



RAFAELA CARVALHO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE DANOS MUTAGÊNICOS ATRAVÉS DE
ENSAIO DE MICRONÚCLEOS**

LAVRAS-MG

2021

RAFAELA CARVALHO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE DANOS MUTAGÊNICOS ATRAVÉS DE ENSAIO DE
MICRONÚCLEOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

Profa.: Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

Orientadora

LAVRAS-MG

2021

RAFAELA CARVALHO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE DANOS MUTAGÊNICOS ATRAVÉS DE ENSAIO
DE MICRONÚCLEOS.**

**TÍTULO DA MONOGRAFIA, TCC, TESE OU DISSERTAÇÃO: Detection
of mutagenicity damage through micronucleus bioassay**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas, para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em ___ de ____ 2020.

Dra. _____ (UFLA)

Profa.: Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira

Orientadora

LAVRAS-MG

2021

*Dedico à memória de
Marta Maria de Jesus Souza,
minha querida e amada avó.*

AGRADECIMENTOS

À Deus e à sua Natureza.

Aos meus pais Robson e Rosana que me apoiaram e me incentivaram desde o meu nascimento. Que depositaram em mim o seu profundo amor e cuidado. A vocês dedico todo o meu esforço e a minha caminhada não só acadêmica, mas de toda a minha vida.

À Raíssa, minha irmã. Pela cumplicidade, compreensão e amor. Os melhores momentos da minha vida quero compartilhar com você, pois não há outra pessoa no mundo que eu deposite tanta confiança e orgulho. Voa, seja feliz. Eu te apoio!

Aos meus avós paternos e maternos: Vô Braz e a sua serenidade, Vó Marta que está em memória e em meu coração até a eternidade, Vô Aguilar e Vó Ana que compartilho tantas características em comum, como o amor pelas plantas, em especial, pelas orquídeas. Aprendo todos os dias da minha vida com vocês e cuidarei de vocês até o fim.

À toda a minha família, tios, tias, primos, primas. Em especial a Tia Yô, com quem convivi parte da minha graduação e me acolheu com amor. Essa é Federal!

À Renata, pela lealdade, fidelidade e compreensão. Sua bondade é genuína.

À minha colega de casa que se tornou amiga e família, Gabriela Bacci, a famosa Bibi. Obrigada pela acolhida, pela cumplicidade e paciência.

A todos meus amigos com quem compartilho uma amizade há anos, em especial ao meu amigo Luiz, um amigo de todas as horas e para toda a vida.

À todas as pessoas que passaram na minha vida deixando seu legado. Obrigada pelas experiências, elas foram essenciais.

A todos os meus professores desde a pré-escola até a universidade. O meu profundo respeito e admiração por todos.

A todos os meus colegas do curso de Ciências Biológicas com quem eu compartilho um grande afeto.

A todos do Laboratório de Citogenética, em especial a Dra. Graciele Silveira que me ensinou a dar os primeiros passos dentro de um laboratório e ao Fábio e Maria Gabriela que muito me ajudaram. Sucesso a todos!

À minha orientadora Profa. Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira que sempre me instruiu com imensa competência e com quem aprendo constantemente. Obrigada pela paciência e empenho.

E à Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade.

*“Se a educação sozinha não transforma a sociedade,
sem ela tampouco a sociedade muda.”
(Paulo Freire)*

RESUMO

O principal objetivo do estudo de toxicologia ambiental é compreender os efeitos de poluentes ambientais nos seres vivos. Diversas técnicas estão disponíveis com o intuito de compreender o efeito e mecanismo de ação de substâncias potencialmente tóxicas, entre elas, podemos destacar aquelas com ação citogenotóxica. Foi avaliada a mutagenicidade de poluentes ambientais (agente alquilante MMS, o herbicida Atrazina, metal pesado Cádmio e o resíduo sólido Spent Pot Liner - SPL) através do ensaio de micronúcleo em células F1 de pontas de raiz dos modelos vegetais *Allium cepa* e *Lactuca sativa*. A água destilada foi utilizada para controle negativo. A frequência de micronúcleos foi avaliada e o tamanho dos micronúcleos induzidos por cada agente foi medido. Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo em ambos modelos. As células tratadas com MMS em ambos modelos apresentaram uma maior frequência de micronúcleos, seguido do Atrazina, SPL e Cádmio. Com relação ao tamanho de micronúcleos entre os diferentes tratamentos dentro do modelo *A. cepa* e *L. sativa*, o MMS apresentou as menores medidas de micronúcleos e todos os demais tratamentos apresentaram medidas maiores, que diferiram significativamente do MMS. As medidas dos micronúcleos observadas nos tratamentos com MMS e SPL diferiram entre os modelos vegetais, sendo menores em alface do que em cebola. Já os micronúcleos decorrentes da exposição ao Cd e ATZ apresentaram tamanho significativamente iguais entre os modelos avaliados

Palavras chave: Atrazina. Cádmio. Micronúcleo. MMS. Spent Pot liner.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	9
2.1 A problemática entre a poluição e mutagênese ambiental	9
2.2 Importância dos bioensaios na toxicologia ambiental	10
2.3 O uso do ensaio de micronúcleo para avaliar o potencial mutagênico de poluentes ambientais.	13
2.4 Poluentes ambientais utilizados no presente estudo	14
2.4.1 Atrazina (ATZ)	14
2.4.2 Cádmiio (Cd)	15
2.4.3 Spent Pot-Liner (SPL)	15
2.4.4 Metil Metano Sulfonato (MMS)	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Material	16
3.2 Metodologia	17
3.2.1 Exposição aos agentes químicos	17
3.2.2 Análise de frequência de micronúcleos	17
3.2.3 Análise estatística	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Resultados	18
4.1.1 Efeito de poluentes sobre a frequência de micronúcleos	19
4.1.2 Efeito dos poluentes sobre a área dos micronúcleos	20
4.2 Discussão	21
5 CONCLUSÃO	23
6 REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A partir da segunda metade do século passado a humanidade pôde acompanhar as consequências de um sistema remanescente da Revolução Industrial que, por visar apenas a produtividade com foco no crescimento econômico, não zelou pela qualidade do ambiente e a consequente saúde da população. Contaminações de rios, poluição do ar, vazamento de produtos químicos nocivos e a perda de milhares de vidas foram o estopim para que, partindo da população e passando pela comunidade científica, governantes de todo o mundo passassem a discutir e buscar formas de remediação ou prevenção para que tamanhas catástrofes não se repetissem. (POTT e ESTRELA, 2017).

Diante dessa problemática ambiental, tem se reconhecido nos últimos anos, a importância de levantar todas as informações sobre os resíduos ambientais para assegurar a qualidade e a saúde ambiental, tanto em curto como em longo prazo (SILVEIRA, 2016). Além das características físico-químicas dos agentes poluidores, o conhecimento sobre os efeitos que eles podem ter nos organismos vivos é de extrema importância (ANDRADE-VIEIRA, 2012).

A toxicologia ambiental é um ramo de estudo que tem como principal objetivo avaliar as ações de agentes poluidores e compreender os efeitos de poluentes ambientais nos seres vivos. Entende-se por toxicidade qualquer efeito adverso manifestado por organismos testes, o que pode incluir desde alterações genéticas, imobilidade, deformidades até letalidade (SISINNO e OLIVEIRA, 2013).

Uma das metodologias que vem sendo utilizada para avaliar a toxicidade de poluentes ambientes são os bioensaios com organismos modelos, os quais são essenciais para o monitoramento da ação tóxica dos poluentes em organismos vivos. Os bioensaios que utilizam plantas superiores apresentam vantagens por serem mais simples e de baixo custo (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1982) e por não necessitar de aprovação em comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) quando comparados aos bioensaios com modelos animais. Além disso, compõem um sistema de grande importância como bioindicadoras de poluição e vêm sendo utilizadas há bastante tempo para este fim, uma vez que propiciam a avaliação da toxicidade e mutagenicidade no ambiente natural (*in situ*) (SANDALIO et al., 2001).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A problemática entre a poluição e a mutagênese ambiental

Nas últimas décadas, houve um aumento populacional considerável e um crescimento na área industrial, com isso as atividades antrópicas se tornaram ainda mais intensas devido às necessidades envolvidas na produção de energia, materiais e alimentos suficientes para toda a população. Como consequência, o aumento da industrialização, tecnologia e economia mudaram radicalmente o planeta. Como exemplos dessas mudanças temos o aquecimento global, poluição atmosférica e da água, destruição da camada de ozônio, grandes quantidades de resíduos sólidos e chuva ácida. É importante salientar que essas mudanças provocadas pela poluição podem afetar profundamente a saúde e o bem-estar dos seres vivos, uma vez que esses possuem uma relação direta com o meio ambiente em que vivem (YU, 2011).

Uma grande variedade de substâncias químicas com potencial mutagênico, tanto naturais como sintéticas, têm sido investigadas. Muitas destas substâncias, que são encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos complexos de efluentes domésticos e industriais e nos defensivos agrícolas podem causar mudanças prejudiciais herdáveis, sem que se expressem de imediato (VOGEL, 1995).

A grande variedade de atividades produtivas gera compostos diversos que podem ser caracterizados desde os menos nocivos até aqueles com um alto grau de toxicidade, podendo ser substâncias simples ou uma mistura de diferentes compostos com os mais variados mecanismos de ação (PALMIERI, 2012). Esses poluentes são classificados por Walker et al. (2012), como íons inorgânicos (Cd, Pb, Zn, NO_3^- e PO_4^{3-}) e compostos orgânicos (hidrocarbonetos, inseticidas, herbicidas e produtos farmacêuticos). De qualquer forma, quando descartados ou manejados de forma inadequada, apresentam um sério risco ao meio ambiente e à saúde humana (HOUK, 1992).

Sabe-se que os agroquímicos possibilitaram o aumento da produção de alimentos necessária para acompanhar o grande crescimento populacional durante o último século. Porém, esses produtos podem contaminar o ambiente, inclusive os alimentos e, devido à sua toxicidade, colocar em risco todo um ecossistema (CARVALHO, 2017). O contato de alguns metais com sistemas biológicos pode induzir a alterações metabólicas, estresse oxidativo, modificação de proteínas, danos ao DNA, entre outros problemas ao organismo que podem ser passadas através de gerações e provocar doenças graves como o câncer (BAFANA et al., 2018). Isso evidencia o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dos metais e justifica a constante preocupação com o descarte inadequado desses compostos no meio ambiente (WU et al., 2016).

As mutações podem ser classificadas como gênicas e cromossômicas. Mutações gênicas são caracterizadas pela alteração da sequência de nucleotídeos no polímero de DNA através de substituições, inserções ou deleções dos mesmos e alteram o comportamento de um gene. Já as mutações cromossômicas, ocorrem devido à uma falha na segregação, alterando a estrutura e/ou o número do complemento cromossômico (NUSSBAUM; MCINNER; WILLARD, 2016). Portanto, o estudo do efeito de poluentes com potencial genotóxico tem aumentado significativamente, uma vez que suas ações podem levar à mutações (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

2.2 Importância dos bioensaios na toxicologia ambiental

Tendo em vista a preocupação dos estudos em Toxicologia Ambiental em entender como agentes tóxicos podem afetar os organismos vivos surgiu a necessidade da criação de testes eficazes que avaliem com precisão a toxicidade de poluentes ambientais. Entre alguns exemplos de testes que determinam a toxicidade de substâncias estão ensaios sobre a composição química e os ensaios biológicos ou bioensaios (PALMIERI, 2012). Apesar de cada teste sozinho possuir sua devida importância, em uma abordagem eco-geno-toxicológica é importante a realização de uma bateria de testes que sejam capazes de fornecer a maior quantidade de informações possíveis para que o real risco que esses compostos oferecem ao ecossistema seja conhecido (ALTENBURGER et al., 2015; PEDRAZZANI et al., 2018).

Organismos vivos respondem diretamente à essas substâncias evidenciando o impacto que elas causam no ambiente e fornecendo uma medida mais direta da toxicidade do que somente análises químicas (CHAPMAN; LONG, 1983; KEDDY; GREENE; BONNELL, 1995).

De acordo com Silveira (2016), os bioensaios permitem avaliar diferentes aspectos dos mecanismos de ação do agente poluidor, como por exemplo sua influência na anatomia, fisiologia, comportamento, célula e DNA. Mais especificamente para agentes citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, várias técnicas são utilizadas como ferramenta para a detecção desse potencial, como o teste de aberrações cromossômicas, ensaio cometa, teste de micronúcleo e análise de características nucleolares (ARKHIPCHUK; GARANKO, 2005, 2002; CORRÊA et al., 2016; BAJPAYEE; KUMAR; DHAWAN, 2016; PATHIRATNE; HEMACHANDRA; DE SILVA, 2015).

Dois grandes grupos de organismos são utilizados em bioensaios, dependendo do seu sistema biológico e do *endpoint* desejado: seres unicelulares são utilizados em testes para

detecção de agentes que induzem mutações gênicas e danos primários ao DNA. A exemplo, podemos citar o teste Ames, com a bactéria *Salmonella typhimurium* e o SOS-Chromotest, que utiliza *Escherichia coli*. Já para testes com organismos pluricelulares, plantas, mamíferos, peixes, crustáceos e insetos são exemplos de organismos Semodelo para detecção de inibição de crescimento, mortalidade, mutações gênicas, danos e reparos ao DNA, aberrações cromossômicas e aneuploidias. A variedade de organismos utilizados em teste biológicos para determinação de toxicidade de poluentes ambientais fornece informações imprescindíveis para o entendimento dos mecanismos de ação desses compostos, sendo importante na identificação de riscos aos seres vivos (HOUK, 1992; WIECZERZAK; NAMIEŚNIK; KUDŁAK, 2016).

Dentre os organismos utilizados para a realização de bioensaios, os vegetais superiores se destacam dos demais. Leme e Marin-Morales (2009), afirmam que as plantas superiores são excelentes modelos para o estudo do efeito de poluentes ambientais, devido à sua alta sensibilidade a agentes mutagênicos. Além disso, bioensaios vegetais permitem o uso de um grande número de *endpoints* para o monitoramento da ação de resíduos tóxicos, desde mutações a aberrações cromossômicas, sejam elas em uma única célula até órgãos como folhas, pólen e endosperma (GRANT, 1994). Portanto, as plantas são excelentes sistemas para indicar os efeitos genotóxicos de misturas complexas, proporcionando vantagens únicas no monitoramento *in situ* e na detecção de possíveis danos genéticos resultantes da exposição a produtos químicos em seu ambiente (GRANT, 1999; MONTEIRO et al., 2007). Elas compõem um sistema de grande importância como bioindicadoras de poluição e vêm sendo utilizadas há bastante tempo para este fim, uma vez que propiciam a avaliação da toxicidade e mutagenicidade no ambiente natural (*in situ*) (SANDALIO et al., 2001) e (*ex-situ*) em laboratório. Dentre vantagens de se utilizar plantas em bioensaios de cito(geno)toxicidade, vale destacar também o fato de que plantas são fáceis de lidar, geralmente possuem cromossomos grandes e de fácil visualização, são de baixo custo e apresentam boa correlação com outros sistemas, como modelos animais (FISKESJÖ, 1985) inclusive células humanas, como demonstrado por Reis (2017).

Apesar da utilização de vegetais superiores como organismos modelo para a investigação do efeito de poluentes ambientais ser feita desde os anos 1930, somente no final da década de 1970 e início da de 1980 foi popularizado os testes realizados com esses organismos, uma vez que focaram na importância do uso dos mesmos para monitoramento ambiental, bem como listaram as espécies mais indicadas para investigações acerca do potencial tóxico e mutagênico de poluentes (GRANT, 1994, 1999).

Grant (1994) ressalta que os vegetais superiores mais usados em bioensaios são a *Allium cepa* L. (2n=16), *Arabidopsis thaliana* sp. (2n=10), *Crepis capillaris* sp (2n=6), *Vicia faba* sp. (2n=12), *Tradescantia* sp. (2n=24), *Zea mays* sp. (2n=20), *Glycine max* sp. (2n=40), *Hordeum vulgare* sp. (2n = 14), *Lycopersicon esculentum* sp. (2n = 16), *Nicotiana* sp. (2n = 48), *Pisum sativum* sp. (2n = 14), sendo cada uma das espécies citadas efetiva para o tipo de *endpoint* que se deseja estudar.

Entre as espécies citadas, *Allium cepa* (cebola) é a mais utilizada para estudos de aberrações cromossômicas. Segundo Fiskesjö (1985), a utilização da cebola como organismo modelo para detecção de atividade genotóxica de compostos químicos foi introduzida primeiramente por Levan em 1938, quando este investigou os efeitos antimitóticos da colchicina.

Allium cepa, é uma monocotiledônea da família Amaryllidaceae e destaca-se como um excelente modelo vegetal para bioensaios de cito(geno)toxicidade devido a características como cromossomos grandes e em pequena quantidade (2n=16), o que facilita análises para detecção de aberrações cromossômicas e alterações no ciclo celular (FISKESJÖ, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009) e mostra um excelente modelo para estudos relacionados ao metabolismo celular e atividade transcricional do rDNA (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015).

A espécie também apresenta sensibilidade e resultados similares aos obtidos em células humanas (FISKESJÖ, 1985; REIS et al., 2017) o que nos possibilita inferir sobre o risco real dos poluentes sobre a saúde humana. Ademais, a reprodutibilidade do teste em um modelo vegetal permite uma redução no número de animais que seriam usados e, conseqüentemente, sacrificados para esse tipo de estudo (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014), que possibilita, portanto, realizar um maior número de tratamentos sem se preocupar com a comissão de ética.

A *L. sativa*, assim como a *A. cepa*, apresenta um número pequeno de cromossomos (2n=2x=18), que variam de 2,8 a 5,5 µm de tamanho (MATOBA et al., 2007) e são facilmente visualizados ao microscópio. Segundo Silveira (2016a), a eficiência na utilização da *L. sativa*, para avaliar a genotoxicidade de compostos já vem sendo comprovada em grupos de pesquisa que começaram a utilizar a avaliação do ciclo celular e de suas alterações para complementar a análise de germinação e crescimento da plântula, tanto em estudos sobre a alelopatia como em estudos envolvendo resíduos industriais, tendo resultados tão confiáveis e reproduzíveis quanto os obtidos em testes com *A. cepa*, como por exemplo os trabalhos de Andrade-Vieira et

al. (2014); Aragão et al. (2015); Campos et al. (2008); Hou et al. (2014); Palmieri et al. (2014) e Sousa et al. (2009).

Portanto, ambas espécies vegetais (*A. cepa* e *L. sativa*) são utilizadas em estudos que investigam os efeitos de substâncias sobre o ciclo celular. Esses estudos demonstraram a possibilidade de realizar ensaios macroscópicos (germinação e desenvolvimento inicial das plântulas) e microscópicos (análise de alterações na célula ciclo, esqueleto de proteína cromossômica e núcleo em geral) simultaneamente (SILVEIRA et al., 2017).

2.3 O uso do ensaio de micronúcleo para avaliar o potencial mutagênico de poluentes ambientais

O micronúcleo consiste numa porção citoplasmática de cromatina de forma redonda ou ovalada que se localiza perto do núcleo. A sua formação resulta de uma lise na molécula de DNA após a ação de carcinógenos quando as células da camada basal, ou meristema, estão em divisão. São constituídos de fragmentos de cromátide ou, cromossomos acêntricos ou aberrantes, que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose (SETÚBAL et al., 2005).

Foram primeiramente descritos por Howell em 1891 como inclusões citoplasmáticas em células vermelhas do sangue de gatos anêmicos. Jolly observou essas mesmas estruturas em 1901 em seus estudos com eritrócitos de embriões de ratos (SLESINSKI e GUZZIE, 1988). Embora os micronúcleos possam ser originados espontaneamente, a sua indução é comumente usada para se detectar danos genotóxicos resultantes de exposição a agentes mutagênicos (HEDDLE, et al., 1983; MAJER et al., 2001).

Desta forma, o ensaio do micronúcleo avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros, caracterizando a potencialidade mutagênica do agente estudado. A técnica é aplicada, principalmente, em monitoramento da poluição ambiental e utiliza diversos organismos testes (roedores, peixes, plantas, etc.) como bioindicadores (FERNANDES, 2005).

2.4 Agentes químicos utilizados no presente estudo

2.4.1 Atrazina (ATZ)

A Atrazina é um herbicida que faz parte da classe das triazinas. É um dos agroquímicos mais estudados na história. Esse herbicida é importante no controle de ervas daninhas em mais de 50 culturas ao redor do mundo, principalmente na cultura do milho, sorgo e cana-de-açúcar (LEBARON; MCFARLAND; BURNSIDE, 2008). As triazinas, são tóxicas, persistentes no ambiente e potencialmente carcinogênicos para o homem, sendo também importantes contaminadores dos corpos d'água e já foram detectados inclusive na água de abastecimento público (BESPLUG et al., 2004; PATUSSI e BÜNDCHEN, 2013). A ATZ é conhecida por ser tóxica para vários organismos vivos e foi banida da Europa em 2004, sendo encontrada em águas superficiais, subterrâneas e no solo, porém é ainda usada nas Américas (European Commission, 2004). Venceslau et al. (2017), demonstraram o potencial genotóxico do herbicida a uma concentração de $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ em células de *Lactuca sativa* provocando um aumento na frequência de aberrações cromossômicas e morte celular. A diminuição do índice mitótico, ocorrência de micronúcleos e aberrações cromossômicas em células de *Allium cepa* e *Vicia fava* tratadas com ATZ foram relatadas por Srivastava e Mishra (2009) e por Silveira et al. (2017) em células de *Allium cepa* e *Lactuca sativa*, que evidenciou o potencial cito(genoto)tóxico deste herbicida.

Além disso, o potencial tóxico da atrazina já foi relatado em células humanas, sendo capaz de induzir danos em células sanguíneas (como micronúcleos, brotos e apoptose) (RUIZ-GUZMÁN et al., 2017) e indução de apoptose em células SH-SY5Y (ABARIKWU; FAROMBI, 2015). Em aves, a atrazina é capaz de causar alterações morfofisiológicas no fígado, através de danos mitocondriais e indução de apoptose em hepatócitos (ZHANG et al., 2017).

2.4.2 Cádmio (Cd)

O cádmio é um metal pesado que possui a densidade igual a $8,6 \text{ gcm}^{-3}$. É liberado no ambiente por estações de geração de energia, indústrias de metal e de cimento, incineradores, tráfego urbano e é um dos componentes de fertilizantes de fosfato (SANITÀ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). De acordo com Pinto et al. (2004), o Cd é um elemento reconhecido devido à sua alta toxicidade e solubilidade em água, sendo assim de grande preocupação para a contaminação em uma cadeia alimentar.

Este metal é conhecido pelo seu potencial cito(genoto)tóxico, induzindo à queda do índice mitótico, aberrações cromossômicas como c-metáfases, pontes em anáfase,

cromossomos aderentes e micronúcleos em diversos organismos como tomate, cevada e peixes (CARVALHO et al., 2018; SHI et al., 2016). O potencial tumorigênico do Cd em *zebrafish* foi demonstrado através do estímulo à proliferação celular combinado com a inibição da apoptose, criando um ambiente propício a instabilidade genômica e carcinogênese (CHEN; ZHU; CHAN, 2014). Além disso, o Cd é absorvido rapidamente pelas raízes das plantas e armazenado em apoplastos ou vacúolos, inibindo o crescimento da raiz, além de poder induzir a fragmentação da cromatina e provocar alterações no nucléolo (BEHBOODI e SAMADI, 2004).

2.4.3 Spent Pot-Liner (SPL)

Segundo Palmieri (2014) e Silveira (2002), o Spent Pot-Liner é um resíduo sólido da produção de alumínio formado por uma série de substâncias que se acumula nas cubas de redução da alumina durante os processos de purificação e refino da bauxita. Esse composto é caracterizado por apresentar diversos componentes, entre eles o fluoreto e cianeto e por esta razão e por ter tendência de dissociação ao entrar em contato com água, foi classificado pela US Environmental Protection Agency (USEPA) como resíduo perigoso (SILVEIRA, 2002).

É comprovadamente tóxico, provocando redução significativa no índice mitótico, no crescimento radicular e retardo no enraizamento de sementes de modelos vegetais testados (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008), além de alterações no ciclo celular, tanto em *A. cepa* (ANDRADE; CAMPOS; DAVIDE, 2008; ANDRADE-VIEIRA; CAMPOS; DAVIDE, 2012) como em *L. sativa* (ANDRADE; DAVIDE; GEDRAITE, 2010; PALMIERI et al., 2014).

Além disso, podem provocar inibição do crescimento radicular, aberrações cromossômicas de origem clastogênica e aneugênica, fragmentação do DNA e até mesmo morte celular tanto em células de modelos vegetais (*Allium cepa* e *Lactuca sativa*), como animais (*Danio rerio*) (ANDRADE-VIEIRA; PALMIERI; DAVIDE, 2017; CASTRO et al., 2018; FREITAS et al., 2016) e humanas (Palmieri et al., 2016, REIS et al., 2017)

2.4.4 Metil Metano Sulfonato (MMS)

Segundo Mauro et al. (2014), o MMS é um agente indutor de danos no DNA porque atua como um agente alquilante, provocando uma série de lesões, incluindo rupturas na cadeia. Essas alterações podem ser observadas como *endpoints* no ciclo celular. O Metil

Metano Sulfonato (MMS) é muito utilizado como controle positivo em alguns testes de cito(geno)toxicidade, o qual pode induzir alterações nucleares como observado por Tan et al. (2014).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

As espécies modelo utilizadas foram *Allium cepa* L. var. *baia periforme* (cebola) e *L. sativa* L. var. *verônica* (alface). As sementes usadas para os experimentos eram novas, sendo utilizadas dentro de 6 meses após a data de análise fornecida pelo produtor.

As soluções usadas para o teste foram preparadas a partir de compostos químicos com ação conhecidamente citotóxica e mutagênica, sendo eles:

- (1) Spent Pot Liner (SPL), na concentração de 26,5 g.L⁻¹, dose determinada por Palmieri et al. (2014), como sendo referente à concentração que inibiu o crescimento de plântulas de *L. sativa* em 50% (IC₅₀). A solução foi preparada pelo método de adsorção descrito por Palmieri et al. (2014).
- (2) Cádmio (Cd), a uma concentração de 25 µM que, segundo Behboodi e Samadi (2004), induziu a fragmentação do DNA e morte celular por apoptose em células de *Allium cepa*. A solução foi preparada a partir do sal CdSO₄, segundo BEHBOODI; SAMADI, (2004)
- (3) Atrazina (ATZ), herbicida utilizado no controle de plantas daninhas, na concentração de 0,003 g.L⁻¹. De acordo com Venceslau (2017), essa concentração induziu uma alta taxa de aberrações cromossômicas e alterações nucleares;
- (4) A solução de Metil Metano Sulfonato (MMS) foi utilizada como controle positivo na concentração de 4x10⁻⁴ mol.L⁻¹. Essa concentração é normalmente utilizada como controle positivo em trabalhos de cito(geno)toxicidade devido à sua capacidade de induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Neste experimento foi utilizada a água destilada como controle negativo.

Todos os experimentos e análises foram realizados no Laboratório de Citogenética, no Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Metodologia

3.2.1 Exposição aos agentes químicos

O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com 5 repetições (placa de Petri) por tratamento. Foram utilizadas no total 25 placas de Petri de polietileno com 30 sementes em cada placa de cada espécie modelo. As sementes foram dispostas nas placas de Petri sobre papel filtro embebido de 3 mL de água destilada. Após emissão de raiz, foram adicionados 3 mL das soluções teste (item 3.1) em cada placa e após 96 horas as raízes tratadas foram coletadas para análise microscópica. Durante todo o período do experimento as placas foram acondicionadas em estufa B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand), à 24 °C, no escuro (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009). As raízes foram coletadas, excisadas das sementes e fixadas em Carnoy na proporção de 3:1 de Álcool Etílico e Ácido Acético Glacial e armazenadas a -4° C.

3.2.2 Análise de frequência de micronúcleos

Para avaliação citogenética foram confeccionadas 5 lâminas para cada tratamento. Para o preparo das lâminas, as raízes passaram por hidrólise com HCl 1N a 60 °C, em banho maria, seguida de exposição ao Reativo de Shiff, no escuro, por 1 h e 30 min. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento (BELLING, 1921).

As análises foram realizadas em microscópio de luz, na objetiva de 40X. Foram contabilizadas 1000 células por lâmina da região F1 da raiz (Figura 1), conforme mostrado por Palmieri et al. (2016), e anotada a frequência de micronúcleos observada.

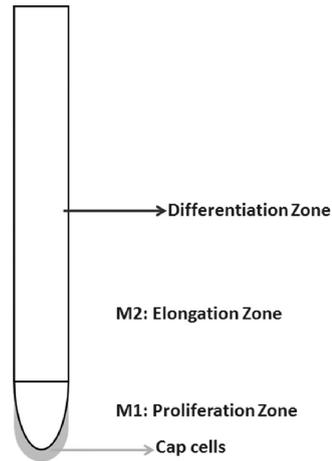


Figura 1- Modelo da raiz identificando suas áreas. A região F1 corresponde a "M2: Elongation Zone" como mostrado na figura. Fonte: Palmieri et al, 2016.

Para a mensuração da área dos micronúcleos, foram capturadas imagens de 20 micronúcleos ao acaso, sendo 4 por lâmina e utilizado o software livre ImageJ Versão 1.8.0 (Image Processing and Analysis in Java) o qual foi calibrado em μm (micrômetro) para corresponder a unidade de medida utilizada para mensurar células.

3.2.3 Análise Estatística

Para a análise estatística da frequência de micronúcleos nos tratamentos foi usado o Programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2021), realizando o teste de Tukey ($p < 0,05$).

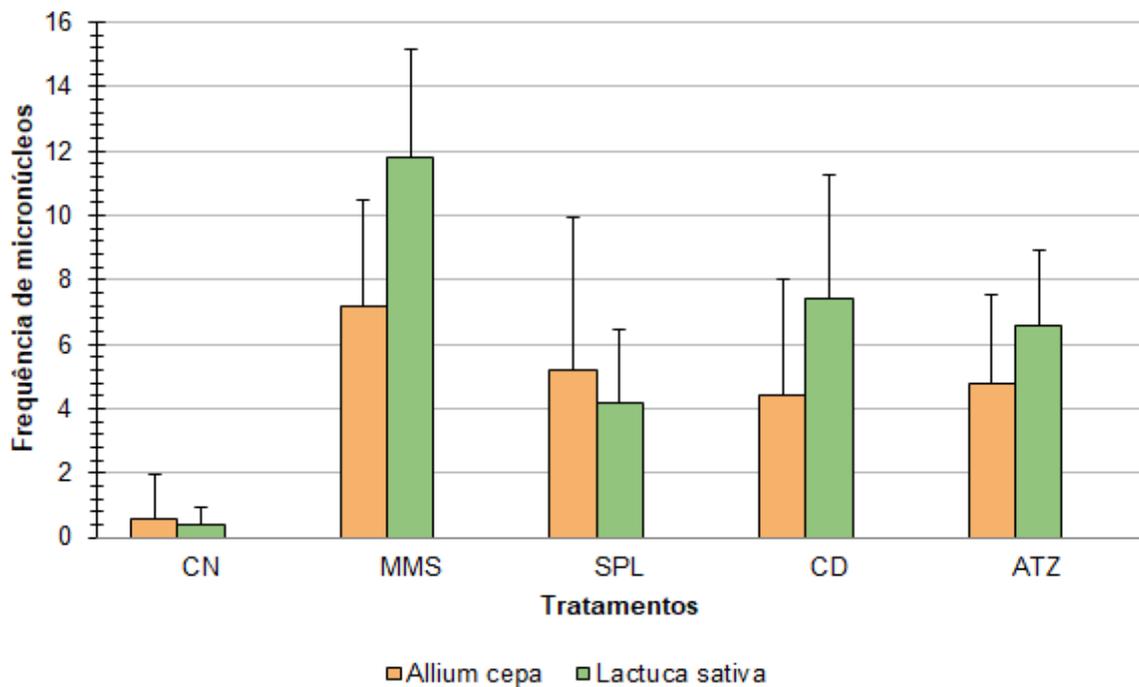
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados

4.1.1 Efeito de poluentes sobre a frequência de micronúcleos

Foi observado que a frequência de micronúcleos nas células das raízes de *A. cepa* e *L. sativa* aumentou significativamente ao se comparar as tratadas com ATZ, Cd, SPL e MMS com àquelas expostas ao controle negativo. Além do mais, não houve diferença significativa entre os dois modelos vegetais ($p < 0,05$) (GRÁFICO 1)

Gráfico 1 - Frequência de micronúcleos em ambos os modelos vegetais nos diferentes tratamentos.



Em ambos modelos vegetais, o tratamento MMS apresentou maior frequência de micronúcleos, contabilizando 7,2 em *A. cepa* e 11,8 em *L. sativa*. O metal pesado Cádmio apresentou 4,4 de frequência de micronúcleo na *A. cepa* e 7,4 no *L. sativa*, seguido do SPL com 5,2 (*A. cepa*) e 4,2 (*L. sativa*) e o herbicida atrazina apresentando 4,8 no modelo *A. cepa* e 6,6 no *L. sativa*. Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo.

E, independente do modelo vegetal usado, a frequência de micronúcleos não apresentou diferenças estatísticas significativas entre eles.

4.1.2 Efeito dos poluentes sobre a área dos micronúcleos

As medições de micronúcleos entre os tratamentos em células F1 de *A. cepa* variaram de 4,37 μm^2 no tratamento com MMS a 12, 23 μm^2 com SPL. Em *L. sativa* a variação no tamanho dos micronúcleos nas células tratadas foi de 1,22 μm^2 para MMS a 8,37 μm^2 para ATZ. (TABELA 1)

Tabela 1 - Médias da áreas em μm^2 de micronúcleos avaliados

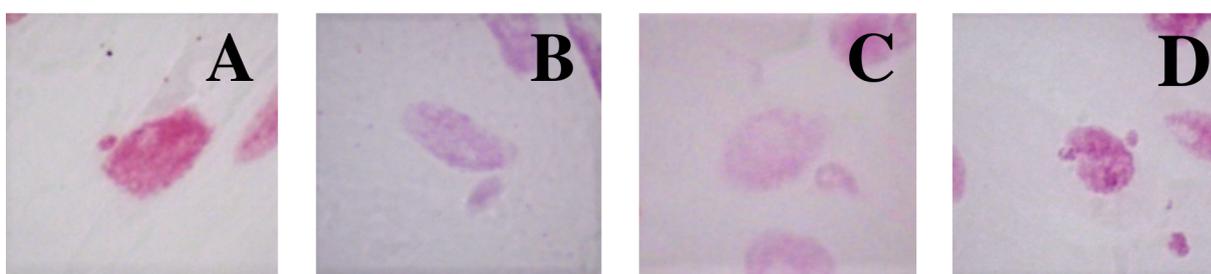
Modelos	Tratamentos			
	MMS	SPL	Cd	ATZ

<i>Allium cepa</i>	4,37 b	12,23 *b	8,5985 *	8,37 *
<i>Lactuca sativa</i>	1,2224 b	4,55 *b	6,04 *	8,35 *

Em *A. cepa* os tamanhos de micronúcleos entre os tratamentos obedecem a seguinte ordem crescente: MMS<Cd<ATZ<SPL, enquanto para alface constituiu em: MMS<SPL<Cd<ATZ (FIGURA 3 e 4).

Comparando o tamanho de micronúcleos entre os diferentes tratamentos dentro do modelo *A. cepa* e *L. sativa*, o MMS apresentou as menores medidas de micronúcleos e todos os demais tratamentos apresentaram medidas maiores, que diferiram significativamente do MMS. Além disso, as medidas dos micronúcleos observadas nos tratamentos com MMS e SPL diferiram entre os modelos vegetais, sendo menores em alface do que em cebola. Já os micronúcleos decorrentes da exposição ao Cd e ATZ apresentaram tamanho significativamente iguais entre os modelos avaliados (FIGURA 2).

Figura 2 - Tamanho de micronúcleos entre os diferentes tratamentos no modelo *A. cepa*.



A: micronúcleo apresentado no tratamento com MMS; B: micronúcleo apresentado no tratamento com SPL; C: micronúcleo apresentado no tratamento com Cd e D: micronúcleo apresentado no tratamento com ATZ. Fonte: Da autora (2021).

4.2 Discussão

No presente trabalho, agentes conhecidamente tóxicos, com ação mutagênica, foram utilizados como indutores de micronúcleos em dois modelos, a *A. cepa* e *L. sativa* com intuito de avaliar a frequência de micronúcleos e o modo de ação dos agentes poluidores.

Os micronúcleos são constituídos de fragmentos de cromátide ou cromossomos acêntricos ou aberrantes, que não foram incluídos no núcleo principal após a conclusão da mitose (SETÚBAL et al., 2005) sendo este morfológicamente igual ao núcleo principal, porém de tamanho inferior (BALLESTRERI, 2017). Entende-se então que, os micronúcleos

são resultado de danos cromossômicos estruturais ou do aparelho mitótico. (VOISIN et al., 2002).

Existem dois modos de ação em que os micronúcleos se originam em decorrência da exposição em agentes mutagênicos, sendo eles: o de ação clastogênica e o de ação aneugênica.

De um modo geral, as pontes e quebras cromossômicas, indicam ação clastogênica, e resultam em micronúcleos menores, enquanto cromossomos não orientados, atrasados, multipolaridade e c-metáfases, são consequência de efeitos aneugênicos (LEME e MARIN-MORALES, 2009) e resultam em micronúcleos maiores (FIGURA 5). Comparando o tamanho de micronúcleos entre os diferentes tratamentos dentro do modelo *A. cepa* ou *L. sativa*, o MMS apresentou as menores medidas de micronúcleos e todos os demais tratamentos apresentaram medidas maiores, que diferiram significativamente do MMS. Os micronúcleos decorrentes da exposição ao Cd e ATZ apresentaram tamanho significativamente iguais entre os modelos avaliados (FIGURA 2).

Os agentes clastogênicos induzem principalmente fragmentos cromossômicos (HINTZSCHE, 2017) e induzem quebras cromossômicas que produzem fragmentos acêntricos (TERRADAS, 2010), como observados no tratamento com o alquilante MMS.

As substâncias alquilantes são compostos capazes de substituir em outra molécula um átomo de hidrogênio por um radical alquil. Eles se ligam ao DNA de modo a impedir a separação dos dois filamentos do ADN na dupla hélice espiralada, fenômeno este indispensável para a replicação (Pro-Onco, 1993). Ou seja, o efeito do MMS está relacionado à indução de quebras de DNA (Mauro et al., 2014) originando, portanto, micronúcleos morfológicamente iguais ao núcleo principal, porém de tamanho inferior (BALLESTRERI, 2017). Desta forma, foi possível observar que o tratamento com o agente MMS usado como controle positivo, apresentou maior frequência de micronúcleos e micronúcleos de menor tamanho que corroboram a ação clastogênica em ambos os modelos.

A presença de micronúcleos maiores foi observada nos tratamentos com o SPL, Cádmiio e Atrazina que possivelmente se originam de cromossomos inteiros. Segundo Miller (1973) os cromossomos não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose. O fuso mitótico é formado pelos microtúbulos que executam funções celulares importantes durante o ciclo celular (CAMPOS et al., 2008b; JORDAN e WILSON, 1999). Alterações na dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos, bem como a não ligação destes aos cromossomos por problemas na região

centromérica (FREITAS et al., 2016), afetam a segregação dos cromossomos para as células. (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; CAMPOS et al., 2008b; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009). Há também a ocorrência do encurtamento e alongamento de alguns microtúbulos do fuso mitótico, sem sincronia com os demais, o que pode provocar a disjunção desigual de cromossomos (cromossomos não orientados), originando os micronúcleos (ANDRADE-VIEIRA, 2012; CAMPOS et al., 2008b; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009) de origem aneugênicas. Foi possível, portanto, observar que nos tratamentos com os agentes SPL, Cádmio e Atrazina usados como controle positivo neste trabalho apresentaram uma frequência de micronúcleos consideráveis e cromossomos de maiores tamanhos. Essas características observadas comprovam a ação aneugênica destes agentes químicos.

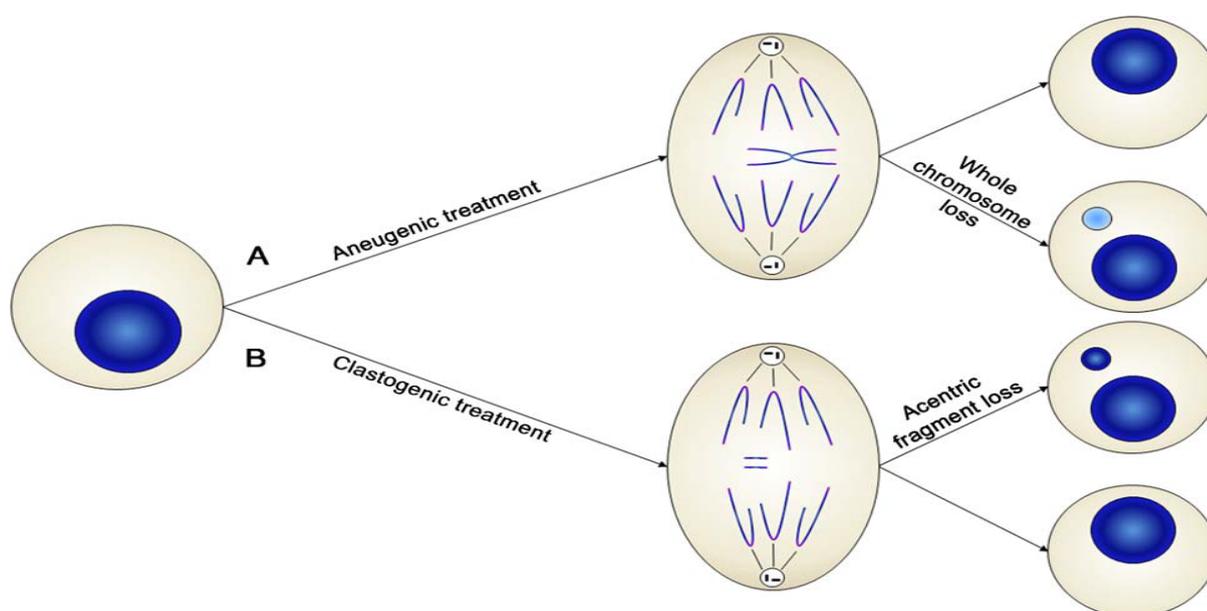


Figura 5 - Mecanismo de formação de micronúcleos. A: Os agentes aneugênicos impedem a formação do aparelho do fuso durante a mitose; B: Agentes clastogênicos induzem micronúcleos quebrando a dupla hélice do DNA, formando fragmentos acêntricos. Fonte: Terradas et al (2010).

Analisando o cariótipo de *A. cepa* e *L. sativa* é possível observar que os tamanhos dos cromossomos variam entre as espécies. As medidas dos micronúcleos observadas nos tratamentos com MMS e SPL diferiram entre os modelos vegetais, sendo menores em alface do que em cebola. De acordo com Lima et al. (2019), o comprimento médio total (TLHL) dos cromossomos de *A. cepa* variam entre 88,19 e 78,71 μm , enquanto em *L. sativa* apresentam valores médios de 33,16 e 20,15 μm . Portanto, é evidente que haja uma variação de tamanho dos micronúcleos entre os modelos vegetais, pois a *A. cepa* apresenta um cromossomo maior que *L. sativa*, independente dos modos de ação, como foi possível observar neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados podemos concluir que o tamanho do micronúcleo está relacionado com o modo de ação dos mutágenos e diferentes espécies apresentam tamanhos de micronúcleos variados dependentes do tamanho de seus cromossomos.

REFERÊNCIAS

ABARIKWU, S. O.; FAROMBI, E. O. Atrazine induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells via the regulation of Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3-dependent pathway. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, p. 90–98, fev. 2015.

ALMEIDA V.L., LEITÃO A, REINA L.D.C.B, MONTANARI C.A, DONNICI C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo celular não-específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova* 2005;

ALTENBURGER, R. et al. Future water quality monitoring--adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. **The Science of the total environment**, v. 512–513, p. 540–551, 15 abr. 2015.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373–382, mar. 2014.

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

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

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

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of**

Environmental Management. Sint-KatelijneWaver, v. 107, p. 140-146, 2012.

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

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; PALMIERI, M. J.; DAVIDE, L. C. Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 10, p. 489, 7 out. 2017.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 1, p. 42–52, set. 2005.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology** v. 17, p. 187–194, 2002.

BAFANA, A. et al. Mutagenicity and genotoxicity testing in environmental pollution control. In: KUMAR, A. et al.. **Mutagenicity: Assays and Applications**. 1st. ed. London: Academic Press, 2018. cap.6, p. 113–132.

BAJPAYEE, M.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. The comet assay: a versatile tool for assessing DNA damage. In: DHAWAN, A.; ANDERSON, D. **The comet assay in toxicology**. 2. ed. Croydon, London: Royal Society of Chemistry, 2016. cap. 1, p. 3-5.

BALLESTRERI, E. Teste de micronúcleos como ferramenta para avaliação da exposição ocupacional a pesticidas: revisão, *Revinter*, v. 10, n. 01, p. 19-28, fev. 2017.

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

BELLING, J. On counting chromosomes in pollen-mother cells. **The American Naturalist**, v. 55, n. 641, p. 573–574, nov. 1921.

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

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

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

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**, v. 72, n. 5, p. 722–725, jun. 2008.

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment, and food safety. **Food and Energy Security**, v. 6, n. 2, p. 48–60, maio 2017.

CARVALHO, M. E. A. et al. Cadmium exposure triggers genotype-dependent changes in seed vigor and germination of tomato offspring. **Protoplasma**, p. 1–11, 21 jan. 2018.

CASTRO, T. F. D. et al. Genotoxicity of spent pot liner as determined with the zebrafish (*Danio rerio*) experimental model. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1–9, 9 fev. 2018.

DOS REIS, Gabriela Barreto et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110-116, 2017.

CHAPMAN, P. M.; LONG, E. R. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 14, n. 3, p. 81–84, mar. 1983.

CHEN, Y. Y.; ZHU, J. Y.; CHAN, K. M. Effects of cadmium on cell proliferation, apoptosis, and proto-oncogene expression in zebrafish liver cells. **Aquatic Toxicology**, v. 157, p. 196–206, dez. 2014.

CORRÊA, A. X. R. et al. Genotoxicity assessment of particulate matter emitted from heavy-duty diesel-powered vehicles using the in vivo *Vicia faba* L. micronucleus test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 199–204, maio 2016.

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

EUROPEAN COMMISSION. Commission decision of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance, 2004/248/EC. OJEU L78:53–55, (2004).

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

FERNANDES, T. C. C.; VENTURA, B. C.; MARIN-MORALES; M. A. Estudo na Bacia do Médio Paranapanema – SP: Avaliação dos efeitos de água coletada em diversos pontos Das sub-bacia do Pari-Veado, na germinação de *A. cepa*. **Genetics and Molecular Biology: Supplement, Águas de Lindóia**, v. 23, p., 688, 2005.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 7 nov. 1985.

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

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

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175–185, out. 1994.

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

HINTZSCHE, Henning et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRHART, B.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, p. 61-118, 1983.

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

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p. 91–138, ago. 1992.

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

KEDDY, C. J.; GREENE, J. C.; BONNELL, M. A. Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 30, n. 3, p. 221–251, abr. 1995.

LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. The triazine herbicides: a milestone in the development of weed control technology. In:_____. **The triazine herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. 1st ed. San Diego, CA: Elsevier, 2008. cap. 1, p. 1–12.

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

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

- LEVAN, A. Chemically induced chromosome reactions in *A. cepa* and *Vicia Faba*. *Biology*, London, v. 16, p. 233-243, 1951.
- LEVAN, A. Cytological reactions induced by inorganic salt solutions, *Nature*, New York, v. 156 (2973): p. 751-752, 1945.
- LI, J.X.; SUN, D.Y. A study on CaM distribution in cells of living things. **Chin. J. Cell Biol.** 1991, 12, 1–6.
- LIMA, M. G. F. et al. Effects of three antimitotic agents on karyotype of *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.: two plant model species for cytogenotoxic assessments. *South African Journal of Botany*, v. 125, p. 244-250, 2019.
- MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Use of the Micronucleus Assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutation Research*, v. 489, p. 147-172, 2001.
- MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. *Hereditas*. Lund, v. 144, p. 235-243, 2007.
- MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **CYTOLOGIA**, v. 69, n. 4, p. 399–408, 2004.
- MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4808–4819, 2014.
- MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 13, p. 9796–9806, 3 jul. 2015.
- MILLER, Jeffrey H.; LOW, K. Brooks. Specificity of mutagenesis resulting from the induction of the SOS system in the absence of mutagenic treatment. **Cell**, v. 37, n. 2, p. 675-682, 1984.
- MONTEIRO, C. et al. Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chemical Research in Toxicology*. Washington, v. 25, n. 7, p. 1423-1434, 2012.
- MONTEIRO, M. et al. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. *Environmental and Experimental Botany*. Oxford, v. 60, p. 421–427, 2007.
- NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. Chapter 1: laboratory bioassays in allelopathy. **Plant Bioassays, Studium Press, Houston, Texas**, p. 1-20, 2009.
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R.R.; WILLARD, H.F. Human genetic diversity: mutation and polymorphism. In: _____ **Thompson & Thompson Genetics in Medicine**. 8th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences, 2016. cap. 4, p. 49.

PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of Spent Pot Liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 5, p. 156, 23 maio 2016.

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

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

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C. K.; DE SILVA, N. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 12, p. 730, 7 dez. 2015.

PATUSSI, Carina; BÜNDCHEN, Márcia. Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de Tradescantia clone 4430. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1173-1178, 2013.

PEDRAZZANI, R. et al. The role of bioassays in the evaluation of ecotoxicological aspects within the PEF/OEF protocols: The case of WWTPs. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. October 2017, p. 742–748, jan. 2018.

PINTO, A. et al. Influence of organic matter on the uptake of cadmium, zinc, copper and iron by sorghum plants. **Science of The Total Environment**, v. 326, n. 1–3, p. 239–247, 29 jun. 2004.

POTT, Crisla Maciel; ESTRELA, Carina Costa. Histórico ambiental: desastres ambientais e o despertar de um novo pensamento. **Estudos avançados**, v. 31, n. 89, p. 271-283, 2017.

PRO - ONCO, Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 2 ed. rev. atual. - Rio de Janeiro: Pro-Onco. 1993 (inca)
http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101

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

RUIZ-GUZMÁN, J. A. et al. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of children exposed to pesticides in agricultural areas of the department of Cordoba, Colombia. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 824, p. 25–31, dez. 2017.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**. Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 41, n. 2, p. 105–130, abr. 1999.

SETÚBAL, A.M.G. et al. Micronúcleo: um importante marcador biológico intermediário na prevenção do câncer bucal, *Rev Odonto Ciência-Fac.Odonto/PUCRS*, v.20, n.28, abr./jun.2005.

SHI, Q. et al. Cadmium localization and its toxic effects on root tips of barley. **Zemdirbyste-Agriculture**, v. 103, n. 2, p. 151–158, 16 maio 2016.

SILVEIRA, B. Characterization of inorganic fraction of spent potliners: evaluation of the cyanides and fluorides content. **Journal of Hazardous Materials**, v. 89, n. 2–3, p. 177–183, 28 jan. 2002.

SILVEIRA, G. L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, jul. 2017.

SILVEIRA, G. L. **Modelos vegetais aplicados a estudos de toxicologia ambiental: uma abordagem comparativa entre *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L.** 2016. 154 p. Dissertação (Mestrado em Botânica Aplicada) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Princípios de Toxicologia Ambiental, Editora Interciência. **Rio de Janeiro, Brasil**, p. p198, 2013.

SLESINSKI, R. S. et al. In vitro and in vivo evaluation of the genotoxic potential of 2-ethyl-1, 3-hexanediol. **Toxicology**, v. 53, n. 2-3, p. 179-198, 1988

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

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

SRIVASTAVA, K.; MISHRA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p. 8–12, jan. 2009.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 392, n. 1-2, p. 165-174, 1997.

TERRADAS, Mariona et al. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 705, n. 1, p. 60-67, 2010.

VENCESLAU, A. DE F. A. et al. Cyclodextrins as effective tools to reduce the toxicity of atrazine. **Energy, Ecology and Environment**, n. Cavas, 7 set. 2017.

VOGEL, E. W. Assessment the impact of pesticides on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam v. 60, p. 81-96, 1995.

Voisin P, Barquinero F, Blakely B, et al. Towards a standardization of biological dosimetry by cytogenetics. **Cellular and Molecular Biology** (Noisy-le-Grand, France). 2002.

WAKATA, A.; SASAKI, M. S. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. **Mutation Research Letters**, v. 190, n. 1, p. 51-57, 1987.

WALKER, C. H. et al. Major classes of pollutant. In: _____ **Principles of Ecotoxicology**. 4th. ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2012. cap. 1, p. 3-21.

WYATT, Michael D.; PITTMAN, Douglas L. Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. **Chemical research in toxicology**, v. 19, n. 12, p. 1580-1594, 2006.

WIECZERZAK, M.; NAMIEŚNIK, J.; KUDŁAK, B. Bioassays as one of the Green Chemistry tools for assessing environmental quality: a review. **Environment International**, v. 94, p. 341–361, 2016.

WU, X. et al. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8244–8259, 2016.

YAMAMOTO, Koichi I.; KIKUCHI, Yasumoto. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 163-173, 1981.

YU, M.-H. Introduction. In: _____ **Environmental Toxicology: Biological Effects of Pollutants**. 2. ed. Boca Raton, Florida: Ed. CRC Press LLC, 2005. cap.1. p. 1-13.

YU, M.-H. In: _____ **Environmental Toxicology: Biological Effects of Pollutants**, 3. ed. Boca Raton, Florida: Ed. CRC Press LLC, 2011. cap. 1, p.

ZHANG, C. et al. Atrazine triggers hepatic oxidative stress and apoptosis in quails (*Coturnix C. coturnix*) via blocking Nrf2-mediated defense response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 137, n. September 2016, p. 49–56, mar. 2017.