

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

TATIELI PLAVAK

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO ESTRESSE CAUSADO POR
ARSÊNIO E CÁDMIO EM *Allium cepa* L.

GUARAPUAVA

2013

TATIELI PLAVAK

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO ESTRESSE CAUSADO POR
ARSÊNIO E CÁDMIO EM *Allium cepa* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Carla Giloni de Lima.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Kellen Regina Boldrini.

GUARAPUAVA

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pela capacidade a mim confiada para que eu pudesse iniciar e concluir essa pesquisa.

À minha família, pelo apoio em todos os momentos, principalmente após o nascimento da minha filha Beatriz.

À professora Patrícia, por aceitar me orientar e acreditar que essa pesquisa traria bons resultados.

À professora Kellen pela co-orientação e disponibilidade durante a realização dessa pesquisa.

Ao professor Vanderlei, pela sua ajuda para a realização da análise estatística e por sempre estar acompanhando o trabalho.

Ao professor Paulo, por inúmeras vezes emprestar a câmara de germinação do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Vegetal.

Às alunas de Ciências Biológicas que me auxiliaram na coleta, fixação, hidrólise e coloração das raízes.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Muito Obrigada!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Aberrações cromossômicas em células da raiz de *A. cepa* L. submetidas a diferentes tratamentos com arsênio (As) e cádmio (Cd). A) metáfase normal (controle); b) metáfase com cromossomo em ascensão precoce (7,5 mg/L de As); c) quebra cromossômica na metáfase (7,5 mg/L de As); d) c-metáfase (7,5 mg/L de As); e) anáfase normal (5 mg/L de As); f) quebra cromossômica na anáfase (controle); g) ponte cromatídica na anáfase (controle); h) aderência na anáfase (7,5 mg/L de As); i) telófase normal (controle); j) micronúcleo na telófase (5 mg/L de As); k) ponte cromatídica na telófase (8 mg/L de Cd); l) aderência na telófase (7,5 mg/L de As); m) interfase normal (controle); n) micronúcleo na interfase (controle); o) aderência na interfase (7,5 mg/L de As); p) núcleos com formas irregulares (pseudolobulados) (12 mg/L de Cd). 21
- Figura 2 - Formação de micronúcleos em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de arsênio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). 23
- Figura 3 - Formação de micronúcleos em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de cádmio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). 24
- Figura 4 - Frequência de Índice Mitótico em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de arsênio e erro padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). 26
- Figura 5 - Frequência de Índice Mitótico em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de cádmio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). 27
- Figura 6 - Análise estatística: PC1 versus PC2 (a) scores (b) loadings, para as amostras de raízes de *A. cepa* L., submetidas ao arsênio (As) e cádmio (Cd). Os números que acompanham As e Cd referem-se às concentrações testadas em mg/L. P: prófase; M: metáfase; A: anáfase; T: telófase; II: interfase inicial; IF: interfase final; ACQ: quebra cromossômica em anáfase; MCP: metáfase com cromossomo em ascensão precoce; Cm: c-metáfase; MI: micronúcleo na interfase; AC: aderência cromossômica. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Concentrações de arseniato de sódio testadas em bioensaios com <i>A. cepa</i> L.	15
Tabela 2	-	Concentrações de nitrato de cádmio testadas em bioensaios com <i>A. cepa</i> L.	16
Tabela 3	-	Porcentagem de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raiz de <i>A. cepa</i> L., submetidas a diferentes concentrações de arsênio. Os valores entre parênteses referem-se ao desvio-padrão. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).....	19
Tabela 4	-	Porcentagem de aberrações cromossômicas em células meristemáticas da raiz de <i>A. cepa</i> L., submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Os valores entre parênteses referem-se ao desvio-padrão. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$)	19
Tabela 5	-	Estatística descritiva da variação média do número de células de <i>A. cepa</i> L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de arsênio e erro padrão entre parênteses. Resultados obtidos da contagem de 1000 células por repetição. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).	29
Tabela 6	-	Estatística descritiva da variação média do número de células de <i>A. cepa</i> L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de cádmio e erro padrão entre parênteses. Resultados obtidos da contagem de 1000 células por repetição. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).....	31
Tabela 7	-	Matriz de correlação da variação média do número de células de <i>A. cepa</i> L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de arsênio ao nível de 5% de significância. Resultados sombreados diferentes significativamente ($p < 0,05$).....	33
Tabela 8	-	Matriz de correlação da variação média do número de células de <i>A. cepa</i> L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de cádmio ao nível de 5% de significância. Resultados sombreados diferentes significativamente ($p < 0,05$).....	35
Tabela 9	-	Autovalores da matriz de correlação e estatísticas relacionadas .	36

SUMÁRIO

RESUMO	1
Abstract	2
1 INTRODUÇÃO GERAL	3
1.1 METAIS PESADOS	4
1.1.1 Arsênio (As)	4
1.1.2 Cádmio (Cd)	6
1.2 TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Allium cepa</i> L	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
RESUMO	12
Abstract	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Indução de desenvolvimento de raízes	15
2.2 Coleta, fixação, estocagem e hidrólise das raízes	16
2.3 Coloração das raízes	16
2.4 Análise das lâminas	17
2.5 Análise estatística	17
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
3.1 Efeitos genotóxicos causados por arsênio e cádmio em <i>A. cepa</i> L.	17
3.2 Efeitos citotóxicos causados por arsênio e cádmio em <i>A. cepa</i> L.....	25
3.3 Efeitos do arsênio e cádmio sobre a interfase e as fases da mitose.....	28
3.4 Correlações entre os eventos normais e anormais da mitose e interfase	32
3.5 Análise de Componentes Principais.....	36
3.4 Correlações entre os eventos normais e anormais da mitose e interfase	32
4 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

RESUMO

A poluição ambiental causada por metais tornou-se em um sério problema para a humanidade, principalmente após o advento da Revolução Industrial. Alguns elementos ocorrem de forma natural, sendo essenciais para as plantas. Outros, no entanto, não são essenciais e se apresentam tóxicos para muitos organismos vivos, dos quais podem se citados o arsênio (As) e o cádmio (Cd). Compostos destes dois elementos são largamente utilizados na indústria, além de existirem ainda pesticidas à base de As. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a genotoxicidade e a citotoxicidade dos elementos As e Cd, utilizando *Allium cepa* L. como organismo teste. As cebolas foram colocadas para enraizar em diferentes concentrações de arseniato de sódio (5; 7,5; 10; 15 e 20 mg/L) e de nitrato de cádmio (4, 6, 8, 10 e 12 mg/L), além do controle, por 48 horas. Após esse período, as raízes foram coletadas e realizados os procedimentos de fixação, hidrólise, coloração e montagem das lâminas para posterior análise microscópica. As principais aberrações cromossômicas observadas foram c-metáfase, aderência, metáfase com cromossomo em ascensão precoce, quebra cromossômica em anáfase e formação de micronúcleos, comprovando a genotoxicidade dos elementos em *A. cepa* L. Além disso, verificou-se que os índices mitóticos das células das raízes sob ambos os tratamentos alteraram-se em relação ao controle, demonstrando que o arsênio e o cádmio foram citotóxicos para *A. cepa* L., havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$) nos tratamentos comparados ao controle. A PCA foi realizada simultaneamente com os dados das fases mitóticas normais e anormais dos tratamentos com As e Cd, a qual permitiu a compreensão sobre quais componentes foram mais frequentes em cada um, possibilitando sua divisão em dois grupos distintos. Embora este trabalho tenha fornecido dados importantes que certamente contribuirão para a Ecotoxicologia, serão necessários futuros estudos para se investigar exatamente quais estruturas do ciclo celular estão sendo prejudicadas por esses elementos.

Palavras-chave: Aberrações cromossômicas; índice mitótico; análise de componentes principais; ecotoxicologia; aneogenicidade; clastogenicidade.

Abstract

Environmental pollution caused by metals has become a serious problem for humanity, especially after the advent of the Industrial Revolution. Some elements occur naturally and are essential for plants. Others, however, are not essential and present toxic to living organisms, which can be cited arsenic (As) and cadmium (Cd). Compounds of these two elements are widely used in industry, and there are still pesticides based on arsenic. Thus, the objective of this study was to evaluate the genotoxicity and cytotoxicity of As and Cd elements, using *Allium cepa* L. as test organism. The roots were grown at different concentrations of sodium arsenate (5, 7.5, 10, 15 and 20 mgL⁻¹) and cadmium nitrate (4, 6, 8, 10 and 12 mgL⁻¹), and control for 48 hours. After this time, the roots were collected and carried out the procedures of fixation, hydrolysis, staining and mounting the slides for subsequent microscopic analysis. The main chromosomal aberrations observed were c-metaphase, stickiness, precocious chromosome migration at metaphase, chromosomal breakage at anaphase, and micronucleus, proving the genotoxicity of elements in *A. cepa* L. Also it was found that the mitotic index of root cells under both treatments altered compared to control, demonstrating that arsenic and cadmium were cytotoxic to *A. cepa* L., with statistically significant difference ($p < 0.05$) in cadmium treatments compared to the control. PCA was carried out simultaneously with the data of mitotic phases and abnormalities of As and Cd treatments, which allowed the understanding of which components were most frequent in each element, allowing their division into two different groups. Although this study has provided important data will certainly contribute to the Ecotoxicology, future studies are required to investigate exactly which structures of the cell cycle are being harmed by these elements.

Keywords: Chromosomal aberrations; mitotic index; principal component analysis; ecotoxicology; aneugenicity; clastogenicity.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A partir da Revolução Industrial, no século XVIII, a poluição ambiental tornou-se um problema para a humanidade (LEAL et al., 2008). Com o crescente desenvolvimento das atividades de mineração e da indústria, as águas e os solos têm sido contaminados por meio do lançamento de vários poluentes, principalmente nos ambientes aquáticos (ESTEVES, 1988; BENAVIDES et al., 2005).

Uma grande parcela destes poluentes ocorre naturalmente, em baixas concentrações, sendo alguns, elementos essenciais para as plantas. No entanto, em locais poluídos suas concentrações podem elevar-se até níveis fatais (VARDANYAN; INGOLE, 2006; BEGON et al., 2007). Assim, os seres vivos, em geral, ficam expostos a uma grande variedade de compostos mutagênicos e citotóxicos, sendo relevante que se realizem estudos para determinar a toxicidade causada por substâncias que acabam os afetando.

A Toxicologia é uma linha de pesquisa que objetiva estudar os efeitos prejudiciais de substâncias tóxicas sobre os organismos. Além disso, ela busca os mecanismos que estão envolvidos no processo de intoxicação, identificando e quantificando substâncias nocivas, e definindo seus níveis aceitáveis para o indivíduo e o meio ambiente. A toxicologia envolve uma grande área do conhecimento e pode ser dividida em diferentes campos de trabalho: Toxicologia Ambiental (Ecotoxicologia), de Alimentos, de Medicamentos e Cosméticos, Ocupacional, e Social (AZEVEDO; CHASIN, 2003; OGA, 2003).

A Ecotoxicologia agrupa a Ecologia e a Toxicologia e caracteriza-se como uma nova modalidade, na qual são estudados os impactos de substâncias químicas sobre os ecossistemas, vegetais, microorganismos e animais, inclusive o homem (AZEVEDO; CHASIN, 2003; OGA, 2003).

Os metais estão incluídos na categoria de poluentes ambientais que permanecem no ambiente por longos períodos, pois diferentemente da matéria orgânica, não podem ser degradados e, portanto, se acumulam na água, no solo, nos sedimentos mais profundos e nos organismos vivos, sendo potencialmente perigosos aos humanos, animais e plantas (MIRETZKY et al., 2004; GRATÃO et al., 2005).

1.1 METAIS PESADOS

O termo “metais pesados” normalmente refere-se a uma classe de metais e metaloides que, além de serem contaminantes, apresentam potencial de toxicidade ou ecotoxicidade (DUFFUS, 2002). Caracterizam-se por possuírem altas densidades comparadas a de outros materiais, como elevado número atômico, normalmente acima de 22, alta massa específica, variando entre 3,5 e 7,0 g/cm³ e massa atômica elevada (BAIRD, 2002; DUFFUS, 2002; DULČIĆ; POLLE, 2005; MACEDO, 2012).

De acordo com Macedo (2012), todas as formas de vida acabam sendo comprometidas pela presença dos metais pesados no ambiente. Von Sperling (2005) discorre que, dependendo da concentração e do tempo de exposição, podem oferecer riscos ao meio e interferir na atividade dos organismos vivos. Segundo o autor, mesmo que não sejam detectáveis nos corpos de água receptores, podem ser encontrados em altas quantidades em níveis mais elevados da cadeia alimentar, devido à característica de bioacumulação de alguns metais.

É importante salientar que muitos desses elementos são fundamentais em diversas etapas metabólicas, no crescimento de animais e plantas (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Alguns deles são essenciais em pequenas doses, caracterizando os micronutrientes, como por exemplo, zinco, cobalto, magnésio e ferro. Outros, porém, não são naturais do organismo e não possuem funções nutricionais ou bioquímicas, como é o exemplo do chumbo, mercúrio e cádmio (VON SPERLING, 2005).

Os metais tóxicos e não essenciais, que possuem configuração eletrônica e propriedades semelhantes aos essenciais, concorrem com estes, podendo bloquear suas funções nos organismos (OGA, 2003). Podemos citar como exemplo, a competição entre arsênio e fósforo, e entre cádmio e zinco, os quais, segundo Baird (2002) apresentam semelhanças entre suas propriedades.

1.1.1 Arsênio (As)

O arsênio (As) é classificado como um metaloide e pertence ao grupo 15 da Tabela Periódica, fazendo parte do mesmo grupo que o fósforo. Devido à semelhança entre as suas propriedades, os compostos de arsênio ocorrem simultaneamente com os de fósforo, comportando-se como este (BAIRD, 2002).

O arsênio é encontrado espontaneamente na forma de sulfetos, sulfoarsenetos, óxidos e arseniatos e, comumente apresenta-se nas formas As (III) e As (V) em águas naturais (QUINÁGLIA, 2012). O As (V) predomina em águas superficiais ricas em oxigênio, ou seja, condições aeróbias, sendo encontrado nas formas HAsO_4^{2-} , H_2AsO_4^- , quando o pH está entre 4 e 10 (ROSA et al., 2012). O As (III) na forma de ácido arsenioso (H_3AsO_3) prevalecerá em condições anaeróbias (QUINÁGLIA, 2012).

Baird (2002) relata que ocorre liberação do arsênio durante a mineração e fundição de ouro, chumbo, cobre e níquel, produção de ferro e aço e da queima de carvão. Ainda segundo o autor, existem pesticidas comuns à base de arsênio, tais como inseticidas e herbicidas. Outras fontes de arsênio para o ambiente são: fabricação de tintas e vernizes, produção de vidros, conservação de peles, tratamento e preservação da madeira com a utilização de compostos de arsênio (QUEIROZ, 2010).

As diferentes formas de vida dificilmente conseguem distinguir entre arsênio e fosfato inorgânicos. Assim, o As é considerado tóxico devido aos organismos tentarem substituir o fósforo pelo arsênio (WOLFE-SIMON et al., 2009). Outra possível explicação para o efeito tóxico do arsênio é a capacidade que este metaloide tem de se ligar a grupos sulfidríla – SH de enzimas, afetando-as e impossibilitando suas atividades normais (BAIRD, 2002).

As principais formas tóxicas de arsênio são os compostos trivalentes. Já os pentavalentes possuem pouca implicação na atividade enzimática. O arsênio bloqueia atividades mitocondriais, competindo com o fosfato durante a fosforilação oxidativa. Além de causar prejuízos na respiração celular, também diminui a produção de ATP e aumenta a de peróxido de hidrogênio, podendo acarretar em estresse oxidativo e na produção de espécies reativas de oxigênio (GOYER, 1996). Conforme Klaassen et al. (2012), o arsênio, juntamente com seus metabólitos produzem oxidantes e danos oxidativos ao DNA, prejudicando o reparo e causando proliferação celular.

Vários estudos foram conduzidos objetivando estudar o efeito tóxico do arsênio em plantas. Em um deles, realizado por Yi et al. (2007), foi observado que o arsênio induziu a formação de micronúcleos em raízes de *Allium cepa* L. de forma concentração-dependente, além de diminuir a taxa de índice mitótico da mesma maneira. Dho et al. (2010) encontraram, principalmente, metáfases irregulares e c-

mitoses, porém, concluíram que o arsênio possui uma pequena atividade clastogênica em *Pisum sativum*, devido ao pequeno número de fragmentos cromossômicos e pontes ana-telófase encontrados em seu trabalho.

1.1.2 Cádmio (Cd)

Este metal encontra-se no mesmo subgrupo que o zinco e o mercúrio na Tabela Periódica, sendo mais parecido com o primeiro por apresentarem semelhanças físicas e químicas. O único íon comum do cádmio é a espécie Cd^{2+} (DAS et al., 1997; BAIRD, 2002).

As principais fontes de emissão deste elemento na natureza são a fusão do zinco, a combustão de carvão e a incineração de resíduos contendo este elemento, havendo certa poluição ambiental por cádmio em locais próximos a fundições de zinco, cobre e chumbo (BAIRD, 2002; ROSA et al., 2012).

Na sua forma iônica, o cádmio é usado como pigmento para plásticos coloridos, monitores de TV, além dos pigmentos de sulfeto de cádmio serem usados em tintas para produzir cor amarela. Por isso, quando plásticos e outros materiais que contenham o elemento são incinerados, acabam por liberar este metal na atmosfera. Outro uso importante do cádmio é na fabricação de eletrodos de baterias alcalinas de níquel-cádmio, usadas, por exemplo, em calculadoras (BAIRD, 2002; QUEIROZ, 2010; KLAASSEN et al., 2012; ROSA et al., 2012).

Um fenômeno que, segundo Baird (2002) contribui para a introdução de cádmio nas plantas é a chuva ácida, que causa uma diminuição do pH do solo e como consequência, a entrada de cádmio nos alimentos. As plantas absorvem o cádmio pela sua semelhança com o zinco. Ambos são encontrados juntos nos minérios e competem por muitos ligantes. A diferença é que o cádmio é um metal pesado tóxico e o zinco é um elemento essencial (DAS et al., 1997). Quando é absorvido pelas raízes, o cádmio pode ser carregado para o xilema e transportado para as folhas (FARID et al., 2013).

O cádmio também foi reportado interferindo na captação, transporte e utilização de muitos elementos, como cálcio, magnésio, fósforo e potássio (DAS et al., 1997). Conforme Farid et al. (2013), o Cd causa estresse oxidativo durante a germinação e o desenvolvimento das plantas, além de resultar em acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas folhas.

Paiva (2008) observou que folhas expandidas de *Thlaspi arvense* apresentaram clorose e necrose, crescimento diminuído devido ao acúmulo de Cd na raiz. Em *T. caerulescens* não houve diferença morfológica da folha, nem no crescimento, havendo acúmulo de cádmio nas folhas.

Foi relatado que o cádmio também causou uma diminuição na taxa do índice mitótico conforme o aumento de sua concentração e duração do tratamento em *Hordeum vulgare* (cevada), além de serem encontradas anormalidades mitóticas, incluindo c-mitoses, pontes em anáfase, quebras cromossômicas, aderências, cromossomos retardatários e micronúcleos (ZHANG; YANG, 1994).

Diante destes estudos, conclui-se que é de extrema importância realizar testes para identificar os efeitos dos metais, já que os seres vivos estão a eles expostos. Segundo Fiskesjö (1985), testes de toxicidade devem ser feitos de maneira fácil, cujos resultados devem ser obtidos rapidamente. As plantas são úteis para os testes de avaliação da ação de compostos e substâncias presentes no meio ambiente, das quais o ensaio com *Allium cepa* L. é altamente recomendado para estudar aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico.

1.2 TESTES DE TOXICIDADE COM *Allium cepa* L.

O teste *Allium cepa* L. foi introduzido por Levan, em 1938, quando se estudavam os efeitos da colchicina (FISKESJÖ, 1985). É considerado como um procedimento padrão de controle do ambiente para teste rápido e detecção de níveis de toxicidade e poluição ambiental (MA et al., 1995; EL-SHAHABY et al., 2003). Segundo Fiskesjö (1985), o teste *Allium* apresenta algumas vantagens como: baixo custo, facilidade de manipulação e os cromossomos são grandes e bem visíveis, sendo adequados para o estudo de danos em cromossomos ou distúrbios da divisão celular.

De acordo com Amaral et al. (2007), as células da raiz de *A. cepa* L. são adequadas para análises de parâmetros macroscópicos e microscópicos. Dentro dos parâmetros macroscópicos podem ser incluídos crescimento e deformidade radicular. Por sua vez, os parâmetros microscópicos compreendem índice mitótico e aberrações cromossômicas, como aderências, c-metáfases, fragmentos e pontes cromossômicas e micronúcleos.

Aderências cromossômicas são originadas pela condensação anormal do DNA, formando massas de cromatina (ZOU et al., 2012; ASITA; MOKHOBBO, 2013). As c-metáfases são derivadas de alterações no fuso mitótico, pela inibição da polimerização da tubulina (XU et al., 2009). Os fragmentos e pontes cromossômicas resultam de quebras cromossômicas que, mais tarde levarão à formação de micronúcleos (FISKESJÖ, 1985).

Com base nos tipos de aberrações cromossômicas encontradas, pode-se inferir sobre a clastogenicidade e aneugenicidade de determinada substância. Compostos que possuem atividade clastogênica conduzem a quebras cromossômicas, tendo como resultado a formação de micronúcleos. Já substâncias aneugênicas alteram a formação do fuso mitótico e ocasionam erros na separação de cromossomos durante a divisão celular, levando à formação de c-metáfase e aderência (OLIVEIRA et al., 2011).

Como relatam Leme e Marin-Morales (2009), a análise de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* L., permitiu incluir outro tipo de anormalidade: a anormalidade nuclear, que consiste em alterações morfológicas nos núcleos de células em interfase, podendo se apresentar nas formas de núcleos lobulados, núcleos com brotos, células polinucleadas, mini-células etc.

Leme e Marin-Morales (2009) relatam que muitos estudos foram conduzidos utilizando o teste *A. cepa* L., detectando uma grande variedade de poluentes ambientais, com resultados satisfatórios para a maioria das pesquisas realizadas. Türkoğlu (2007) estudou os efeitos dos conservantes alimentares em pontas de raízes de *A. cepa* L., cujos resultados demonstraram diminuição na divisão celular e nos valores do índice mitótico. Além disso, foram observadas anormalidades como pontes em anáfase, c-mitose, micronúcleos, aderências e quebras cromossômicas. Outros trabalhos indicaram redução significativa no crescimento de raízes (KRÜGER, 2009), inibição do índice mitótico, indução de aberrações cromossômicas e presença de micronúcleos (MARCANO et al., 2004).

Segundo Ma et al. (1995), o teste *Allium* é adequado para o monitoramento da toxicidade e pode ser utilizado para a inspeção da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos. Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros microscópicos, como alterações no

índice mitótico e aberrações cromossômicas em *A. cepa*, induzidos pelo estresse dos elementos arsênio e cádmio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos genotóxicos e citotóxicos do estresse causado por arsênio e cádmio em ensaios ecotoxicológicos com *Allium cepa* L.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar possíveis aberrações cromossômicas como aderências, c-metáfases, cromossomos em ascensão precoce, quebras e pontes cromossômicas e formação de micronúcleos, para inferir sobre a genotoxicidade de arsênio e cádmio;
- Determinar os valores dos índices mitóticos em cada tratamento e compará-los ao controle, para inferir sobre a citotoxicidade dos referidos elementos;
- Verificar se os elementos possuem atividade aneugênica ou clastogênica, com base nos tipos de anormalidades encontradas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos referentes a esse estudo estão exibidos na seção resultados e discussão, que se encontra estruturado na forma de um artigo científico a ser submetido ao periódico Journal of Hazardous Materials.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITOS GENOTÓXICOS E CITOTÓXICOS DO ESTRESSE CAUSADO POR ARSÊNIO E CÁDMIO em *Allium cepa* L.

RESUMO

A contaminação ambiental causada pela liberação de substâncias químicas pelas atividades antropogênicas é um problema da atualidade. Os elementos não essenciais aos organismos vivos, como os metais pesados, em geral, apresentam toxicidade, a qual deve ser estudada. Desta forma, este trabalho avaliou os efeitos dos elementos arsênio (As) e cádmio (Cd) por meio do teste com *Allium cepa* L. (cebola). As cebolas foram colocadas para enraizar em água, sob temperatura de 25°C. Após o crescimento de novas raízes, as cebolas foram submetidas a diferentes concentrações de arseniato de sódio (5 a 20 mg/L) e de nitrato de cádmio (4 a 12 mg/L), além do controle, por 48 horas. Depois, suas raízes foram coletadas, fixadas, hidrolisadas e coradas para posterior montagem de lâminas e análise microscópica. Através da análise de componentes principais pôde-se observar a formação de dois grupos. Em um deles, ficaram agrupadas amostras de arsênio, com alta frequência de metáfase com cromossomo em ascensão precoce (0,10%), quebra cromossômica na anáfase (0,54%) e c-metáfase (0,99%). No outro, agruparam-se amostras de cádmio, as quais apresentaram altos índices de micronúcleos na interfase (0,68%) e aderência (1,87%). Estes elementos alteraram também o índice mitótico em *A. cepa* L. Com base nos resultados, infere-se que estes elementos são genotóxicos e citotóxicos em células meristemáticas de raiz de *A. cepa* L.

Palavras-chave: Metais pesados; aberrações cromossômicas; índice mitótico; análise de componentes principais; genotoxicidade; citotoxicidade; metaloide.

Abstract

Environmental contamination caused by releasing of chemicals by anthropogenic activities is a current problem. The elements that are no essential to living organisms generally exhibit toxicity, which must be studied. In this way, this study has evaluated the effects of the elements arsenic (As) and cadmium (Cd) through *Allium cepa* L. test (onion). The roots were grown in water under 25 °C. After growing, the onions were submitted to different concentrations of sodium arsenate (5 to 20 mgL⁻¹) and cadmium nitrate (4 to 12 mgL⁻¹), and control for 48 hours. Then roots were collected, fixed, hydrolysed and stained for subsequent assembly of slides and microscopic analysis. Through the principal component analysis could be observed the formation of two groups. In one of them were grouped arsenic samples, with high frequency of precocious chromosome migration at metaphase (0.10%), chromosomal breakage at anaphase (0.54%) and c-metaphase (0.99%). The other one was with cadmium samples, which showed high index of micronuclei in interphase (0.68%), and stickiness (1.87%). These elements also have changed the mitotic index in *A. cepa* L. Based on the results, it is inferred that these elements are genotoxic and cytotoxic in *A. cepa* L. root meristematic cells.

Keywords: Heavy metals; chromosomal aberrations; mitotic index; principal component analysis; genotoxicity; cytotoxicity; metalloids.

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente vem sendo afetado por meio do lançamento de substâncias químicas pelo homem, desde que este começou a habitar a face da Terra (OGA, 2003). Atualmente, grande parte da contaminação ambiental é, dentre outros, decorrente da industrialização (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Além disso, o avanço da tecnologia e o uso de fertilizantes na agricultura têm contribuído muito para a liberação de substâncias químicas no ambiente (OGA, 2003).

Diante desta realidade, é imprescindível que medidas adequadas de controle sejam adotadas para impedir o desequilíbrio do ecossistema (OGA, 2003). Assim, surge a Ecotoxicologia, proposta em 1969 por René Truhaut, que reúne o prefixo eco (*oikos* - casa) e a palavra toxicologia - ciência dos agentes tóxicos, dos venenos e da intoxicação. Dessa forma, origina-se um ramo comum da toxicologia e da ecologia, responsável por estudar os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos sobre os ecossistemas e seus constituintes, inclusive o homem (MORIARITY, 1988).

Para Fiskesjö (1985), o ensaio para a toxicidade deve ser executado de forma simples e os resultados devem ser rapidamente obtidos. Conforme o autor, muitos testes de plantas podem cumprir estes quesitos e, dentre eles, destaca-se o teste com *Allium cepa* L. (cebola comum), o qual segundo El-Shahaby et al. (2003), é vantajoso para avaliar a toxicidade de diversas substâncias químicas no ambiente, dentre elas, os metaloides e metais. Entre estes elementos estão o arsênio e o cádmio. O arsênio é um semi-metal obtido durante a mineração e fundição de ouro, níquel, cobre e chumbo, além de ser empregado como inseticida, herbicida, raticida, fungicida e larvicida. O cádmio é um metal produzido em sua maior parte a partir da fusão do zinco e usado amplamente em plásticos coloridos (SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA, 1982; BAIRD, 2002).

Estes dois elementos foram relatados como indutores de vários tipos de aberrações cromossômicas em células vegetais, como por exemplo, aderências, c-metáfases, micronúcleos e pontes, comprovando a genotoxicidade dessas substâncias em determinadas plantas (YI et al., 2007; SETH et al., 2008; DHO et al., 2010; WU et al., 2010). Outro parâmetro comumente avaliado é a alteração no índice mitótico, expressando a citotoxicidade destes elementos em diferentes vegetais.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e a citotoxicidade do estresse causado por arsênio e cádmio, por meio de bioensaios utilizando *A. cepa* L. como organismo-teste.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Indução de desenvolvimento de raízes

O organismo-teste utilizado para este estudo foi a cebola comum (*Allium cepa* L., $2n = 16$). As cebolas foram adquiridas do comércio local e suas raízes secas foram retiradas e descartadas. Em seguida, foram colocadas para enraizar em água de torneira, em câmara de germinação a 25 °C.

Quando as novas raízes tinham em média dois centímetros de comprimento, foram retiradas da água e submetidas a cinco diferentes concentrações de arseniato de sódio (Tabela 1) (VETEC Química Fina LTDA – Dosagem mínima 98%) e de nitrato de cádmio (Tabela 2) (VETEC Química Fina LTDA – Dosagem mínima 98%), separadamente, além do controle (água destilada), por 48 horas, sendo que cada tratamento foi realizado em triplicata.

As concentrações dos elementos foram definidas observando-se os limites máximos de contaminantes admitidos em substrato para plantas e condicionadores de solo, onde o valor máximo admitido para o arsênio é 20,00 mg/Kg e para o cádmio é 8,00 mg/Kg, sendo que para este foram utilizadas duas concentrações superiores ao limite (Tabela 2) (INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 27/2006 – MAPA).

Tabela 1 – Concentrações de arseniato de sódio testadas em bioensaios com *A. cepa* L.

Concentração (mg/L)	Volume de Na_3HasO_4 (MI)	Volume de água destilada (MI)	Volume total (MI)
0,0	0,0	130,0	130,0
5,0	1,6	128,4	130,0
7,5	2,3	127,7	130,0
10,0	3,1	126,9	130,0
15,0	4,7	125,3	130,0
20,0	6,2	123,8	130,0

Tabela 2 – Concentrações de nitrato de cádmio testadas em bioensaios com *A. cepa* L.

Concentração (mg/L)	Volume de Cd(NO ₃) ₂ .4H ₂ O (ml)	Volume de água destilada (ml)	Volume total (ml)
0,0	0,0	130,0	130,0
4,0	4,3	125,7	130,0
6,0	6,5	123,5	130,0
8,0	8,7	121,3	130,0
10,0	10,8	119,2	130,0
12,0	13,0	117,0	130,0

2.2 Coleta, fixação, estocagem e hidrólise das raízes

Após 48 horas de exposição ao arseniato de sódio (Na₃AsO₄) e ao nitrato de cádmio [Cd(NO₃)₂], sob temperatura de 25°C, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 álcool etílico : 1 ácido acético) por 24 horas à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as raízes foram lavadas três vezes em água destilada e, em seguida, estocadas em álcool 70%.

As raízes foram retiradas do álcool 70%, lavadas três vezes em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N, por 12 minutos, à 25°C. Após, foram lavadas novamente três vezes em água destilada e o excesso de água foi retirado com papel filtro.

2.3 Coloração das raízes

A coloração foi realizada pelo método Feulgen, com adaptações. As raízes foram colocadas em Reativo de Schiff por uma hora. Em seguida foram lavadas por gotejamento. Depois disso, a porção apical de cada raiz foi seccionada e o restante do material foi descartado.

Em cada lâmina, duas a três raízes foram cobertas com uma gota de carmim propiônico 1%, prosseguindo-se com a fragmentação. Em seguida, os fragmentos foram cobertos com uma lamínula, realizou-se a técnica de esmagamento, pressionando a lâmina contra a lamínula entre dois papéis filtros dobrados. Por último, as bordas das lamínulas foram seladas com esmalte incolor.

2.4 Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas sob microscópio de luz, com aumento de 1000 vezes, em óleo de imersão. As anormalidades foram fotografadas em fotomicroscópio Olympus CX21.

Para cada réplica, foram contadas 1000 células, totalizando 3000 células para cada concentração.

Para avaliar os parâmetros de genotoxicidade, foram analisadas a ocorrência de anormalidades cromossômicas, a saber: aderência cromossômica, quebras cromossômicas, c-metáfase, cromossomos em ascensão precoce, pontes cromossômicas e micronúcleos. Também foram analisadas as frequências de interfase e das etapas de divisão celular prófase, metáfase, anáfase e telófase.

A citotoxicidade foi analisada a partir de alterações no índice mitótico. A fórmula utilizada para calcular o índice mitótico foi a seguinte:

$$IM (\%) = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células contadas}}$$

2.5 Análise estatística

O conjunto de dados foi submetido ao teste de homogeneidade de variância de Cochran H e a normalidade dos resíduos foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada nos dados cujas variâncias apresentaram homocedasticidade. Para os testes de contrastes de média foram utilizados o teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Todos os testes estatísticos foram realizados no Ambiente R.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos genotóxicos causados por arsênio e cádmio em *A. cepa* L.

Os resultados indicaram a presença de aberrações cromossômicas nos tratamentos com arseniato de sódio e com nitrato de cádmio testados. Nos tratamentos com arsênio, houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de

significância, em: 1) c-metáfase, nas concentrações 7,5 e 15 mg/L comparadas ao controle, entre 5 e 15 mg/L e entre 10 e 15 mg/L; e 2) micronúcleo na interfase, nas concentrações 5; 7,5; 10 e 15 mg/L, incluindo o grupo controle, em relação à última concentração (20 mg/L).

Nos tratamentos com cádmio, houve diferença estatística significativa, com intervalo de 95 % de confiança, em: 1) aderência cromossômica, nas concentrações 6, 8, 10 e 12 mg/L comparadas ao controle; 2) micronúcleo na interfase, concentrações 8, 10 e 12 mg/L em relação ao controle, entre as concentrações 4 e 8 mg/L, 4 e 10 mg/L e 6 e 8 mg/L; e 3) ponte cromatídica, nas concentrações 8 e 10 mg/L comparadas ao controle, e entre 6 e 10 mg/L.

As anormalidades oscilaram entre as concentrações, com menor frequência na concentração 5 mg/L (0,06%) e maior frequência na concentração 15 mg/L (0,79%) (Tabela 3). Nos tratamentos com cádmio, a menor frequência foi na solução controle (0,11%) e a maior na solução 8 mg/L (0,87%) (Tabela 4).

Dentre as anormalidades, foram observados cromossomos em ascensão precoce na metáfase (Figura 1 b) e quebras cromossômicas na metáfase (Figura 1 c) e na anáfase (Figura 1 f). Não foi encontrada metáfase com cromossomos em ascensão precoce na primeira concentração de arseniato de sódio (5 mg/L), porém a maior porcentagem esteve na concentração mais elevada, 20 mg/L (0,04%) (Tabela 3). Em tratamentos com cádmio, essa anormalidade foi encontrada na concentração 4 mg/L (0,01%), além da solução controle (0,03%).

Metáfase com quebra cromossômica apareceu no controle e concentrações 7,5; 10 e 15 mg/L de arseniato de sódio, com maior frequência na concentração 15 mg/L (0,02%) (Tabela 3). Em tratamentos com cádmio, não foi observado esse tipo de anormalidade.

Quebras cromossômicas em anáfase apareceram em todos os tratamentos com arsênio e controle, sendo menos frequentes a 5 mg/L (0,02%) e mais frequentes a 15 e 20 mg/L (0,19%) (Tabela 3). Nas concentrações com nitrato de cádmio, apareceram no controle (0,03%) e na concentração mais elevada, 12 mg/L (0,01%) (Tabela 4).

Tabela 3 – Porcentagem de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de raiz de *A. cepa* L., submetidas a diferentes concentrações de arsênio. Os valores entre parênteses referem-se ao desvio-padrão. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

[As] (mg/L)	Número total de células	Aderência (%)	C-metáfase (%)	Metáfase com quebra cromossômica (%)	Metáfase com cromossomo em ascensão precoce (%)	Anáfase com quebra cromossômica (%)	Porcentagem de anormalidades por concentração
0,0 (C)	3000	0,02 ($\pm 0,05$)a	0,03 ($\pm 0,08$)a	0,01 ($\pm 0,03$)a	0,03 ($\pm 0,05$)a	0,03 ($\pm 0,07$)a	0,13 ($\pm 0,00$)
5,0	3000	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,02 ($\pm 0,05$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,02 ($\pm 0,05$)a	0,06 ($\pm 0,00$)
7,5	3000	0,03 ($\pm 0,06$)a	0,32 ($\pm 0,35$)b	0,01 ($\pm 0,03$)a	0,03 ($\pm 0,06$)a	0,04 ($\pm 0,09$)a	0,44 ($\pm 0,06$)
10,0	3000	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,08 ($\pm 0,07$)a	0,01 ($\pm 0,03$)a	0,01 ($\pm 0,03$)a	0,10 ($\pm 0,21$)a	0,24 ($\pm 0,02$)
15,0	3000	0,06 ($\pm 0,09$)a	0,43 ($\pm 0,31$)b	0,02 ($\pm 0,03$)a	0,02 ($\pm 0,03$)a	0,19 ($\pm 0,27$)a	0,79 ($\pm 0,08$)
20,0	3000	0,04 ($\pm 0,13$)a	0,14 ($\pm 0,17$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,04 ($\pm 0,09$)a	0,19 ($\pm 0,22$)a	0,61 ($\pm 0,04$)

Tabela 4 – Porcentagem de aberrações cromossômicas em células meristemáticas da raiz de *A. cepa* L., submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Os valores entre parênteses referem-se ao desvio-padrão. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

[Cd] (mg/L)	Número total de células	Aderência (%)	C-metáfase (%)	Metáfase com cromossomo em ascensão precoce (%)	Anáfase com quebra cromossômica (%)	Ponte Cromatídica (%)	Porcentagem de anormalidades por concentração
0,0 (C)	3000	0,02 ($\pm 0,05$)a	0,03 ($\pm 0,08$)a	0,03 ($\pm 0,05$)a	0,03 ($\pm 0,07$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,11 ($\pm 0,01$)
4,0	3000	0,23 ($\pm 0,13$)a	0,02 ($\pm 0,07$)a	0,01 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,02 ($\pm 0,07$)ab	0,30 ($\pm 0,04$)
6,0	3000	0,27 ($\pm 0,12$)b	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)ac	0,34 ($\pm 0,05$)
8,0	3000	0,49 ($\pm 0,27$)b	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,07 ($\pm 0,06$)bc	0,87 ($\pm 0,10$)
10,0	3000	0,61 ($\pm 0,50$)b	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,09 ($\pm 0,09$)b	0,86 ($\pm 0,12$)
12,0	3000	0,27 ($\pm 0,39$)b	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,00 ($\pm 0,00$)a	0,01 ($\pm 0,03$)a	0,02 ($\pm 0,03$)ab	0,42 ($\pm 0,05$)

Rank e Nielsen (1998), num ensaio de aberração cromossômica em *A. cepa* L., com lodo de águas residuais, também observaram fragmentos cromossômicos e cromossomos desorientados, tanto nos controles, como nas concentrações testadas. Seth et al. (2008) e Zou et al. (2012) encontraram essas anormalidades ao analisarem o efeito do cádmio nas células de raízes de *A. cepa* L., sendo suas frequências aumentadas com o aumento da concentração.

Essas anormalidades podem ser causadas pela indução de estresse oxidativo dos elementos arsênio e cádmio, acarretando em um aumento e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que atuarão em bases purinas e pirimidinas do material genético. Dessa forma, as EROs conduzem a quebras na cadeia do DNA, que mais tarde, serão levadas à formação de micronúcleos (RODRÍGUEZ-SERRANO et al., 2006; YI et al., 2007). Esses tipos de aberrações cromossômicas sugerem que estes elementos tenham um efeito clastogênico por induzirem quebras no material genético (OLIVEIRA et al., 2011).

A c-metáfase (Figura 1 d) ocorreu em todas as concentrações de arsênio testadas, apresentando menor frequência a 5 mg/L (0,02%) e maior a 15 mg/L (0,43%) (Tabela 3). Nos tratamentos com cádmio, a c-metáfase foi observada na concentração 4 mg/L (0,02%), além do controle (0,03%) (Tabela 4). Teerarak et al. (2009) encontraram c-metáfase em células de raízes de *A. cepa* L. submetidas a cloreto de sódio, no entanto, somente na concentração de 40 Mm. Kiran e Sahin (2006) verificaram essa anormalidade em células de lentilha, nas quais foram observadas c-metáfase em todas as concentrações de cádmio, inclusive no controle.

Células com c-metáfase não possuem fibras do fuso mitótico e notam-se cromossomos inteiros soltos e espalhados pela célula, normalmente induzidos por alteração do fuso (ASITA; MOKHOBBO, 2013). A indução dessa anormalidade sugere que, principalmente o arsênio possa estar interagindo com a tubulina, bloqueando seu processo de polimerização e conduzindo a defeitos no fuso mitótico, que consequentemente, levam à formação de c-metáfase (XU et al., 2009). Além disso, o arsênio comportou-se como uma substância aneugênica, devido às alterações no fuso mitótico (OLIVEIRA et al., 2011).

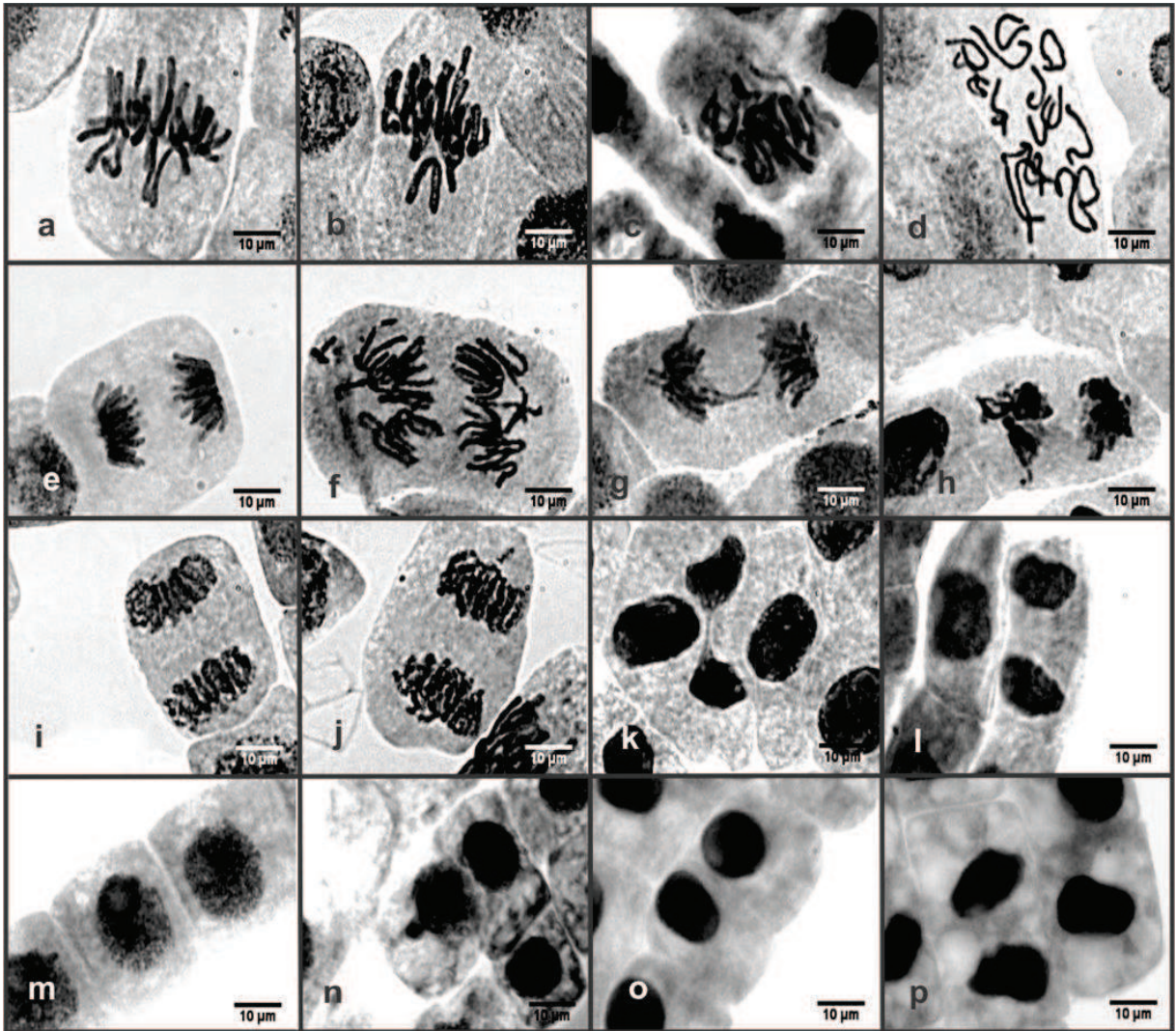


Figura 1 – Aberrações cromossômicas em células da raiz de *A. cepa* L. submetidas a diferentes tratamentos com arsênio (As) e cádmio (Cd). A) metáfase normal (controle); b) metáfase com cromossomo em ascensão precoce (7,5 mg/L de As); c) quebra cromossômica na metáfase (7,5 mg/L de As); d) c-metáfase (7,5 mg/L de As); e) anáfase normal (5 mg/L de As); f) quebra cromossômica na anáfase (controle); g) ponte cromatídica na anáfase (controle); h) aderência na anáfase (7,5 mg/L de As); i) telófase normal (controle); j) micronúcleo na telófase (5 mg/L de As); k) ponte cromatídica na telófase (8 mg/L de Cd); l) aderência na telófase (7,5 mg/L de As); m) interfase normal (controle); n) micronúcleo na interfase (controle); o) aderência na interfase (7,5 mg/L de As); p) núcleos com formas irregulares (pseudolobulados) (12 mg/L de Cd).

A aderência cromossômica (Figura 1 h, l, o) foi observada no controle e concentrações 7,5; 15 e 20 mg/L de arsênio, com maior frequência a 15 mg/L (0,06%) (Tabela 3). Nos tratamentos com cádmio, a aderência foi observada em todos os tratamentos e controle, tendo este a menor frequência (0,02%), enquanto a maior foi a 10 mg/L (0,61%) (Tabela 4).

Teerarak et al. (2009) encontraram aderência em células de raízes de *A. cepa* L., em todas as concentrações de cloreto de sódio testadas (40 – 80 Mm), exceto no controle. No trabalho de Zou et al. (2012) foi verificado que a aderência

em *A. cepa* L. aumentou com o aumento da concentração de cádmio, desde o controle até a concentração mais elevada testada (100 μ M). Outros autores também observaram esse tipo de aberração em *A. cepa* L., utilizando diferentes compostos (MARCANO et al., 2004; CHANDRA et al., 2005; AMARAL et al., 2007).

A aderência cromossômica é caracterizada por cromossomos que não conseguem condensar por inteiro, formando massas de cromatina, vistos como aglomerados em alguns casos, além das células apresentarem-se com um aspecto pegajoso (ASITA; MOKHOBLO, 2013). Substâncias que levam à formação desse tipo de anormalidade são consideradas aneugênicas (OLIVEIRA et al., 2011). Assim, Pode-se inferir que os elementos arsênio e cádmio apresentam atividade aneugênica por estarem causando uma condensação anormal do DNA, resultando em aderência cromossômica, que segundo Zou et al. (2012) é irreversível e reflete a alta toxicidade do metal, levando a célula à morte.

Os micronúcleos, nos tratamentos com arsênio, foram observados na telófase (Figura 1 j) e na interfase (Figura 1 n). Micronúcleos na telófase não foram visualizados na concentração 7,5 mg/L, mas sua maior frequência deu-se na concentração 5 mg/L (0,02%). Micronúcleos na interfase não foram encontrados no controle e na concentração 7,5 mg/L, enquanto a maior frequência foi a 20 mg/L (0,19%) (Figura 2).

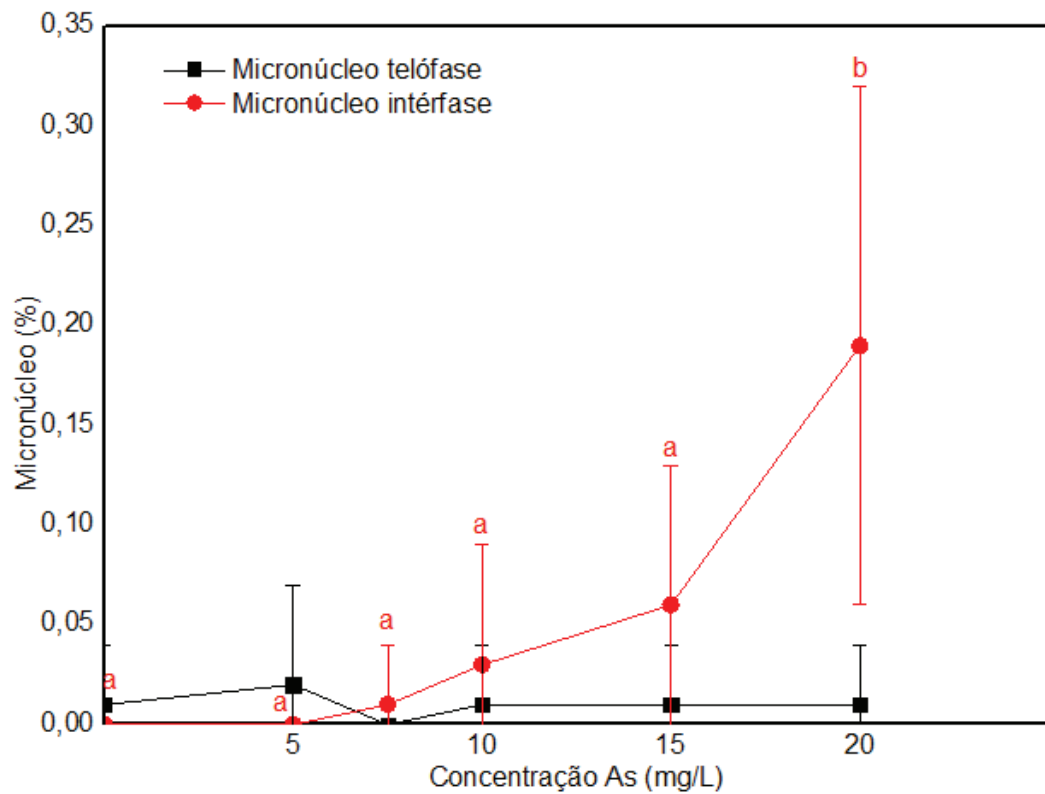


Figura 2 – Formação de micronúcleos em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de arsênio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Nos tratamentos com cádmio, somente foram notificados micronúcleos na interfase, com maior frequência a 8 mg/L (0,31%), enquanto que na solução controle, não foram observados (Figura 3).

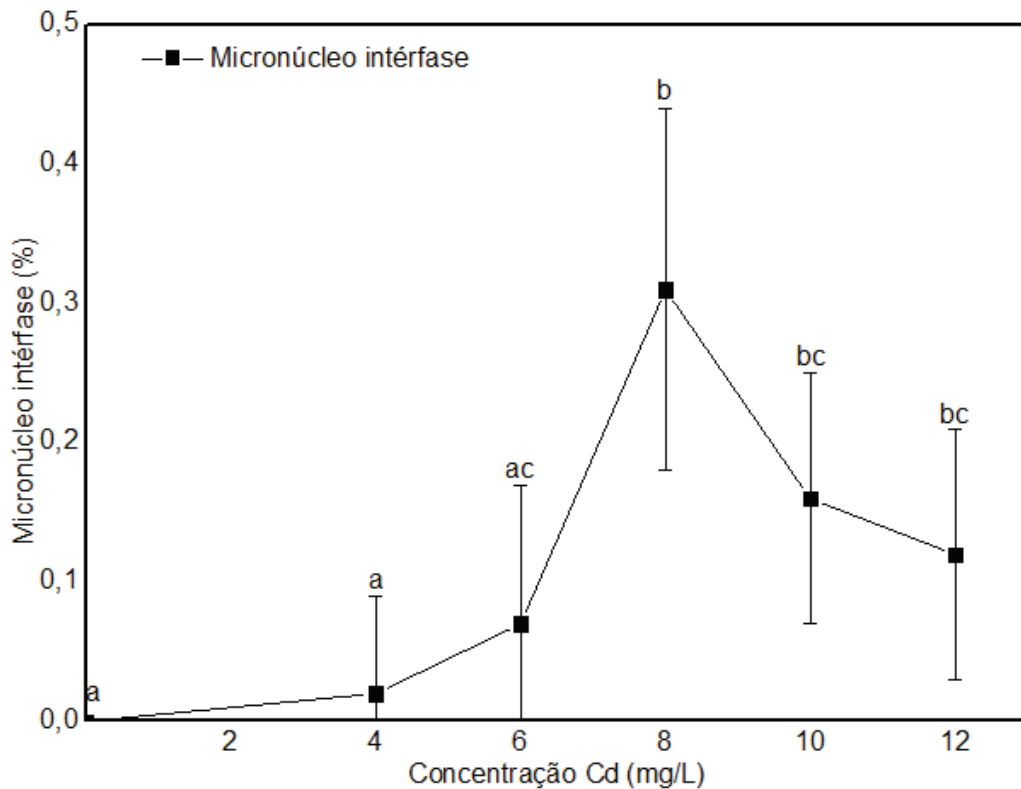


Figura 3 – Formação de micronúcleos em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de cádmio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Wu et al. (2010) verificaram que o arsênio induziu a formação de micronúcleos em *A. cepa* L. e *Vicia faba*, demonstrando de forma clara, o efeito genotóxico do arsênio em células vegetais. Contudo a frequência de micronúcleos diminuiu na maior concentração (30 mg/L) em *V. faba*, devido à toxicidade fisiológica mais elevada e um declínio na atividade mitótica.

Diversos autores também encontraram micronúcleos em seus estudos utilizando o cádmio em diversas plantas (KIRAN; SAHIN, 2006; SETH et al., 2008; AMIRTHALINGAM et al., 2013). No entanto, seus resultados diferem do presente trabalho, pelas porcentagens de micronúcleos aumentarem com o aumento da concentração nos diferentes tratamentos com cádmio testados.

Akinboro et al. (2007), relatam que as formações de micronúcleos são induzidas por distúrbios no fuso mitótico de células de *A. cepa* L., que ocorrem por causa da separação dos cromossomos durante a anáfase de maneira irregular, em que alguns chegam aos pólos mais tarde que outros. Para Fenech (2000), além de alguns cromossomos serem incapazes de mover-se para os pólos no decorrer da mitose, outro motivo da formação de micronúcleos é a quebra cromossômica. Ainda

segundo o autor, durante a telófase, os cromossomos retardatários e fragmentos são englobados por um envoltório nuclear, assemelhando-se a um pequeno núcleo na interfase. Para Oliveira et al. (2011), a presença de micronúcleo evidencia a clastogenicidade de determinada substância. Portanto, foi possível verificar, com base nesse tipo de anormalidade, que os elementos arsênio e cádmio comportaram-se como substâncias clastogênicas em *A. cepa* L.

A ponte cromatídica (Figura 1 g, k) foi observada somente nos tratamentos com cádmio, estando ausente na concentração 6 mg/L e no controle, sendo a maior frequência a 10 mg/L (0,09%) (Tabela 4). Esse fenômeno também foi observado por diversos autores (BARBOA; DE LA TORRE, 1996; KIRAN; SAHIN, 2006; ZOU et al., 2012), os quais constataram que sua frequência oscilou entre os diferentes tratamentos.

Segundo Barboa e de La Torre (1996), a indução de pontes evidencia a clastogenicidade de uma dada substância, pois as pontes causam quebras no DNA, resultando em cromossomos com terminações quebradas na interfase seguinte. Portanto, os autores concluíram que o cádmio apresenta um efeito indiretamente clastogênico sobre células de raízes de *A. cepa* L.

Além dessas aberrações cromossômicas, foram visualizadas ainda, células com núcleos de formas irregulares nos tratamentos com cádmio (Figura 1 p). Marcano et al. (2001) também observaram alterações citológicas em seu trabalho com cádmio em *A. cepa* L., notificando células com formatos ovóides e núcleos pseudolobulados. Com base nessas observações, os autores inferiram que o cádmio é citotóxico sobre meristemas radiculares de *A. cepa* L.

3.2 Efeitos citotóxicos causados por arsênio e cádmio em *A. cepa* L.

O nível citotóxico pode ser determinado pela diminuição da taxa do Índice Mitótico (IM) (EL-SHAHABY et al., 2003). Assim, foi obtido o IM por meio da razão percentual de células em divisão e o número total de células visualizadas.

No presente trabalho foi verificado que o IM oscilou entre as concentrações de arsênio testadas com menor porcentagem na concentração 5 mg/L (6,63%) e maior porcentagem na concentração mais elevada, 20 mg/L (12,70%) (Figura 4). Não houve diferença estatística significativa. Estes resultados foram diferentes dos

encontrados por Yi et al. (2007) e Wu et al. (2010), onde o IM diminuiu com o aumento da concentração de arsênio.

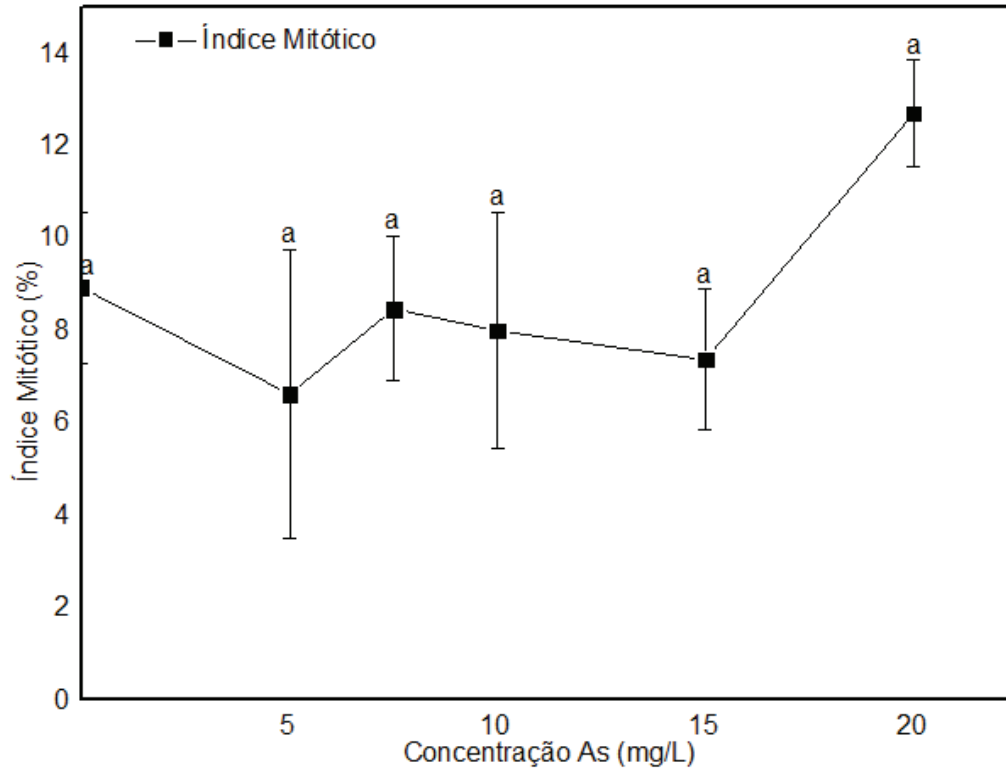


Figura 4 - Frequência de Índice Mitótico em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de arsênio e erro padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$). Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Nos tratamentos com cádmio, houve diferença estatística significativa ao nível de 5% de significância em todos os tratamentos comparados ao controle. O IM em células meristemáticas de *A. cepa* L. apresentou maior frequência no controle (9,62%) e drástica redução em todas as concentrações, sendo a menor a 12 mg/L (1,37%) (Figura 5). Zhang e Yang (1994) testaram o cádmio em *H. vulgare* e verificaram que houve redução do IM conforme o aumento da concentração.

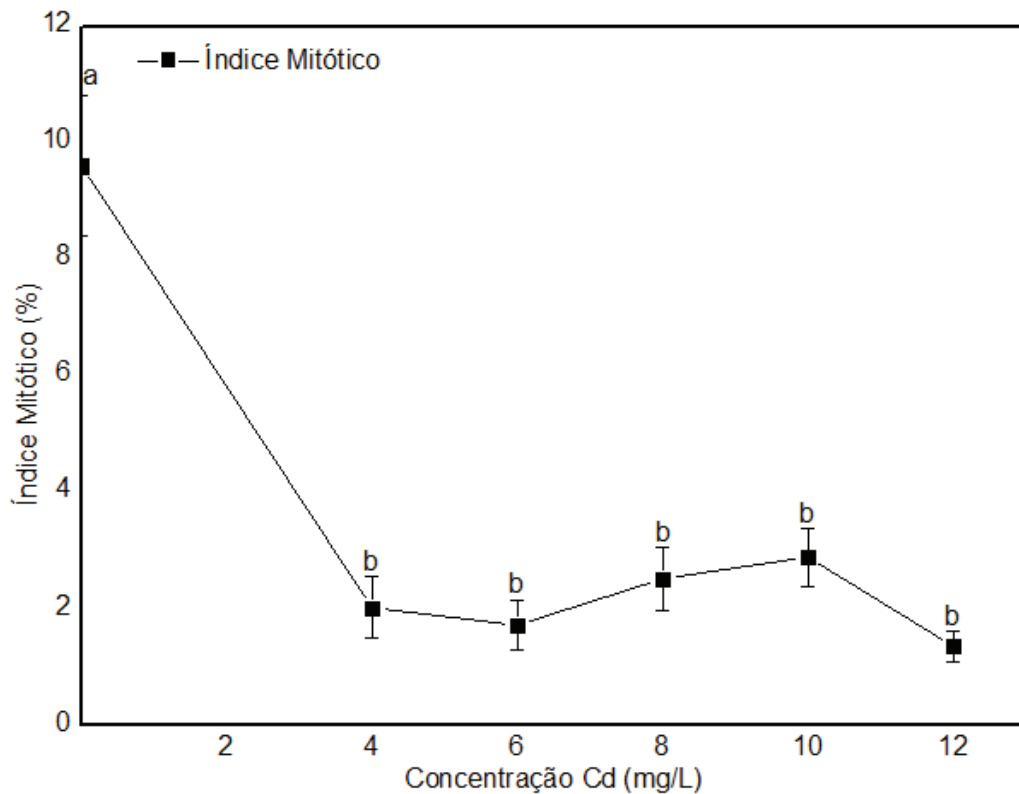


Figura 5 - Frequência de Índice Mitótico em células de ponta de raiz de *A. cepa* L. em diferentes concentrações de cádmio e erro-padrão. Letras distintas representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Os valores do IM das concentrações 5; 7,5; 10 e 15 mg/L de arseniato de sódio e todas as concentrações de nitrato de cádmio foram menores que os do controle. Essa redução na atividade mitótica, conforme relata El-Ghamery et al. (2003), pode indicar que as concentrações mostraram-se inibidoras da formação de vários metabólitos importantes para uma continuação normal da mitose. Por outro lado, Caritá e Marin Morales (2008) afirmam que valores de IM superiores aos do controle, como foi o caso da concentração 20 mg/L de arsênio do presente estudo, resultam da indução de aumento da divisão celular, podendo representar um evento nocivo para as células.

Pôde-se observar que houve uma grande redução do IM dos tratamentos com cádmio comparados ao controle. Para Seth et al. (2008), essa inibição do IM indica que a exposição ao cádmio bloqueia a entrada das células em divisão celular, sugerindo que este elemento tenha um potencial efeito de citotoxicidade. Isso também pode explicar o fato de poucas aberrações como quebras cromossômicas e c-metáfase serem observadas nas concentrações com cádmio, pois com um efeito tóxico elevado da substância, ocorre uma diminuição na atividade mitótica, levando,

consequentemente a um baixo índice de anormalidades cromossômicas (WU et al., 2010).

3.3 Efeitos do arsênio e cádmio sobre a interfase e as fases da mitose

A estatística descritiva com os resultados do número de células em interfase e em divisão celular, submetidas a estresse de arsênio está mostrada na tabela 5. Para os dados dos tratamentos com arsênio, todas as variáveis dependentes foram normalizadas, pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizado o teste de homogeneidade de variância, pelo teste de Cochran C, demonstrando que todas essas variáveis foram homogêneas. Assim, justifica-se a aplicação de um teste paramétrico, que, no caso, foi utilizada a Análise de Variância (*Analysis of Variance* – ANOVA). Não houve diferença estatística significativa nas células em interfase e em divisão celular.

Conforme demonstra a tabela 5, as médias das fases mitóticas – prófase, metáfase, anáfase e telófase – oscilaram entre as diferentes concentrações de arsênio. Para a prófase nota-se que a menor média foi obtida na concentração 10 mg/L, enquanto que a maior foi na concentração 7,5 mg/L. Além disso, observa-se também que as médias inferiores àquelas do controle foram as das concentrações 5, 10 e 15 mg/L, enquanto que as demais foram superiores. Para a metáfase, a menor média foi na concentração 15 mg/L e a maior foi a 20 mg/L. A concentração 20 mg/L foi a única cuja média foi superior à do controle. Quanto à anáfase, a menor média foi encontrada na concentração 7,5 mg/L, enquanto a maior foi a 20 mg/L, sendo esta a única superior à média do grupo controle. Na telófase, verificou-se menor média na concentração de 15 mg/L e maior a 20 mg/L. Somente as médias das concentrações 7,5 e 15 mg/L foram menores que as do controle. É possível observar ainda que todas as fases mitóticas apresentaram suas frequências elevadas na concentração 20 mg/L em relação aos controles.

Tabela 5 – Estatística descritiva da variação média do número de células de *A. cepa* L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de arsênio e erro padrão entre parênteses. Resultados obtidos da contagem de 1000 células por repetição. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

[As] (mg/L)	N	II	P	M	A	T	IF
0,0 (C)	6	624,00 ($\pm 39,22$)a	26,25 ($\pm 6,98$)a	17,25 ($\pm 5,45$)a	14,25 ($\pm 2,87$)a	28,00 ($\pm 2,27$)a	286,75 ($\pm 46,94$)a
5,0	2	664,00 ($\pm 33,00$)a	24,00 ($\pm 13,00$)a	15,50 ($\pm 10,50$)a	10,00 ($\pm 1,00$)a	34,50 ($\pm 16,50$)a	250,50 ($\pm 75,50$)a
7,5	3	656,33 ($\pm 50,87$)a	33,33 ($\pm 8,09$)a	8,33 ($\pm 1,20$)a	9,67 ($\pm 0,33$)a	20,00 ($\pm 5,13$)a	258,67 ($\pm 39,16$)a
10,0	3	623,00 ($\pm 76,24$)a	14,67 ($\pm 4,67$)a	16,67 ($\pm 4,67$)a	10,67 ($\pm 4,91$)a	31,67 ($\pm 11,02$)a	296,00 ($\pm 65,60$)a
15,0	3	624,67 ($\pm 20,90$)a	23,00 ($\pm 4,00$)a	5,33 ($\pm 2,60$)a	10,33 ($\pm 3,33$)a	13,00 ($\pm 4,00$)a	300,00 ($\pm 10,54$)a
20,0	3	549,00 ($\pm 33,42$)a	31,67 ($\pm 7,69$)a	23,67 ($\pm 2,60$)a	20,33 ($\pm 2,73$)a	38,33 ($\pm 3,48$)a	318,33 ($\pm 36,50$)a
Média	20	621,28 ($\pm 18,15$)	25,61 ($\pm 2,90$)	14,56 ($\pm 2,19$)	12,78 ($\pm 1,42$)	27,22 ($\pm 13,20$)	287,06 ($\pm 17,18$)

C: Solução controle; N: Número de amostras; II: Interfase Inicial; P: Prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; IF: Interfase Final. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

Nos tratamentos com cádmio, todas as variáveis dependentes apresentaram homocedasticidade entre as variâncias. A análise de variância – ANOVA revelou que houve diferença estatística significativa comparando-se cada concentração com o grupo controle, com intervalo de 95% de confiança, em prófase, metáfase, anáfase e telófase (Tabela 6).

Conforme os resultados na tabela 6, o cádmio foi mais impactante em todas as fases das divisões celulares que o arsênio. As médias mais elevadas das fases foram observadas na solução controle. As menores médias da prófase foram nas concentrações 6 e 10 mg/L. Metáfase e anáfase não foram encontradas nas concentrações 10 e 12 mg/L, enquanto que a telófase foi menos frequente na última concentração (12 mg/L), possivelmente porque as células já estavam finalizando o processo de divisão celular no momento em que procedeu-se a fixação.

Como discutido anteriormente, para os tratamentos tanto de arsênio quanto de cádmio, que demonstraram redução nas médias das fases mitóticas, é possível inferir que estes elementos estejam comportando-se como bloqueadores de substâncias necessárias para o normal prosseguimento da divisão celular (EL-GHAMERY et al., 2003). Por outro lado, um aumento das médias dos eventos normais da mitose, que no caso do presente estudo foi verificado somente na última concentração de arsênio (20 mg/L), pode significar que este elemento esteja causando uma proliferação celular anormal, sendo, portanto, extremamente perigoso para as células, já que estas podem estar perdendo o controle sobre o seu ciclo (CARITÁ; MARIN MORALES, 2008).

Tabela 6 – Estatística descritiva da variação média do número de células de *A. cepa* L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de cádmio e erro padrão entre parênteses. Resultados obtidos da contagem de 1000 células por repetição. Intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

[Cd] (mg/L)	N	II	P	M	A	T	IF
0,0 (C)	4	624,00 ($\pm 39,22$)a	26,25 ($\pm 6,98$)a	17,25 ($\pm 5,45$)a	14,25 ($\pm 2,87$)a	28,00 ($\pm 2,27$)a	286,75 ($\pm 46,94$)a
4,0	3	619,33 ($\pm 13,45$)a	5,33 ($\pm 1,20$)b	2,00 ($\pm 1,15$)b	0,67 ($\pm 0,67$)b	4,00 ($\pm 1,53$)b	359,67 ($\pm 11,84$)a
6,0	3	628,00 ($\pm 37,47$)a	1,33 ($\pm 0,88$)b	1,00 ($\pm 1,00$)b	0,67 ($\pm 0,67$)b	6,33 ($\pm 1,20$)b	352,67 ($\pm 38,92$)a
8,0	3	620,67 ($\pm 13,87$)a	3,67 ($\pm 1,45$)b	0,33 ($\pm 0,33$)b	0,33 ($\pm 0,33$)b	4,33 ($\pm 0,88$)b	344,67 ($\pm 13,25$)a
10,0	3	637,00 ($\pm 24,70$)a	1,33 ($\pm 0,88$)b	0,00 ($\pm 0,00$)b	0,00 ($\pm 0,00$)b	6,67 ($\pm 2,60$)b	329,33 ($\pm 28,82$)a
12,0	3	541,00 ($\pm 54,24$)a	2,00 ($\pm 1,53$)b	0,00 ($\pm 0,00$)b	0,00 ($\pm 0,00$)b	2,67 ($\pm 0,88$)b	441,67 ($\pm 52,65$)a
Média	19	612,32 ($\pm 14,22$)	7,68 ($\pm 2,66$)	4,16 (1,91)	3,26 ($\pm 1,45$)	9,68 ($\pm 2,34$)	349,00 ($\pm 17,26$)

C: Solução controle; N: Número de amostras; II: Interfase Inicial; P: Prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; IF: Interfase Final. Letras distintas na coluna representam diferenças significativas estatisticamente ($p < 0,05$).

3.4 Correlações entre os eventos normais e anormais da mitose e interfase

As correlações entre as fases do ciclo celular, incluindo fases normais e anormalidades cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa* L. expostas ao arsênio, estão apresentadas na tabela 7. As correlações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) estão sombreadas na tabela. Pode-se perceber que houve correlação significativa ($p < 0,05$) positiva entre: prófase e metáfase, prófase e anáfase, prófase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, metáfase e anáfase, metáfase e telófase, anáfase e telófase, c-metáfase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, c-metáfase e quebra cromossômica em anáfase, metáfase com cromossomo em ascensão precoce e anáfase com quebra cromossômica, e entre anáfase com quebra cromossômica e micronúcleo na telófase.

Correlação positiva significa que as duas variáveis estão se movendo juntas no mesmo sentido, ou seja, conforme uma aumenta, a outra aumenta também. Já a correlação negativa significa que as duas variáveis estão se movendo em sentidos opostos, ou seja, conforme uma aumenta, a outra diminui. Na tabela 7 observa-se correlação negativa significativa ($p < 0,05$) entre: interfase inicial e telófase, interfase inicial e interfase final, anáfase e metáfase com quebra cromossômica e entre telófase e metáfase com quebra cromossômica.

Tabela 7 – Matriz de correlação da variação média do número de células de *A. cepa* L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de arsênio ao nível de 5% de significância. Resultados sombreados diferentes significativamente ($p < 0,05$).

	II	P	M	A	T	IF	Cm	AC	MCP	ACQ	MI	MCQ	MT
II	1,000000												
P	0,101329	1,000000											
M	-0,219033	0,486664	1,000000										
A	-0,404183	0,562955	0,680032	1,000000									
T	-0,524752	0,269076	0,756057	0,596946	1,000000								
IF	-0,889911	-0,454345	-0,191548	0,036104	0,186669	1,000000							
Cm	-0,052706	0,305557	-0,300345	-0,185205	-0,316230	0,054900	1,000000						
AC	-0,460409	0,266790	0,141741	0,258762	-0,005112	0,353703	0,458760	1,000000					
MCP	-0,158016	0,565388	0,347206	0,339086	0,173571	-0,054040	0,525035	0,294716	1,000000				
ACQ	-0,202635	0,199312	0,251435	0,214841	0,114342	0,042236	0,612416	0,330685	0,642749	1,000000			
MI	-0,289050	0,080843	0,096653	0,252033	0,046974	0,176980	0,223851	-0,046354	0,187092	0,425572	1,000000		
MCQ	0,132964	-0,210078	-0,284434	-0,548072	-0,482094	0,030866	0,461509	0,176112	0,079477	0,310721	-0,073515	1,000000	
MT	-0,101824	0,374399	0,468194	0,222096	0,454510	-0,138597	0,169724	0,041547	0,252519	0,468293	-0,008194	0,169231	1,000000

II: Interfase Inicial; P: Prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; IF: Interfase Final; Cm: C-metáfase; AC: Aderência Cromossômica; MCP: Metáfase com Cromossomo em Ascensão Precoce; ACQ: Quebra Cromossômica em Anáfase; e MI: Micronúcleo na Interfase; MCQ: Anáfase com quebra cromossômica e MT: Micronúcleo na Telófase.

A tabela 8 mostra as correlações das fases normais e anormais da mitose em células meristemáticas de *A. cepa* L. submetidas ao cádmio. As correlações que foram significativas com intervalo de 95% de confiança estão sombreadas. Nota-se que houve correlação significativa ($p < 0,05$) positiva entre: prófase e metáfase, prófase e anáfase, prófase e telófase, prófase e c-metáfase, prófase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, prófase e anáfase com quebra cromossômica, metáfase e anáfase, metáfase e telófase, metáfase e c-metáfase, metáfase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, metáfase e anáfase com quebra, anáfase e telófase, anáfase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, anáfase e anáfase com quebra, telófase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, c-metáfase e metáfase com cromossomo em ascensão precoce, c-metáfase e anáfase com quebra, aderência e micronúcleo na interfase, aderência e ponte cromatídica, metáfase com cromossomo em ascensão precoce e anáfase com quebra, e entre micronúcleo na interfase e ponte cromatídica.

Houve também correlação significativa ($p < 0,05$) negativa entre: interfase inicial e interfase final, prófase e interfase final, prófase e aderência, prófase e micronúcleo na interfase, metáfase e interfase final, metáfase e interfase inicial, metáfase e aderência, metáfase e ponte cromatídica, anáfase e interfase final, anáfase e aderência, anáfase e micronúcleo na interfase, anáfase e ponte cromatídica, telófase e interfase final, telófase e aderência, telófase e micronúcleo na interfase, e entre interfase final e metáfase com cromossomo em ascensão precoce

(Tabela

8).

Tabela 8 – Matriz de correlação da variação média do número de células de *A. cepa* L. com eventos mitóticos normais e anormais submetidas a estresse de cádmio ao nível de 5% de significância. Resultados sombreados diferentes significativamente ($p < 0,05$).

	II	P	M	A	T	IF	Cm	AC	MCP	ACQ	MI	PC
II	1,000000											
P	0,292830	1,000000										
M	0,204731	0,942633	1,000000									
A	0,228115	0,927412	0,952527	1,000000								
T	0,188107	0,791116	0,821891	0,893312	1,000000							
IF	-0,884354	-0,650168	-0,581017	-0,607170	-0,497163	1,000000						
Cm	-0,145766	0,477385	0,568851	0,390760	0,344837	-0,055820	1,000000					
AC	-0,141876	-0,657434	-0,671921	-0,704334	-0,689003	0,328388	-0,153111	1,000000				
MCP	0,096208	0,783554	0,843260	0,725771	0,571986	-0,470917	0,652969	-0,401878	1,000000			
ACQ	-0,190039	0,643513	0,715290	0,592194	0,415796	-0,203663	0,634484	-0,269634	0,911376	1,000000		
MI	-0,080894	-0,490131	-0,602524	-0,583677	-0,546405	0,223844	-0,381186	0,723113	-0,372072	-0,272518	1,000000	
PC	0,143649	-0,335941	-0,514581	-0,456937	-0,399365	-0,009690	-0,283710	0,709346	-0,276926	-0,228905	0,727353	1,000000

II: Interfase Inicial; P: Prófase; M: Metáfase; A: Anáfase; T: Telófase; IF: Interfase Final; Cm: C-metáfase; AC: Aderência Cromossômica; MCP: Metáfase com Cromossomo em Ascensão Precoce; ACQ: Quebra Cromossômica em Anáfase; e MI: Micronúcleo na Interfase e PC: Ponte Cromatídica.

3.5 Análise de Componentes Principais

Os dados dos eventos mitóticos normais e anormais presentes em ambos os tratamentos com arsênio e cádmio foram normalizados para então se fazer a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis* - PCA). A tabela 9 mostra as porcentagens de variâncias total e cumulativa para cada componente principal. É possível notar que os dois primeiros componentes são responsáveis pela maior parte das variâncias (66%).

Tabela 9 – Autovalores da matriz de correlação e estatísticas relacionadas.

Autovalor	% Total	Autovalor Cumulativo	% Cumulativa
5,41	49,20	5,41	49,20
1,85	16,80	7,26	65,99
1,35	12,27	8,61	78,27
1,02	9,27	9,63	87,53
0,44	3,99	10,07	91,53
0,35	3,19	10,42	94,72
0,30	2,75	10,72	97,47
0,16	1,47	10,88	98,94
0,08	0,77	10,97	99,71
0,03	0,29	10,99	100,00

A análise de componentes principais permitiu a separação dos componentes em dois grupos distintos. Na figura 6 (a) nota-se que as amostras de cádmio ficaram agrupadas nos quadrantes à direita, enquanto que amostras de arsênio agruparam-se nos quadrantes à esquerda. Os eventos que contribuíram para essa segregação são mostrados na figura 6 (b), onde é possível verificar que as amostras de cádmio apresentaram altos índices de micronúcleos na interfase (MI), aderência cromossômica (AC), além do evento normal interfase final (IF), visualizados no quarto quadrante. Nos quadrantes à esquerda, observa-se que os eventos que apresentaram maiores índices em arsênio foram: anáfase com quebra (ACQ), metáfase com cromossomo em ascensão precoce (MCP), c-metáfase (Cm) e os eventos normais interfase inicial, prófase, metáfase, anáfase e telófase.

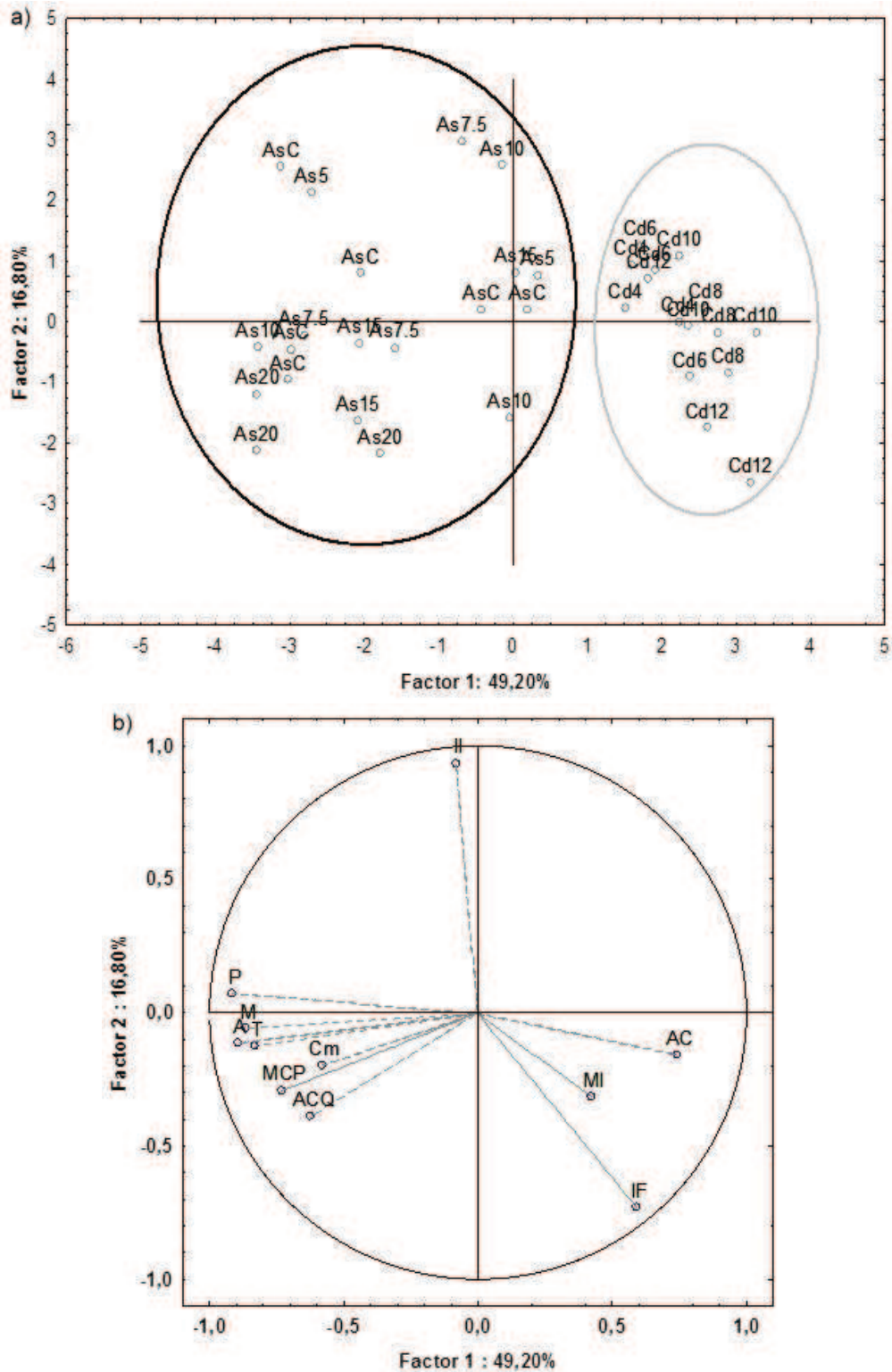


Figura 6 – Análise estatística: PC1 versus PC2 (a) *scores* (b) *loadings*, para as amostras de raízes de *A. cepa* L., submetidas ao arsênio (As) e cádmio (Cd). Os números que acompanham As e Cd referem-se às concentrações testadas em mg/L. P: prófase; M: metáfase; A: anáfase; T: telófase; II: interfase inicial; IF: interfase final; ACQ: quebra cromossômica em anáfase; MCP: metáfase com cromossomo em ascensão precoce; Cm: c-metáfase; MI: micronúcleo na interfase; AC: aderência cromossômica.

Com base nesses resultados, pode-se inferir que ambos, arsênio e cádmio, estejam exercendo tanto atividade clastogênica como aneugênica em células de raiz de *A. cepa* L. Substâncias clastogênicas induzem quebras no material genético, sendo pontes e micronúcleos, exemplos desse mecanismo (OLIVEIRA et al., 2011). Portanto, a clastogenicidade foi observada através de quebras cromossômicas, que apresentaram altos índices nos tratamentos com arsênio, e formação de micronúcleos na interfase, que foram mais frequentes nos tratamentos com cádmio.

Por outro lado, substâncias aneugênicas ocasionam erros na separação de cromossomos durante a divisão celular, interferindo na formação do fuso mitótico e levando, conseqüentemente à formação de c-mitose e aderências (OLIVEIRA et al. 2011). Assim, a aneugenicidade do arsênio foi notificada por meio de índices elevados de c-metáfase, enquanto que a do cádmio foi observada pela maior frequência de aderência cromossômica.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados observados, pode-se inferir que ambos os elementos arsênio e cádmio apresentaram-se genotóxicos para a espécie *A. cepa* L. No entanto, a maior genotoxicidade foi verificada pelo cádmio, pois por meio da análise de componentes principais notou-se que as formas mais graves de aberrações cromossômicas: aderências e micronúcleos foram mais frequentes nos tratamentos com este metal, onde a aderência comprova a alta toxicidade do cádmio, enquanto que com o arsênio foram quebras cromossômicas e cromossomos em ascensão precoce, além de grande número de c-metáfase, sendo que esta última representa um fraco efeito tóxico do arsênio sobre *A. cepa* L.

Foi possível observar também que os dois elementos foram citotóxicos para a cebola, pois houve alterações nos índices mitóticos em relação ao controle, no entanto, o cádmio demonstrou maior citotoxicidade pelo grande impacto redutivo no número de células em divisão, comparada ao arsênio.

Outra observação feita foi que a partir das aberrações cromossômicas encontradas, infere-se que tanto o arsênio quanto o cádmio comportaram-se como substâncias clastogênicas, bem como aneugênicas.

A espécie *A. cepa* L. demonstrou-se adequada para o estudo com aberrações cromossômicas e distúrbios na divisão celular. Portanto, estudos posteriores ainda devem ser realizados para se tomar conhecimento sobre quais genes e proteínas específicas do ciclo celular estão sendo interferidas e causando prejuízos aos processos celulares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology** 112; 470–475, 2007.
- AMARAL, A. M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia** 20, n.1 e 2; 65-72, 2007.
- AMIRTHALINGAM, T.; VELUSAMY, G.; PANDIAN, R. Cadmium-induced changes in mitotic index and genotoxicity on *Vigna unguiculata* (Linn.) Walp. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology** Vol. 5(3), pp. 57 62, March 2013.
- ASITA, A. O.; MOKHOBHO, M. M. Clastogenic and Cytotoxic Effects of Four Pesticides Used to Control insect Pests of Stored Products on Root Meristems of *Allium cepa*. **Environment and Natural Resources Research**; Vol. 3, No. 2, 2013.
- ATEEQ, M. B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**; 514; 105–113, 2002.
- AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas de ecotoxicologia**. São Paulo: Intertox, 2003. 322 p.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. 622p.
- BARBOA, L.; DE LA TORRE, C. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. **New Phytol.** 134, 481-486, 1996.
- BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. **Ecologia: de indivíduos a ecossistemas**. Tradução: Adriano Sanches Melo et al. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 740 p.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 27, de 5 de junho de 2006**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>> Acesso em 02 de out. 2013.
- 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**. 72; 722–725, 2008.
- CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K. S.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid

waste of two industries using *Allium test*. **Science of the Total Environment** 347; 46– 52, 2005.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Vol. 98, N°. 1, pp. 29-36, 1997.

DHO, S.; CAMUSSO, W.; MUCCIARELLI, M.; FUSCONI, A. Arsenate toxicity on the apices of *Pisum sativum* L. seedling roots: Effects on mitotic activity, chromatin integrity and microtubules. **Environmental and Experimental Botany** 69;17–23, 2010.

DULČIĆ, T.; POLLE, A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n. 1, p. 103-112, 2005.

DUFFUS, J. H. “Heavy Metals” – A Meaningless Term? **Pure Appl. Chem.**, Vol. 74, No. 5, pp. 793–807, 2002.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; ABOU EL-YOUSER, M. A. Evaluation of cytological effects of Zn^{2+} in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research** 537; 29–41, 2003.

EL-SHAHABY, O. A.; ABDEL MIGID, H. M.; SOLIMAN, M. I.; MASHALY, I. A. Genotoxicity Screening of Industrial Wastewater Using the *Allium cepa* Chromosome Aberration Assay. **Pakistan Journal of Biological Sciences** 6 (1): 23-28, 2003.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência: FINEP, 1988. 575p.

FARID, M.; SHAKOOR, M. B.; EHSAN, S.; ALI, S.; ZUBAIR, M.; HANIF, M. A. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd stress. **IJCBS**, 3 : 53-60, 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research** 455; 81–95, 2000.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas** 102: 99-1 12, 1985.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Funct. Plant Biol.**, v. 32, p. 481-494, 2005.

GOYER, R. A.; CLARKSON, T. W. **Toxic Effects of Metals**. In: Klaassen CD ed. Cassarett & Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill. New York, NY., 691-736 p., 1996.

KIRAN, Y; SAHIN, A. The Effects of Cadmium on Seed Germination, Root Development and Mitotic of Root Tip Cells of Lentil (*Lens culinaris* Medik). **World Journal of Agricultural Sciences** 2 (2): 196-200, 2006.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. McGraw-Hill – New York. Editora brasileira: AMGH editora LTDA – Porto Alegre: 2012.

KRÜGER, R. A. **Análise da Toxicidade e da Genotoxicidade de Agrotóxicos Utilizados na Agricultura Utilizando Bioensaios com *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

LEAL, G. C. S. G.; FARIAS, M. S. S.; ARAUJO, A. S. O Processo de Industrialização e seus Impactos no Meio Ambiente Urbano. **Qualitas Revista Eletrônica**.ISSN 1677-4280 V7.n.1, 2008.

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

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research** 334; 185-195, 1995.

MACEDO, R. B. **Segurança, Saúde, Higiene e Medicina do Trabalho**. Curitiba, PR: IESDE Brasil, 2012. 160 p.

MARCANO, L. CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research** 94; 221–226, 2004.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X. Alteraciones citológicas inducidas por El cadmio en células meristemáticas de raíces de cebolla (*Allium cepa* L). **Rev. Fac. Agron. (LUZ)**. 18: 247-257, 2001.

MORIARITY, F. **Ecotoxicology: The Study of Pollutants in Ecosystems** 2nd ed., Academic Press, San Diego, 1988.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 997-1005, Nov., 2004.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 474p.

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

PAIVA, C. I. C. **Avaliação da Genotoxicidade do Cádmi em Duas Espécies de *Thlaspi***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2008.

QUEIROZ, S. **Tratado de Toxicologia Ocupacional**. 1. ed. São Paulo: Biblioteca 24h oras, 2010. 498 p.

QUINÁGLIA, G. A. **Caracterização dos Níveis de Basais de Concentração de Metais nos Sedimentos do sistema estuarino da Baixada Santista**. 1. ed. São Paulo: Biblioteca 24 horas, 2012.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research** 418; 113-119, 1998.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio Ambiente e Sustentabilidade [Recurso Eletrônico]**. Porto Alegre: Bookman, 2012.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; ZABALZA, A.; CORPAS, F. J.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. **Plant, Cell and Environment** 29, 1532–1544, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA. **Toxicologia Contemporânea**. Curitiba: Departamento de Fiscalização, 1982.

SETH, C. S.; MISRA, V.; CHAUHAN, L. K. S.; SINGH, R. R. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71; 711–716, 2008.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTYIAMA, H.; WAHL, G. M. Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase. **The Journal of Cell Biology**, Volume 140; 1307–1320, Number 6, March 23, 1998.

TEERARAK, M.; BHINIJA, K.; THITAVASANTA, S.; LAOSINWATTANA, C. The impact of sodium chloride on root growth, cell division, and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) in root tip cells of *Allium cepa* L. **Scientia Horticulturae** 121; 228–232, 2009.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research** 626; 4–14, 2007.

VARDANYAN, L. G.; INGOLE, B. S. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. **Environ. Int.**, v. 32, p. 208-218, 2006.

VON SPERLING, M. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, 2005. 452 p.

WOLFE-SIMON, F.; DAVIES, P. C. W.; ANBAR, A. D. Did nature also choose arsenic? **International Journal of Astrobiology** 8 (2): 69–74, 2009.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **Journal of Hazardous Materials** 176; 952–956, 2010.

XU, P.; LIU, D.; JIANG, W. Cadmium effects on the organization of microtubular cytoskeleton in interphase and mitotic cells of *Allium sativum*. **Biologia Plantarum** 53 (2): 387-390, 2009.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment** 383; 232–236, 2007.

ZHANG, Y.; YANG, X. The toxic effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research** 312; 121-126, 1994.

ZOU, J.; YUE, J.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of Cadmium Stress on Root Tip Cells and Some Physiological Indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica** 54/1: 129–141, 2012.

