia de Menezes Furtado pelas contribuições nas análises físico-químicas e apoio na realização deste trabalho.

À Unidade de Tecnologia de Alimentos, nas pessoas de Rui Santana de Menezes e Osmar da Silva Torres pela presteza e auxílio nas análises físico-químicas e microbiológicas.

Aos amigos e parceiros de laboratório Francisco Vaniclei Araújo da Silva e Bruna Alencar França Lima pelo auxílio nas coletas de campo.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, a gentileza e presteza em avaliar o presente trabalho.

À Fundação Nacional de Saúde pelo financiamento do projeto.

À Universidade Federal do Acre pelo afastamento concedido para o mestrado.

RESUMO

A genotoxicidade de um agente físico ou químico possui o potencial de promover alterações genéticas, estruturais, informacionais ou segregacionais no material genético e com isso comprometer a integridade dos seres vivos. Biomonitoramentos que investiguem e detectem potenciais genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos são fundamentais para a verificação da qualidade dos ecossistemas aquáticos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas provenientes do igarapé São Francisco da cidade de Rio Branco, Acre, Brasil. Foi desenvolvida uma revisão de literatura acerca dos principais métodos genotóxicos e posteriormente uma adaptação do teste de *Allium cepa*. A metodologia utilizada para avaliar os potenciais foi o teste de *A. cepa*. Foram coletadas amostras de água, em 10 pontos no mês de junho, período de seca (95mm) e dezembro, período chuvoso (452mm), no ano de 2019, no igarapé São Francisco na região urbana e uma amostra da Nascente da região rural. Cada amostra foi utilizada para a germinação das sementes, sendo colocadas em duas placas de petri com papel filtro, contendo 100 sementes cada. As sementes germinaram sob temperatura constante de 24°C, sendo irrigadas uma vez ao dia. Após 3 dias, os meristemas foram coletados e submetidos a técnica de coloração pororceína acética 2%. Foram analisadas 5000 células por amostra, sendo identificadas células em interfase, mitose, anormalidades nucleares e cromossômicas e micronúcleos. No período de seca, os índices mitóticos foram significativamente menores nos pontos 4 e 10 em relação ao controle e os pontos 4, 6, 8 e 10 à nascente, já no período chuvoso os pontos houve uma diminuição do índice mitótico nos pontos 2, 3, 8, 9 e 10 em relação à nascente e o ponto 10 em relação ao controle. Somente o ponto 4 apresentou resultados menores na seca e o ponto 7 no chuvoso. Durante o período de seca os pontos 1, 2 e 3 apresentaram uma maior quantidade de micronúcleos tanto em relação ao controle quanto a nascente, porém na estação chuvosa, somente o ponto 2 continuou demonstrando esse fenômeno. Foram encontrados valores significativos em relação ao controle negativo em 9 dos 10 pontos ao longo do igarapé, com exceção do ponto 7, demonstrando assim que existem agentes causadores de alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; *Allium cepa*; Poluição ambiental.

ABSTRACT

The genotoxicity of a physical or chemical agent has the potential to promote genetic, structural, informational or segregational changes in the genetic material and thereby compromise the integrity of living beings. Biomonitoring that investigates and detects genotoxic, cytotoxic and mutagenic potentials is essential for verifying the quality of aquatic ecosystems. This study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of waters from the São Francisco stream in the city of Rio Branco, Acre, Brazil. A literature review was developed about the main genotoxic methods evaluations and later an adaptation of the *Allium cepa* assay. The methodology used to evaluate the potentials was the *A. cepa* test. Water samples were collected at 10 points in the months of June, dry season (95mm) and December, rainy season (455mm), in the year of 2019, in the urban region of São Francisco stream and a sample of the spring in the rural region. Each sample was used for seed germination, placed in two petri dishes with filter paper, containing 100 seeds each. The seeds germinated under a constant temperature of 24 ° C, they were irrigated once a day. After 3 days, the meristems were collected and submitted to the 2% acetic orcein staining technique. 5000 cells were analyzed per sample, identifying cells on interphase, mitosis, nuclear and chromosomic alterations and micronuclei. In the dry season, the mitotic indexes were significantly lower on points 4 and 10 compared to the control and points 4, 6, 8 and 10 from the spring, while in the rainy season the points that showed a decrease in the mitotic index were 2, 3, 8, 9 and 10 in relation to the spring and point 10 in relation to the control. Only point 4 showed lower results in drought and point 7 in rainy. During the dry season, points 1, 2 and 3 showed a greater amount of micronuclei both in relation to the control and the spring, but in the rainy season, only point 2 continued to demonstrate this phenomenon. Significant values were found in relation to the negative control in 9 of 10 points along the stream (exception of point 7), thus demonstrating that there are agents that cause cytotoxic, genotoxic and mutagenic alterations.

Keywords: Ecotoxicology; *Allium cepa*; Enviromental polution.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo II	
Figura 1. Fotos das lâminas de meristema de <i>A. cepa</i> em diferentes períodos.	35
Capítulo III	
Figura 1. Mapa do Estado do Acre e Brasil, identificando o município da nascente (Bujari) e pontos de coleta (Rio Branco).	42
Figura 2. Imagem de satélite identificando os pontos de coleta na área urbana do município de Rio Branco.	42
Figura 3. Meristemas de <i>A. cepa</i> submetidos a amostras de água do igarapé São Francisco, Rio Branco, Acre.	47
Figura 4. Comparação dos Índices mitóticos, Anomalias nucleares e cromossômicas e Micronúcleos, entre os períodos de Verão (Junho) e Inverno Amazônico (Dezembro).	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Capítulo III	
Tabela 1. Tabela 1: Valores médios e desvio padrão do Índice Mitótico (IM), Anomalias Cromossômicas e Nucleares (ACN) e Micronúcleos (MN) das coletas do período de Verão (VA) e Inverno Amazônico (IA).	44

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. CAPÍTULO I - ANÁLISE GENOTÓXICA: MÉTODOS E APLICAÇÕES.	17
4. CAPÍTULO II - ADAPTAÇÃO DO TESTE DE <i>Allium cepa</i> PARA AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA.....	32
5. CAPÍTULO III - POTENCIAL GENOTÓXICO E CITOTÓXICO DA ÁGUA DO IGARAPÉ SÃO FRANCISCO, RIO BRANCO, ACRE, BRASIL.....	38
6. ANEXOS.....	55
6.1 CAPÍTULO DE LIVRO – TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE.....	56
6.2 CAPÍTULO DE LIVRO – A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA TESTE DE <i>Allium cepa</i> PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA.....	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

A água é um bem mineral fundamental para a fisiologia e manutenção da vida (WHO, 2018). A colonização humana se deu historicamente em torno de rios, riachos e lagoas, oferecendo assim aos povos um importante recurso à sobrevivência (FRANÇA, 2006). A disponibilidade e característica da água no globo terrestre é classificada em dois tipos: salgada (que compreende aproximadamente 97,5%) e doce (com cerca de 2,5%), essa última que está distribuída na seguinte proporção: 69% em geleiras, 30% em águas subterrâneas e apenas 1% em rios (MARTINS; LUZ; ADAMATTI, 2017; ANA, 2018; LIMA et al., 2018).

O Brasil apresenta aproximadamente 12% do total de água doce no mundo, sendo a região Norte a maior em termos de disponibilidade com 80%, apesar de possuir somente cerca de 5% da população brasileira, enquanto o restante do país, com 95% da população, tem acesso apenas a 20% desse recurso hídrico (GIATTI; CUTOLO, 2012; ANA, 2018).

A colonização e expansão urbana ao longo dos corpos d'água, representam uma ameaça aos ecossistemas aquáticos, visto que acabam sendo alvos de despejo de efluentes domésticos, industriais e agrícolas (MARINHO, 2017). A capacidade da água de solubilizar diversas substâncias, pode influenciar no transporte de contaminantes para longe dos focos de contaminação, podendo disseminar esses produtos em ambientes distantes (SANTOS et al., 2017; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018).

Substâncias químicas provenientes da poluição ambiental, tais como compostos orgânicos e metais pesados, podem alterar a atividade celular, inibindo atividades enzimáticas e alterando seu material genético (MACEDA et al., 2015).

Alguns dos compostos que alteram o material genético das células são denominados de mutagênicos, esses agentes podem alterar o metabolismo celular, de forma que, as células podem perder o controle de regulação da expressão gênica, desencadeando mecanismos apoptóticos e formação de células neoplásicas (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003; CARITÁ, 2010).

Ensaio que envolvem análises genotóxicas possibilitam a visualização destes efeitos macro e microscopicamente, sendo possível observar, a ação direta no desenvolvimento celular e tecidual (CHANDRA et al., 2005). A genotoxicidade de um agente físico ou químico possui o potencial de promover alterações genéticas, estruturais, informacionais ou segregacionais no DNA, que podem causar danos ao material genético, provocando anormalidades cromossômicas, tais como metáfase com aderência, C-Metáfases, metáfase com perdas cromossômicas, pontes anafásicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas cromossômicas, e anormalidades nucleares, tais como brotamentos e multinucleação

(PALSIKOWSKI et al., 2017; DUSINSKA et al., 2019, PROLO JÚNIOR et al., 2019). Essas alterações causadas por agentes genotóxicos podem formar fragmentos cromossômicos que não são incorporados ao núcleo após a mitose, resultando em corpúsculos denominados micronúcleos (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013), que medem cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal (PEREIRA JÚNIOR, 2015).

Alguns dos testes para análise de parâmetros citotóxicos e mutagênicos utilizam a espécie *Allium cepa*, conhecida popularmente como cebola de cabeça. Trata-se de um teste de baixo custo e alta eficiência, sendo utilizado para biomonitoramento de contaminantes ambientais (FISKESJÖ, 1985; PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; MALINI et al., 2010; LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018). A utilização de plantas para ensaios de genotoxicidade é de grande importância, pois dispensa a preparação de meios de cultura elaborados, estabelecimento de ambientes extremamente controlados, autorização de Comitês de Ética em Pesquisa, além de apresentarem uma boa correlação quando a outras metodologias que utilizam animais ou microrganismos para o mesmo tipo de análise (FISKESJÖ, 1988; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MENEGUETTI et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012).

Os biomonitoramentos de rios, riacho e igarapés são fundamentais, uma vez que agentes contaminantes podem apresentar uma alta biodisponibilidade e bioacumulação em diferentes níveis tróficos ambientais (SILVA et al., 2004; SANTOS et al., 2017), inclusive podendo provocar efeitos mutagênicos e citotóxicos, afetando a integridade genética dos seres vivos e direta ou indiretamente as comunidades e ecossistemas (KASPER et al., 2018).

O crescimento populacional demanda recursos ambientais, tais como novas áreas para ocupação, alimentos e água, sendo que historicamente as populações ocupam desordenadamente as margens de rios e riachos, e ausência de políticas públicas de saneamento, acabam por ali despejarem seus dejetos (FRANÇA, 2006). Assim como indústrias que utilizam o recurso hídrico em seus processos de produção, e muitas vezes, não realizando o tratamento adequado de seus resíduos, liberando-os nos cursos d'água (COSTA, 2017; RIBEIRO; ROLIM, 2017).

A proteção e monitoramento dos recursos hídricos superficiais é importante para garantir a sustentabilidade hídrica das cidades, pois desta forma possibilita a preservação da qualidade da água para o consumo, produção de comida e uso recreativo (WHO, 2018).

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ANA. AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). Água no mundo: Situação da Água no Mundo. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/agua-no-mundo>>. 10 de setembro de 2019.

_____. Panorama das águas: Quantidade de Água. Disponível em: <<http://www3.ana.gov.br/portal/ANA/panorama-das-aguas/quantidade-da-agua>>. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de Amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da Cidade de Santa Gertrudes – SP**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular. Universidade Estadual Paulista, 2010.

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**, n. 72, p.722-725, 2008.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment**, n. 347, p. 46–52, 2005.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, p. 59-72 2018.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

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

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

FRANÇA, D. D. **Avaliação da atividade mutagênica de águas superficiais utilizadas para abastecimento público após tratamento na bacia dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Universidade de São Paulo, 2006.

GIATTI, L. L.; CUTOLO, S. A. Acesso à água para consumo humano e aspectos de saúde pública na Amazônia Legal. **Ambiente & Sociedade**, v. 15, n. 1, p. 93-109, 2012.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 3, p.1-10, 2018.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotoxicidade e mutagenicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

LIMA, W. T.; OLIVEIRA, A. M. L.; SILVA, I. A.; TANANTA, C. T.; COSTA, H.; et al. Uma geopolítica para as águas continentais na Amazônia Ocidental. **Revista de Geopolítica**, v. 9, n. 1, p. 11-21, 2018.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p.117-129, 2015.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S.; MATSUMOTO, S. T.; et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n.1, p.176-181, 2010.

MARINHO, M. L.; MORAES, V. H. T.; VASCONCELOS, M.; NASCIMENTO, W. S.; SERAPIÃO, D. X.; MELO, A. M. M. A.; et al. Análise ecotoxicológica e mutagênica da região têxtil de Toritama utilizando *Daphnia magna* e *Biomphalaria glabrata*. In: ENCONTRO ANUAL DA BIOFÍSICA. 2017, Recife, Pernambuco, Brasil. **Anais: Biofísica e Radiobiologia, Biociências, UFPE**. p. 36-38, 2017

MARTINS, V. B.; LUZ, R. M.; ADAMATTI, D. F. Educando e conscientizando crianças a respeito do uso da água potável através de jogos. **Scientia Plena**, v. 13, n. 4, p. 1-10, 2017.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETTO, P. O.; RAMOS, L. J.; et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 181-187, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; 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**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2012.

OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. In: **VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**. E-book VIII Jornada Científica do CEDSA, v. 8. p. 73-88, 2013.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PEREIRA JÚNIOR, J. L. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do teste de micronúcleo em *Allium cepa***. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PROLO JÚNIOR, S. L.; PAIXÃO, H. C. S.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise Genotóxica: Métodos e Aplicações. In: **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**. 1 ed.: Stricto Sensu Editora, 2019, v.1, p. 149-162.

RIBEIRO, L. G. G.; ROLIM, N. D. Planeta água de quem e para quem: uma análise da água doce como direito fundamental e sua valoração mercadológica. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**, v.7, n. 1, p. 7-33, 2017.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. 356p.

SANTOS, C. S.; JÚNIOR, D. S. S; OLIVEIRA, J.S.; CASTRO, K. M. S. A; FEITOSA, M. B. J.; PANTALEÃO, S. M.; et al. Potencial mutagênico de um afluente do Rio Vaza-Barris (SE), por meio do sistema-teste micronúcleo (TMN) em molusco bivalve. **Scientia Plena**, v. 13, n. 10, p. 1-6, 2017.

SILVA, M. F. P. T. B.; FERRARI, G. P.; TOLEDO, F.; ROCHA, C. M. L. S C.; VICENTINI, V. E. P.; et al. Mutagenic effect of fresh water (well, rivers Fichta and Minas Gerais, close to the town of Ubiratã, Paraná, Brazil) in the animal test system. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 101-105, 2004.

WHO, World Health Organization. Health topics: Water. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/water/en/>>. Acesso em: 10 de setembro de 2019.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

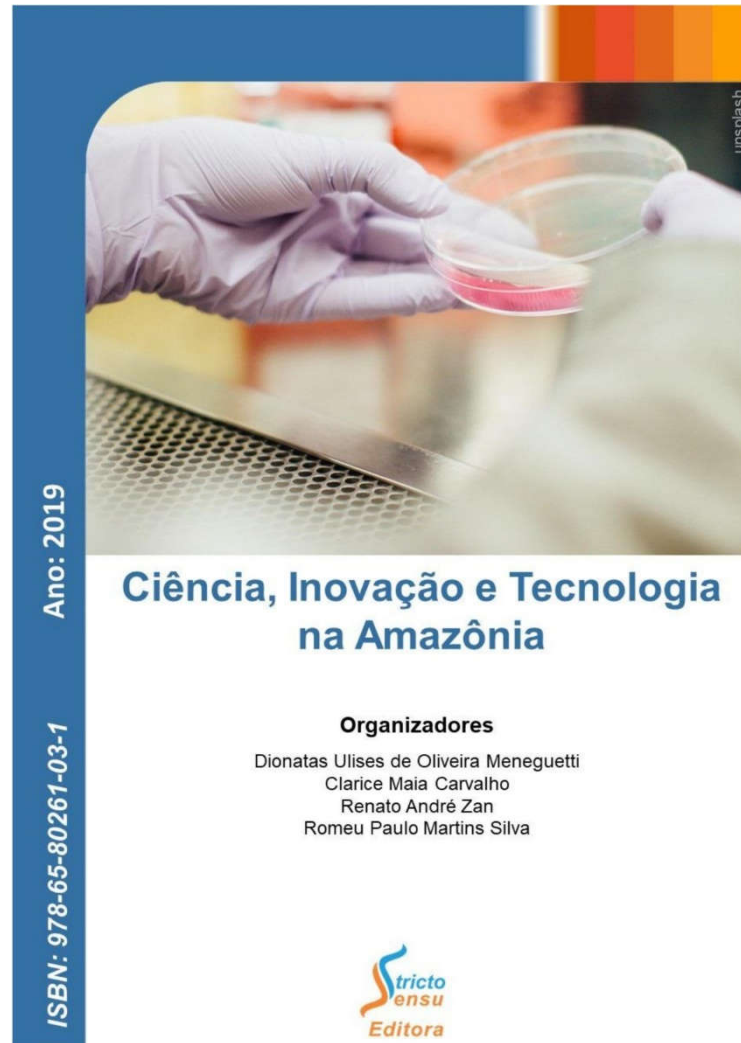
- Avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico de possíveis contaminantes presentes na água do Igarapé São Francisco no município de Rio Branco, Acre.

2.2 ESPECÍFICOS

- Descrever as principais técnicas de análises genotóxicas;
- Desenvolver uma adaptação do protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) para avaliação genotóxica e mutagênica;
- Averiguar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água do Igarapé São Francisco em período chuvoso e de estiagem.

3. CAPITULO I – Análise Genotóxica: Métodos e Aplicações

O capítulo I foi publicado como capítulo no livro *Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia*.



CAPÍTULO 11

ANÁLISE GENOTÓXICA: MÉTODOS E APLICAÇÕES

Sérgio Luiz Prolo Júnior^{1,2}, Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Laura Nadyne da Silva Silvestre¹, Romeu Paulo Martins Silva¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,3}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Genotoxicidade é a capacidade de um agente causar danos ao material genético das células. Substâncias químicas e agentes físicos derivados de poluição ambiental, drogas e afins podem ser difíceis de serem detectados por testes físico-químicos, então modelos biológicos são adequados para uma melhor compreensão dos potenciais danos que oferecem aos seres vivos. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização de testes de avaliação de genotoxicidade. Dentre as principais técnicas aplicadas para ensaios genotóxicos destacam-se o teste de *Allium cepa*, Ensaio Cometa e SOS Chromotest, sendo estas as mais frequentes utilizadas em experimentos. Estas técnicas apresentam boa correlação quando comparadas a outros testes, permitindo que o pesquisador adote o melhor método para a realização de seu experimento de acordo com sua realidade.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

ABSTRACT

Genotoxicity is the ability of an agent to cause damage to the genetic material of cells. Chemicals and physical agents derived from environmental pollution, drugs and others, may be difficult to detect by physical-chemical tests, so biological models are adequate for a better understanding of the potential damage they offer to living beings. The objective of the present study was to perform a literature review demonstrating the main techniques used to execute genotoxicity evaluation tests. Among the main techniques applied for genotoxic assays, *Allium cepa*, Comet Assay and SOS Chromotest tests are the most frequent tests used in experiments. These techniques present a good correlation when compared to other tests, allowing the researcher to adopt the best method to carry out their experiment according to their reality.

Keywords: Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

1. INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a molécula que armazena as informações genéticas nas células, sendo que sua integridade e estabilidade é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos (GAJSKI, 2019). Esta molécula está localizada em

compartimentos celulares, sendo armazenada no citoplasma de procariotos e núcleo em eucariotos, mesmo assim ela pode sofrer alterações mediadas por agentes físicos ou químicos do ambiente, podendo gerar danos que eventualmente levam a mutações, desencadeando patologias, incluindo câncer (LEME; MORALES, 2009; HELLEDAY; ESHTAD; NIK-ZAINAL, 2014; ZHANG et al., 2018; FATEH et al., 2019; GERÍĆ et al., 2019).

Substâncias químicas provenientes da poluição ambiental, tais como compostos orgânicos e metais pesados, podem alterar a atividade celular, inibindo atividades enzimáticas e alterando seu material genético (MACEDA et al., 2015; KASPER et al., 2018).

A genotoxicidade é um termo geral que refere-se a capacidade de um agente provocar alterações genéticas, sejam de ordem estrutural, informacional ou de segregação do DNA, que podem levar a danos no material genético, provocando aberrações cromossômicas, tais como C-Metáfases, metáfase com aderência, metáfase com perdas cromossômicas, pontes anafásicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas cromossômicas e anormalidades nucleares, são algumas evidências de alterações desencadeadas por agentes genotóxicos (PALSIKOWSKI et al., 2017; DUSINSKA et al., 2019).

O termo mutagenicidade está associado à genotoxicidade, uma vez que se caracteriza pela indução de mutações no material genético de forma permanente, ou seja, um agente genotóxico leva a mutagenidade (ARAÚJO, 2013; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Ensaio que envolvem análises genotóxicas possibilitam a visualização destes efeitos macro e microscopicamente, sendo possível observar, a ação direta no desenvolvimento celular e tecidual (CHANDRA et al., 2005). Essas alterações causadas por agentes genotóxicos podem formar fragmentos cromossômicos que não são incorporados ao núcleo após a mitose, resultando em corpúsculos denominados micronúcleos (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013), que medem cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal (PEREIRA JÚNIOR, 2015). Os micronúcleos são componentes citoplasmáticos de material genético nuclear incorporados durante a divisão celular, demonstrando assim que houve erro durante a replicação do DNA cromossômico e ou da divisão celular (FLORES-BRACHO et al., 2019).

As análises genotóxicas são realizadas afim de detectar se agentes químicos, físicos e biológicos, são capazes de alterar o material genético das células, e conseqüente, produzir mutações que podem comprometer a viabilidade celular (ROBERTO et al., 2016).

A aplicabilidade de testes genotóxicos é bastante ampla, destacam-se testes investigativos para análise de ecossistemas aquáticos (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018; GUERREIRA, 2019), análise de componentes fitoquímicos (MENEGUETTI et al., 2015; ROBERTO et al., 2016; LIMAN; CIĞERCI GÖKÇE, 2018; WOLFF et al., 2018; MEDEIROS et al., 2019; FATEH et al., 2019), resíduos laboratoriais e industriais (MAZZEO et al., 2015; ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; ITOH; HATTORI, 2019; KHAN; ANAS; MALIK, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019), nanopartículas (BHAGAT; S; SHYAMA, 2019; DELMOND et al., 2019; DU et al., 2019; DUSINSKA et al., 2019; GHOSH et al., 2019), metais pesados (DELMOND et al., 2019) e metabólitos microbiológicos (GERIĆ et al., 2019; LACERDA et al., 2019).

Muitas análises físico-químicas por vezes podem apresentar certa dificuldade em elucidar se determinado efluente, droga, moléculas, metabólitos e afins, apresentam toxicidade para os seres vivos, pois podem se apresentar em pequenas concentrações, portanto testes genotóxicos vem a complementar tais análises, uma vez que organismos biológicos são susceptíveis a certos agentes, mesmo em baixas concentrações (KHAN; ANAS; MALIK, 2019).

Existe uma ampla gama de ensaios genotóxicos, cada qual com um organismo biológico adequado, dentre os testes, destacam-se o teste de *Allium cepa* (plantas), Ensaio Cometa (animais) e SOS Chromotest (bactérias). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de análise genotóxica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TESTE DE *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* foi inicialmente utilizada como organismo biológico a partir do ano 1920, e desde então, diversos estudos relacionados a toxicidade e genotoxicidade utilizam essa espécie em experimentos, pois trata-se de um teste de baixo custo e alta eficiência (FISKESJÖ, 1985; PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; MALINI et al., 2010; LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018). A utilização de plantas para ensaios de genotoxicidade é de grande importância, pois dispensa a preparação de meios de cultura elaborados, estabelecimento de ambientes extremamente controlados, autorização de Comitês de Ética em Pesquisa, além de apresentarem uma boa correlação quando a outras

metodologias que utilizam animais ou microrganismos para o mesmo tipo análise (FISKESJÖ, 1988; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MENEGUETTI et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; IQBAL et al., 2019; QUADRA et al., 2019).

O teste de *A. cepa* possui diversas adaptações, sendo que será apresentado dois protocolos de execução, um utilizando sementes e outro bulbos.

2.1.1 Sementes de *Allium cepa*

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Palsikowski et al. (2017):

- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (100 sementes por placa, duas placas para cada tratamento);
- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando como meio as amostras a serem analisadas (extratos, efluentes, etc).
- c) Utilizar como Controle Negativo, água ultrapura e Controle Positivo, Metanossulfonato de metila em concentração de $4\times 10^{-4}\text{M}$ e Trifluralina em 0,84 ppm (Dois controles positivos, cada qual consiste em um tratamento independente);
- d) Após os meristemas crescerem cerca de 1,5 cm em comprimento, devem ser coletados e fixados em solução Carnoy (3:1 Álcool-Ácido Acético) durante 6h a temperatura ambiente;
- e) Substituir a solução de Carnoy e depois armazenar a 4°C até a preparação;
- f) Submeter os meristemas fixados à Reação de Feulgen (MELO; VIDAL, 1978);
- g) Colocar os meristemas em lâminas, pingar uma gota de solução de Carmim acético 2%.
- h) Cobrir a lâmina com lamínula e pressionar suavemente para realizar o esmagamento do meristema;
- i) Remover a lamínula, colocando e retirando a lâmina rapidamente sobre nitrogênio líquido;
- j) Realizar a preparação permanente da lâmina utilizando resina sintética;
- k) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- l) Contar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.

Seguindo o protocolo acima descrito, é possível avaliar os seguintes índices propostos por Palsikowski et al. (2017):

Fitotoxicidade por meio do Índice de Germinação (GI):

$$GI = \frac{\text{Número total de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes expostas}} \times 100$$

Citotoxicidade, avaliando o Índice Mitótico (MI):

$$MI = \frac{\text{Número total de células em divisão (Mitose)}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Genotoxicidade, avaliada por meio do Índice de Alterações Cromossômicas. Consideram-se as células que contém aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, C-metáfase, multipolaridade e pontes) e anormalidades nucleares (células binucleadas, trinucleadas e núcleos lobulados):

$$CAI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Mutagenicidade, avaliando o Índice de Mutagenicidade (MutI) por meio da presença de micronúcleos:

$$MutI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

2.1.2 Bulbos de *Allium cepa*

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

- a) Adquirir 10 bulbos de *A. cepa* (pequenas, uniformes, da mesma origem, não germinadas e sadias) para cada amostra e controle;
- b) Colocar cada bulbo para germinar em frascos de 50 ml, com o fundo imerso na amostra e no controle (água mineral);

- c) Coletar os meristemas após cerca de 72 horas com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento;
- d) Lavar os meristemas em água destilada;
- e) Hidrolisar com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, resfriar os tubos em água corrente;
- f) Lavar os meristemas com água destilada;
- g) Realizar a preparar em duas lâminas por bulbo, utilizando a técnica de esmagamento;
- h) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- i) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- j) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- k) Contar 1.000 células por lâmina;

Para uma melhor conservação da lâmina, Lopes (2016) sugere a colocação de uma gota verniz vitral incolor Acrilex® (PAIVA et al., 2006), posteriormente a colocação de uma lamínula e secagem *overnight*, desta forma a lâmina se torna permanente, facilitando sua visualização por um longo período de tempo.

O teste de *A. cepa* modificado de Meneguetti et al. (2012), permite a realização desta metodologia de uma forma rápida, mais econômica e já foi comprovada sua eficiência por meio dos trabalhos realizados por Ancia e Romão (2016), Meneguetti et al. (2014) Vanuchi et al. (2015) Lopes (2016).

Para ambos os protocolos descritos podem ser utilizados os índices de Palsikowski et al. (2017) previamente apresentados, com exceção do Índice de Germinação.

2.2 ENSAIO COMETA

Esta metodologia foi introduzida pelos cientistas suecos Ostling and Johanson em 1984, ela consiste na análise do dano causado por um agente a molécula de DNA, que foi nomeada a partir da semelhança da imagem que o DNA analisado deixa após uma eletroforese (RAJAPAKSHA; WIJAYARATHNA, 2017).

Esta técnica é relativamente simples, sensível, confiável e de baixo custo, sendo que diferentes organismos biológicos podem ser utilizados para sua realização, tais como

células humanas e de outros animais, leveduras, plantas e protozoários (GAJSKI, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019).

2.2.1 Ensaio Cometa com sangue periférico de peixes

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Caritá (2010), baseado na metodologia de Singh et al. (1988):

- a) Submergir as lâminas em agarose normal 1,5% a 60°C, secar e armazenar em geladeira;
- b) Coletar amostras de 3µL de sangue de peixes e diluir em 1000µL de solução fisiológica de vertebrados;
- c) Colocar 10µL da suspensão celular nas lâminas e adicionar 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C;
- d) Incubar em uma solução de lise (1mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de Lauryl sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, uma hora.
- e) Após a lise, transferir as lâminas para cuba de eletroforese, contendo solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12,1) à 4°C, em corrente 49V e 300mA, por 20 minutos;
- f) Neutralizar as lâminas em solução tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secar a temperatura ambiente e fixar com etanol 100% durante dez minutos.
- g) Realizar a coloração foi com Brometo de Etídio (0,02 mg/mL);
- h) Visualizar em microscópio de fluorescência, aleatoriamente, 100 nucleoides de cada peixe;
- i) Os nucleoides são classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995) e de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível); classe 1 (pequeno dano - cauda menor que uma vez o tamanho do nucleoide); classe 2 (médio dano – cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleoide); e classe 3 (grande dano - cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleoide).

2.2.2 Ensaio Cometa com *A. cepa*

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Liman, Acikbas e Ciğerci, (2019), baseado no protocolo de Tice et al. (2000):

- a) Submeter a germinação bulbos de *A. cepa* contendo as amostras a serem analisadas (seguir as orientações do experimento com *A. cepa* do referido trabalho);
- b) Selecionar 10 meristemas de cada tratamento;
- c) Realizar a extração nuclear, colocando 500 μL por meio de solução gelada de tampão Tris-MgCl₂ (4 mM MgCl₂–6H₂O; 0,2 M Tris, 0,5% v/v Triton X-100, pH 7,5);
- d) Suspender 50 μL da solução e misturar com 50 μL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C;
- e) Colocar a suspensão sobre lâminas previamente cobertas por agarose normal (1%), sendo 3 lâminas para cada tratamento;
- f) Submergir as lâminas em tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13) a 4 °C por 20 minutos;
- g) Realizar a eletroforese a 25 V e 300 mA at 4 °C por 20 minutos;
- h) Neutralizar as lâminas com solução Tris (0,4 M pH 7,5) três vezes e realizar a coloração com 70 μL de Brometo de Etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 min;
- i) Visualizar o material com microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.
- j) Contar aleatoriamente 50 cometas por lâmina e classificar em cinco classe, 0-sem danos até 4-dano completo.

2.2.3 Ensaio Cometa sangue periférico humano

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Gerić et al. (2019):

- a) Coletar sangue periférico e submeter as diferentes amostras (para orientações sobre a coleta e condições de incubação vide o referido trabalho);
- b) Utilizar como controle positivo Peróxido de Hidrogênio (1mM durante 10 minutos);
- c) Após a exposição (4 a 24h), deixar as amostras *overnight* em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10);
- d) Realizar a desnaturação por meio de solução desnaturante (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13) durante 20 minutos;
- e) Realizar a eletroforese (1v/cm) durante 20 minutos;

- f) Neutralizar em solução tampão (0,4 M Tris; pH 7,5) por 15 minutos a 4°C;
- g) Efetuar a coloração com Brometo de Etídio (10 µg/mL);
- h) Visualizar o material com microscópio de fluorescência, com aumento de 250x;
- i) Contar aleatoriamente 100 cometas por lâmina, sendo duas lâminas para cada tratamento;
- j) Sugere-se repetir o experimento duas vezes.

2.3 SOS CHROMOTEST

O método SOS Chromotest foi desenvolvido e validado por Quillardet e Hofnung em 1985 e baseia-se nas respostas metabólicas de *Escherichia coli* frente à agentes genotóxicos (OTHMEN et al., 2019)

Trata-se de um ensaio quantitativo, colorimétrico, de dose-resposta que verifica se uma determinada substância causa dano ao genoma bacteriano, influenciando assim a produção da enzima β-galactosidase, utilizando como parâmetro de comparação, a produção natural de alcalino fosfatase (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985).

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Othmen et al. (2019):

- a) Cultivar *overnight* cultura de *E. coli* de linhagem PQ37 em caldo Luria com ampicilina (30 µg/mL) a 37°C sob agitação de 250 rpm;
- b) Diluir a cultura até uma densidade óptica de 0,6;
- c) Colocar 190 µl da cultura e 10 µl da amostra a ser testada em placa de 96 micropoços;
- d) Incubar sob agitação de 1200g a 37°C durante 3 horas;
- e) Descartar o sobrenadante e suspender o pellet 200 µl em tampão (Tris (hidroximetil) Aminometano 2,43%);
- f) Transferir 100 µl para a placa e adicionar 100 µl de tampão SOS Chromogênico (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985);
- g) Incubar durante 2 horas a 37°C sob agitação de 100g;
- h) Realizar o ensaio de atividade de β-galactosidase e de alcalino fosfatase, seguindo o protocolo de Quillardet e Hofnung (1985);
- i) Calcular a razão entre a atividade de β-galactosidase/alcalino fosfatase, sendo maior que 1,5, considera-se atividade genotóxica.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversas técnicas para a avaliação da atividade genotóxica de um agente, sendo que uma mesma técnica pode ser aplicada com a mesma finalidade, seja avaliando uma um princípio ativo, efluente, metal pesado, nanopartículas, etc.

Dentre os métodos para avaliação genotóxica, destaca-se o teste de *A. cepa*, pois sua aplicabilidade é ampla na investigação de inúmeros agentes, baixo custo, fácil execução, dispensa autorização em Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e apresenta boa correlação quando comparado a testes realizados com animais.

A utilização de modelos biológicos para avaliação genotóxica apresenta-se complementar às avaliações químicas e físicas, uma vez que muitas substâncias podem estar presentes em baixas concentrações, dificultando a identificação de sua presença, todavia pode ser notada pelas células.

4. REFERÊNCIAS

ANCIA, J. P.; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 3, n. 5, p.16-26, 2016.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere.**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BHAGAT, J.; S, G. S.; SHYAMA, S. K. Genotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticle in Zebrafish and Green Mussel *Perna viridis* Using Alkaline Comet Assay. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences.**, v. 4, n. 3, p. 118-127, 2019.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de Amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da Cidade de Santa Gertrudes – SP.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular - Universidade Estadual Paulista, 2010.

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.**, n. 72, p.722-725, 2008.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment.**, v. 347, p. 46–52, 2005.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE.**, v. 66, n. 209, 2018.

DELMOND, K.A.; VICARI, T.; GUILOSKI, I.C.; DAGOSTIM, A. C.; VOIGT, C. L.; SILVA DE ASSIS, H. C. et al. Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and inorganic lead (PbII). **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v. 67, p. 42-52, 2019.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology.**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

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

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

FLORES-BACHO, M. G.; TAKAHASHI, C. S.; CASTILLO, W. O.; SARAIVA, M. C. P.; KÜCHLER, E. C.; MATSUMOTO, M. A. N. et al. Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. **Clinical Oral Investigations**, *in press*, 2019.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO´, C.; NOVAK, M. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1) Invertebrates). **Mutation Research-Reviews in Mutation Research.**, v. 779, p. 82–113, 2019.

GERIĆ, M.; GAJSKI, G. DOMIJAN, AM.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIC, M.; ZEGURA, B. Genotoxic effects of neurotoxin β-N-methylamino-l-alanine in human peripheral blood cells. **Chemosphere.**, v. 214, p. 623-632, 2019.

GHOSH, M.; GHOSH, I.; GODDERIS, L.; HOET, P.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, *in press*, 2019.

GUERRERA, E.; DOMICINI, L.; LEVORATO, S.; VANNINI, S.; ACITO, M.; FATIGONI, C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated particulate matter collected in underground workplaces. **Air Quality, Atmosphere & Health.**, p. 1-9, 2019.
HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere.**, v. 174, p. 321–330, 2017.

HELLEDAY, T.; ESHTAD, S.; NIK-ZAINAL, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. **Nature Reviews Genetics.**, v. 15, n. 9, p.585–598, 2014.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International.**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

ITOH, S.; HATTORI, C. In vivo genotoxicity of 1,4-dioxane evaluated by liver and bone marrow micronucleus tests and Pig-a assay in rats. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 837, p. 8-14, 2019.

KHAN, S.; ANAS, M. MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. **Toxicology Reports.**, v. 6, p. 193-201, 2019.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água.**, Taubaté, v. 13, n. 3, 2018.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Communication.**, v.3, p.103-115, 1995.

LACERDA, G. R. S.; CANTALICE, J. C. L.; LIMA, G. M. S.; ALBUQUERQUE, L. E. F. SILVA, I. DE. G.; MELO, M. E. B. et al. Genotoxic activity of L-asparaginase produced by *Streptomyces ansochromogenes* UFPEDA 3420. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.**, p. 35-41, 2019

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research.**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotóxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus.**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

LIMAN, R., ACIKBAS, Y., & CIĞERCI, İ. H. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**, v. 168, p. 408–414, 2019.

LIMAN, R., CIĞERCI, İ. H., & GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 121, p. 444-449, 2018.

LOPES, R. M. **Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.).** (Tese) Doutorado em Botânica - Universidade de Brasília, 2016.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água.**, v.10, n.1, 2015.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, p.176-181, 2010.

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

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MEDEIROS, I. U.; MEDEIROS, R. A.; BORTOLIN, R. H.; QUEIROZ, F. M.; SILBIGER, V. N.; PFLUGMACHER, S. et al. Genotoxicity and pharmacokinetic characterization of *Cereus jamacaru* ethanolic extract in rats. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, 2019.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30: p. 665-676, 1978.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETTI, P. O.; RAMOS, L. J. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.2, p.181-187, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; 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**, v.2, n.2, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.

OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. In: **VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**. E-book VIII Jornada Científica do CEDSA, v. 8, p. 73-88, 2013.

OUANES-BEN OTHMEN, Z.; BARKA, S.; ADELJELIL, Z.B.; MOUELHI, S.; KRIFA, M.; KILANI, S. et al. In situ genotoxicity assessment in freshwater zooplankton and sediments from different dams, ponds, and temporary rivers in Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 1435–1444, 2019.

PAIVA, J. G. A; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment.**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, J. L. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.** (Monografia) Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências.**, v.7, n.2, p.155-159, 2009.

QUADRA, G. R., ROLAND, F., BARROS, N., MALM, O., LINO, A. S., AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects.**, v. 147, n. 3, p. 65–78, 1985.

RAJAPAKSHA, R. P. N. H.; WIJAYARATHNA, C. D. Determination of genotoxicity of aqueous extracts of *Flueggea leucopyrus* willd. (Katupila) using the optimized “Alkaline Comet Assay”. **Pharmaceutical Journal of Sri Lanka.**, v. 7, p. 23–33, 2017.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology.**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.**, v. 175, 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

VANUCHI, V. C. F.; SOUZA, A. S. H.; SILVA, J. R.; BAPTISTA, J. A. A.; MENEGUETTI, D. U. O.; ZAN, R. A. Análise do potencial mutagênico em afluentes do rio Ji-paraná influenciados pela emissão de rejeitos de uma indústria de laticínios e um curtume no município de Presidente Médici – RO, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 2, n. 1, p. 68-73, 2015.

WOLFF, F. R.; BROERING, M. F.; JURCEVIC, J. D.; ZERMIANI, T.; BRAMORSKI, A.; VITORINO, J. C. et al. Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 230, p. 109-116, 2019.

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere.**, v. 217, p. 176-182, 2018.

4. CAPITULO II – Adaptação do teste de *Allium cepa* para avaliação Genotóxica e Mutagênica

O capítulo II será submetido à Revista *Genetics and Molecular Research*, em formato de comunicado breve. A tradução, normatização e submissão irão ocorrer após as correções e sugestões da banca.



Qualis: B2 em Interdisciplinar (2013-2019)

Fator de Impacto: 0.764

Adaptação do teste de *Allium cepa* para avaliação Genotóxica e Mutagênica

Sergio Luiz Prolo Júnior^{1,2*}, Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Tiago Lucena da Silva²
Cydia de Menezes Furtado³, Romeu Paulo Martins Silva^{1,4} e Dionatas Ulises de Oliveira
Meneguetti^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

² Centro Multidisciplinar, Campus Floresta, Universidade Federal do Acre, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil;

³ Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

⁴ Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Catalão, Goiás, Brasil.

⁵ Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

*E-mail para correspondência: sergioprolo@yahoo.com.br

Resumo

Este trabalho teve como objetivo adaptar o protocolo de avaliação genotóxica e mutagênica de Guerra e Souza (2002). Os ensaios foram feitos com sementes de *Allium cepa* da variedade Baia periforme sem agroquímicos. Após o desenvolvimento dos meristemas com 1 a 2cm de comprimento, foram coletados, armazenados e conservados sob refrigeração (2-8°C) em tubos contendo orceína acética 2%, por 1h, 24h, 48h e 72h. Foram realizados esmagamentos para confecção das lâminas e observadas ao microscópio óptico na objetiva de 40X. Observou-se que os meristemas conservados em até 48h apresentaram resultados satisfatórios quanto a coloração e detalhamento de cromossomos, núcleos e micronúcleos. Esta técnica difere-se das demais por não apresentar agentes fixadores e hidrolisantes, possibilitando ainda a conservação do material em orceína acética 2% por até 72h.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Genotoxicidade. Mutagenicidade.

O primeiro relato da utilização A espécie *Allium cepa*, conhecida popularmente como “cebola de cabeça”, como organismo para testes biológicos foi a partir do ano de 1920 (LEVAN, 1938) e, desde então, diversos estudos relacionados à toxicidade e genotoxicidade têm utilizado essa espécie em experimentos de biomonitoramento, pois possui capacidade de corresponder ao ambiente em que está inserida, indicando assim, indiretamente, a presença de substâncias citotóxicas e genotóxicas, sendo o teste de *A. cepa* um método de baixo custo e alta eficiência se comparado a outros testes que realizam as mesmas avaliações, tais como teste Cometa e SOS Chromotest (FISKESJÖ, 1985; MALINI et al., 2010; GALVÃO et. al., 2015; LESSA; CARIELLO, 2017; PROLO JÚNIOR et al., 2019).

Existem vários métodos que utilizam *A. cepa*, que podem variar na utilização de sementes (PALSIKOWSKI et al., 2017) ou bulbos (MENEGUETTI et al., 2015), mas a maior variação encontrada na literatura é a escolha do protocolo de fixação e coloração (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dentre as técnicas de preparação do teste *A. cepa*, destacam-se a utilização de Reação de Feulgen (MELO; VIDAL, 1978, CARVALHO et al., 2017), orceína acética (FISKEJÖ, 1985), carmin acético (ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017) e Kit Panóptico rápido (MENEGUETTI et al., 2011).

Para fornecer um método alternativo para o teste de *A. cepa*, este estudo teve como objetivo desenvolver uma adaptação do protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) para avaliação genotóxica e mutagênica.

Os ensaios foram realizados com sementes de *A. cepa*, da variedade Baia periforme, mesma linhagem, livres de agroquímicos da marca Isla® (Isla Sementes LTDA, Brasil). O experimento foi realizado com amostras de água provenientes da região urbana do igarapé São Francisco da cidade de Rio Branco, Acre.

Para cada amostra foram utilizadas duas placas de petri revestidas com papel de germinação, contendo 100 sementes cada. As sementes foram mantidas em ambiente controlado entre 20 a 24°C, sendo irrigadas uma vez ao dia com água proveniente da amostra coletada.

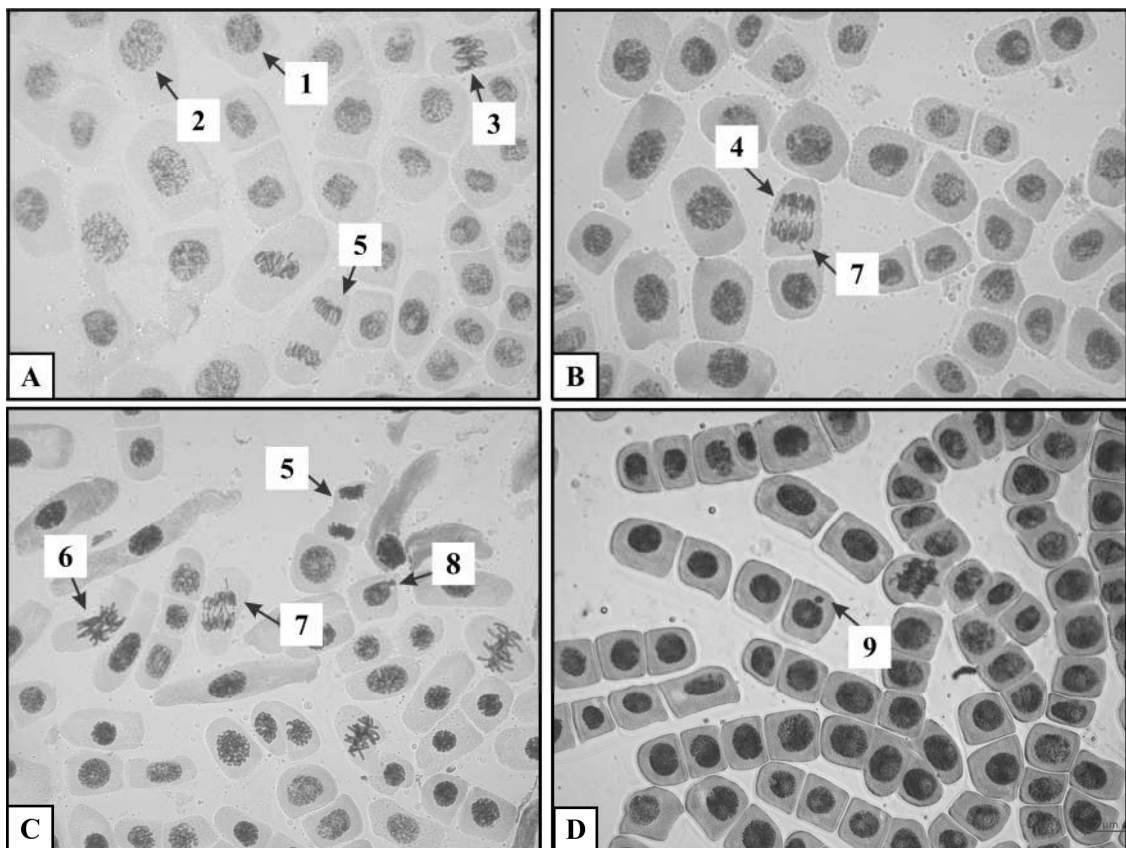
Após 72h, os meristemas foram coletados com aproximadamente 10mm a 20mm de comprimento e acondicionados em microtubos de centrifugação contendo orceína acética 2%, essa conservação em orceína acética não é descrita no protocolo proposto por Guerra e Souza (2002).

Para avaliar a viabilidade da técnica, antes da preparação das lâminas, os meristemas ficaram expostos ao corante durante 1h, 24h, 48h e 72h e conservadas em refrigerador (2-8°C).

Para a confecção das lâminas, os meristemas foram colocados sobre uma lâmina, seccionado a porção apical, adicionadas duas gotas de orceína acética 2%, e então cobertos com uma lamínula, e diferentemente de Guerra e Souza (2002), não foram utilizados o agente fixador (Carnoy – Álcool e Ácido Acético 3:1) e hidrolisante (Ácido clorídrico 1N). As lâminas foram aquecidas em chama, três vezes durante 3 segundos cada, sendo posteriormente realizado o esmagamento dos meristemas e em seguida visualizadas ao microscópio óptico com ocular de 10x e objetiva de 40x (Magnificação de 0,63).

A figura 1 apresenta o resultado da técnica, realizada com os diferentes intervalos de tempo (1h, 24h, 48h e 72h), sendo possível notar que a qualidade da coloração não se alterou, outrossim as lâminas que permaneceram 24h e 48h foram as que os cromossomos e núcleos ficaram mais evidentes, podendo notar de uma forma bem nítida alterações cromossômicas e micronúcleos com qualidade satisfatória.

Figura 1: Fotos das lâminas de meristema de *A. cepa* em diferentes períodos de manutenção na solução de orceína acética: 2g de orceína + 55 mL de água + aquecimento + 45 mL de ácido acético absoluto.



A) 1 hora; B) 24h; C) 48h; D) 72h.

1 - Prófase, 2 - Prometáfase, 3 - Metáfase, 4 - Anáfase, 5 - Telófase, 6 - C-Mitose, 7 - Quebra cromossômica, 8 - Brotamento nuclear e 9 - Micronúcleo.

Este protocolo, adaptado de Guerra e Souza (2002), se distingue dele e de outros trabalhos por utilizar o ácido acético presente na orceína acética em substituição da solução Carnoy e não utilização de um agente hidrolisante (HCl 1N). O ácido acético, presente na orceína acética, atua como agente fixador, uma vez ele atua na desnaturação e/ou coagulação de proteínas (BUESA, 2008).

Esta técnica oferece a vantagem de acondicionar e conservar os meristemas por até 72h, sem perder qualidade na leitura das lâminas. Em comparação com outros trabalhos que apresentam fotos das células coradas com as técnicas geralmente utilizadas de Reação de Feulgen, carmin acético,orceína acética com fixador ou Kit panóptico rápido (LEME; MARIN-MORALES, 2009; MENEGUETTI et al., 2012; MENEGUETTI et al., 2014; MAZZEO et al., 2015), nota-se que esta adaptação apresenta resultados iguais ou superiores.

A elaboração de novas técnicas e adaptações é importante para oferecer novos protocolos, mais simples e eficientes para a realização de testes genotóxicos com *A. cepa*, este estudo propôs uma adaptação em contrastes à outras metodologias utilizadas, afim de facilitar a realização e eficácia deste teste.

REFERÊNCIAS

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BUESA, R. J. Histology without formalin? **Annals of Diagnostic Pathology**, Philadelphia, n. 12, p. 387-396, 2008.

CARVALHO, L. G.; BRITTO, F. F.; MARIN-MORALES, M. A.; MAFFEI, E. M. D. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n.1, p.1-5, 2017.

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

GALVÃO, M.; MIRANDA, D. P.; COSTA, G. M.; DILVA, A. B.; KARSBURG, I. V. Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de alta floresta – MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 23-73, 2015.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicines on root mitosis of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotoxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p.176-181, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30: p. 665-676, 1978.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETTO, P. O.; RAMOS, L. J. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 2, p. 181-187, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; 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**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, J. L. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do teste de micronúcleo em *Allium cepa***. (Monografia) Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PROLO JÚNIOR, S. L.; PAIXÃO, H. C. S.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise Genotóxica: Métodos e Aplicações. In: **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**. 1 ed.: Stricto Sensu Editora, 2019, v.1, p. 149-162.

5. CAPITULO III – Potencial genotóxico e citotóxico da água do Igarapé São Francisco, Rio Branco, Acre, Brasil

O capítulo III apresenta o futuro artigo que será submetido à **Revista Ambiente & Água**.

A tradução, normatização, submissão irão ocorrer após a apreciação da dissertação pela banca examinadora.



Qualis: B1 em Interdisciplinar (2013-2019)

POTENCIAL GENOTÓXICO, MUTAGÊNICO E CITOTÓXICO DA ÁGUA DO IGARAPÉ SÃO FRANCISCO, RIO BRANCO, ACRE, BRASIL

Sergio Luiz Prolo Júnior^{1,2*}, Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Cydia de Menezes Furtado³, Romeu Paulo Martins Silva^{1,4} e Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

² Centro Multidisciplinar, Campus Floresta, Universidade Federal do Acre, Cruzeiro do Sul, Acre, Brasil;

³ Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

⁴ Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Catalão, Goiás, Brasil.

⁵ Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

*E-mail para correspondência: sergioprolo@yahoo.com.br

RESUMO

A genotoxicidade de um agente físico ou químico apresenta o potencial de promover alterações genéticas, estruturais, informacionais ou segregacionais no DNA, que levam a danos ao material genético e com isso podem comprometer a sobrevivência dos seres vivos. Biomonitoramentos são fundamentais para a investigação e detecção de potenciais genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos, sendo assim indispensáveis para a verificação da qualidade dos ecossistemas aquáticos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas provenientes do igarapé São Francisco da cidade de Rio Branco, Acre, Brasil. A metodologia utilizada para avaliar os potenciais foi o teste de *Allium cepa*. Foram coletadas amostras de água, em 10 no igarapé São Francisco na região urbana e uma amostra da Nascente da região rural, nos meses de junho com repetição no mês de dezembro de 2019. Cada amostra foi utilizada para a germinação das sementes, sendo colocadas em duas placas de petri com papel filtro, contendo 100 sementes cada. As sementes germinaram sob temperatura constante de 24°C, sendo irrigadas uma vez ao dia. Após 3 dias, os meristemas foram coletados e submetidos a técnica de coloração pororceína acética 2%. Foram analisadas 5000 células por amostra. No período de seca, os índices mitóticos foram significativamente menores nos pontos 4 e 10 em relação ao controle e P4, P6, P8 e P10 à nascente, já no período chuvoso os pontos houve uma diminuição do índice mitótico nos pontos 2, 3, 8, 9 e 10 em relação à nascente e o ponto 10 em relação ao controle, efeito este provavelmente ocasionado, devido à presença de residências no entorno dos pontos, aumentando assim o contato da água com resíduos e efluentes domésticos. Somente o ponto 4 apresentou resultados menores na seca e o ponto 7 no chuvoso. Durante o período de seca os pontos 1, 2 e 3 apresentaram uma maior quantidade de micronúcleos tanto em relação ao controle quanto a nascente, porém na estação chuvosa, somente o ponto 2 continuou demonstrando esse fenômeno. Foram encontrados valores significativos em relação ao controle em alguns pontos ao longo do igarapé, demonstrando assim que existem agentes causadores de alterações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, evidenciando assim uma necessidade de estabelecer medidas de proteção deste igarapé.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; *Allium cepa*; Poluição ambiental.

ABSTRACT

The genotoxicity of a physical or chemical agent has the potential to promote genetic, structural, informational or segregational changes in DNA, which lead to damage to the genetic material and thus can compromise the survival of living beings. Biomonitoring is fundamental for the investigation and detection of genotoxic, cytotoxic and mutagenic potentials, being therefore indispensable for verifying the quality of aquatic ecosystems. The present study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of waters from the São Francisco stream in the city of Rio Branco, Acre, Brazil. The methodology used to evaluate the potentials is the assay using the *Allium cepa* test. Ten water samples were collected in the months of June and December 2019 at different points of the São Francisco stream in the urban region and a sample of the Spring in the rural region. Each sample was used for seed germination, being placed in two petri dishes with filter paper, containing 100 seeds each. The seeds germinated under a constant temperature of 24 ° C, being irrigated once a day. After 3 days, the meristems were collected and submitted to the 2% acetic orcein staining technique. 5000 cells were analyzed per sample. In the dry season, the mitotic indexes were significantly lower at points 4 and 10 compared to the control and P4, P6, P8 and P10 at the source, while in the rainy season the points showed a decrease in the mitotic index at points 2, 3, 8, 9 and 10 in relation to the spring and point 10 in relation to the control. Only point 4 showed lower results in drought and point 7 in rainy. During the dry season, points 1, 2 and 3 showed a greater amount of micronuclei both in relation to the control and the spring, but in the rainy season, only point 2 continued to demonstrate this phenomenon. Significant values were found in relation to the control at some points along the stream, thus demonstrating that there are agents that cause cytotoxic, genotoxic and mutagenic alterations, showing the necessity to implement protective measures to this stream.

Keywords: Ecotoxicology; *Allium cepa*; Environmental pollution.

1. INTRODUÇÃO

O igarapé São Francisco é um importante curso d'água que tem sua nascente no ambiente rural, atravessa o ambiente periurbano e urbano, recebendo descarga de efluentes domésticos, provenientes dos igarapés Saituba, Dias Martins e Batista, e ao final liberando-os na sua foz que se dá no rio Acre (SANTI et al., 2012). Este igarapé está inserido na Área de Proteção Ambiental Igarapé São Francisco, criada em junho de 2005 pelo decreto estadual N° 12.310, trata-se de uma Unidade de Conservação de uso sustentável, de extensão de 30.004,125 hectares que compreende parte dos municípios de Bujari e Rio Branco (MIRANDA, 2019).

Na área urbana de Rio Branco, ele é o maior afluente do rio Acre, com largura média de 15m, seu comprimento na área urbana é de cerca de 20km, sendo que seu curso d'água é o principal responsável pela macrodrenagem local, respondendo por cerca de 70% da drenagem natural. (NASCIMENTO; SIMÕES, 2017; GADELHA, 2019).

De acordo com Santi et al. (2012) e IBGE (2019a), o Igarapé São Francisco, apresenta percurso de 115,6 km e densidade de drenagem de 1,37 km/km². É o principal coletor da bacia hidrográfica do sítio urbano de Rio Branco, com exceção do Rio Acre. Suas margens apresentam-se muito degradadas pela ocupação humana, ocasionando assim o processo de erosão e assoreamento. Devido a sua localização no ambiente urbano, este corpo d'água acaba recebendo resíduos provenientes de diversas instalações humanas, como dejetos, lixo e esgoto doméstico, ocasionando assim uma poluição de suas águas (SANTI et al., 2012; IBGE, 2019b; GADELHA, 2019).

Alguns estudos demonstram que diversos rios, lagos e açudes podem estar contaminados agentes tóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos, provenientes do descarte de efluentes industriais e domésticos (COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018). Logo, os monitoramentos ambientais de corpos d'água são cruciais para a preservação e conservação dos ecossistemas aquáticos, pois devido a ação de agentes físicos e químicos de poluentes, estes podem provocar efeitos genotóxicos e citotóxicos aos seres vivos, desencadeando assim erros informacionais e estruturais às suas células, principalmente ao DNA, sendo estes testes indiretos de grande importância, pois podem servir de direcionamento ao poder público para identificar as áreas potencialmente impactadas (CASSANEGO et al., 2014; SANTOS et al., 2017; KASPER et al., 2018).

Visando analisar a qualidade da água deste igarapé, este trabalho teve como objetivo averiguar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do Igarapé São Francisco no município de Rio Branco, Acre.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A área de estudo foi o município de Rio Branco, Acre (Figura 1), onde, foram realizadas duas coletas, a primeira em julho de 2019, período conhecido como verão Amazônico, de baixo regime pluvial e outra em dezembro de 2019, durante a estação chuvosa, conhecida como inverno Amazônico e alto regime pluvial (SANTI et al., 2012).

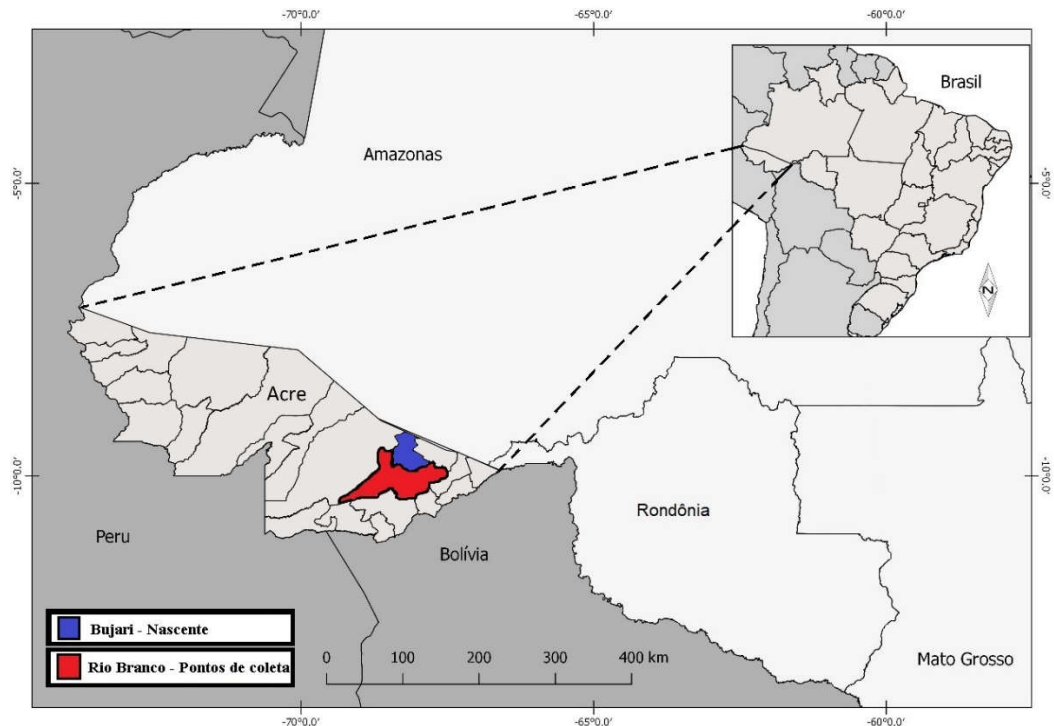
Foram delimitados 10 pontos de coleta aproximadamente equidistantes (Figura 2), ao longo do percurso urbano do igarapé. As coordenadas geográficas dos pontos são: Ponto 1 (9°56'14.60"S 67°52'48.20"W); Ponto 2 (9°56'13.90"S 67°52'23.40"W); Ponto 3 (9°56'18.20"S 67°51'44.70"W); Ponto 4 (9°56'32.90"S 67°51'1.20"W); Ponto 5 (9°57'1.00"S 67°50'16.00"W); Ponto 6 (9°56'39.30"S 67°49'29.40"W); Ponto 7 (9°57'6.40"S

67°48'48.60"W); Ponto 8 (9°57'32.40"S 67°48'2.70"W); Ponto 9 (9°57'20.40"S 67°47'30.30"W); Ponto 10 (9°57'30.20"S 67°47'10.10"W).

Para fins de comparação também foi realizado uma coleta na nascente do igarapé, localizado na zona rural do município de Bujari-Acre (figura 1) (9°56'19.2"S 68°09'01.2"W) e um Controle Negativo (CN) contendo H₂O mineral (FAZILI; AHMAD, 2014).

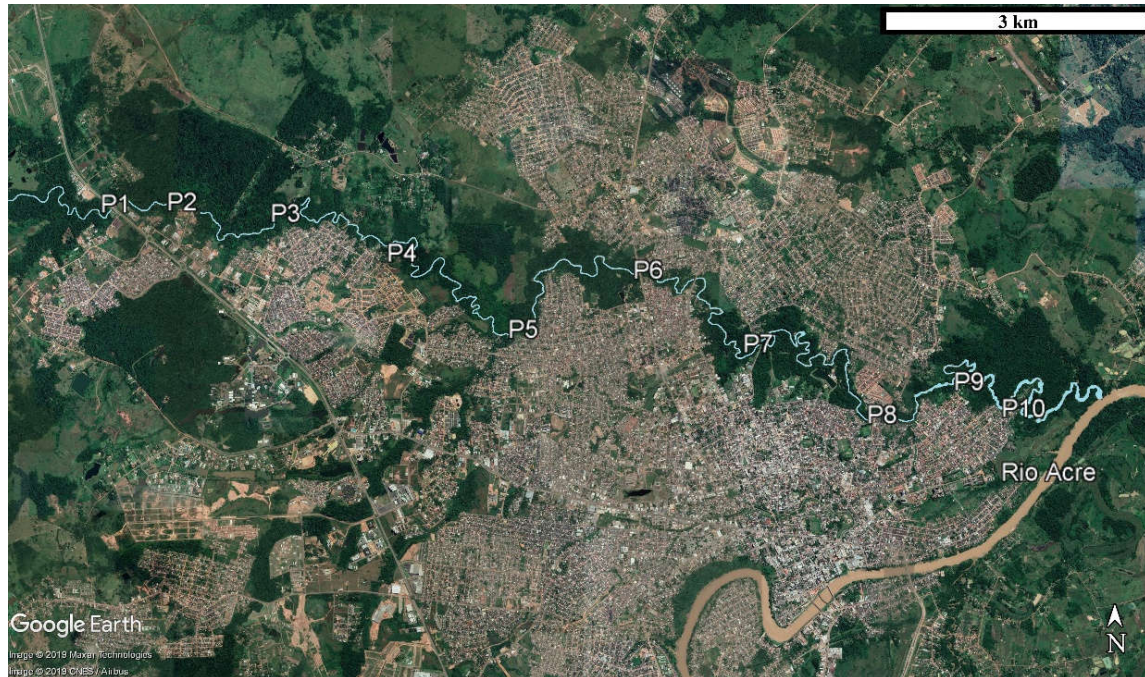
As amostras foram coletadas com auxílio de batiscafo, com cerca de 15cm de profundidade na coluna d'água, armazenadas e transportadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011) até o Laboratório de Medicina Tropical da Universidade Federal do Acre.

Figura 1: Mapa do Estado do Acre e Brasil, identificando o município da nascente (Bujari) e pontos de coleta (Rio Branco).



Os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados utilizando o sistema *Allium cepa* (LEVAN, 1938). Sementes de *A. cepa*, da variedade Baia periforme, mesma linhagem, livres de agroquímicos da marca Isla® (Isla Sementes LTDA, Brasil). Para cada amostra e o controle negativo, foram utilizadas duas placas de petri revestidas com papel filtro, contendo 100 sementes cada. As sementes foram mantidas em ambiente controlado com temperatura de 22±2° C, sendo irrigadas uma vez ao dia com água proveniente da amostra coletada. Após 72h, as porções meristemáticas foram coletadas para a realização dos ensaios.

Figura 2: Imagem de satélite identificando os pontos de coleta na área urbana do município de Rio Branco.



Fonte: Elaborado pelo autor com auxílio do Google Earth, 2019.

Foram confeccionadas 10 lâminas de cada amostra pela técnica de esmagamento corada com Orceína acética 2%. As lâminas foram analisadas e fotografadas sob objetivas de 20X e 40X em microscópio Zeiss® modelo AxioScope.A1. Após o registro fotográfico, as células foram contadas utilizando o software ImageJ versão 1.52d com auxílio do plugin Cell Counter.

2.1 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

O ensaio citotóxico foi realizado por meio da análise do Índice Mitótico. Este índice é expresso pela razão entre o número de células em divisão em relação ao número total de células, sendo essa razão multiplicada por 100. Foram analisadas 500 células por lâmina (10 lâminas), totalizando 5 mil células por amostra (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

2.2 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

A análise Genotóxica foi avaliada pela presença de alterações cromossômicas e nucleares. Foram identificadas as células que contém aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, C-metáfase, multipolaridade, pontes anafásicas e pontes telofásicas) e

anormalidades nucleares (células binucleadas, trinucleadas e núcleos lobulados) (PROLO JÚNIOR et al., 2019), sendo utilizadas para este parâmetro, 500 células por lâmina, totalizando 5 mil células por amostra (PALSIKOWSKI et al., 2017).

Para a análise mutagênica foram identificadas células que continham um ou mais micronúcleos, sendo contadas 500 células por lâmina, totalizando 5 mil células por amostra (FISKESJÖ, 1988; MENEGUETTI et al., 2014; ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; SARGSYAN et al., 2018; PAIXÃO et al., 2019a; PAIXÃO et al., 2019b).

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos em médias e desvio padrão para cada abordagem. Para a verificação de normalidade dos dados foi realizado um teste Shapiro-Wilk, sendo constatado que os dados não apresentaram normalidade. Sendo assim para verificar as diferenças entre as médias, foi realizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com teste *post-hoc* Dunns, comparando os diferentes pontos com o controle negativo e nascente. Para a comparação dos pontos entre as duas estações, foram adotados os testes T-Student e Mann-Whitney de acordo com normalidade. A análise dos dados e a elaboração dos gráficos foi realizada por meio do programa GraphPad Prism® 8.0, sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises estão representados na tabela 1, com os valores médios e desvio padrão para o Índice Mitótico (IM), número de Anomalias Cromossômicas e Nucleares (ACN) e Micronúcleos (MN).

Tabela 1: Valores médios e desvio padrão do Índice Mitótico (IM), Anomalias Cromossômicas e Nucleares (ACN) e Micronúcleos (MN) das coletas do período de Verão (VA) e Inverno Amazônico (IA).

	Período	CN	N	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
IM	VA	6.02	7.82	6.84	10.54	18.06	0.72	5.30	1.60	4.8	2.14	2.62	0.74
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	IA	2.45	2.03	4.74	9.37	14.84	0.54***###	1.99	0.50##	2.67	1.22##	1.15	0.25*****
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		4.44	5.54	5.26	3.08	3.20	6.84	4.52	3.68	4.62	3.24	2.84	2.26
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
ACN	VA	1.83	0.81	1.36	1.10##	1.64#	1.03	0.66	1.20	1.41	0.73#	0.68###	0.53*###
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	IA	2.40	2.80	7.70	1.80	3.70	0.0	4.80	1.20	3.30	2.00	2.80	0.60
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.58	0.92	5.46	1.75	4.16	0.0****	3.58	0.92	2.75	1.49	2.10	0.52#
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
MN	2.60	3.50	4.40	1.70	1.10	5.00	7.30	2.00	3.70	2.20	2.30	1.20	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
MN	VA	1.71	3.80	2.17	1.23	0.99	1.63	2.63*#	0.94	2.58	1.55	1.34	0.63
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
	IA	2.40	1.70	7.80	10.40	9.30	0.80	3.30	1.60	3.60	1.60	2.00	0.90
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
		1.43	1.06	4.47*##	4.77*####	2.83*####	0.42	0.95	1.07	1.65	0.96	1.25	0.74
		±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
MN	3.10	3.00	5.50	7.40	5.10	1.80	3.50	2.00	3.50	1.90	2.50	3.50	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
MN	1.60	0.66	2.72	2.68*#	2.96	1.40	0.85	1.16	1.78	0.74	1.27	1.51	
	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	

* representa diferença significativa entre os pontos e o Controle Negativo (CN), enquanto o # a diferença entre a Nascente (N) e os Pontos. * ou # p<0.05; ** ou ## p<0.01, *** e ### p<0.001 (Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunns).

Verificou-se que quanto ao IM, tanto no período de verão e inverno amazônico, não houve diferença estatística encontrada nos valores do CN e a nascente, demonstrando que quanto a esse parâmetro, a água proveniente desse ponto, não influenciou no crescimento e desenvolvimento das células.

Durante o verão, estação com menor pluviosidade (julho/2019, 95mm) (INMET, 2019), o IM dos pontos 4 e 10, apresentaram valores significativamente menores ($p < 0,001$) que o CN (6.02 ± 2.45), sendo que quando se comparou com o resultado da nascente (7.82 ± 2.03), os pontos que tiveram significância para redução do IM foram 4 ($p < 0,001$), 6 e 8 ($p < 0,01$) e 10 ($p < 0,001$).

No inverno (dezembro/2019, 452mm) (INMET, 2019), o ponto 10 apresentou valor abaixo do CN (4.44 ± 1.83 $p < 0,05$) e da nascente (5.54 ± 0.81 $p < 0,001$), já os pontos 2 ($p < 0,01$), 3 e 8 ($p < 0,05$) e 9 ($p < 0,001$) apresentaram índices mitóticos menores somente em relação à nascente.

É importante ressaltar que as maiores diferenças encontradas foram em relação aos pontos e a amostra da nascente, o que demonstra que ao longo do percurso do igarapé, conforme ele atravessa o perímetro urbano, ele sofre influência antrópica, que é acentuada no período chuvoso, em que devido a ocupação humana perto das suas margens, acaba aumentando a quantidade de dejetos, lixos e esgotos lançados no igarapé.

Alterações do índice mitótico podem ser ocasionadas pela presença de agentes com ação citotóxica, sendo que uma diminuição nesse índice pode ser ocasionada pela presença de agentes químicos ou físicos dificultando assim o desenvolvimento e a divisão celular, enquanto aumentos podem levar a uma multiplicação desordenada e assim formar tecidos tumorais (MACEDA et al., 2015; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018). Peron et al. (2009) destacam que variações do índice mitótico e alterações do material genético podem desencadear quadros graves e irreversíveis à saúde animal ou humana. Portanto este é um parâmetro importante para avaliar a citotoxicidade de amostras de água, se tornando assim uma ferramenta essencial para monitoramento ambiental (GOMES et al., 2015).

Em um estudo de Ramos et al. (2020), foram encontrados índices mitóticos maiores durante a estação de seca, resultado diferentes do presente estudo, que encontrou um aumento em 3 pontos e uma diminuição em 4 deles.

Ferreira et al. (2012) não encontraram diferenças significativas nos índices mitóticos entre o controle e amostras de água dos ribeirões Varginha e Tabatinga, durante o período chuvoso, provavelmente pela diluição ou dispersão de potenciais agentes citotóxicos.

Düsman et al. (2014) ao analisarem a água do rio Quatorze, Francisco Beltrão, estado do Paraná, em mês com alta taxa de precipitação, verificaram que 3 dos 4 pontos, não apresentaram diferenças significativas quanto a citotoxicidade, resultado que se assemelha ao presente estudo, que somente um ponto, dentre os 11, apresentou um índice mitótico que se caracteriza como citotóxico.

Dentre os pontos que apresentaram potencial citotóxico, destaca-se o ponto 10, próximo da foz do igarapé, que apresentou baixo índice mitótico tanto na estação seca, quanto na chuvosa, evidenciando-se assim um potencial citotóxico preocupante para a biota ali presente. Este resultado pode ser explicado devido ser o último ponto de coleta, que recebe toda a carga de agentes que são carregados pelos sedimentos e pela água ao longo do igarapé, que então será descarregado no rio Acre, principal rio do município de Rio Branco, que compõe a sub-bacia Rio Acre, que está inserida na formação da bacia hidrográfica do rio Purus (PEREIRA; SZLAFSZTEIN; ARAÚJO, 2016).

O teste de genotoxicidade, revelou a presença de anormalidades cromossômicas e nucleares dos tipos pontes anafásicas, pontes telofásicas, C-metáfase, aderência, anáfases com cromossomos atrasados, quebras cromossômicas, brotamentos (Figura 3).

O resultado da avaliação genotóxica, constatou que apesar de presentes, a quantidade de anormalidades encontradas não diferiu estatisticamente do CN e a nascente nos dois períodos de coleta.

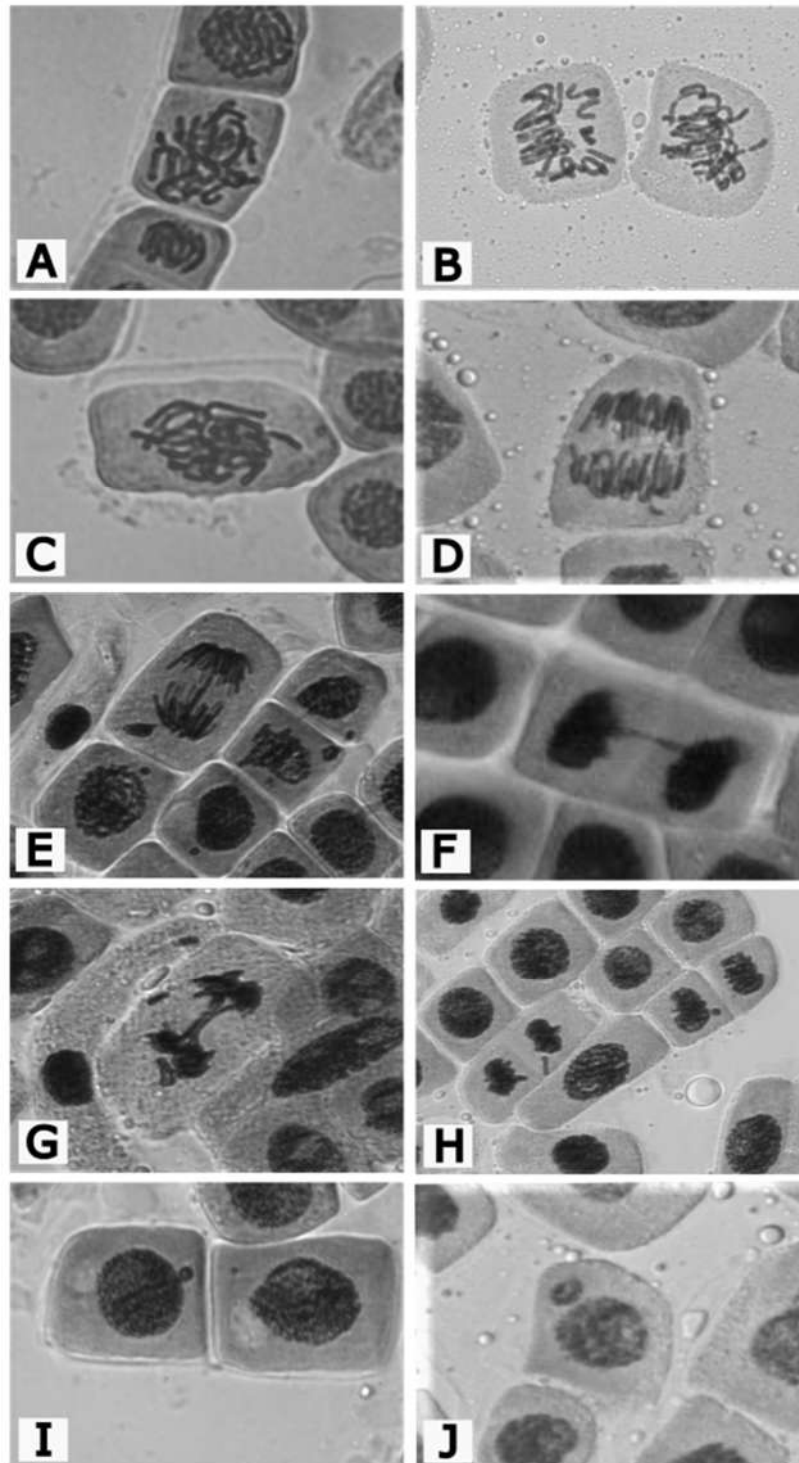
No verão, o ponto 4 ($0,0 \pm 0,0$) apresentou valores médios de ACN significativamente menores em relação ao CN (2.40 ± 1.58 $p < 0,05$) e nascente (2.80 ± 0.92 $p < 0,001$), enquanto o ponto 10 apresentou menor valor significativo somente em relação a nascente ($p < 0,05$). Esses valores dos pontos 4 e 10, provavelmente se devem aos baixos índices mitóticos obtidos por esses dois pontos na avaliação citotóxica, uma vez que para surgimentos de caracteres genotóxicos, é necessário que a célula realize as etapas de duplicação do DNA e/ou o processo mitótico. No inverno, o único ponto que apresentou valores significativamente maiores do que o CN (2.60 ± 1.71) e a nascente (3.50 ± 3.80) foi o ponto 5 (7.30 ± 2.63 $p < 0.05$).

Em um estudo nos rios Fica e Minas Gerais, próximo a cidade de Ubatã, Minas Gerais, Silva et al. (2004) não detectaram valores de anomalias cromossômicas em relação ao controle durante o período chuvoso, resultado este semelhante ao presente estudo, que somente encontrou um ponto 5 com valores maiores significativos. Resultado semelhante foi encontrado por Ferreira et al. (2012), que não encontraram diferenças significativas de alterações cromossômicas amostras de água dos ribeirões Varginha e Tabatinga, durante o período chuvoso.

Braga e Lopes (2014) em um estudo realizado no rio Subaé, município de Humildes, estado da Bahia, avaliaram o potencial citotóxico e genotóxico em três pontos, constatando todos apresentaram anormalidades cromossômicas e redução do índice mitótico significativas, destacam ainda que efluentes liberados na água, podem conter substâncias com potencial de causar danos à biota não aparentes inicialmente, todavia podem levar à quadros de cronicidade, diminuindo a taxa de sobrevivência, danos ao material genético, neoplasias, danos histológicos, que desencadeiam consequências graves à sobrevivência dos organismos.

Gomes et al. (2015) afirmam que mesmo alguns pontos apresentem amostras com potencial citotóxico, não necessariamente estes estarão associados com a ocorrência de caracteres genotóxicos, uma vez que agentes que causam alterações metabólicas que influenciam a divisão celular, podem não causar danos ao DNA, fato este que foi verificado no presente estudo, pois nenhum dos pontos que apresentaram potencial citotóxico em relação ao controle, independente da estação, apresentaram potencial genotóxico.

Figura 3: meristemas de *A. cepa* submetidos a amostras de água do igarapé São Francisco, Rio Branco, Acre.



A. C-mitose; B. Metáfase precoce; C. Metáfase com cromossomo vagante; D. Anáfase com cromossomo vagante; E. Ponte anafásica com micronúcleo; F. Ponte telofásica; G. Ponte telofásica com cromossomo isolado; H. Telófase tardia com cromossomo isolado; I. Brotamento nuclear; J. Micronúcleo.

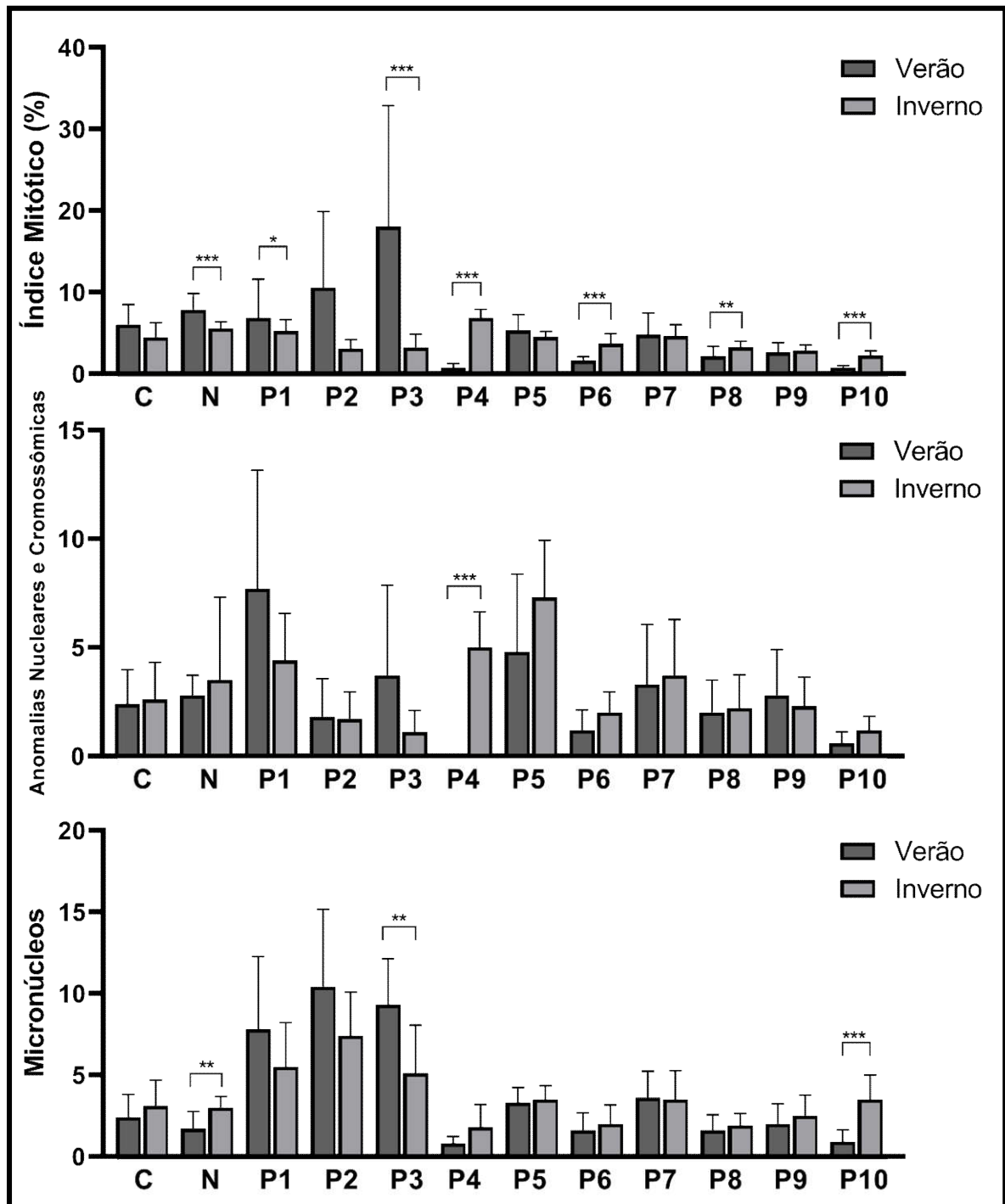
A avaliação mutagênica não verificou diferença estatística no número médio de micronúcleos entre o CN e a nascente nos dois períodos de coleta. No Verão, verificou-se que os pontos 1 (7.80 ± 4.47), 2 (10.40 ± 4.77) e 3 (9.30 ± 2.83), apresentaram um número maior de micronúcleos comparados os pontos com o CN (2.400 ± 1.43 - P1 $p < 0,05$; P2 $p < 0,01$ e P3 $p < 0,05$) e a nascente (1.70 ± 1.06 - P1 $p < 0,01$; P2 $p < 0,001$; P3 $p < 0,001$). No período de inverno, somente o ponto 2 (7.40 ± 2.68) apresentou número significativamente maior de micronúcleos em relação ao CN (3.10 ± 1.60 $p < 0.05$) e nascente (3.00 ± 0.66 $p < 0.05$).

Em um estudo realizado Maschio (2009) no Rio Preto, cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, foi encontrado um aumento significativo no número de micronúcleos em meristemas de *A. cepa*, durante o período de baixa pluviosidade (estação seca), possivelmente pela maior concentração de substâncias oriundas de despejo direto de esgoto urbano, em comparação ao período de alta pluviosidade (estação chuvosa), fato este que também encontrado no presente estudo, em que 3 pontos apresentaram alterações significativas no período de seca, em comparação ao período chuvoso, que foi encontrado somente 1 ponto.

Freitas et al. (2017), destacam que micronúcleos são formados por fragmentos ou cromossomos inteiros, que se localizam no citoplasma celular, próximo ao núcleo, sendo estes de origem clastogênica (quebras cromossômicas), em que agentes clastogênicos atuam à nível de DNA ou aneugênica (cromossomos inteiros), onde principalmente proteínas do fuso são afetados por agentes aneugênicos, sendo observados na figura 3 (E e J).

Os resultados do IM, ACN e MN das duas estações foram comparados entre si como pode ser observado na figura 4.

Figura 4: Comparação dos Índices mitóticos, Anomalias nucleares e cromossômicas e Micronúcleos, entre os períodos de Verão (Junho) e Inverno Amazônico (Dezembro).



* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$, teste T-Student/Mann-Whitney.

Quando avaliados os valores médios do índice mitótico entre as estações, verificou-se que no período chuvoso houve uma diminuição na nascente ($p < 0.001$), ponto 1 ($p < 0.05$), ponto 3 ($p < 0.001$) em relação ao período de seca, provavelmente devido a uma maior diluição

de possíveis agentes citotóxicos. Todavia, os pontos 4 ($p<0.001$), ponto 6 ($p<0.001$), ponto 8 ($p<0.001$) e ponto 10 ($p<0.001$) obtiveram índices maiores no período chuvoso, possivelmente por estarem em uma região do igarapé com pouca quantidade de mata ciliar e maior ocupação de residências nas suas margens.

Farias et al. (2017), em um estudo do potencial de citotoxicidade no rio Jaru, estado de Rondônia, não encontraram diferença significativa no índice mitótico quando comparados período de seca e chuvosa, resultado este que também foi encontrado em 4 dos 11 pontos de coleta analisados do presente trabalho.

Somente o ponto 4 se diferiu quanto a quantidade de anomalias cromossômicas e nucleares ($p<0,001$) quando comparados os dois períodos de coleta, sendo que durante o período chuvoso, este obteve um valor médio maior. Contudo essa diferença foi devida não ter sido encontrada nenhuma ocorrência de anomalias no período de seca, enquanto esse valor no período chuvoso foi de em média de 5.00 ± 1.63 , sendo assim significativo.

Os valores de micronúcleos foram maiores no período de chuvoso na nascente ($p<0.01$) e no ponto 10 ($p<0.001$) e menores no ponto 3 ($p<0.01$). O aumento desses valores na nascente pode ter sido ocasionado ao acaso ou pelo excesso de sedimentos angariados do entorno, todavia, esses valores quando comparados a seus respectivos controles, não apresentaram diferenças significativas entre seus valores médios. Em relação ao ponto 10, durante o período chuvoso, muitas residências localizadas nas margens do igarapé são invadidas pela água, e com isso alguns agentes são lançados nele. Dados semelhantes foram encontrados por Batista et al. (2016), que averiguaram o potencial genotóxico e mutagênico de quatro pontos do rio Corrente, município de Pedro II, estado do Piauí, nas estações de seca e chuvosa, sendo que houve um aumento significativo de todos os pontos, exceto do ponto 4, tanto do potencial genotóxico, quanto mutagênico, nas duas estações. Foi verificado também que os pontos 1, 2 e 3 apresentavam esgoto doméstico nas redondezas, o que não foi verificado no ponto 4, justificando o resultado da avaliação.

5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo, demonstram que existem potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, causados por possíveis agentes contaminantes em alguns pontos do Igarapé São Francisco, principalmente de origem doméstica. Esses agentes causaram alterações cromossômicas, nucleares e variação na multiplicação celular, evidenciando que

podem estar afetando o ciclo celular e metabolismo dos meristemas de *A. cepa*, e com isso pode estar atuando na biota presente no Igarapé.

Portanto, isso demonstra que existe uma necessidade de novos estudos acerca de sazonalidade, ampliação dos pontos investigados e identificação dos agentes poluentes devem ser realizados, afim de realizar um monitoramento ambiental para estabelecer medidas de proteção, recuperação e mitigação das condições deste Igarapé, para garantir uma boa qualidade da água a este importante afluente do rio Acre.

6. REFERÊNCIAS

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BATISTA, N. J. C.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; OLIVEIRA, M. G.; MEDEIROS, E.C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; SANTOS, C. E.; DUARTE, A.; SILVA, F. R.; SILVA, J.; Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**, v. 164, p. 134-141, 2016.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015.

CASSANEGO, M. B. B. et al. The *Tradescantia pallida* var. *purpurea* active bioassay for water monitoring: evaluating and comparing methodological conditions. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 3, p. 424-433, 2014.

CETESB. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos** / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão ... [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011 326p.

COSTA, V.M.; MONTEIRO, C.A.B.; BATISTA, N.J. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v.66 (209): p57-72, 2018.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná. Braz. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 186, p. 1793-1800, 2014.

FARIA, M. L. C.; COSTA, F. M.; SILVA, F. C.; BOSSO, R. M.V. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, estado de Rondônia, em células de *Allium cepa*. **Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, 2017.

FAZILI; N. A.; AHMAD, M. In vitro analysis of the phytotoxic and genotoxic potential of Aligarh wastewater and Mathura refinery wastewater. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 981-986, 2014.

FERREIRA, C.F.; FRUEH, A.; DUSMAN, E.; HECK, M.C., VICENTINI, V.E.P. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L.; SaBios: **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.2, p.46-54, 2012.

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

FREITAS, L. A. D.; RAMBO, C. L.; FRANSCESCON, F.; BARROS, A. F. P. D.; LUCCA, G. D. S. D.; SIEBEL, A. M.; SCAPINELLO, J.; LUCAS, E. M.; MAGRO, JD. Coal extraction causes sediment toxicity in aquatic environments in Santa Catarina, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 12(4): p. 591–604, 2017.

GADELHA, A. Igarapé São Francisco está com toda extensão poluída na área urbana de Rio Branco. **G1**, 2019. Disponível em: <<https://g1.globo.com/ac/acre/noticia/2019/09/05/igarape-sao-francisco-esta-com-toda-extensao-poluida-na-area-urbana-de-rio-branco.ghtml>>, acesso em 13/09/2019.

GOMES, J. V. et al. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p. 48-58, 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama de Rio Branco. 2019a. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ac/rio-branco/panorama>>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019b. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/painel/painel.php?codmun=120040>>. Acesso em: 20 de setembro de 2019.

INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br> . Acesso em 18 de fevereiro de 2020.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n. 3, 2018.

MIRANDA, K. Meio Ambiente dá posse a 50 conselheiros das APAs Lago do Amapá e Igarapé São Francisco. **G1**, 2019. Disponível em: <<https://agencia.ac.gov.br/meio-ambiente-da-posse-a-50-conselheiros-das-apas-lago-do-amapa-e-igarape-sao-francisco/>> Acesso em: 03 de Março de 2020.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LEVAN, A. The effect of colchicines on root mitosis of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 24, p. 471–486, 1938.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p.117-129, 2015.

MASCHI, L. R. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP**. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista, 2009.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular. Universidade Estadual Paulista, 2010.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

NASCIMENTO, R. R.; SIMÕES, G. F. Avaliação da suscetibilidade a movimentos de massa gravitacionais em margens de cursos d'água da cidade de Rio branco (AC). **Geociências**, v. 36, n. 2, p. 233–249, 2017.

PAIXÃO, H. C. S.; PROLO JÚNIOR, S. L.; ZAN, R. A.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. A utilização do sistema teste de *Allium cepa* para análise mutagênica de rios da Amazônia. In: **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**. 1 ed.: Stricto Sensu Editora, 2019a, v.1, p. 163-175.

PAIXÃO, H. C. S.; PROLO JÚNIOR, S. L.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. Teste de micronúcleo e suas diferentes aplicabilidades para análise da genotoxicidade. In: **Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental**. 2 ed.: Stricto Sensu Editora, 2019b, p. 117-140.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PEREIRA, D.M.; SZLAFSZTEIN, C.F.; ARAÚJO, F.A. Avaliação de risco de desastres na Bacia Hidrográfica do Rio Purus (Brasil) com base em índices compostos. **Revista da Associação Nacional de Pós-graduação e Pesquisa em Geografia (Anpege)**, v. 12, n. 17, p. 167–90, 2016.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PROLO JÚNIOR, S. L.; PAIXÃO, H. C. S.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise Genotóxica: Métodos e Aplicações. In: **Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia**. 1 ed.: Stricto Sensu Editora, 2019, v.1, p. 149-162.

RAMOS, L. P. N. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effect of *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) root cells after exposure in water samples of five lakes of Alta Floresta, State of Mato Grosso. **Revista Ambiente Água**, v. 15, n. 1, p. 591-604, 2020.

SANTI, G. M.; FURTADO, C. M.; MENEZES, R. S.; KEPPELER, E. C.; et al. Variabilidade espacial de parâmetros e indicadores de qualidade da água na sub-bacia hidrográfica do igarapé São Francisco, Rio Branco, Acre, Brasil. **Ecología Aplicada**, v. 11, n. 1, 2012.

SANTOS, C. S.; JÚNIOR, D. S. S; OLIVEIRA, J.S.; CASTRO, K. M. S. A; FEITOSA, M. B. J.; PANTALEÃO, S. M.; et al. Potencial mutagênico de um afluente do Rio Vaza-Barris (SE), por meio do sistema-teste micronúcleo (TMN) em molusco bivalve. **Scientia Plena**, v. 13, n. 10, 2017.

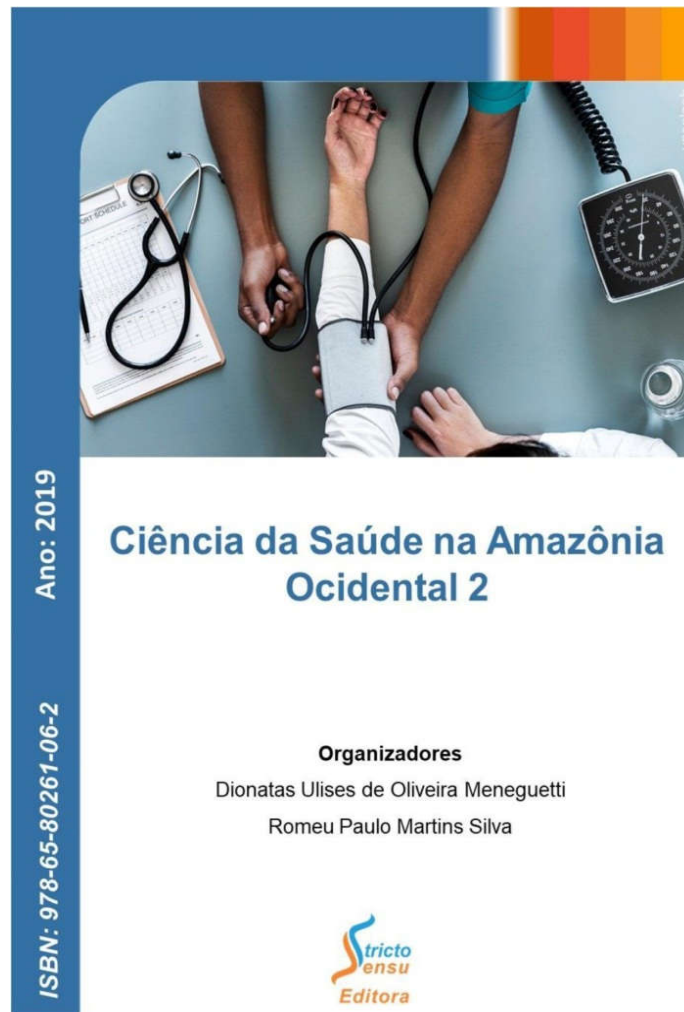
SARGSYANA, A.; SIMONYAN, A.; HOVHANNISYAN, G.; ARAKELYAN, M.; AROUTIOUNIAN, R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskia* lizards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 835, p. 1-8, 2018.

SILVA, M. F. P. T. B; FERRARI, G. P.; DE TOLEDO, F.; DA ROCHA, T. C. L. M. C.; VICENTINI, V. E. P Mutagenic effect of fresh water (well, rivers Fichta and Minas Gerais, close to the town of Ubiratã, Paraná, Brasil) in the animal test system. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 1, p.101-105, 2004.

6. ANEXOS

6.1 CAPÍTULO: O TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE

Co-autor do capítulo publicado no livro Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental 2.



CAPÍTULO 10

O TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE

Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Sérgio Luiz Prolo Júnior¹, Laura Nadyne da Silva Silvestre¹, Romeu Paulo Martins Silva^{1,2}, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2,3}

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental;

3. Universidade Federal do Acre, Colégio de Aplicação, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Ensaio de micronúcleo têm sido amplamente utilizados em diversos estudos ao longo dos anos, dado sua importância para contribuição no conhecimento citogenético ou em testes de biomonitoramento, conferindo uma significativa reprodutibilidade. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade. Ao permitir analisar distintos sistemas de verificação biológica e sua interação com determinado grupo de células, ensaios para micronúcleo possuem a vantagem da simplicidade e rapidez na identificação de alterações cromossômicas.

Palavras-chave: ensaios para micronúcleos; testes de mutagenicidade; testes de toxicidade genética.

ABSTRACT

Micronucleus assays have been widely used in several studies over the years, given their importance to contribute to cytogenetic knowledge or biomonitoring tests, conferring a significant reproducibility. The present study aimed to perform a literature review demonstrating the main techniques applied to perform the micronucleus test in genotoxicity analyzes. By allowing the analysis of different biological verification systems and their interaction with a particular group of cells, micronuclei assays have the advantage of simplicity and speed in the identification of chromosomal alterations.

Key words: micronuclei tests; mutagenicity test; genetic toxicity tests.

1. INTRODUÇÃO

A genotoxicidade é a competência de causar danos e alterações no processo de segregação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou do seu conteúdo, decorrente da exposição a agentes nocivos (HERSHMAN et al., 2017). A consequente modificação que

ocorre no material genético da célula, devido ação de substâncias genotóxicas caracteriza a mutagênicidade (BAFANA et al., 2018). Dentre as técnicas utilizadas para identificação do potencial mutagênico desses processos, uma das principais é o teste do micronúcleo (SARGSYAN et al., 2018).

Micronúcleos são pequenos núcleos, que se localizam próximos ao núcleo principal de uma célula (AGOSTINI, 1993). Correspondem a alterações cromossômicas induzidas ou espontâneas, que ocorrem durante o processo de divisão celular (BALLESTRERI et al., 2017).

A existência de micronúcleos tem sido reconhecida há muitos anos (BRENNEKE, 1937; MATHER, 1937; TAYDAY, 1951; RUSSELL; RUSSELL, 1954). Sua utilização para verificar danos citogenéticos surge em torno de 1959, ao ser verificado que as quebras e as trocas incompletas e desreguladas dos cromossomos, dariam origem a fragmentos que, na interfase, não estariam aderidos ao núcleo das células filhas, porém adjacentes, como micronúcleos (EVANS; NEARY; WILLIAMSON, 1959).

Durante a anáfase, penúltima fase da mitose, podem ocorrer danos do fuso mitótico devido a trocas cromossômicas, perda mitótica de fragmentos acêntricos, cromossomos inteiros ou consequências mecânicas de quebras, que poderão resultar, no fim do processo de divisão, em células filhas com a presença de micronúcleos (AGOSTINI, 1993; SILVA, 2017).

O teste do micronúcleo foi primordialmente descrito por Schmid em 1975, utilizando células de medula óssea de pequenos animais, permitindo observar que após a telófase, os elementos que se atrasavam poderiam estar incluídos nas células-filhas, entretanto, uma proporção considerável transformava-se em um ou vários núcleos secundários, menores que o núcleo principal (SCHMID, 1975).

Ensaio do micronúcleo consistem em verificar alterações citogenéticas, através da frequência de micronúcleos em células, que sofreram aguda ou crônica ação de substâncias potencialmente mutagênicas (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2016). Apresenta diversas características importantes como a rápida execução, aplicabilidade *in vivo/in vitro* e a possibilidade de investigação de potencial carcinogênico (SELKAR et. al., 2016).

Ao considerar o mecanismo pelo qual se formam os micronúcleos, sugere-se que, dependendo do nível, a sua presença pode atribuir risco genético (BALLESTRERI et al., 2017). Estudos recentes sugerem que a presença do micronúcleo nas células propicia condições de variação genética que podem estar relacionadas ao câncer (RUSSO; DEGRASSI, 2018). A concentração, o tamanho e a frequência de micronúcleos em células

refletem o grau e a característica do dano que o agente indutor pode representar (CAVALCANTE et al., 2017).

É um teste que envolve diferentes organismos e tecidos nos quais, após induzidos por agentes que interferem na função dos ácidos nucléicos, poderá ser quantitativamente mensurado o dano cromossômico (SOETEMAN-HERNANDEZ; JOHNSON; SLOB, 2016). Este ensaio possibilita a detecção de mutágenos específicos que causam quebras nos cromossomos, denominados de clastógenos, e agentes aneugênicos que geram alterações na divisão celular e no fuso mitótico, com conseqüente ganho ou perda de material genético (CARVALHO et al., 2017).

Para o emprego do teste de micronúcleo é necessário o uso de células que já tenham experimentado ou ainda estejam em processo de divisão celular (AGOSTINI, 1993; SILVA, 2017). Nos animais, como camundongos, utilizam-se células da medula óssea, fígado de embriões ou células de tumores de ovários (BEKESCHUS et al., 2018). No homem, podem-se empregar linfócitos de sangue periférico, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas (BEKESCHUS et al., 2018).

Ensaio de micronúcleo têm sido amplamente utilizados em diversos estudos ao longo dos anos, dado sua importância para contribuição no conhecimento citogenético ou em testes de biomonitoramento, conferindo uma significativa reprodutibilidade (BALLESTRERI, 2018). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Células da medula óssea foram as pioneiras na realização do teste de micronúcleo, detentoras da capacidade de rápida divisão (SCHMID, 1995). Os micronúcleos podem ser observados em mielócitos, mieloblastos ou eritroblastos, sendo facilmente reconhecido em eritrócitos jovens (SCHMID, 1995). Em humanos, células eritroblásticas são utilizadas para realização do teste, enquanto que em ratos e camundongos os eritrócitos policromáticos são os mais adequados para uso (MENEGUETTI et al., 2015; BAKARE et al., 2016).

De acordo com Schmid et al. (1975) a técnica com eritrócitos policromáticos segue os seguintes passos:

- a) Preencher, para cada indivíduo, um tubo Falcon de 5 ml com soro fetal bovino;
- b) Extrair do animal pós-morto os dois fêmures inteiros em um corte desde a pelve até a tíbia;
- c) Com uma gaze, tracionar suavemente a porção epifisária distal e remover a tíbia e o músculo adjacente;
- d) Com uma tesoura, encurtar cuidadosamente a extremidade proximal do fêmur até visualizar uma pequena abertura do canal medular;
- e) Aspirar com uma seringa de insulina 0,2 ml de soro fetal bovino do tubo Falcon;
- f) Inserir a agulha alguns milímetros na parte proximal do canal medular que ainda está fechado na extremidade distal;
- g) Submergir o fêmur completamente no soro, pressionando dentro do tubo Falcon para evitar que a agulha escorregue;
- h) Aspirar a medula e enxaguar subsequentemente com o soro fetal, as células devem entrar no soro como uma suspensão fina. Após várias aspirações suaves e enxágue, o processo será repetido da extremidade distal do fêmur;
- i) Centrifugar o tubo a 1000 rpm por 5 minutos, remover o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- j) Misturar as células do sedimento por aspiração com uma pipeta Pasteur siliconizada, (se necessário, repetir os passos “i” e “j”).
- k) Colocar uma gota da suspensão na extremidade de uma lâmina estéril previamente identificada;
- l) Realizar o esfregaço com auxílio de outra lâmina posicionada em 45° que irá puxar e distribuir o material uniformemente;
- m) Secar em temperatura ambiente *overnight*;
- n) Com a lâmina em local apropriado, cobrir a extensão do esfregaço com 1 ml do corante May-Grunwald, deixar agir por 3 minutos. Em seguida, acrescentar 1 ml de água destilada, homogeneizar com um bastão de vidro com movimentos de cima para baixo até que os dois líquidos estejam totalmente misturados, deixar agir por 1 minuto;
- o) Escorrer a mistura, e sem lavar, recobrir a lâmina com 2 ml da solução diluída de Giemsa com água destilada 1:6, deixar agir por 15 minutos;

- p) Lavar a preparação abundantemente em água corrente e deixar a lâmina para secar na posição vertical;
- q) Montar a lâmina com Entellan ou com lamínula de vidro;
- r) Analisar no microscópio com objetiva de 100x e ocular de 10x;
- s) Para determinar a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, foram preparadas 3 lâminas para cada indivíduo e analisadas, no total, 2.000 células de eritrócitos policromáticos.

O uso de células eritropoiéticas *in vivo* pode representar vantajosa aplicação em humanos devido a sua rápida diferenciação, principalmente, se comparado ao lento processo que ocorre em linfócitos de sangue periférico (SALES, et al., 2018). Entretanto, testes do micronúcleo em células da medula óssea *in vivo*, têm a desvantagem de metabólitos produzidos no fígado não a atingirem, baixo nível de ativação metabólica de alguns carcinógenos e sensibilidade reduzida na detecção de substâncias com capacidade de induzir micronúcleos, sendo necessário o emprego de doses letais (MAHIOUT, et al., 2018; LIMA et al., 2018).

2.2 TESTES DE MICRONÚCLEO EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO:

A utilização de linfócitos de sangue periférico para verificação de dano genético através do teste de micronúcleo teve início na década de 70 (COUNTRYMAN; HEDDLE, 1976). Ganhou notoriedade devido ao longo tempo de vida da cultura, fácil obtenção e distribuição por todo o corpo, seu uso tem sido contínuo em diferentes tipos de pesquisas que visam observar o potencial dano de substâncias tóxicas ao organismo (STURBELLE et al., 2010).

De acordo com Monteiro et al. (2000), a técnica é descrita da seguinte forma:

- a) Coletar 5 ml de sangue periférico de cada indivíduo em tubos de heparina sódica, previamente codificados e mantidos a 4°C;
- b) Cultura de linfócitos - adicionar 0,5 ml do sangue coletado a 4,5 ml de meio F-10 HAM, suplementado com 1% de heparina sódica (50 UI/ml), 1% de L-glutamina, 24% de soro fetal bovino (SFB) e mistura de antibióticos (estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100 UI/ml));

- c) Para estimular a divisão celular, inserir 80 µl de fitohemaglutinina reconstituída a 2% em água deionizada e homogeneizar a mistura;
- d) Incubar a 37° C durante um período de 44 horas, 2 réplicas para cada indivíduo; após este período, adicionar à cultura 150µL citocalasina B (concentração final desta na cultura: 6 µg/mL) de forma a inibir a citocinese das células;
- e) Incubar por mais 28 horas até completar o total de 72 horas de incubação;
- f) No final do período de incubação, homogeneizar os tubos e separar as células por centrifugação a 1000 rpm (270xg) durante 10 minutos;
- g) Decantar o sobrenadante e tratar as amostras por 2 vezes com 5 ml de solução de lavagem (pH 7,2) RPMI 1640. Suplementar com 2% de SFB e centrifugar a 1000 rpm durante 7 minutos;
- h) No agitador, adicionar 5 ml de solução hipotônica de choque osmótico, RPMI 1640 (meio de cultura), na proporção de 4:1 (água:RPMI), suplementar com 2% de SFB e imediatamente centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm;
- i) Desprezar o sobrenadante e utilizar o pellet para realizar os esfregaços nas lâminas;
- j) Preparar cerca de 6 esfregaços (por cada indivíduo) e posteriormente colocar para secar durante 24 horas ao abrigo da luz;
- k) Após secagem ao ar, fixar as lâminas numa tina contendo uma solução fria (-20°C) de metanol: ácido acético (3: 1), por 20 minutos;
- l) Quando as lâminas estiverem secas, corar com Giemsa 4% em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,8, por 8 minutos. Após esse período, lavar em água corrente e colocar para secar na posição vertical;
- m) Montar as lâminas com Entellan e colocar para secar na posição horizontal;
- n) Analisar as células com microscópio de campo claro, ampliação de 500x (ocular: 12,5x; objetiva: 40x);
- o) Para cada indivíduo da amostra selecionar duas lâminas e contabilizar os micronúcleos presentes em 1000 células binucleadas (500 por réplica/lâmina).

A detecção de micronúcleos em linfócitos humanos foi aperfeiçoada por métodos que permitem verificar as células que se dividiram ao menos uma vez após exposição à substância mutagênica (HOBBS, et al., 2018). O emprego da citocalasina B mantém o citoplasma íntegro e propicia a identificação de núcleos que sofrem divisão celular por bloqueio da citocinese após a telófase, acumulando células binucleadas na fase G1,

assegurando eficácia na análise de micronúcleos em linfócitos de pessoas expostas, ou substâncias em testes *in vitro* (TOBÓLSKA, et al., 2018).

2.3 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS

Células com origem na camada basal em proliferação, que se tornam esfoliadas ao atingir a camada superficial, expressam alterações cromossômicas em análises citogenéticas (GARCÍA et al., 2018). O uso destas células em testes é aplicável nos tratos pulmonar, urinário, gastrointestinal e na mucosa oral para verificar exposição recente a substâncias carcinogênicas, ou reparos decorrentes de erros espontâneos no material genético (LUCENA et al., 2011).

Conforme Reis et al. (2002), o teste de micronúcleo para células da mucosa oral pode ser realizado da seguinte forma:

- a) Orientar os participantes a realizar um enxágue bucal com água;
- b) Coletar as células com uma escova de cerdas de nylon (cytobrush) girando 5 vezes, suavemente, no lado direito e esquerdo da mucosa bucal maxilar correspondente ao fundo de sulco vestibular posterior;
- c) Inserir a escova em um tubo falcon contendo 5 ml de solução salina (NaCl a 0,9% de concentração em água destilada);
- d) Centrifugar o tubo a 1500 rpm durante 10 minutos;
- e) Descartar o sobrenadante;
- f) Fixar em solução metanol:ácido acético (3:1) e posteriormente transferir para lâminas limpas, úmidas e geladas;
- g) Secar as lâminas durante 24 horas;
- h) Submergir as lâminas, após o período de 24 horas, em solução de HCl 1 N por 30 minutos;
- i) Corar com reação de Feulgen e a contracoloração "Fast Green";
- j) Desidratar as células com etanol e clarificar com xilol;
- k) Montar as lâminas com lamínula, utilizando bálsamo do Canadá;
- l) Analisar as células no microscópio de luz com ampliação de 400 x;
- m) Contar no mínimo 1.000 células de cada sítio para análise de células micronucleadas e de micronúcleo por células.

Meneguetti et al. (2012), também descreve outro método de detecção de micronúcleos em mucosa oral, porém de acordo com o mesmo, de menor custo que o descrito anteriormente. A técnica segue os passos abaixo:

- a) Orientar os participantes a realizar três repetições de enxágue bucal com água destilada;
- b) Coletar as células com uma escova de cerdas de nylon (cytobrush) girando 10 vezes, suavemente, no lado direito e esquerdo da mucosa bucal maxilar;
- c) Inserir a escova em um tubo de ensaio contendo 04 ml de tampão (Cloridrato de Tris 0,01 M Tris HCl, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 M EDTA e Cloreto de Sódio 0,02M NaCl) com ph 6,8 e vedar os tubos para transporte;
- d) Homogeneizar o material no vórtice;
- e) Centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante;
- f) Adicionar 04 ml de solução tampão, homogeneizar no vórtice e centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante (repetir este passo até completar no total 3 lavagens);
- g) Para fixação, adicionar 2 ml de Triarilmetano a 0,1% e 2 ml de xantenos a 0,1%. Homogeneizar no vórtice e centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos;
- h) Descartar o sobrenadante deixando apenas o pellet branco mais três vezes a quantidade de pellet de solução 50% Triarilmetano a 0,1% e 50% xanthenes 0,1%. Homogeneizar no vórtice;
- i) Aspirar o material com uma pipeta Pasteur e gotear 3 gotas em lâmina pré aquecida a 37° C;
- j) Secar em temperatura ambiente durante 30 minutos;
- k) Corar as lâminas mergulhando 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- l) Lavar as lâminas com água destilada para remover excesso de corante;
- m) Secar em temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente realizar a contagem das células.

A análise de micronúcleos em células da mucosa oral permite a coleta de células esfoliadas em grande quantidade, sendo rotineiramente aplicada em indivíduos fumantes, consumidores de álcool, trabalhadores expostos a material genotóxico ou indivíduos em

tratamento químico ou radioterápico (BATISTA; JÚNIOR, 2014; FARHADI; SOUZA et al., 2014; JOLEHAR; SAFAPOUR, 2018). As células podem ser coradas por diversos métodos, desde os mais elaborados como o estabelecido por Feulgen contracoradas por “Fast Green”, até os mais simples como a coloração do Papanicolau multicromática ou o corante azul de metileno (CAMPOS; GONÇALVES; NOVENTA, 2017; PAZ et. al., 2018).

2.4 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS VEGETAIS

Substâncias tóxicas apresentam efeito genotóxico em plantas (AMORIM, et. al., 2018). O uso da *Allium cepa* em citogenética permite identificar potenciais agentes causadores de danos ao DNA em células vegetais, através da verificação de alterações fitotóxicas, citotóxicas e mutagênicas provenientes de extratos de plantas, agroquímicos, fármacos, efluentes industriais ou águas contaminadas (MENEGUETTI et al., 2014; FARIA et. al., 2017).

Para esse teste podem ser utilizadas sementes de *Allium cepa* e segundo Carvalho et al. (2017), o teste ocorre da seguinte forma:

- a) Depositar 30 sementes de *A. cepa*, para cada tratamento, em placa Petri forrada com papel filtro ou de germinação;
- b) Aplicar 3 ml dos tratamentos e do controle nas sementes diariamente, colocar para germinar em temperatura de 25° C com placa Petri fechada;
- c) Coletar os meristemas com 1 a 2 cm de comprimento;
- d) Fixar em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) em frasco de vidro por 2 a 20 horas em temperatura ambiente;
- e) Retirar as raízes do fixador, enxugar levemente com papel filtro;
- f) Colocar em tubo de ensaio com orceína 2%, em quantidade que cubra os meristemas;
- g) Acrescentar uma gota de HCl 1N (ácido clorídrico) para cada nove de orceína (ou cerca de 10% do volume de corante), e agitar;
- h) Aquecer o tubo de ensaio aberto em chama de lamparina a álcool ou bico de Bunsen até que o corante ferva;
- i) Retirar o tubo rapidamente da chama quando o corante borbulhar, tampar o tubo de ensaio e deixar esfriar por 20-30 minutos;

- j) Em uma lâmina limpa colocar uma raiz, seccionar a porção apical (mais escura) e eliminar o restante do material;
- k) Fragmentar o meristema em pedaços menores;
- l) Acrescentar duas gotas do corante, cobrir com uma lamínula e pressionar para espalhar bem as células de cada fragmento;
- m) Pressionar a lamínula com papel toalha para remover vestígios do corante;
- n) Analisar em microscópio óptico com objetiva de 40x;
- o) Verificar micronúcleos contando 1.000 células por lâmina, totalizando 3.000 células por tratamento.

Outro mecanismo para se realizar esse teste é a utilização do bulbo de *Allium cepa*. De acordo com Meneguetti et al., (2012) a técnica pode ser realizada da seguinte forma:

- a) Adquirir 10 bulbos de *A. cepa* (pequenas, uniformes, da mesma origem, não germinadas e saudáveis) para cada amostra e controle;
- b) Colocar cada bulbo para germinar em frascos de 50 ml, com o fundo imerso na amostra e no controle (água mineral);
- c) Coletar os meristemas após cerca de 72 horas com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento;
- d) Lavar os meristemas em água destilada;
- e) Hidrolisar com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, resfriar os tubos em água corrente;
- f) Lavar os meristemas com água destilada;
- g) Preparar os esfregaços em duas lâminas por bulbo;
- h) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- i) Lavar as lâminas com água desionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- j) Contar 1.000 células por lâmina.

Detentora da capacidade de corresponder ao meio em que está inserida, a *Allium cepa*, representa uma valiosa ferramenta para biomonitoramento (GALVÃO et. al., 2015). De simples manuseio, obtenção, verificação de alterações cromossômicas e micronúcleos

ao microscópio óptico, as células de *A. cepa* configuram satisfatória análise de citotoxicidade e genotoxicidade em pesquisas (ROSA; JÚNIOR; COCCO, 2017).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao permitir analisar distintos sistemas de verificação biológica e sua interação com determinado grupo de células, ensaios para micronúcleo possuem a vantagem da simplicidade e rapidez na identificação de alterações cromossômicas (XINYUE et. al., 2018). Porém, ao se tratar de pesquisa científica, testes com humanos necessitam ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e com animais, ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). No caso de células meristemáticas, como *Allium cepa*, que não necessitam aprovação ou liberação de um comitê, é importante garantir a utilização de sementes ou vegetais livres de agroquímicos.

4. REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas**, v.6, n. 2, p. 01 – 19, 1993.
- AMORIM, A. S.; FROTA, R. G.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação citológica, genotóxica e mutagênica do infuso da espécie quebrapedra (*Phyllanthus amarus* – Euphorbiaceae) em diferentes concentrações através do sistema *Allium cepa*. **Revinter**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2018.
- BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; SIVANESAN, S.; NAOGHARE, P.K. Mutagenicity and Genotoxicity Testing in Environmental Pollution Control. **Mutagenicity: Assays and Applications**. 1ª edição, 2018.
- BAKARE, A. A.; UDOAKANG, A. J.; ANIFOWOSHE, A. T.; FADOJU, O. M.; OGUNSUYL, O. L.; ALABI O. A. et al. Genotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles using the Mouse Bone Marrow Micronucleus and Sperm Morphology Assays. **Journal of Pollution Effects and Control**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2016.
- BALLESTRERI, ERICA. Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão. **Revinter**, v. 10, n. 01, p. 19-28, 2017.
- BATISTA, C. R.; JÚNIOR, E. O. C. Avaliação da genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. **Gestão Tecnologia e Ciências**, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2014.
- BEKESCHUS, S.; SCHMIDT, A.; KRAMER, A.; METELMANN, H. R.; ADLER, F.; WOEDTKE, T. V. et al. HighThroughput Image Cytometry Micronucleus Assay to Investigate

the Presence or Absence of Mutagenic Effects of Cold Physical Plasma. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, n.4, p. 268-277, 2018.

BRENNEKE, H. Strahlenschadigung an mause und ratten sperma, beobachtet an der fruhentwicklung der eier. **Strahlentherapie**, v. 60, p. 214-238, 1937.

CAMPOS, A. A. B.; GONÇALVES, P. C.; NOVENTA, M. A. Efeitos genotóxicos do uso crônico do fumo na mucosa oral. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 82-86, 2017.

CARVALHO, L. G.; BRITTO, F. F.; MARIN-MORALES, M. A.; MAFFEI, E. M. D. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.

CAVALCANTE, D. N. C.; SPOSITO, J. C. V.; CRISPIM, B. A.; NASCIMENTO, A. V.; GRISOLIA, A. B. Genotoxic and mutagenic effects of passive smoking and urban air pollutants in buccal mucosa cells of children enrolled in public school. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 27, n.5, p. 346-351, 2017.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. **International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine**, v. 01, p. 216-229, 1959.

FARIA, M. L. C.; COSTA, F. M.; SILVA, F. C.; BOSSO, R. M. V. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, Estado de Rondônia, em células de *Allium cepa*. **Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, p. 1-11, 2017.

FARHADI, S.; JOLEHAR, H.; SAFAPOUR, F. Micronucleus Assay of Buccal Mucosal Cells in Hairdressers: The Importance of Occupational Exposure. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 8, p. 2131-2134, 2018.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, 2014.

GALVÃO, M.; MIRANDA, D. P.; COSTA, G. M.; DILVA, A. B.; KARSBURG, I. V. Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de alta floresta – MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 23-73, 2015.

GARCÍA, A. F.; BERNÉS, S. R.; GARCÍA, P. A.; GUERRERO, V. B.; SOLÍS, M. O. V.; NOYOLA, et al. Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino: estudio piloto. **El Residente**, v. 13, n. 2, p. 56-61, 2018.

GARCIA-RODRIGUES, M. C.; HERNADEZ-CORTES, L. M.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. InVivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and AlphaTocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, V. 2016, P. 1-11, 2016.

GUERRA, M.; SOUZAS, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

HERSHMAN, J. M.; FRANCE, B.; HON, K.; DAMOISEAUX, K. H. Direct quantification of gamma H2AX by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of pesticides in a human thyroid cell lines. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 7, p. 522-528, 2017.

HOBBS, C. A.; KOYANAGI, M.; SWARTZ, C.; DAVIS, J.; MARONPOT, R.; RECIO, L.; et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 695-708, 2018.

KISURINA-EVGENIEVA, O. P.; SUTIAGINA, O. I.; ONISHCHENKO, G. E. Biogenesis of micronuclei. **Biochemistry**, v. 81, n. 5, p. 453-464, 2016.

LIMA, C. F. A.; FERNANDES, A. S.; GOMES, E. M.; OLIVEIRA, L. L.; MACEDO, A. F.; ANTONIASSI, R. et al. Antioxidant Activity and Genotoxic Assessment of Crabwood (Andiroba, *Carapa guianensis* Aublet) Seed Oils. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 11, 2018.

LUCENA, E. E. S.; MIRANDA, A. M.; ARAÚJO, F. A. C.; GALVÃO, C. A. B.; MEDEIROS, A. M. C. Método de coleta e a qualidade do esfregaço de mucosa oral. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 11, n. 2, p. 55-62, 2011.

MAHIOUT, S.; TAGLIABUE, S. G.; NASRI, A.; OMORUYI, L. M.; PETERSSON, L.; BONATI, L. et al. In vitro toxicity and in silico docking analysis of two novel selective AH receptor modulators. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 178-188, 2018.

MATHER, K. The analysis of single-factor segregations. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 124, p. 97-106, 1937.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J. Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Environmental and Analytical Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.

PAZ, M. F. C. J.; SOBRAL, A. L. P.; PICADA, J. N.; GRIVICICH, I.; JÚNIOR, A. L. G.; MATA, A. M. O. F. et al. Persistent Increased Frequency of Genomic Instability in Women Diagnosed with Breast Cancer: Before, during, and after Treatments. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 10, 2018.

REIS, S. R. S.; SADIGURSKY, M.; ANDRADE, M. G. S.; SOARES, L. P.; SANTO, A. R. E.; BÔAS, D. S. V. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 221-225, 2002.

ROSA, P. A. F.; JÚNIOR, E. O. C.; COCCO, D. D. A. Biomonitoramento no córrego olaria, monte carmelô - mg utilizando o teste allium. **Gestão, Tecnologia e Saúde**, v. 6, n. 14, p. 1-12, 2017.

RUSSEL, L. B.; RUSSEL, W. E. Cold Spring Harbor. **Quantitative Biology**, v. 19, p. 50-59, 1954.

RUSSO, A.; DEGRASSI, F. Molecular Cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 36-40, 2018.

SALES, I. M. S.; SILVA, J. M.; MOURA, E. S. R.; ALVES, F. D. S.; SILVA, F. C. C.; SOUSA, J. M. C. et al. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 11, 2018.

SARGSYANA, A.; SIMONYAN, A.; HOVHANNISYAN, G.; ARAKELYAN, M.; AROUTIOUNIAN, R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in Darevskializards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 835, p. 1-8, 2018.

SILVA, H. C. M. Efeito Mutagênico da planta Coffea Arábica L. nas células da medula óssea de ratos wistar. **Colloquium Vitae**, v. 9, n. 3, p. 36-39, 2017.

SELKAR, N.; BHAGAT, S.; CHAWADA, M.; VAHALIA, M. K.; PURANIK, .; VANAGE, G. Genotoxic and Mutagenic Activity of Suvarna Bhasma. **Informatic Journals**, v. 23, n. 3, p. 221-228, 2016.

SOETEMAN-HERNANDEZ, L. G.; JOHNSON, G. E.; SLOB, W. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the *in vivo* micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 31, n. 3, p. 347-358, 2016.

SOUZA, A. M.; SILVA, A. M.; RAMOS, L. J.; ZAN, R. A.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do efeito mutagênico em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não-fumantes. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 3, p. 43-52, 2014.

SCHMID, W. THE MICRONUCLEUS TEST. **Mutation Research**, v.31, n. 1, p. 9-15, 1995.

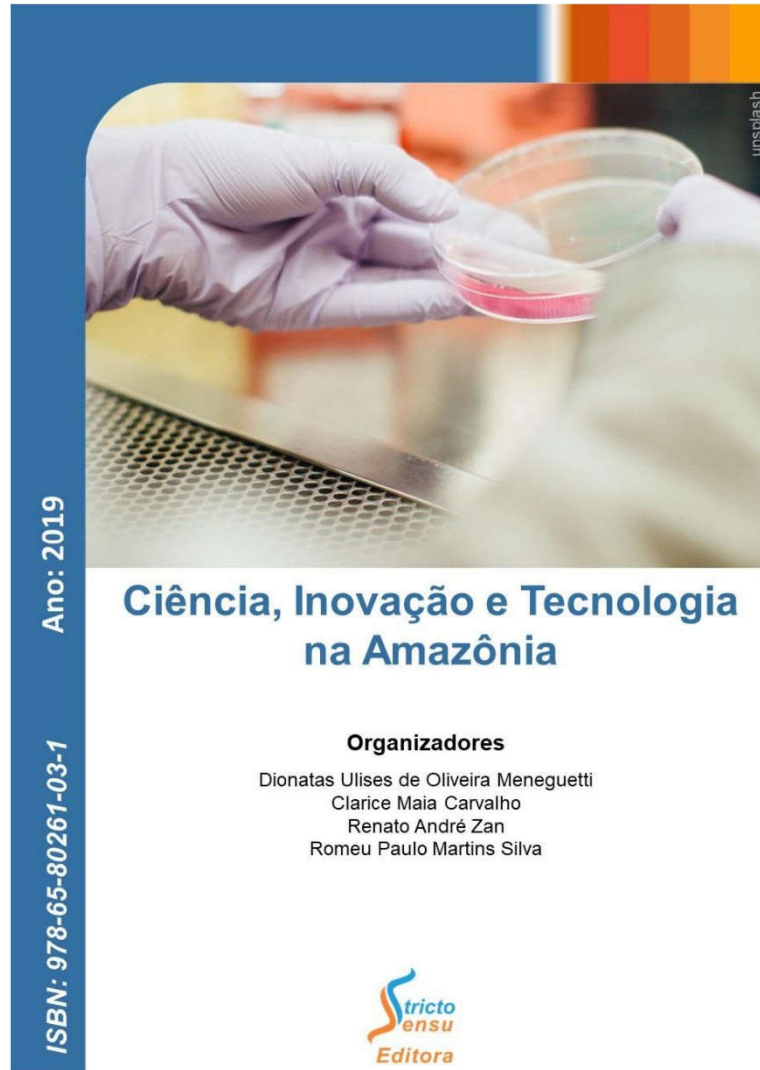
TOBÓLSKA, S.; TERPILOWSKA, S.; JAROSZEWSKI, J.; SIWICKI, A. K. Genotoxicity and mutagenicity of inosine pranobex. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 207-213, 2018.

THODAY, J. M.; The effect of ionizing radiations on the broad bean root, Part IX. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. **British Journal of Radiology**, v. 24, p. 572-628, 1951.

XINYUE, Y.; TOMOKO, A.; JING, X.; YIYI, C.; WEIYING, L.; XINYU, Z. et al. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. **Mutagenesis**, v. 33, n. 2, p. 153-160, 2018.

6.2 CAPÍTULO: A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE TESTE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA

Co-autor de capítulo publicado no livro *Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia*.



CAPÍTULO 12

A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA

Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Sérgio Luiz Prolo Júnior¹, Renato André Zan²,
Romeu Paulo Martins Silva¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2}

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-paraná, Rondônia, Brasil.

RESUMO

O sistema teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagênicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*. A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

ABSTRACT

The micronucleus test system in roots of the *Allium cepa* (onion) species is defined as being one of the best for environmental monitoring and water mutagenesis studies because of its sensitivity and accuracy. The present study aimed to perform a literature review demonstrating the main procedures for the mutagenic analysis of surface waters of Amazonian rivers through the *Allium cepa* test system. The mutagenic analysis of surface water using *A. cepa* does not require elaborate equipment, reagent with high value, the raw material is easily found and throughout the year, and does not require approval in Ethics and Research Committees in Humans or Animals.

Key words: Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

1. INTRODUÇÃO

A hidrografia da região amazônica é a maior, e uma das mais importantes do mundo, concentrando cerca de 15% das águas doces superficiais não congeladas do planeta (SNIF, 2014; NETO; FURTADO, 2015). Formada por grandes rios e pequenos igarapés que correspondem a 81% das águas superficiais do território nacional, a rede hidrográfica

da Amazônia é responsável pelo abastecimento de centenas de cidades e milhares de pessoas (SNIF, 2014; SILVA; NODA, 2016).

O crescimento da urbanização e das fronteiras agrícolas, que têm ocorrido ao longo dos anos, causam prejuízos a rios e igarapés devido exposição a dejetos humanos, agrotóxicos, excretas de laticínios, frigoríficos e, várias outras empresas, que despejam efluentes nestes mananciais, muitas vezes, sem um tratamento prévio (SINGH et al., 2014). Conseqüentemente, o consumo e a utilização dessas águas contaminadas, podem levar a intoxicações e até mesmo mutações, apresentando o potencial de desencadear a curto e longo prazo sérios problemas de saúde (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015).

As substâncias mutagênicas podem causar danos celulares aos organismos vivos que estão frequentemente expostos a estas, danos que geralmente são induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos que acabam afetando processos como a transcrição e duplicação gênica e alterações cromossômicas, o que leva a processos cancerosos e morte celular (MENEGUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; QUADRA et al., 2018). Compostos que causam lesões nos materiais genéticos são conhecidos como genotóxicos (IQBAL et al., 2019)

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma (SILVA ET AL., 2011; FATEH et al., 2019). Micronúcleos podem ser resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com seqüências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e, dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (Figura 1) (POLLETO et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012; ZHANG et al., 2018).

O teste de micronúcleos detecta mutagênese em organismos eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (MILLER, 1973; HARA; MARIN-MORALES, 2017). Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, sendo possível aplicar seu uso em análises para diagnóstico de doenças hematológicas, em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de testes com roedores e plantas (FENECH, 1993; FÃO et al., 2012; DUSINSKA et al., 2019). Para que o micronúcleo seja visualizado é necessário uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, a realização do cultivo celular, ou uso de células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea e as raízes vegetais (meristemas) (SILVA et al., 2012; PALSIKOWSKI et al., 2017).

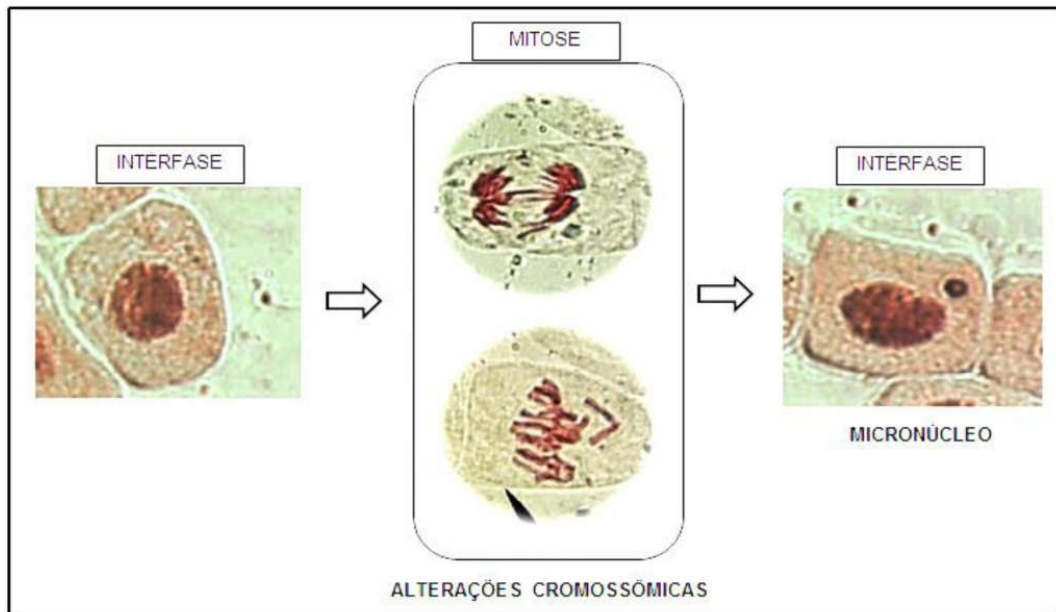


Figura 1. Célula em divisão mitótica e formação de micronúcleos.
Fonte: Elaborado pelos autores

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão (SILVA et al., 2003; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018). As raízes da *A. cepa* possuem processo de divisão celular similar aos do homem, e devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, apresenta potencial genotóxico em qualquer tipo de célula animal, vegetal ou microrganismos (COSTA; MENK, 2000; GAVRONSKI, 2008; ROBERTO et al., 2016).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura, demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

As coletas devem ser realizadas em pontos estratégicos, antes e após algumas possíveis causas de interferência na qualidade dos rios, podem ser locais de despejo de

dejetos humanos ou animais, frigoríficos, laticínios, cidades, conjuntos habitacionais dentre outros. Um exemplo de pontos de coletas pode ser observado na (Figura 2).

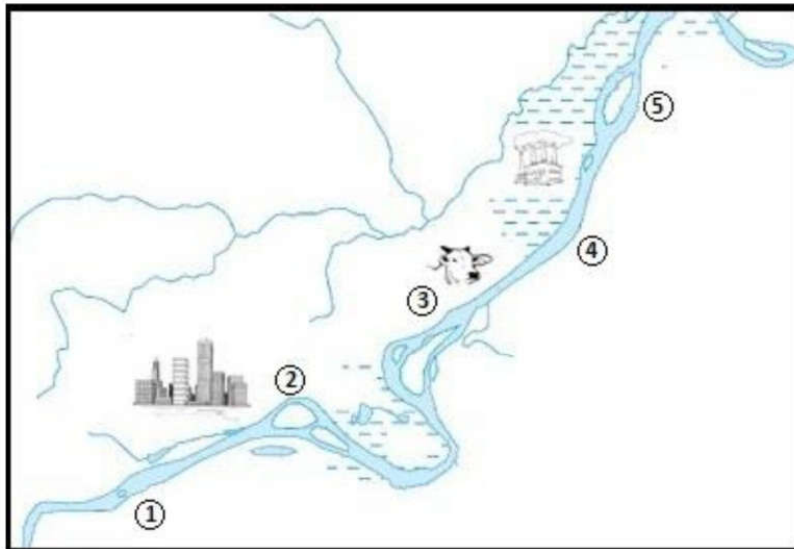


Figura 2. Mapa demonstrando os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 indicados para a coleta, em um determinado rio.

Fonte: Elaborado pelos autores

O ponto 1, da figura acima, ou a nascente do rio podem ser utilizados como controle negativo, porém é importante utilizar um segundo controle negativo contendo água mineral, para utilizar como parâmetro de comparação com o controle do ponto 1.

Em alguns casos, é indicada também a utilização de um controle positivo, contendo agentes mutagênicos, esse controle é importante para demonstrar a gravidade da poluição em casos de resultados com significância estatística alta.

As amostras poderão ser coletadas em dois períodos do ano, no de estiagem e de chuva, para observar se há variação nos resultados ao comparar o período da cheia com o período da seca em rios ou igarapés.

As coletas de água são, geralmente, feitas na calha central do rio na profundidade de 15 a 30 cm (CETESB, 1988). O balde normalmente utilizado para amostragem na superfície de corpos d'água (Figura 3), em geral, deve estar acoplado a uma corda e ser confeccionado em aço inox AISI 316L polido, para evitar incrustações nas costuras de solda, e apresentar volume adequado para a finalidade da amostragem (CETESB; ANA, 2011).



Figura 3. Coleta de águas superficiais com auxílio de balde inox acoplado a corda.
Fonte: Arquivo pessoal

Os recipientes mais utilizados para coleta e preservação de amostras são os de plástico autoclavável de alta densidade (polietileno, polipropileno, policarbonato ou outro polímero inerte) e os de vidro, com boca larga (mais ou menos 4 cm de diâmetro) para facilitar a coleta da amostra e a limpeza. As amostras deverão ser transportadas e mantidas sob refrigeração em torno de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (CETESB; ANA, 2011).

2.2 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO BULBOS DE *Allium cepa*

O experimento utiliza a espécie *Allium cepa*, (conhecida popularmente como cebola de cabeça) de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem (de preferência orgânica), não germinadas e saudáveis, sendo realizadas repetições de 10 espécimes por ponto de coleta (Figura 4a), postos a germinar em frascos transparentes de 50 ml (copos descartáveis ou coletores de fezes) com a parte inferior mergulhada nas águas coletadas (Figura 4b).

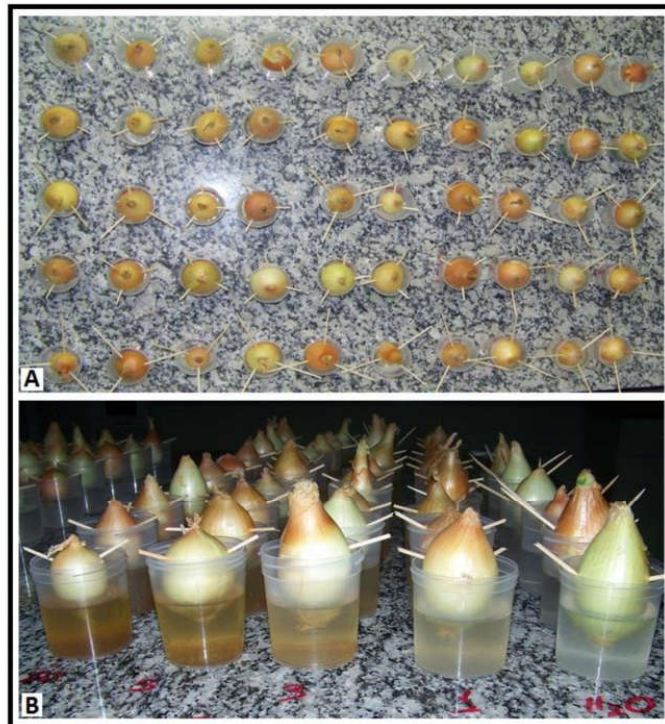


Figura 4. Germinação de *A. cepa*.
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

2.2.1 Preparo das lâminas

As seguintes etapas são adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas são coletados com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento (Figura 5), sendo lavados em água destilada.



Figura 5. Meristemas germinados
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

a) Para o preparo de 1 litro de solução 0,1 N de HCl, deve-se transferir 8,36 mL de HCl concentrado e diluir a 1000 mL;

Fórmula para preparo de solução HCL 1 N - Adicionar 3,65g de HCl em um litro de solução, 0,1 N = 0,1 Normal = 0,1 equivalente-grama/L = 0,1 eq-g/L , equivale a 3,65g de HCl em 1 L de solução.

A questão é como realizar este procedimento quando não é possível pesar o HCl?

Para isso, são necessárias algumas informações, pois normalmente essa substância é feita a partir de uma solução concentrada de HCl. Informações:

- HCl Fumegante.
- Concentração de HCl = 37%
- Densidade = 1,18 g/mL
- Mol do HCl = 36,5.

Se a densidade é 1,18 g/mL, é possível concluir que 1000 mL = 1180 g. Como a concentração é 37%, deve-se calcular a massa de HCl na solução utilizando uma regra de três:

- $c(\%) = (m \text{ HCL} \times 100) / m \text{ sol}$
 - $c(\%) = \text{concentração porcentual} = 37\%$
 - $m \text{ HCl} = \text{massa de HCl} = \text{valor procurado}$
 - $m \text{ sol} = \text{massa total da solução} = 1,18$
 - $\text{kg mHCl} = c(\%) \times m \text{ sol} / 100 = 37 \times 1,18 / 100 = 0,4366 \text{ kg ou } 436,6 \text{ g de HCl}$ por litro de solução.
 - $n \text{ equivalentes} = 436,6 / 36,5 = 11,96 \text{ equivalentes gramas de HCl}$
 - Então a solução é 11,96 N
 - $M_1 V_1 = M_2 V_2$
 - $V_1 = M_2 V_2 / M_1 = 0,1 \times 1000 / 11,96 = 8,36 \text{ mL}$;
- b) Inserir os meristemas coletados em tubos de ensaio e adicionar 1N HCL até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos;

- c) Hidrolisar os meristemas com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C e posteriormente resfriar os tubos em água corrente;
- d) Lavar os meristemas com água destilada;
- e) Realizar esfregaços em duas lâminas por bulbo, sendo postas em seguida em gelo seco por 1 minuto para retirada da lamínula e deixado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem;
- f) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- g) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- h) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- i) Em cada lâmina serão contadas mil células em interfase e a quantidade de micronúcleos por mil células (Figura 6).

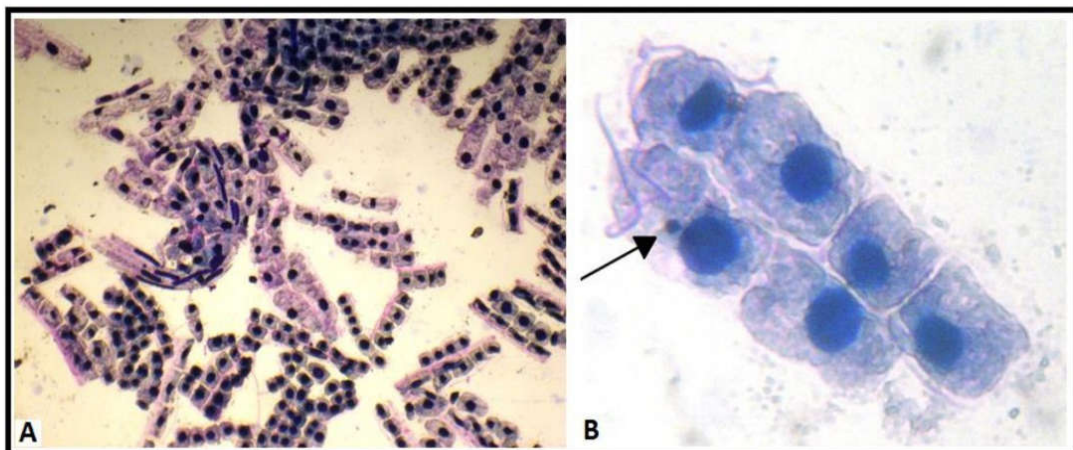


Figura 6. A – Células de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 10x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).

Fonte: Meneguetti et al. (2012)

2.3 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO SEMENTES DE *Allium cepa*

O uso das sementes de *A. cepa* fornece maior praticidade na realização de experimentos devido ocuparem menor espaço, não desprender odor intenso no local em que estão inseridas, de simples manuseio e facilidade de obtenção com boa qualidade e livre de agroquímicos (LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018).

2.3.1 Preparo das lâminas

Será descrito, a seguir, uma adaptação desta técnica utilizando as sementes de *A. cepa*:

- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (Figura 7). Cerca de 50 sementes por placa e duas placas para cada tratamento;



Figura 7. Sementes de *A. cepa*
Fonte: Arquivo pessoal

- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando como meio as amostras (água coletada e controle);
- c) Utilizar como Controle Negativo, água mineral e/ou a nascente do rio/Igarapé;
- d) Aplicar 3 ml das amostras e controle correspondentes, diariamente, utilizando pipeta Pasteur e manter a placa Petri fechada;
- e) Preparo da orceína acética a 2% (100 ml) para fixar e corar os meristemas - usar um béquer de 250 ml e colocar 100 ml de ácido acético 45%. Colocar o béquer no agitador magnético e adicionar 2,0 g de orceína. Deixar agitando por 10 minutos, filtrar a solução utilizando papel filtro e guardar em frasco fechado em temperatura ambiente;

- f) Coletar os meristemas com 1 a 2 cm de comprimento e colocar em tubos de ensaio ou Eppendorf previamente identificados com a amostra correspondente;
- g) Com auxílio de uma pipeta Pasteur, inserir no tubo/Eppendorf a orceína acética até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos, armazenar na geladeira (2 a 8 ° C) no período de 12 a 24 horas para fixação;
- h) Colocar os meristemas em lâminas, seccionar a porção apical (mais escura) e eliminar o restante do material;
- i) Posicionar uma lâmina limpa sobre a bancada e pingar, sobre ela, 3 gotas de orceína acética a 2%;
- j) Cobrir com uma lamínula e segurar a lâmina sobre a chama (bico de Bunsen/vela), a cerca de 5 cm de distância, por cerca de 3 segundos. Repetir esse procedimento por 3 vezes com intervalos de 3 segundos. Se houver necessidade acrescentar mais uma gota de orceína na borda da lamínula.
- k) Esmagar a ponta do meristema pressionando levemente a lamínula com a ponta da pinça. Atenção: cuidado para não deslocar a lamínula do lugar. A pressão deve ser suficiente para esmagar as raízes sem quebrar a lamínula.
- l) Retirar o excesso de orceína lático/acética colocando a lâmina entre um pedaço de papel filtro dobrado e passando o dedo sobre ele;
- m) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- n) Tirar fotos das lâminas em objetivas de 20x ou 40x (Figura 8) utilizando software de processamento e análise de imagens digitais;
- o) Utilizar contador de células para quantificar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.

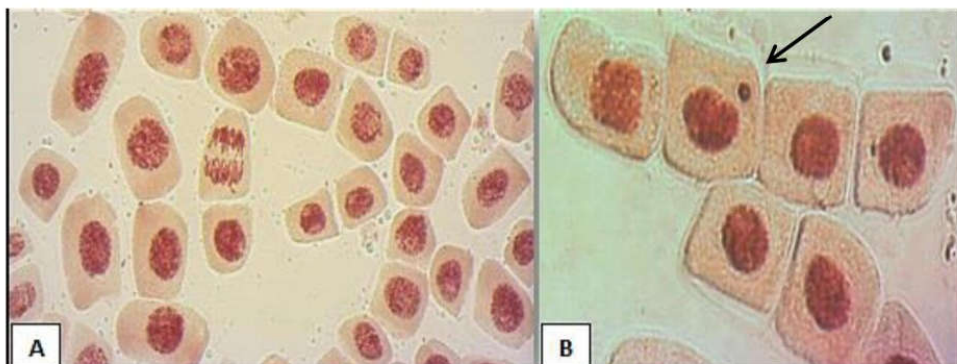


Figura 8. A – Células de *A. cepa* coradas com orceína acética 2% (ocular: 10x, objetiva 20x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).

Fonte: Arquivo pessoal

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste caso é utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), que é um procedimento paramétrico para analisar três ou mais tratamentos. Esse teste especifica se ocorreu diferença estatística significativa entre os postos, porém ele não especifica entre quais pontos ocorreu essa diferença, por esse motivo utiliza-se também o teste Tukey, que pode ser considerado como uma extensão do ANOVA.

Para essa análise são utilizados vários softwares, sendo indicado o Graphad Prism 5.0 para as pessoas que utilizam Windows XP, e a versão 6.0 para Windows 7, e outros sistemas operacionais.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

O sistema teste de *A. cepa* dispõe de aplicações e adaptações diversificadas que contribuem positivamente na elaboração de experimentos. As técnicas que fazem uso desse sistema são regularmente aprimoradas garantindo satisfatória reprodutibilidade e contribuição científica.

4. REFERÊNCIAS

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, CETESB, 1988.

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.

COSTA, R. M. A; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 24-26, 2000.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, 2018.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of

Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista de Saúde e Biologia - Sabios**, v.7, n.1, p.91-98, 2012.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, v. 285, p.35-44, 1993.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

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

GAVRONSKI, L. **Avaliação da Mutagênicidade de Amostras de Água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Aplicada) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, 2017.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotoxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p.176-181, 2010.

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

MENEGUETTI, D.U.O.; DA SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental and Analytical Toxicology**, v. 2, n.127, 2012.

MILLER, R.C. **The Micronucleus Test as an *in Vivo* Cytogenetic Method**. Environmental Health Perspectives. Institute for Medical Research Camden, New Jersey, 1973.

NETO, F. R.; FURTADO, L. G. A ribeirividade amazônica: algumas reflexões. **Cadernos de Campo**, n. 24, p.158-182, 2015.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

POLETO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.1, p.163-175, 2011.

QUADRA, G. R., ROLAND, F., BARROS, N., MALM, O., LINO, A. S., AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SILVA, J.; EDRTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.158-159, 2003.

SILVA, F. C.; BARROS, M.A.B.; VIANA, R.R.; ROMÃO, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; MENEGUETTI, D.U.O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p.13-22, 2011.

SILVA, A.M.; SOUZA, A.M.; MACIEL, F. P.; DINIZ, A.P.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; BARBOSA, N.V. et al. Analysis Physical-Chemical, Mutagenic and Antimutagenic of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae: Rubioideae) Noni, Germinated in the Region of Brazilian West Amazon. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 569, 2012.

SILVA, S. H.; NODA, S. N. A dinâmica entre as águas e terras na Amazônia e seus efeitos sobre as várzeas. **Ambiente e Água**, v. 11, n. 2, p. 378-386, 2016.

SINGH, M.; DAS, A.; SINGH, D.; MAITI, P.; SHABBIR, M.; DAS, A. High genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, p. 321-327, 2014.

SNIF. Sistema Nacional de Informações Florestais. **Os Biomas e suas florestas**. Brasília, 2014. Disponível em: florestal.gov.br

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere**, v. 217, p. 176-182, 2018.