

ALLIUM SATIVUM L. COMO BIOINDICADOR PARA ANÁLISE DE PRODUTOS TÓXICOS

CAMILA SILVEIRA SINNEMANN¹; LUANA BUENO LONGARAY²; VIVIANE AGUILAR VIGHI³; ALDO GIRARDI POZZEBON⁴; VERA LUCIA BOBROWSKI⁵; BEATRIZ HELENA GOMES ROCHA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – sinnemann08@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – lubuelong@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – vivi_vighi@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – aldogirardipozzebon@outlook.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – vera.bobrowski@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – orientadora – biahgr@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os biomarcadores podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem subsistemas de um organismo completo, usados para identificação de um alvo específico (SILVA et al., 2003). Esses sistemas têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos, dentre esses o teste de *Allium cepa* tem sido amplamente empregado para a detecção de genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, além de fornecer informações importantes para avaliar os mecanismos de ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVA et al., 2003). A análise de alterações cromossômicas serve como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a mutagênicos ou carcinogênicos potenciais, porém para possibilitar a avaliação dos efeitos desses agentes, faz-se necessário que a amostra esteja em constante divisão mitótica.

Além da cebola, pesquisadores têm utilizado outras espécies vegetais em bioensaios, o *Allium sativum* L. (alho), *Lactuca sativa* L. (alface) e a *Vicia faba* L. (feijão fava), por serem altamente sensíveis e simples, e os resultados reprodutíveis em estudos de genotoxicidade (YI; MENG, 2014; SILVA et al., 2003).

As principais classes de contaminantes emergentes incluem produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal, plastificantes, retardantes de chama, surfactantes, nanomateriais e pesticidas (PEREIRA et al., 2015). Pesticidas é o termo internacional utilizado para agrupar classes de compostos que atuam como herbicidas (controlam plantas daninhas), inseticidas (usado no controle de insetos), fungicidas (controlam fungos), dentre outros, sendo no Brasil denominados de agrotóxicos (LIMA et al., 2016).

De acordo com MAGALHÃES; FERRÃO FILHO (2008) nos testes de biomonitoramento, procedimentos padronizados devem ser seguidos como a inserção de controle negativo, positivo e série de diluições. O controle negativo é uma população preexistente igual à que se encontra em teste, mas sem adição do contaminante, para determinar se os efeitos podem ter acontecido por outro fator qualquer. No controle positivo, utiliza-se um agente tóxico de efeito conhecido para assegurar que o organismo responde adequadamente. Em testes com bioindicadores vegetais encontramos na bibliografia diferentes controles positivos como trifluralina, cloreto de níquel, sulfato de cobre, paracetamol, etilmetanosulfonato, glifosato, etc. (BRAGA; LOPES, 2015; SANTOS et al., 2018; HISTER et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi identificar alterações citogenéticas de produtos tóxicos sobre células radiculares do bioindicador *Allium sativum* L., visando determinar um eficiente controle positivo para esse bioensaio.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi conduzido no Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, durante o ano de 2018.

Foram preparados cinco repetições por tratamento, sendo utilizada como controle negativo água destilada e testados como possíveis controles positivos o herbicida trifluralina, nas concentrações de 1,2; 1,4, 1,8; 2,4 mL/L; o fungicida sulfato de cobre, nas concentrações de 0,08; 0,10; 0,12 mL/L; e os medicamentos paracetamol (400mg) e dipirona sódica (400 mg) nas concentrações de 0,4 e 0,8 mL/L.

Para o teste foram selecionados bulbilhos de alho, usado como bioindicador, para cada concentração dos cinco tratamentos. Posteriormente, cada bulbilho foi disposto em recipientes de 25 mL, nomeados de acordo com a dose e o tratamento correspondente. Os recipientes foram organizados de forma aleatória e mantidos em uma sala de crescimento à temperatura de 25 °C.

Os efeitos cito e genotóxico dos tratamentos foram verificados pela análise do ciclo mitótico e calculados os índices mitótico (IM), metafásico (IMet) e anafásico (IAf), e das anormalidades cromossômicas (IAC). Após o período de quatro dias as amostras do controle negativo apresentaram emissão radicular superior às demais, logo, foram retiradas e as raízes fixadas em Carnoy (3:1, álcool etílico: ácido acético) por um período de 48h à temperatura ambiente. Os outros tratamentos foram retirados sete dias após o início do experimento e, assim como o controle negativo, foram fixados por um período de 48h em Carnoy.

Para proceder a análise das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento das raízes (GUERRA; SOUZA, 2002), hidrolisadas em HCL 5 N durante dez minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. Para cada tratamento foram analisadas 10 lâminas e observadas 250 células/lâmina pela técnica de varredura, em microscópio óptico a uma magnitude de 400x, sendo contadas 2500 células por tratamento, observando-se o número de células em cada fase da mitose e alterações cromossômicas nos tratamentos usados como controle positivo.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da normalidade residual. Atendendo as pressuposições foi realizada a análise de variância e de regressão linear a 5 % de probabilidade de erro utilizando o programa Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em testes com *Allium cepa* o uso de diferentes controles positivos tem sido descritos na literatura, como sulfato de cobre, paracetamol, dipirona sódica, trifluralina, etc, porém nesse trabalho ao utilizarmos como bioindicador o *Allium sativum* as concentrações testadas de sulfato de cobre, paracetamol e dipirona sódica foram muito tóxicas, sendo observadas somente células em interfase. No tratamento de trifluralina, com a concentração de 2,4 mL/L não houve a emissão de raízes, as concentrações de 1,2; 1,4 e 1,8 mL/L possibilitaram a análise das fases da divisão celular mitótica.

A análise estatística permitiu verificar que para todas as variáveis analisadas conforme o aumento das concentrações de trifuralina ocorreu uma diminuição dos valores observados (Fig.1). Os índices de fases são sensíveis às várias modificações fisiológicas/bioquímicas celulares no período entre as divisões da mesma, as quais podem promover um atraso na entrada das células em divisão, ocasionando baixos IM ou um adiantamento na divisão celular, gerando IM mais elevados do que os do controle. Quando as células do tecido se encontram em equilíbrio proliferativo a duração de cada fase do ciclo de divisão permanece constante, sendo o número de células em cada fase também constante e proporcional ao tempo de duração das mesmas. Todavia, quando sob efeito de substâncias tóxicas esse equilíbrio pode romper-se (GRIPPA et al., 2009).

O IM é avaliado por meio da contagem de células em divisão pelo número total de células analisadas, sendo que a redução desse índice pode ser ocasionada devido a exposição do organismo à substância tóxica, causando danos ao crescimento e desenvolvimento do organismo, como observado neste trabalho. İLBAŞ et al. (2012), mencionam que isso pode ocorrer devido a um bloqueio na fase G1 ou inibição da síntese de DNA na fase S.

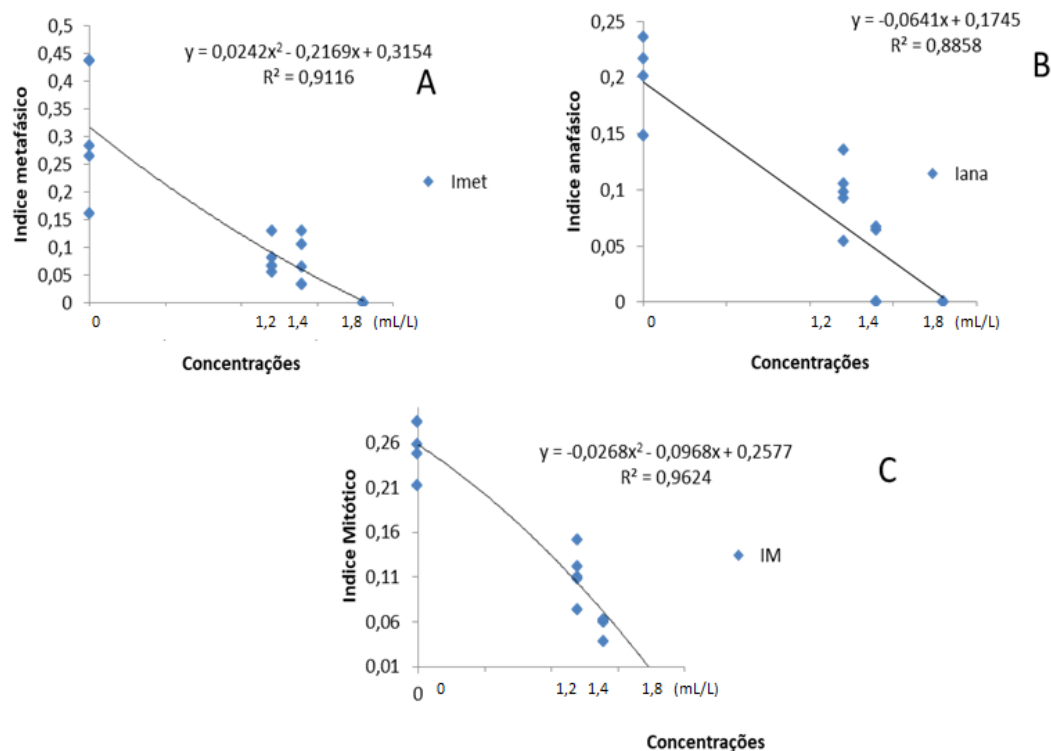


Figura 1. Gráficos das curvas ajustadas e dos valores observados para as variáveis: A - Índice metafásico, B - Índice anafásico, C - índice mitótico em células meristemáticas radiculares de alho sob efeito de diferentes concentrações de trifluralina.

4. CONCLUSÕES

A trifluralina demonstra ser eficiente controle positivo para bioensaios com *Allium sativum* causando alterações no ciclo de vida da célula, porém devido a sua toxicidade devem ser testadas concentrações menores deste herbicida assim como para os demais produtos utilizados neste trabalho.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRAGA, J.R.M., LOPES, D.M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v.10, n.1, 2015.

GRIPPA, G. de A. **Avaliação genotóxica e mutagênica do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* e estudo de sua ação antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e in vivo.** 2009. 102f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Curso de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos:** um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. São Paulo: FUNPEC, 2002.

HISTER, C.A.L.; PASQUALLI, M.; TRAPP, K.C.; STEFANELLO, R. et al. Atividade antiproliferativa e determinação dos compostos fenólicos de extratos aquosos de amoreira-preta (*Rubus* sp.) pelo sistema teste *in vivo* de *Allium cepa* L. **R. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v.15, n.1, p.43-48, 2017.

İLBAŞ, A.İ.; GÖNEN, U.; YILMAZ, S.; DADANDI, M.Y. Cytotoxicity of *Aloe vera* gel extracts on *Allium cepa* root tip cells, **Turk J Bot**, Ankara, v.36, p.263-268, 2012.

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

LIMA, A.L. dos S.; OLIVEIRA, S.E.M. de; REZENDE, A.L.T.; JACOB NETO, J.; LIMA, K. dos S.C. Agrotóxicos: presença diária nos alimentos consumidos, **Revista Semioses**, Rio de Janeiro, v.10, n.1, p.9-22, 2016.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

PEREIRA, L.C.; SOUZA, A.O.; FRANCO-BERNARDES, M.F.; PAZIN, M. et al. A perspective on the potential risks of emerging contaminants to human and environmental health. **Environmental Science and Pollution Research**, Tamilnadu, v.22, n.18, p.13800-13823, 2015.

SANTOS, I.M.C. dos; MELO, H.M. de; CARNEIRO, J.K.R.; OLIVEIRA, M.A.S. Avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica do extrato de *Morinda citrifolia* em diferentes concentrações sobre o teste *Allium cepa*. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.17, n.1, p. 40-45, 2018.

SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica.** Porto Alegre, Alcançe, 2003.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.537, p.109-114, 2003.