

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Guilherme Nichele da Rocha

Uso da espécie arbórea *Pinus taeda* L. como modelo em testes de citogenotoxicidade

Curitibanos

2019

Guilherme Nichele da Rocha

Uso da espécie arbórea *Pinus taeda* L. como modelo em testes de citogenotoxicidade

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Rurais do Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal.
Orientadora: Prof^a. Dr. Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Curitiba

2019

Ficha de identificação da obra

ROCHA, Guilherme Nichele

USO DA ESPÉCIE ARBÓREA *Pinus taeda* L. COMO MODELO EM TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE / Guilherme Nichele Rocha; orientadora, Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro, 2019. 62 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, Graduação em Engenharia Florestal, Curitibanos, 2019.

Inclui referências.

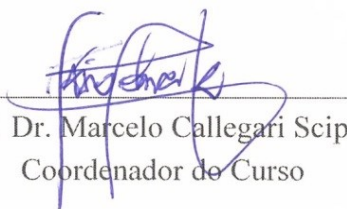
1. bioensaios. 2. metodologia. 3. espécie florestal. 4. *Allium cepa* L. 5. anormalidades cromossômicas. I. CASTRO, Patrícia Maria Oliveira Pierre. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia Florestal. III. Título.

Guilherme Nichele da Rocha

**USO DA ESPÉCIE ARBÓREA *Pinus taeda* L. COMO MODELO EM TESTES DE
CITOGENOTOXICIDADE**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Engenheiro Florestal” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Florestal.

Curitiba, 01 de novembro de 2019.



Prof^o. Dr. Marcelo Callegari Scipioni
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:



Prof^a. Dr^a. Patricia Maria Oliveira Pierre Castro
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof^a. Dr^a. Viviane Glaser
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof^a. Dr^a. Júlia Carina Niemeyer
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico aos meus pais, Antônio e Tatiana, meus irmãos João Gustavo e Mariana, meus avós, João e Maria, e a toda família que sempre torceu e me forneceu apoio.

Ao meu namorado, Enzo Gonçalves, por toda torcida e amor dedicado a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Antônio e Tatiana, que mesmo muitas vezes não acreditando ou tendo condições, me auxiliaram de todas as formas possíveis para seguir lutando.

Aos meus irmãos, João Gustavo e Mariana, assim como meus cunhados Gelson e Scheila, que juntamente aos meus pais, me auxiliaram para prosseguir tentando.

Aos meus avós maternos, João e Maria, que muitas das vezes até contrariando meus pais, serviram de porto seguro durante minha caminhada, assim como tantos outros integrantes da família.

Ao meu namorado, Enzo Gonçalves, que além de me ouvir e aguentar todas as crises que este trabalho causou, também me ajudou a passar noites no laboratório trabalhando, me fornecendo forças quando eu menos tinha.

As amigas Mayrine e Paula, que durante todos esses anos de convivência na universidade tornavam meus dias sempre mais agradáveis, e que mesmo distante durante alguns períodos sempre serviram de apoio para continuar lutando e buscando o melhor para mim.

Ao casal que mais me encanta e inspira, Géssica e Pablo, onde sempre serviram de inspiração e ideal, além de serem indescritíveis amigos. Além de compartilharem de uma amizade recente porém tão forte e verdadeira que é com uma pessoa extremamente humilde e encantadora, o Hellycson.

As amigas Ingrid e Yanka, que durante vários semestres me aturaram e tornaram os dias na universidade mais toleráveis, mas que diante de semestres turbulentos nos afastamos, mas que as guardo no fundo do coração.

A Jéssica, que morou comigo e me aturou durante anos, suportando todas minhas vontades de cozinhar ou limpar a casa durante a madrugada, além de ter sido uma companheira de boas crises existenciais.

Aos meus amigos de Araranguá, que mesmo nos vendo somente entre as férias foram um porto seguro para todas as vezes que me senti distante de casa, principalmente o David, que sempre será uma das grandes amizades que cultivarei.

A minha orientadora, prof^a Dr^a Patrícia Pierre, que acompanhou durante anos minha trajetória e auxiliou na construção deste trabalho, tendo a maior paciência do mundo e cobrando mesmo em períodos que eu não acreditei conseguir conciliar tudo, sendo uma das principais responsáveis pelo meu interesse pela docência, junto com a prof^a Dr^a Viviane Glaser, agora responsáveis por avaliar todo esse desempenho.

A incrível prof^a e amiga Dr^a Carla Carducci, que atualmente não mais ministra aulas na UFSC, mas que porém durante muito tempo serviu de apoio financeiro e psicológico durante todos os problemas que enfrentei, sendo umas das responsáveis pela maioria das conquistas que obtive, onde sem seu auxílio não teria conseguido.

A minha supervisora de estágio e pesquisadora da Embrapa Florestas Ananda e ao meu amigo estudante de doutorado em estatística na ESALQ Wellington, que me ajudaram com as análises estatísticas e conseguiram tranquilizar muitas de minhas noites com esta pesquisa.

A prof^a e amiga Patricia Novo da Universidad Nacional del Nordeste da Argentina, que além de ter propiciado uma das melhores experiências de trabalho que já tive na vida, também contribuiu com dicas valiosas para construção e direcionamento deste trabalho.

Aos professores do curso de Engenharia Florestal, por todos os ensinamentos e contribuições.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Campus de Curitibanos, que serviu de morada durante anos para meus estudos, fornecendo a estrutura para realização deste trabalho e de tantos outros realizados durante a graduação.

E agradecimento especial a todos os colegas que tive em diversas regiões do Brasil e da Argentina, pelo conhecimento e troca de experiências que compartilhamos.

E dentre todos e todas, meu maior agradecimento vai a Alexandra Elbakyan, cazaquistanesa responsável pela criação do Sci- Hub, que de modo libertador permitiu o acesso as mais qualificadas pesquisas do mundo, sendo o site fonte de quase toda obra aqui referenciada, que haja mais Elbakyan's para uma ciência mais acessível.

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça." (Cora Coralina)

RESUMO

As espécies-modelo são aquelas que apresentam características favoráveis para o seu emprego como ferramentas de estudo em vários tipos de experimentos, tais como análises de biomonitoramento. Uma das espécies-modelo mais empregadas em experimentos dessa natureza é a *Allium cepa* L. Esta apresenta características genéticas e laborais excelentes para a detecção e o monitoramento de anormalidades cromossômicas, em especial para testes de citogenotoxicidade, que medem a capacidade de um agente químico em promover mudanças metabólicas nos indivíduos e induzir alterações genéticas. No entanto, a utilização de espécies arbóreas como modelo nesses tipos de testes é pouco relatada na literatura. Além disso, sua eficácia como espécie modelo não foi analisada. Desta forma, o objetivo desta investigação foi averiguar a eficiência e a praticidade de *Pinus taeda* L. como espécie-modelo em testes de citogenotoxicidade com o glifosato em comparação ao teste padrão com *A. cepa*. Para tal, as radículas oriundas da germinação de sementes de *P. taeda* foram submetidas à metodologia-padrão do teste original com *A. cepa* com algumas adaptações. As mesmas foram tratadas com 0, 5, 7,5 e 10 µl/L de glifosato e a 100 µl/L de formaldeído (controle positivo), por períodos de 24 e 48 horas de exposição. Foram realizadas quatro repetições (três lâminas/repetição e cinco campos/ lâmina). As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e analisadas sob microscópio Olympus BX53. Metodologicamente, as sementes de *P. taeda* apresentaram características favoráveis por apresentarem porte reduzido, facilitando o manuseio e empregabilidade, as lâminas são de fácil confecção, uma vez que as radículas apresentam meristemas entre 1,5 a 2 mm em comparação à *A. cepa* com 1,1 a 1,3 mm, facilitando o processo de dissecação e a montagem das lâminas. Os 24 cromossomos de *P. taeda* apresentam comprimentos que variam de 19 a 29 µm, ao passo que *A. cepa* possui 16 cromossomos cujos comprimentos variaram de 8 a 19 µm, favorecendo *P. taeda* na localização das células nas lâminas, a contagem, a visualização e identificação das fases da divisão celular, além das anormalidades cromossômicas. As desvantagens das *P. taeda* L é que suas sementes necessitam de superação da dormência para início dos testes, além de o período de emissão das radículas ser superior que em comparação a *A. cepa*, e o número de radículas/ semente ou bulbo é menor. As principais anormalidades encontradas em ambas espécies foram de origem aneugênica e clastogênica, como cromossomos desorientados, cromossomos perdidos, pontes cromossômicas, cromossomos fragmentados, anáfase multipolar, stickiness cromossômicos e micronúcleos, encontrados em todos os tratamentos, entretanto com maior frequência conforme aumentaram-se as concentrações do glifosato. Também foi observado anel cromossômico em *P. taeda* e morte celular em *A. cepa*. O índice e atividade mitótica evidenciam que os efeitos do glifosato sobre as espécies ocorrem com a inibição do processo de divisão celular em *A. cepa*, algo não observado em *P. taeda*, mas que, porém, para este ocorre um aumento da frequência e duração das fases da divisão, em especial a prófase, que aparenta ser estimulada. Também é possível observar uma maior frequência de anormalidades cromossômicas principalmente em metáfase e anáfase, em sua maioria de origem aneugênica, sendo possível concluir que o glifosato, assim como o formaldeído, age em sua maioria sobre a formação do fuso mitótico, estrutura responsável pela migração dos cromossomos na célula.

Palavras-chave: Bioensaios. *Allium cepa*. Espécie florestal. Metodologia. Anormalidades cromossômicas.

ABSTRACT

Model species are those that have favorable characteristics for their use as study tools in various types of experiments, such as biomonitoring analyzes. One of the most commonly used model species in experiments of this nature is *Allium cepa* L. It has excellent genetic and working characteristics for the detection and monitoring of chromosomal abnormalities, especially for cytogenotoxicity tests, which measure the ability of a chemical agent in promote metabolic changes in individuals and induce genetic changes. However, the use of tree species as a model in these types of tests is little reported in the literature. Moreover, its effectiveness as a model species has not been analyzed. Thus, the objective of this investigation was to verify the efficiency and practicality of *Pinus taeda* L. as a model species in glyphosate cytogenotoxicity tests compared to the standard *A. cepa* test. To this end, the roots from the germination of *P. taeda* seeds were subjected to the standard methodology of the original *A. cepa* test with some adaptations. They were treated with 0, 5, 7.5 and 10 $\mu\text{l} / \text{L}$ glyphosate and 100 $\mu\text{l} / \text{L}$ formaldehyde (positive control) for periods of 24 and 48 hours of exposure. Four repetitions were performed (three slides / repetition and five fields / slide). The slides were prepared by squash technique and analyzed under an Olympus BX53 microscope. Methodologically, the seeds of *P. taeda* showed favorable characteristics for being small in size, facilitating the handling and employability, the blades are easy to make, since the radicles have meristems between 1.5 to 2 mm compared to *A. cepa* with 1.1 to 1.3 mm, facilitating the dissection process and mounting of the blades. The 24 chromosomes *P. taeda* have lengths ranging from 19 to 29 μm , whereas *A.* strain has 16 chromosomes whose lengths ranged from 8 to 19 μm , favoring *P. taeda* in the location of cells in the slides, counting, visualization and identification of the phases of cell division, as well as chromosomal abnormalities. The disadvantages of *P. taeda* L are that their seeds need to overcome dormancy for the beginning of the tests, and the root emission period is longer than in comparison to *A. cepa*, and the number of root / seed or bulb is smaller. The main abnormalities found in both species were of aneugenic and clastogenic origin, such as disoriented chromosomes, lost chromosomes, chromosomal bridges, fragmented chromosomes, multipolar anaphase, chromosomes stickiness and micronuclei, which were found in all treatments, but more frequently as Glyphosate concentrations increased. Chromosome ring was also observed in *P. taeda* and cells death in *A. cepa*. The index and mitotic activity show that the effects of glyphosate on species occur with inhibition of the process of cell division in *A. cepa*, something not observed in *P. taeda*, but, however, there is an increase in frequency and duration. Phases of cell division, especially prophase, which appears to be stimulated. It is also possible to observe a higher frequency of chromosomal abnormalities mainly in metaphase and anaphase, mostly of aneugenic origin, and it can be concluded that glyphosate, as well as formaldehyde, act mostly on the formation of the mitotic spindle, structure responsible for migration of chromosomes in the cell.

Keywords: Bioassays. *Allium cepa*. Forest species. Methodology. Chromosomal anomalies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Radículas e meristemas das espécies utilizadas nos bioensaios. A) Radículas de *Allium cepa* fixadas em etanol:ácido acético (3:1) em microtubo. B) Radículas de *Pinus taeda* fixadas em etanol:ácido acético (3:1) em microtubo. C) Coifa e meristema radicular de *Pinus taeda*. 30
- Figura 2 - Metáfases mitóticas de espécies utilizadas nos bioensaios. A) Cromossomos de *Allium cepa*. B) Cromossomos de *Pinus taeda*. Barra= (5 µm). 31
- Figura 3 - Índice mitótico de *Pinus taeda* entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição. 32
- Figura 4 - Proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Pinus taeda* em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição. 34
- Figura 5 - Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta em A-D) em células de prometáfase em *Pinus taeda*- Barra= 5µm. 36
- Figura 6 - Frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em *Pinus taeda* por A. 24 horas e B. 48 horas. 37
- Figura 7 - Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de metáfase irregulares de *Pinus taeda*. Barra=5µm. 39
- Figura 8 - Porcentagem média de células anormais em estágio de anáfase- telófase de *Pinus taeda* entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição. 40
- Figura 9 - Pontes cromossômicas (A, B), cromossomos desorientados (C), polos desalinhados (C, D), stickiness cromossômicos (E) e micronúcleo (F) (indicados pela seta) em células de anáfase- telófase de *Pinus taeda*. Barra=5µm. 41
- Figura 10 - Formação de anel cromossômico (indicado pela seta) em células de *Pinus taeda*. Barra= 5µm. 41
- Figura 11 - Índices mitóticos de *Allium cepa* entre os respectivos tratamentos em A) 24 horas e B) 48 horas de exposição. 42
- Figura 12 - Proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Allium cepa* em A) 24 horas e B) 48 horas de exposição. 43
- Figura 13 - Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de prometáfase de *Allium cepa*. Barra= 5µm. 45

Figura 14 - Frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em <i>Allium cepa</i> por A. 24 horas e B. 48 horas.	46
Figura 15 - Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de metáfase irregulares de <i>Allium cepa</i> . Barra=5µm.	48
Figura 16 - Porcentagem média de células anormais em estágio de anáfase- telófase de <i>Allium cepa</i> entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição.	49
Figura 17 - Cromossomos fragmentados (A, C), cromossomos desorientados (B), pontes cromossômicas (C), polos desalinhados (D), stickiness cromossômico (E) e anáfase multipolar (F) (indicados pela seta) em células de anáfase- telófase de <i>Allium cepa</i> . Barra=5µm.	50
Figura 18 - Formação de morte celular (indicadas pela seta) em células de <i>Allium cepa</i> . Barra= 5µm.	50
Figura 19 - Comparação aos pares entre a proporção de células em divisão celular entre os diferentes tratamentos submetidos a <i>Pinus taeda</i> e <i>Allium cepa</i>	52
Figura 20 - Comparação aos pares de similaridade da proporção de células com algum tipo de anormalidade cromossômica entre os diferentes tratamentos submetidos a <i>Pinus taeda</i> e <i>Allium cepa</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Croqui de tratamentos aos quais os grupos com cada espécie foram submetidos. .	25
Tabela 2 - Aspectos metodológicos avaliados para <i>Allium cepa</i> e <i>Pinus taeda</i>	29
Tabela 3 - Média e desvio padrão da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de <i>Pinus taeda</i>	34
Tabela 4 - Média e desvio padrão da frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em <i>Pinus taeda</i>	38
Tabela 5 - Média e desvio padrão da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de <i>Allium cepa</i>	44
Tabela 6 - Média e desvio padrão da frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em <i>Allium cepa</i>	47
Tabela 7 - Média, desvio padrão e mediana da proporção de células em divisão celular entre os respectivos tratamentos e períodos de exposição para ambas espécies, <i>Allium cepa</i> e <i>Pinus taeda</i>	53
Tabela 8 - Média, desvio padrão e mediana da proporção de células com algum tipo de anormalidade cromossômica entre os respectivos tratamentos e períodos de exposição para ambas espécies, <i>Allium cepa</i> e <i>Pinus taeda</i>	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral.....	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	BIOENSAIOS DE CITOGENOTOXICIDADE	18
2.2	ESPÉCIES- MODELO DE TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE E SUAS CARACTERÍSTICAS	19
2.3	BIOENSAIOS DE CITOGENOTOXICIDADE COM GLIFOSATO.....	21
2.4	<i>Pinus taeda</i> L.	22
3	METODOLOGIA.....	24
3.1	OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	24
3.2	BIOENSAIOS	24
3.3	PREPARO DAS LÂMINAS	25
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1	ASPECTOS METODOLÓGICOS DE REALIZAÇÃO DO TESTE	28
4.2	CITOGENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM <i>Pinus taeda</i>	32
4.3	CITOGENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM <i>Allium cepa</i>	42
4.4	SENSIBILIDADE ENTRE <i>A. cepa</i> E <i>P. taeda</i>	51
5	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Para verificar o efeito que substâncias químicas podem ocasionar sobre o material genético, utilizam-se bioensaios. Esses podem ser realizados com espécies animais e até bactérias, mas principalmente com vegetais, principalmente pela facilidade de manuseio e baixo custo. Entretanto, são poucos os bioensaios que podem reproduzir as condições relacionadas á toxicidade aos quais se encontram as substâncias químicas, dentre estes encontram-se os bioensaios com *Allium cepa*, reconhecidos pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS - OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

O teste com *A. cepa* L. é reconhecido como um dos mais eficientes para analisar o potencial citogenotóxico de substâncias químicas, pois apresenta grande sensibilidade e facilidade de contato com a substância teste. Nesse teste é avaliada a região meristemática das radículas, um tecido de estágio inicial de desenvolvimento no qual se encontram células em constante divisão mitótica. Esse é um dos testes mais utilizados para o controle de qualidade de substâncias nocivas e monitoramento da poluição ambiental, sendo realizado de forma que são comparados os efeitos da substância testada com os efeitos já conhecidos de uma substância específica (ALVIM *et al.*, 2001; BRASIL, 2009; CHAUHAN *et al.*, 1999; GRANT, 1982; GUERRA; HAUSCHILD, 1993; MA *et al.*, 1995; MARIANI, 2017; NOLDIN *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; SOUZA, 2002; VICENTINI *et al.*, 2001).

Este é um dos poucos bioensaios que permite avaliar diferentes efeitos mutagênicos, como efeitos clastogênicos (quebras cromossômicas) e aneugênicos (que afetam o fuso mitótico), com altas correlações e similaridades de respostas com outros tipos de testes, como por exemplo, com células animais *in vitro* e com mamíferos *in vivo*, sem a necessidade de aprovação por comitês de ética (ALI, 1988; AMARANTE JUNIOR, RODRIGUES SANTOS, 2002; BOLOGNESI *et al.*, 1997; CAMPAROTO *et al.*, 2002; CHAUAN *et al.*, 1999; FACHINETTO *et al.*, 2007; GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER *et al.*, 1990; KIER; KIRKLAND, 2013; KRUGER; 2009; RANK *et al.*, 1993; MA *et al.*, 1995; MAÑAS *et al.*, 2009a; MAÑAS *et al.*, 2009b; TEIXEIRA *et al.*, 2003; VICENTINI *et al.*, 2001).

Entretanto, *A. cepa* não é a única espécie vegetal considerada modelo para bioensaios e testes de citogenotoxicidade, a exemplo das espécies recomendadas pela RAS (BRASIL, 2009), como o agrião, alface, capim-chorão, chicória, dente-de-leão, erva-fina, festuca, rabo de gato, salsão e tomate, porém coincidentemente também de interesse agrícola e comercial.

Teoricamente os parâmetros citogenéticos avaliados no teste com *A. cepa* podem ser aplicados a qualquer espécie vegetal, incluindo espécies florestais, desde que haja um conhecimento prévio a respeito do cariótipo dessas. Nesse sentido, o gênero *Pinus* destaca-se dentre os mais estudados citogeneticamente dentre as espécies florestais. No entanto, o emprego de espécies pertencentes a esse gênero como modelo em ensaios de citogenotoxicidade é escasso na literatura.

Na literatura há alguns relatos sobre a avaliação do efeito de metais pesados sobre o crescimento radicular e morfologia de *Pinus pinea* L. e *Pinus pinaster* Ait. (ARDUINI; GODBOLD; OTINIS, 1994). Outros autores como Prus-Głowacki *et al.* (2006) relataram variações genéticas e distúrbios citológicos causados por metais pesados em indivíduos de populações de *Pinus sylvestris* L., já Butorina *et al.* (2007) avaliaram os efeitos citogenéticos de pinheiros autóctones, como o *Pinus sylvestris* L. e *Quercus robur* L., das florestas de Usmansky e Khrenovskoy, na região de Voronezh, na Rússia, ao passo que Yücel *et al.* (2008) avaliaram o efeito de metais pesados sobre o ciclo celular de *Pinus nigra* Arn., e Belousov, Mashkina e Popov (2012) avaliaram os efeitos de citogenotoxicidade de metais pesados em *Pinus sylvestris* L., assim como desenvolveram critérios para seleção de árvores tolerantes para reflorestamento. No entanto, mesmo diante deste cenário, não existem estudos que avaliam o desempenho de espécies florestais em bioensaios de citogenotoxicidade.

Devido a algumas características que espécies modelo devem apresentar para serem utilizadas em bioensaios, acredita-se que o *P. taeda* L. seja uma espécie potencial para ser utilizada, pois apresenta características ideais para o teste, como número cromossômico baixo com tamanhos significativos, além de fácil manipulação em laboratório dependendo do estágio de desenvolvimento e facilidade de germinação em condições controladas (SAX; SAX, 1933; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO- WITTMANN, 2005). Sendo assim, no intuito de observar se o *P. taeda* seria uma espécie ideal para utilização em bioensaios relacionados a citogenotoxicidade.

O agroquímico glifosato foi escolhido como agente mutagênico pois além de ser um problema de saúde pública no Brasil, também é difícil de ser detectado por alguns métodos de análise de contaminantes aquáticos (AMARANTE JUNIOR, RODRIGUES SANTOS, 2002, HESS; NODARI, 2015), desta forma é imprescindível a observação dos efeitos tóxicos deste agroquímico em organismos não- alvos.

Este estudo se faz importante pois a influência do agente mutagênico em uma espécie florestal pode variar, podendo apresentar maior ou menor sensibilidade, e por não haver estudos que identifiquem nem avaliam o desempenho com espécies- modelo para testes citogenéticos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Verificar a eficiência do *Pinus taeda* L. como espécie-modelo em testes de citogenotoxicidade com o glifosato, comparando-o com a espécie-modelo *Allium cepa* em diferentes concentrações e períodos de exposição.

1.1.2 Objetivos Específicos

Verificar a eficiência do uso de sementes de *Pinus taeda* L. em testes de citogenotoxicidade, através da facilidade de manuseio para realização de bioensaios e na facilidade de preparação das lâminas.

Verificar a sensibilidade do uso de sementes de *Pinus taeda* L. em testes de citogenotoxicidade, através da facilidade de identificação dos cromossomos com presença de anormalidades no processo de divisão, principalmente em anáfase- telófase, identificando os tipos de anormalidades cromossômicas ocasionadas por diferentes períodos de tempo e concentrações de glifosato.

Verificar a sensibilidade do uso de sementes de *Pinus taeda* L. em testes de citogenotoxicidade, através de análises do índice mitótico e de atividades mitóticas, em comparação a *Allium cepa* expostos em diferentes períodos de tempo e concentrações de glifosato.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 BIOENSAIOS DE CITOGENOTOXICIDADE

O desenvolvimento de novas substâncias químicas sem o devido conhecimento dos causou um aumento nos poluentes do meio ambiente e principalmente efeitos genéticos epidemiológicos. Para tal, existem diversos bioensaios de curto prazo de duração que são utilizados para tentar detectar os efeitos da toxicidade, sendo compostos por uma ampla variedade de organismos e tipos celulares e medem uma variedade de alterações genéticas (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

Estas possíveis alterações genéticas observadas representam danos ao próprio DNA e consequentemente a toda estrutura e organização nuclear. Entretanto, não existe um teste universal que possa detectar todos os tipos de danos genéticos que podem ser induzidos pelos diferentes compostos genotóxicos e por todas misturas químicas complexas. Além disso, existe um pequeno número de testes que podem reproduzir as condições de campo aos quais são submetidos, dentre estes encontra-se os bioensaios com *A. cepa*, reconhecidos pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS- OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

As alterações genéticas observadas podem ser medidas pela citotoxicidade do composto, no qual mede a capacidade, intrínseca ou não, de promover mudanças metabólicas nos indivíduos, podendo resultar ou não em morte celular, mas que altera sua capacidade dentro da população (BCRJ, 2017), assim como podem ser medidas pela genotoxicidade do composto, no qual mede a capacidade em induzir alterações no material genético dos indivíduos, sendo estas alterações responsáveis pelo desenvolvimento de cânceres e doenças hereditárias. Há diferentes testes de genotoxicidade para avaliar o nível de mutações cromossômicas e gênicas, sendo mais utilizadas análises citológicas, e dentre estas estão análises de inibição do ciclo celular, através do índice mitótico, as interrupções em metáfases, a presença de micronúcleos, as diversas alterações cromossômicas numéricas e estruturais relacionadas a trocas das cromátides irmãs durante a migração no período de divisão celular (BOMBAIL *et al.*, 2001; KOLLING *et al.*, 2006; VIEIRA; VICENTINI, 1997).

2.2 ESPÉCIES- MODELO DE TESTES DE CITOGENOTOXICIDADE E SUAS CARACTERÍSTICAS

Estudos com bioensaios ocorrem de maneira comparativa, onde são relacionados os efeitos em um indivíduo de uma substância testada com os efeitos já conhecidos de uma substância específica (MARIANI, 2017; NOLDIN *et al.*, 2003). Este indivíduo é caracterizado como modelo e a escolha da espécie para utilizar no bioensaio segue diversos critérios.

Para ser caracterizado como espécie modelo em estudos citogenéticos, é importante utilizar organismos complexos, ou seja, eucariontes. Estes organismos devem ser de fácil manipulação em laboratório e de fácil cultivo em condições controladas. Além disso, não devem apresentar ciclo de vida muito longo, para averiguar os efeitos nas próximas gerações, também necessitam apresentar porte pequeno para produção de grandes números de indivíduos. Necessitam apresentar genoma pequeno, com poucos cromossomos, a fim de facilitar a observação microscópica, além de apresentar um padrão de bandeamento que possibilita observar mudanças físicas que podem ser correlacionadas a alterações genéticas (GRIFFITHS *et al.*, 2011; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Porém, dentre estes critérios, segundo a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (EPA, 1982), ainda podem ser realizados testes *in vitro*. Ainda assim é prioritário o uso de espécies *in vivo* devido ao efeito biológico que pode influenciar. Para tal, os bioensaios com células vegetais demonstram ser testes eficientes para monitorar e avaliar a genotoxicidade de poluentes ambientais, além de serem razoavelmente mais sensíveis e simples de serem realizados (KRUGER; 2009) e não necessitando de aprovação prévia por comitês de ética.

Há diversos organismos-teste utilizados nos bioensaios, variando entre diversas espécies de peixes de ciclo de vida rápido utilizados na avaliação de corpos d'água (GROFF, 2008) a organismos- teste de origem vegetal, a exemplo dos recomendados pela RAS para análises de germinação, todos de também interesse agrícola (como a *Agrostis gigantea* (erva-fina), *Allium cepa* (cebola), *Apium graveolens* (salsão), *Cichorium intybus* (chicória), *Eragrostis curvula* (capim- chorão), *Festuca rubra var. commutata* (festuca), *Lactuca sativa* (alface), *Lepidium sativum* (agrião), *Lycopersicon esculentum* (tomate), *Phleum pratense* (rabo de gato) e *Taraxacum officinale* (dente- de- leão)). Estas espécies, denominadas espécies-modelo são utilizadas para o controle de qualidade de substâncias nocivas, por serem reconhecidamente sensíveis às substâncias tóxicas submetidas. Os efeitos ocasionados são mais

pronunciados em tecidos de estágio inicial de desenvolvimento, observando-se regiões meristemáticas (BRASIL, 2009).

Dentre as diversas espécies modelo de origem vegetal, diversos autores descrevem o teste com *A. cepa*, que devido a sua sensibilidade, é uma das espécies mais eficientes para bioensaios que analisam o potencial citogenotóxico de compostos químicos. (GRANT, 1982; CHAUHAN *et al.*, 1999; GUERRA; SOUZA, 2002). Isso ocorre porque pois suas raízes podem ficar em contato direto com a substância que está sendo testada, fazendo com que as células meristemáticas das raízes que estão em constante divisão mitótica estejam sobre influência direta do composto químico, ocasionando as alterações cromossômicas ocorridas ao longo do ciclo celular (VICENTINI *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2003). Como os efeitos ocasionados são mais pronunciados em tecidos de estágio inicial de desenvolvimento, justifica-se as análises nas regiões meristemáticas (BRASIL, 2009).

Os bioensaios com *A. cepa* L. são amplamente utilizados para testes de citotoxicidade/mutagenicidade em amplos espectros, principalmente como monitores da poluição ambiental e avaliadores do potencial mutagênico de compostos químicos. Várias pesquisas apontam a facilidade de detecção de efeitos clastogênicos causados por contaminantes encontrados no solo e na água, que seriam mais dificilmente detectados com outras metodologias de análise, como por exemplo teste com mamíferos, no qual a *A. cepa* apresentou altas correlações (CHAUAN *et al.*, 1999; MA *et al.*, 1995).

Pesquisas realizadas para validar os bioensaios com *A. cepa* utilizaram-se de sistemas conjuntos com testes animais *in vitro* para análise, utilizando células de medula de ratos Wistar, resultando em altas similaridades de respostas (CAMPAROTO *et al.*, 2002; FACHINETTO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2003; VICENTINI *et al.*, 2001). Outras pesquisas envolvendo o teste vegetal e sistemas de testes com mamíferos resultaram em 75 a 92% de similaridade entre a sensibilidade dos testes (GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER *et al.*, 1990).

Estudos feitos por Teixeira *et al.* (2003) para observar as possíveis diferenças que extratos de *Psidium guajava* L. (goiabeira) e *Achillea millefolium* L. (erva dos carpinteiros ou mil folhas) podem ocasionar em células de *Allium cepa*, células da medula óssea de ratos e em linfócitos humanos, resultaram em efeitos antimutagênicos (reduzem a taxa de mutações espontâneas) similares em todas as análises. Outros estudos também relatam efeitos de mutagenicidade e anti- mutagenicidade, assim como a inibição ou estimulação da divisão celular na ponta das raízes tratadas (BAGATINI *et al.*, 2007; CAMPAROTO *et al.*, 2002; FACHINETTO *et al.*, 2007; KNOLL *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2003; VICENTINI *et al.*,

2001). Esta inibição ou estimulação da divisão celular nas células são medidas pelos índices mitóticos e índices de replicações, os quais são usados como indicadores de proliferação adequada das células (GADANO *et al.*, 2002; IGANCI *et al.*, 2006).

Assim, a espécie é considerada muito eficiente para o biomonitoramento, principalmente para poluição química, sendo facilmente caracterizada também macroscopicamente, analisando a redução do crescimento radicular (HAUSCHILD, 1993; ALVIM *et al.*, 2001).

2.3 BIOENSAIOS DE CITOGENOTOXICIDADE COM GLIFOSATO

Durante um tempo no passado, algumas pesquisas e revisões sobre o glifosato afirmavam não haver resultados negativos sobre o agroquímico em diversos testes de citogenotoxicidade, como os ensaios de reversão de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* WP-2, ensaios com células de ovário de hamster chinês *in vitro*, assim como nas células de medula óssea, entretanto os testes com *A. cepa* já apresentavam resultados em que afirmavam a presença de anormalidades em diferentes aspectos do DNA (A LI, 1988; BOLOGNESI *et al.*, 1997, KIER; KIRKLAND, 2013; RANK *et al.*, 1993).

Atualmente, com a consagração de algumas metodologias de pesquisa, os efeitos citotóxicos e genotóxicos do glifosato podem ser evidenciados mesmo em baixas concentrações, para tal, diversos estudos compararam e avaliaram diferentes testes, como o ensaio do cometa, teste de aberrações cromossômicas, teste de micronúcleo em camundongos *in vivo* e teste com *A. cepa* (MAÑAS *et al.*, 2009a; MAÑAS *et al.*, 2009b; KRUGER; 2009). Estes criam fundamentos científicos para a inutilização do agroquímico ou melhores recomendações de uso, entretanto não se verifica na prática a campo.

Mais recentemente, estudos conseguiram observar a presença de glifosato na água de abastecimento público de várias cidades pelo Brasil (HESS; NODARI, 2015) sem se conhecer o efeito que pode provocar estas contaminações, isso porque ele é um composto extremamente polar, tornando difícil separá-lo das amostras de água, não sendo detectado por métodos de fluorescência ou colorimétrico, inviabilizando assim estudos na área de contaminantes aquáticos (AMARANTE JUNIOR, RODRIGUES SANTOS, 2002), sendo poucos os bioensaios capazes de avaliar estes tipos de substâncias.

2.4 *Pinus taeda* L.

A espécie *Pinus taeda* L. apresentam significativa importância no setor florestal madeireiro brasileiro e no mundo, em especial no setor econômico, havendo milhões de hectares plantados, segundo dados da Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS, 2007) e da FAO (FAO, 2015). Dentre as espécies florestais, é uma das que mais são caracterizadas citogeneticamente, sendo Sax e Sax (1933) os que mais abordaram o gênero e foram os que descreveram primeiramente os cariótipos do gênero *Pinus* L., relatando que o gênero apresenta o complemento cromossômico de $2n = 24$ cromossomos, sendo 11 pares de cromossomos longos e metacêntricos e um par mais curto e submetacêntrico.

Adiante, alguns estudos adicionais analisaram o efeito de metais pesados em espécies florestais que não o *P. taeda*, sendo estes estudos, por exemplo, a avaliação do efeito de metais pesados sobre o crescimento radicular e morfologia de *P. pinea* L. e *P. pinaster* Ait. (ARDUINI; GODBOLD; OTINIS, 1994), variações genéticas e distúrbios citológicos causados por metais pesados em indivíduos de populações de *P. sylvestris* L. (PRUS-GŁOWACKI *et al.*, 2006), avaliação dos efeitos citogenéticos em pinheiros -autóctones, como o *P. sylvestris* L. e *Quercus robur* L., das florestas de Usmansky e Khrenovskoy, na região de Voronezh, na Rússia (BUTORINA *et al.*, 2007), avaliação do efeito de metais pesados sobre o ciclo celular em *P. nigra* Arn. (YÜCEL *et al.*, 2008) e avaliação dos efeitos de citogenotoxicidade de metais pesados em *P. sylvestris* L., assim como desenvolveram critérios para seleção de árvores tolerantes para reflorestamento (BELOUSOV; MASHKINA; POPOV, 2012). No entanto, mesmo diante deste cenário, não existem estudos que avaliam o desempenho de espécies florestais em bioensaios de citogenotoxicidade e tampouco o efeito de agroquímicos sobre estas espécies.

O gênero apresenta um impedimento de germinação da semente, caracterizado dormência, sendo um empecilho para a realização dos bioensaios. No entanto, para germinar de modo uniforme é necessário superar esta através de técnicas de estratificação a frio (FOWLER; BIANCHETTI, 2000).

A espécie apresenta número cromossômico baixo, semelhante a de espécies modelo utilizadas, que dependendo do estágio de desenvolvimento dos indivíduos são de fácil manipulação e fácil germinação, apesar deste, os cromossomos também apresentam tamanho significativo, facilitando a análise (SAX; SAX, 1933; BIONDO; MIOTTO; SCHIFINO-WITTMANN, 2005). Diferente das espécies utilizadas, apresenta maior nível de rusticidade,

fator que pode afetar a interação com o agroquímico avaliado, motivo focal da pesquisa. Vale ressaltar que o estudo visa identificar e avaliar o desempenho de uma espécie arbórea como espécie- modelo para testes de citogenotoxicidade, visto que não existem estudos na área desenvolvidos com espécies do setor florestal, ampliando a variedade e uso das espécies utilizadas nessas análises.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

As sementes de *P. taeda* foram doadas pela empresa Florestal Gateados, apresentando padrão de qualidade exigido pelas normativas do RAS (BRASIL, 2009); já os bulbos de *A. cepa* foram adquiridos comercialmente em feiras em Curitiba, com origens de mesma procedência.

3.2 BIOENSAIOS

Para realização dos bioensaios, foi necessária a superação da dormência das sementes de *P. taeda* através do processo de estratificação a frio, sendo realizado no laboratório de Biologia Celular da UFSC Campus de Curitiba – CBS01, no período de maio a julho de 2017. Após realizada a superação das sementes de *P. taeda*, os bioensaios foram realizados no laboratório de Biologia Celular da UFSC Campus Curitiba – CBS01, no período de agosto a outubro de 2017.

Os ensaios para análise dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade ocorreram no laboratório de Biologia Celular da UFSC Campus de Curitiba – CBS01, no período de outubro a dezembro de 2017. Foi utilizado um bulbo de *A. cepa* e 10 sementes de *P. taeda* com dormência já superada para cada repetição. Foram utilizadas concentrações de 100 µL/L de formaldeído como controle positivo e concentrações de 0 µL/L, 5 µL/L, 7,5 µL/L e 10 µL/L de glifosato, em períodos de exposição de 24 e 48 horas, valores estes inferiores dos aplicados á campo. Cada tratamento foi composto de quatro repetições.

Os bulbos de *A. cepa* foram imersos em água destilada durante 24 horas e os de *P. taeda* por 48 horas, todos a temperatura ambiente para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Os períodos de exposição foram determinados através de adaptações do teste de germinação estipulado pelo RAS (BRASIL, 2009) e instruções para análises de sementes florestais (BRASIL, 2013), além de adaptações da metodologia empregada por Kruger (2009) para *A. cepa*.

Após o período de exposição à água, as sementes e bulbos foram separadas em grupos e submetidos aos tratamentos conforme especificado na tabela 1.

Tabela 1 - Croqui de tratamentos aos quais os grupos com cada espécie foram submetidos.

Tratamentos		0 µL/L de glifosato (controle negativo)	5 µL/L de glifosato	7,5 µL/L de glifosato	10 µL/L de glifosato	100 µL/L de formaldeído (controle positivo)
<i>Pinus taeda</i>	24 horas	P1 – 24	P2 – 24	P3 – 24	P4 – 24	P5 - 24
	48 horas	P1 – 48	P2 – 48	P3 – 48	P4 – 48	P5 - 48
<i>Allium cepa</i>	24 horas	A1 – 24	A2 – 24	A3 – 24	A4 – 24	A5 - 24
	48 horas	A1 – 48	A2 – 48	A3 – 48	A4 – 48	A5 - 48

Legenda: P. referente a *Pinus taeda*, A referente a *Allium cepa*, 1, 2, 3, 4 e 5 referentes aos tratamentos e 24 e 48 referente aos períodos de exposição.

3.3 PREPARO DAS LÂMINAS

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos foram avaliados a partir de análises do ciclo celular após o período de exposição ao agroquímico. Para tal, foram utilizadas cinco radículas de cada bulbo de *A. cepa*, e coletadas as radículas de *P. taeda*. Essas foram fixadas em etanol: ácido acético (3:1) e armazenadas a 4°C. Foram estimados o tempo médio de emissão das radículas, o comprimento médio e a espessura radicular e o comprimento médio do meristema radicular com o auxílio de um paquímetro.

Para a preparação das lâminas, os meristemas radiculares foram retirados do etanol: ácido acético (3:1), lavados em água destilada, submetidos à digestão enzimática em solução Pectinase/Celulase durante 3 horas a 36°C, lavados novamente em água destilada, fixados em etanol: ácido acético (3:1) durante, pelo menos, 24 horas. Após, adicionou-se uma gota de ácido acético 45% sobre a radícula e foram isolados os meristemas do restante do tecido sobre lâminas com auxílio de estiletos sob microscópio estereoscópio. Isolado o meristema, foi adicionada uma gota de corante carmim acético 1%. Após 20 minutos, realizou-se o esmagamento do

tecido com o polegar entre lâmina e lamínula. A estimativa de tempo médio de montagem das lâminas foi realizada com o uso de cronômetro.

As lâminas foram avaliadas pelo método de varredura sob microscópio de luz de campo claro Olympus CX31 sendo analisados cinco campos/lâmina, três lâminas/repetição e quatro repetições/tratamento. Nas lâminas foram avaliadas a estimativa de diâmetro médio das células (10 células/tratamento), a frequência de células/campo na lâmina (número de células/campo), o número de anormalidades cromossômicas (cromossomos retardatários, pontes cromossômicas e fragmentos) nas fases de divisão celular, principalmente em anáfases-telófases, a frequência de células em divisão pelo índice mitótico (IM), conforme fórmula 1, assim como a proporção da frequência absoluta (FA) das células em cada fase de divisão celular, conforme fórmula 2, e a frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica, conforme fórmula 3, para *A. cepa* e *P. taeda*. Para a contagem e registro das anormalidades, as lâminas foram confeccionadas e examinadas pela mesma pessoa.

$$IM = \frac{\text{número de células em divisão celular}}{\text{número total de células}} * 100 \quad (1)$$

$$AM = \frac{\text{número de células na respectiva fase da divisão celular}}{\text{número total de células}} * 100 \quad (2)$$

$$FR = \frac{AM \text{ de células com algum tipo de anormalidade cromossômica}}{AM \text{ de células em divisão celular}} \quad (3)$$

Para a aquisição das imagens, as lâminas foram analisadas sob microscópio de epifluorescência Olympus BX53 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram analisados com auxílio do programa estatístico R e RStudio versão 3.5.3 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2014), sendo avaliado a estatística descritiva das células em divisão celular e das que apresentavam algum tipo de anormalidade cromossômica. Devido os dados não pertencerem a uma distribuição normal e não seguirem os pressupostos, e não plausíveis de transformação devido a sua distribuição, a influência dos fatores apresentados no item 3.2 foi determinado pelo teste de variância não paramétrico

Kruskall- Wallis e a comparação das amostras de *A. cepa* e *P. taeda* submetidas aos mesmos tratamentos foram analisadas utilizando o teste de classificação em pares de Wilcoxon com 95% de significância. Como as análises apresentam distribuição não paramétrica, as avaliações ocorrem em comparação das medianas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ASPECTOS METODOLÓGICOS DE REALIZAÇÃO DO TESTE

A metodologia adaptada de RAS (BRASIL, 2009) e instruções para análises de sementes florestais (BRASIL, 2013), além do período de exposição adaptado utilizado por Kruger (2009) para o teste de *A. cepa* L. se demonstrou eficiente para análise de espécies-modelo, pois avaliou vários parâmetros que permitiram comparar os efeitos entre as espécies, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Aspectos metodológicos avaliados para *Allium cepa* e *Pinus taeda*.

Aspectos metodológicos	<i>Allium cepa</i>	<i>Pinus taeda</i>
Dormência	Não	Sim
Tempo de germinação de sementes	Ausente	Até um mês
Tempo de emissão das radículas	Até 24 horas	Até sete dias
Número de radículas/ semente ou bulbo	Várias	Uma
Comprimento radicular médio	10 mm	7,5 mm
Espessura radicular média	1 mm	2 mm
Comprimento médio do meristema radicular	1,1 a 1,3 mm	1,5 a 2 mm
Tempo médio para montagem da lâmina	28 min	26 min
Tamanho médio das células	8 a 19 μm	19 a 29 μm
Frequência de células na lâmina	Presente a cada 1,5 campo/ lâmina	Presente a cada 1,3 campo p/ lâmina
Facilidade de identificação das fases mitóticas*	Menor	Maior
Facilidade de identificação das anormalidades mitóticas*	Menor	Maior

Legenda: * referente a comparação entre o tamanho das células e cromossomos das espécies avaliadas.

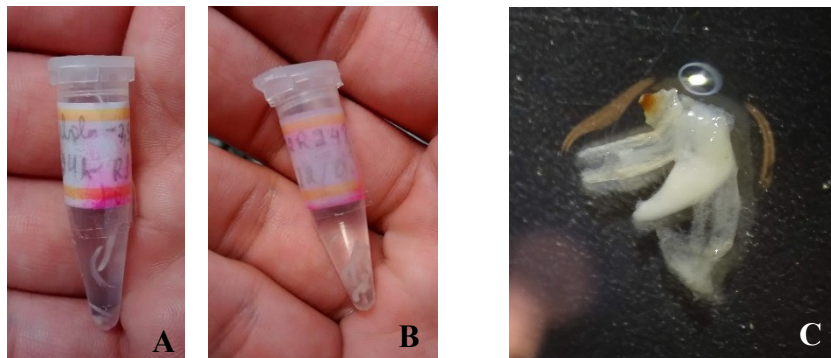
Fonte: Autor (2019).

As sementes de *P. taeda* também apresentaram características favoráveis ao teste, pois seu pequeno porte facilitaram o manuseio para confecção dos bioensaios. Em *P. taeda*, a fase de emissão das radículas, necessária para realização do teste, foi de fácil observação, e os espaços físicos necessários foram ínfimos, podendo utilizar do mesmo espaço para a confecção de várias repetições. O mesmo se observa quanto à facilidade de manuseio, que devido ao pequeno porte é favorecido. A emissão das radículas ocorrem em até sete dias para *P. taeda* e até 24 horas para *A. cepa*, entretanto é importante salientar que a emissão da radícula até o

surgimento das primeiras raízes laterais levam em torno de até sete dias posterior à emissão da radícula, sendo necessário as análises ocorrerem antes deste período, pois a concentração de células em divisão celular do meristema radicular pode diminuir, efeito que pode ocorrer em ambas as espécies.

As lâminas foram de fácil confecção, uma vez que as radículas apresentam meristemas maiores em comparação à *A. cepa*, entre 1,5 a 2 mm, possível observar na figura 1, facilitando o processo de dissecação e a montagem das lâminas. Esta característica é interessante pois, facilita a identificação do meristema na raiz, facilitando a aplicabilidade do teste como bioensaio. Por serem radículas, apresentam coifas, que são camadas de células protetoras do meristema, cuja presença interfere nas análises das lâminas, pois são tecidos constituídos por células diferenciadas, sendo necessária sua remoção antes da confecção da lâmina. Devido ao fato da radícula de *P. taeda* ser mais espessa, com cerca de 2 mm de espessura, a coifa é mais facilmente removível, sendo esta atividade uma das responsáveis pela diferença de tempo de confecção das lâminas entre as espécies.

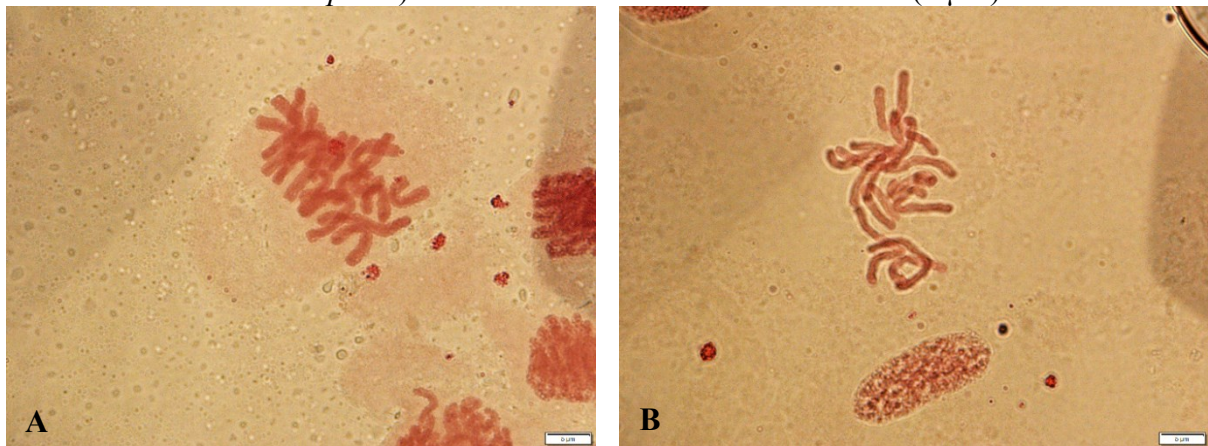
Figura 1 – Radículas e meristemas das espécies utilizadas nos bioensaios. A) Radículas de *Aliium cepa* fixadas em etanol:ácido acético (3:1) em microtubo. B) Radículas de *Pinus taeda* fixadas em etanol:ácido acético (3:1) em microtubo. C) Coifa e meristema radicular de *Pinus taeda*.



Fonte: Autor (2019).

Em relação a aspectos citogenéticos, *P. taeda* apresentam $2n=24$ cromossomos com comprimentos que variam de 19 a 29 μm , ao passo que *A. cepa* possui $2n=16$ cromossomos cujos comprimentos variam de 8 a 19 μm , fazendo com que essa diferença de tamanhos favoreça a localização das células na lâmina, assim como facilita a contagem por haver menos células/ campo, favorece também a visualização e identificação das fases da divisão celular, além do que as anormalidades cromossômicas são facilmente evidenciadas e identificadas no ciclo celular de *P. taeda* (Figura 2).

Figura 2 – Metáfases mitóticas de espécies utilizadas nos bioensaios. A) Cromossomos de *Allium cepa*. B) Cromossomos de *Pinus taeda*. Barra= (5 µm).



Fonte: Autor (2019).

Como grande desvantagem em relação à *A. cepa*, as sementes de *P. taeda* necessitam de superação de dormência para germinação com o emprego de métodos de estratificação a frio para a então confecção dos bioensaios, sendo a atividade de maior consumo de tempo total para a espécie. Por ser uma semente, *P. taeda* necessita de tempo para germinação, enquanto que *A. cepa* não necessita, por ser um bulbo já desenvolvido, além de que as sementes de *P. taeda* emitem apenas uma radícula por semente e necessitam de maior tempo para emissão desta, por ocorrer o processo de ativação e desenvolvimento do embrião, enquanto que o bulbo de *A. cepa* já apresenta toda essa organização.

A metodologia apresenta-se eficiente, pois os poucos estudos que utilizaram de espécies florestais para testes de citogenotoxicidade com metais pesados utilizaram adaptações semelhantes. Por exemplo, Arduini, Godbold e Otinis (1994) avaliaram o efeito de metais pesados sobre o crescimento radicular e morfologia de *P. pinea* L. e *P. pinaster* Ait, utilizando nestas as mesmas concentrações de fixadores e tipo de técnica de confecção das lâminas, diferenciando-se apenas os períodos de análises e reagentes utilizados, possivelmente referente as diferentes espécies estudadas.

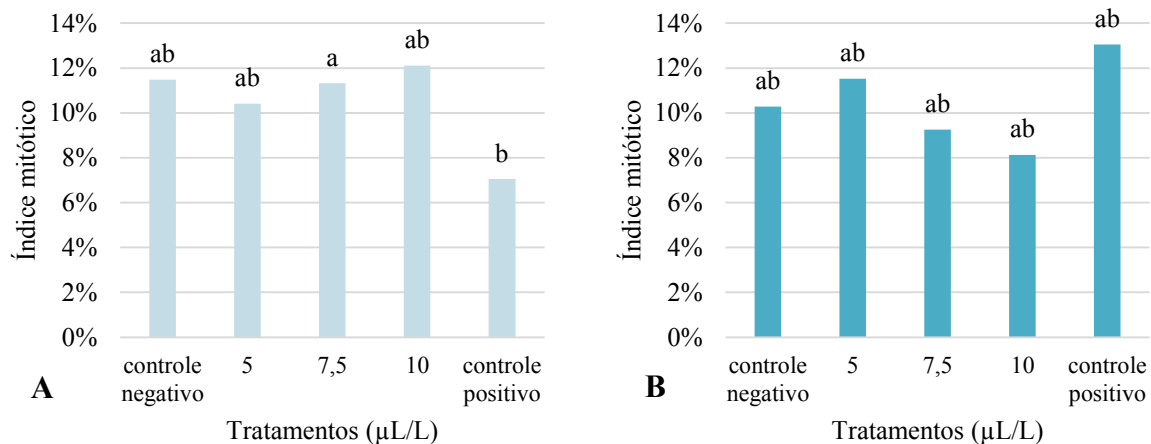
Os outros estudos de citogenotoxicidade com espécies florestais, como o de Butorina *et al.* (2007), que avaliou os efeitos citogenéticos que *P. sylvestris* L. e *Quercus robur* L. das florestas de Usmansky e Khrenovskoy, na região de Voronezh, na Rússia, sofrem; de Yücel *et al.* (2008) que avaliou o efeito de metais pesados sobre o ciclo celular de *P. nigra* Arn. e de Belousov, Mashkina e Popov (2012) que avaliou os efeitos de metais pesados em *P. sylvestris*

L., diferenciaram desta metodologia por emergirem e germinarem as sementes já sob as substâncias teste, mas porque pretendiam avaliar o efeito em sementes de regiões específicas. Prus-Głowacki *et al.* (2006) diferenciou-se por utilizar de análises moleculares para analisar as variações genéticas e distúrbios citológicos causados por metais pesados em indivíduos de *P. sylvestris* L. Desta forma, *P. taeda* demonstrou ser uma espécie que pode ser utilizada em bioensaios devido as características favoráveis apresentadas.

4.2 CITOGENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM *Pinus taeda*

O índice mitótico avalia a influência da substância na inibição ou indução da divisão celular, influenciando assim o crescimento do indivíduo. Vale ressaltar que estudos relatados na literatura com *A. cepa* mostram que nem sempre a toxicidade está correlacionada com a genotoxicidade, porque alterações relacionadas com o índice mitótico são parâmetros indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações em relação às anormalidades cromossômicas indicam genotoxicidade (FISKESJÖ, 1985). Análises de citotoxicidade são parâmetros importantes para determinar a taxa de crescimento da raiz e a proliferação celular (BARBÉRIO; VOLTOLINI; MELLO, 2011; LIU; JIANG; LI, 19922). Através da figura 3, é possível observar o índice mitótico *P. taeda* entre os diferentes tratamentos e períodos de exposição.

Figura 3 – Índice mitótico de *Pinus taeda* entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição.



Legenda: Controle negativo - 0 µL/L de glifosato, controle positivo - 100 µL/L de formaldeído. Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

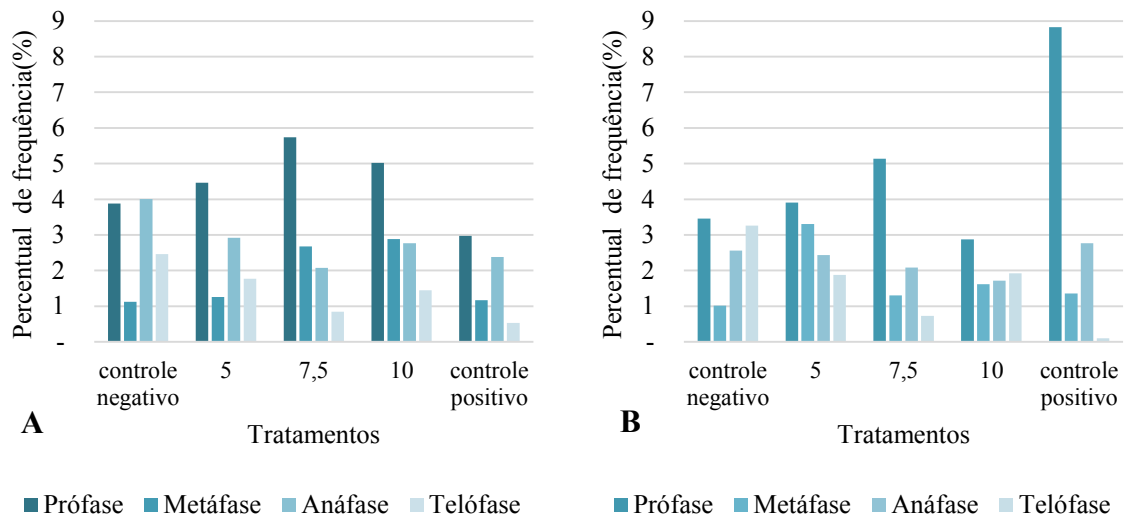
Fonte: Autor.

É possível observar que o índice mitótico de *P. taeda* diferenciou-se entre os períodos de exposição, onde o período de 24 horas apresentou certa estabilidade em relação aos tratamentos com o glifosato, entretanto o controle positivo diferenciou significativamente do tratamento com 7,5 µl/l de glifosato, onde o controle positivo apresentou menor índice (7%), concluindo que para o período de exposição de 24 horas, o controle positivo apresentou algum tipo de inibição do processo de divisão celular com a espécie. Em relação ao período de exposição de 48 horas, o controle positivo foi o que apresentou os maiores índices em relação aos outros tratamentos, inclusive maior até que o controle negativo, entretanto sem diferença significativa. Pode ser compreendido devido à grande quantidade de células prófásicas encontradas neste tratamento mostrando assim que para o período de exposição de 48 horas o controle positivo também exerceu influência sobre o ciclo celular.

Essa variação também é observada quando analisada por outras espécies florestais com outros agentes mutagênicos. Prus- Glowacki *et al.* (2006) observaram um índice mitótico médio de 5,5% durante um teste de germinação de cinco a sete dias de duração para *P. sylvestris* com o controle negativo, mas que variou de 4,5% a 6,9%, entretanto não foi o mesmo para Belousov, Mashkina e Popov (2012), onde encontrou um valor de índice médio padrão de 7,5% analisando a mesma espécie e agente mutagênico. Já Arduini, Godbold e Otinis (1994) encontraram valores de 4,6% para *P. pinea* e 6,3% para *P. pinaster* com análises de até 25 dias dentre o controle negativo, e também Yücel *et al.* (2008), que encontrou valores de 26,42% de índice para *P. nigra*, sendo o maior índice encontrado dentre os avaliados. Não foram comparados estudos com *P. taeda* ou de espécies florestais avaliando o efeito do glifosato por não haver pesquisas que avaliem o índice mitótico dos mesmos.

A análise da proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular (figura 4), assim como das médias estatísticas da tabela 3, é possível observar qual fase do ciclo celular de *P. taeda* é mais frequente e qual delas tem o período mais duradouro, possibilitando assim observar como pode ter se comportado o índice mitótico.

Figura 4 – Proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Pinus taeda* em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição.



Legenda: Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.
Fonte: Autor (2019).

Tabela 3 – Média e desvio padrão da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Pinus taeda*.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
P1-24	0,04 ± 0,0574 bcdfg	0,01 ± 0,0304 aehijklmn	0,04 ± 0,0787 abcdefg	0,02 ± 0,0690 ehijklmn
P2-24	0,04 ± 0,0675 ^{dfg}	0,01 ± 0,0348 ehijklmn	0,03 ± 0,0758 abcdefhijkl	0,02 ± 0,0638 ijklmn
P3-24	0,06 ± 0,0785 ^{fg}	0,03 ± 0,0487 acdefghijk	0,02 ± 0,0369 acdefhijk	0,01 ± 0,0324 klmn
P4-24	0,05 ± 0,0676 ^{fg}	0,03 ± 0,1316 abehijklmn	0,03 ± 0,0724 abcdefhij	0,01 ± 0,0417 hijklmn
P5-24	0,03 ± 0,0597 abcdefgh	0,01 ± 0,0284 abehijklmn	0,02 ± 0,0388 abcdefg	0,01 ± 0,0245 lmn
P1-48	0,03 ± 0,0598 abcdefg	0,01 ± 0,0376 hijklmn	0,03 ± 0,0505 abcdefghi	0,03 ± 0,0840 abehijklmn
P2-48	0,04 ± 0,0590 ^{cdfg}	0,03 ± 0,0923 acdefghijk	0,02 ± 0,0687 abcdefhi	0,02 ± 0,0751 ijklmn
P3-48	0,05 ± 0,0678 ^{fg}	0,01 ± 0,0353 abehijklmn	0,02 ± 0,0530 abcdehijklm	0,01 ± 0,0351 mn
P4-48	0,03 ± 0,0440 bcdfg	0,02 ± 0,0549 ehijklmn	0,02 ± 0,0325 abcdehijk	0,02 ± 0,0919 ijklmn
P5-48	0,09 ± 0,16785 ^g	0,01 ± 0,0270 abcehijklm	0,03 ± 0,1306 abehijklm	0,00 ± 0,0044 ⁿ

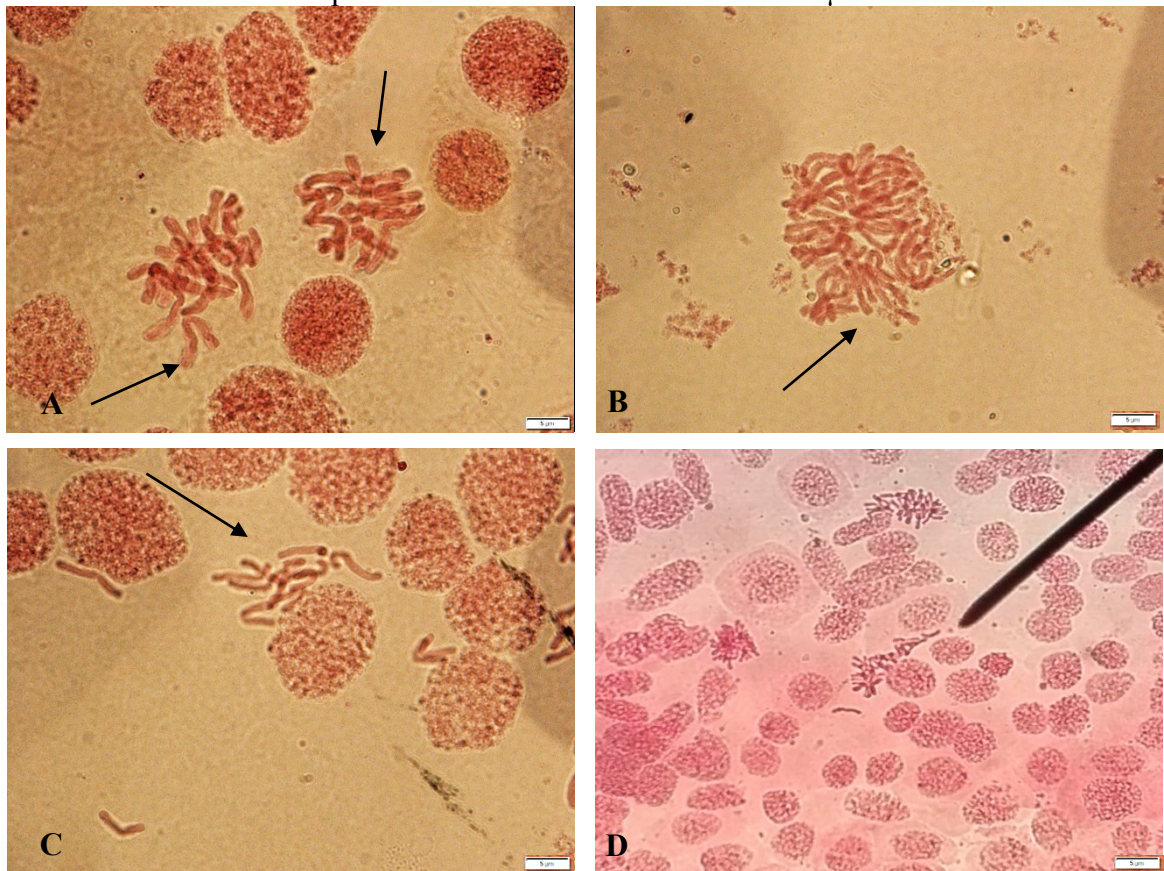
Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.
Fonte: Autor (2019).

Através da proporção e dos valores médios observados e comparando com o índice mitótico, é possível observar que *P. taeda*, durante o período de exposição de 24 horas, apresenta em todos os tratamentos uma maior concentração de células profásicas, sendo esta fase uma das que apresenta maiores variações, no qual diminui significativamente conforme aumentam as concentrações dos agentes mutagênicos, enquanto as outras fases não são tão influenciadas. Além disto, é possível observar que a frequência de células em prófase em *P. taeda* segue uma distribuição semelhante ao índice mitótico, mostrando assim que essa fase da divisão é a principal influenciadora no índice mitótico

Em relação à frequência de células profásicas em tratamentos submetidos à 48 horas de exposição, foi possível observar que a mesma apresentou uma expressiva diferença em relação aos outros tratamentos, mostrando assim que a duração dessa fase foi mais influenciada pela ação dos agentes mutagênicos ocasionando à maior frequência e duração da mesma.

O comportamento das fases da divisão celular entre os tratamentos no qual *P. taeda* foi submetido nos mostra o tipo de interferência que o glifosato e o formaldeído exercem sobre o ciclo celular da espécie. Os dados demonstraram que não ocorreu a inibição da divisão celular em *P. taeda* e sim um aumento na duração das fases de divisão celular, em especial a prófase. A observação de maiores frequências de células em prófase com maior tempo de duração permite sugerir que não ocorre o avanço do processo de divisão. Esse fato pode estar relacionado a falhas no processo de polimerização dos microtúbulos ou à inativação de moléculas essenciais para a transição entre a prófase e as próximas etapas do ciclo celular. De acordo com Raven, Evert e Eichhorn (2013) no final da prófase ocorre a primeira manifestação do fuso mitótico, no qual os microtúbulos alinham-se paralelamente à superfície do núcleo, formando o fuso da pré-prófase. Estudos realizados por Dimitrov *et al.* (2006) indicam que plantas são mais susceptíveis a efeitos aneugênicos quando expostas ao agroquímico RoundUp (à base de glifosato). No presente estudo, o tipo de anormalidade que se apresentou mais frequente foram efeitos aneugênicos, como cromossomos não orientados ou cromossomos perdidos na prófase, prometáfase e metáfase, conforme visualizados nas figuras 5 e 7.

Figura 5 – Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta em A-D) em células de prometáfase em *Pinus taeda*- Barra= 5µm.

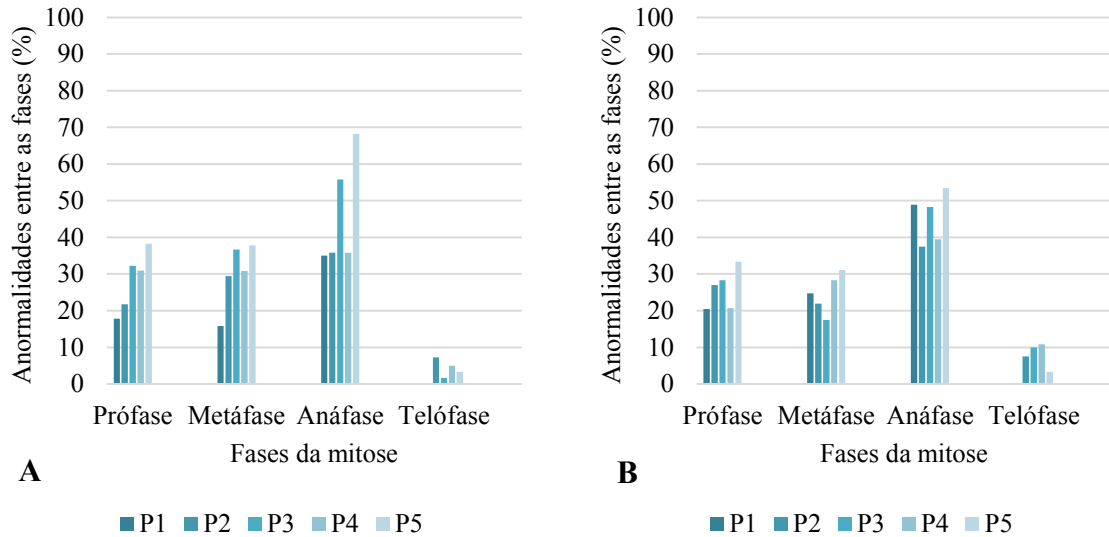


Fonte: Autor (2019).

Entretanto, se observarmos a relação destas anormalidades em relação ao número de células em divisão celular, ou seja, uma frequência relativa (FR) de anormalidades em cada fase de divisão celular, apresentados na figura 6 e nas médias estatísticas da tabela 4, é possível observar que por mais que a prófase apresente maior duração e frequência absoluta na observação de células em divisão celular, a maior frequência relativa de anormalidades foi observada em células em metáfase e anáfase, variando entre os tratamentos. Estas observação dentre as células de *P. taeda* mostra que as metáfases e anáfases foram as fases da divisão celular que apresentaram maiores proporções de células com alguma anormalidade cromossômica, mostrando assim que estas são mais influenciadas e apresentam maiores comprometimentos de suas funções por parte dos agentes mutagênicos. Isso ocorre possivelmente de interações que podem ter ocorrido já durante o período de prófase, como abordado anteriormente, pois a frequência e duração da prófase demonstraram ser estagnados, não permitindo o avanço do processo mitótico, e quando avança, podem ter ocorrido interações e/ ou inibições de estruturas essenciais que atuam na formação do fuso mitótico impedindo a

sucessão do processo de divisão celular, culminando assim em metáfases e anáfases com anormalidades cromossômicas.

Figura 6 – Frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em *Pinus taeda* por A. 24 horas e B. 48 horas.



Legenda: Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.
Fonte: Autor (2019).

Tabela 4 – Média e desvio padrão da frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em *Pinus taeda*.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
P1-24	17,8 ± 27,030 abcdefgh	15,8 ± 36,233 defghijklm	35,0 ± 47,210 bcdefgh	0 ± 0 ^m
P2-24	12,8 ± 32,134 abcdefgh	29,4 ± 44,612 bcdefghij	35,8 ± 47,916 bcdefgh	7,2 ± 25,372 hijklm
P3-24	32,3 ± 40,709 ^{ab}	36,7 ± 48,596 abcdefgh	55,8 ± 49,653 bcde	1,7 ± 12,910 ^{lm}
P4-24	30,9 ± 39,882 abcdefgh	30,8 ± 45,185 bcdefghi	35,8 ± 47,023 bcdeg	5,0 ± 21,978 ijklm
P5-24	38,2 ± 41,354 ^a	37,8 ± 46,826 abcdeg	68,2 ± 45,759 abcd	3,3 ± 15,586 jklm
P1-48	20,5 ± 33,770 ^{abc}	24,7 ± 41,567 bcdefghijk	48,9 ± 49,180 bcdefghij	0 ± 0 ^m
P2-48	26,9 ± 39,945 abcdefg	21,9 ± 40,766 bcdefghijkl	37,5 ± 48,385 bcdefgh	7,5 ± 25,751 fghijklm
P3-48	28,3 ± 42,744 ^{abcd}	17,5 ± 37,760 cdefghijklm	48,3 ± 50,394 bcdefghi	10,0 ± 30,253 fghijklm
P4-48	20,7 ± 34,819 abcdeg	28,3 ± 44,500 bcdefghijk	39,4 ± 48,028 bcdefghijk	10,8 ± 30,659 efghijklm
P5-48	33,4 ± 40,800 ^{ab}	31,1 ± 46,280 bcdefghij	53,5 ± 47,915 bcde	3,3 ± 18,102 ^{klm}

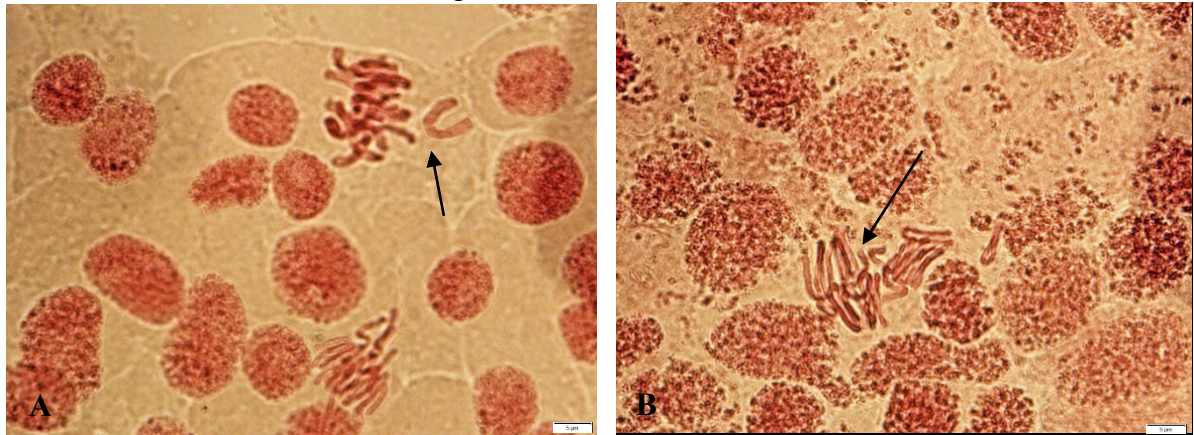
Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

Também é possível observar que conforme aumenta-se a concentração de glifosato até o controle positivo, *P. taeda* apresenta uma maior frequência relativa de anormalidades cromossômicas regular entre as fases, ou seja, das células que estão em divisão celular, a frequência de células com alguma anormalidade também cresce, sendo majoritariamente predominante as anormalidade em metáfase e anáfase, e com anormalidades cromossômicas acima de 80% de frequência no controle positivo, por exemplo, para ambas fases da divisão celular, corroborando com a afirmativa de que os agentes mutagênicos tem maior afinidade e relação pelas estruturas responsáveis por estas fases. *P. taeda* também apresentou menores frequências de anormalidades cromossômicas entre os controles negativos, comportamento esperado para espécies- modelo. Não é possível realizar a comparação destas frequências relativas com a literatura por não haver referências que assim o fazem.

Entre as anormalidades cromossômicas mais frequentes entre as fases da divisão celular, o *P. taeda* apresentou a metáfase como uma das que mais apresentou valores significativos, sendo que estas anormalidades foram de origem aneugênica, como cromossomos desorientados ou cromossomos perdidos, como observado na figura 7.

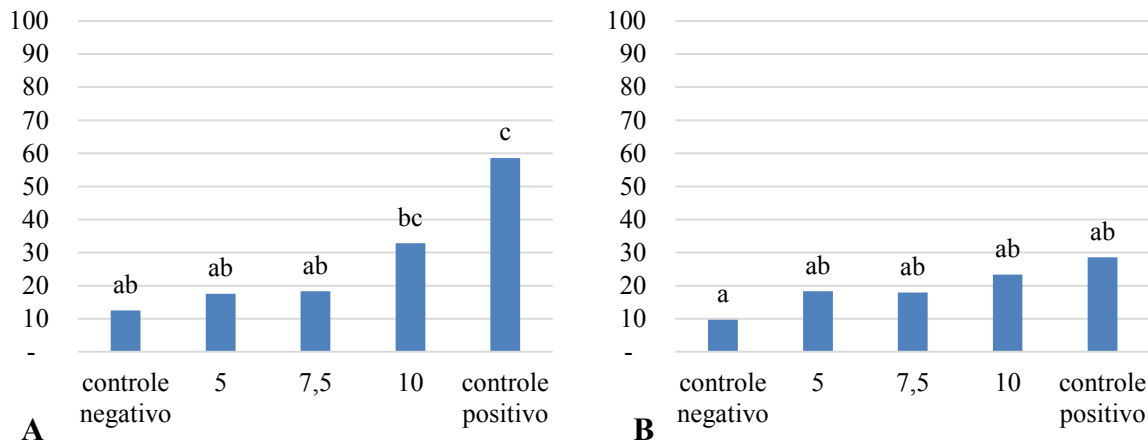
Figura 7– Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de metáfase irregulares de *Pinus taeda*. Barra=5 μ m.



Fonte: Autor (2019).

Dentre todas as fases do processo de divisão celular, a anáfase e telófase são as fases mais críticas e sensíveis deste processo, pois estas são as fases finais do processo de divisão, havendo pouca chance da célula corrigir as anormalidades entre os cromossomos, sendo mais provável gerar células filhas defeituosas. Neste sentido, é possível observar na figura 8 a porcentagem média absoluta de células anormais em anáfase– telófase, no qual é possível verificar que a frequência de anormalidades encontradas em *P. taeda* aumenta conforme se aumentam as concentrações do agroquímico, para ambos períodos de exposição. Para tal análise, o *P. taeda* não há estudos plausíveis para comparação das anormalidade em anáfase – telófase encontradas neste estudo.

Figura 8 – Porcentagem média de células anormais em estágio de anáfase- telófase de *Pinus taeda* entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição.

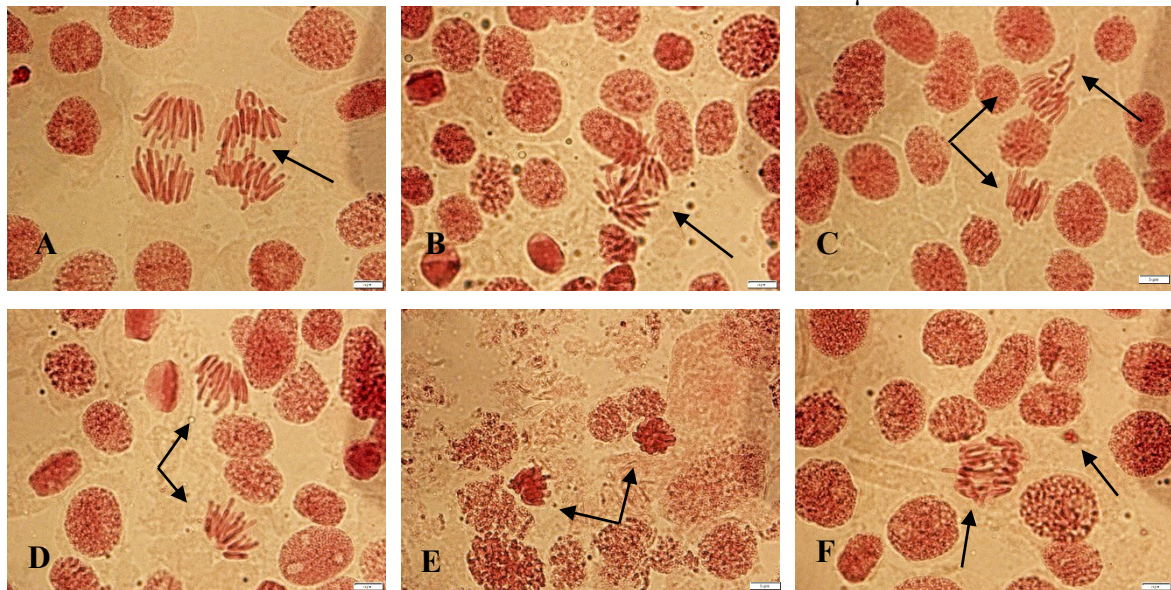


Legenda: Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.
Fonte: Autor (2019).

Nessa análise, foi observado que em *P. taeda*, no período de exposição de 48 horas, as frequências de anormalidades não diferiram estatisticamente para todos os tratamentos. Entretanto, para o período de exposição de 24 horas, foi observado um aumento significativo da frequência de células anormais nos tratamentos com maior concentração de glifosato e também no controle positivo. Esses dados mostram que *P. taeda* apresenta uma rápida interação com o glifosato e o formaldeído, e que quando expostos por período maior de tempo, a concentração destes não mais influencia. Também é possível observar que dentre os controles negativos, apenas cerca de 13% e 10% das anáfases e telófases entre 24 e 48 horas de exposição, respectivamente, apresentaram anormalidades cromossômicas.

As anormalidades observadas nestas fases foram de origem clastogênicas e aneugênicas, como pontes cromossômicas, cromossomos fragmentados, anáfase multipolar, stickiness cromossômicos e micronúcleos, conforme observado na figura 9.

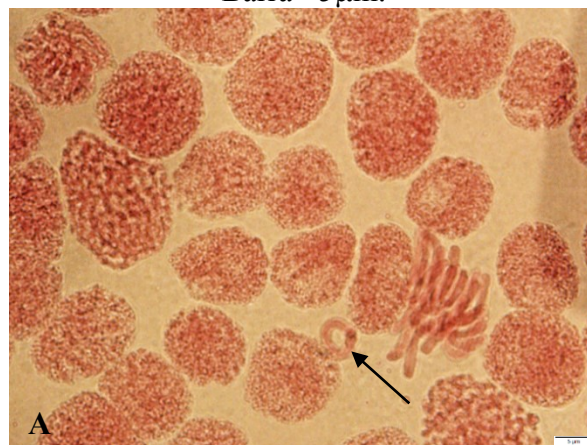
Figura 9 – Pontes cromossômicas (A, B), cromossomos desorientados (C), polos desalinhados (C, D), stickiness cromossômicos (E) e micronúcleo (F) (indicados pela seta) em células de anáfase- telófase de *Pinus taeda*. Barra=5µm.



Fonte: Autor (2019).

Resultante deste teste e das implicações que os agentes mutagênicos mostraram ocasionar, principalmente pela indução do processo de divisão celular, assim como uma maior frequência de anormalidades, principalmente em metáfase e anáfase, foi possível observar a formação de um anel cromossômico em uma metáfase de *P. taeda*, resultante da quebra de uma das extremidades do cromossomo e posterior união entre si, sendo um indício de efeito clastogênico, apresentado na figura 10.

Figura 10 – Formação de anel cromossômico (indicado pela seta) em células de *Pinus taeda*. Barra= 5µm.



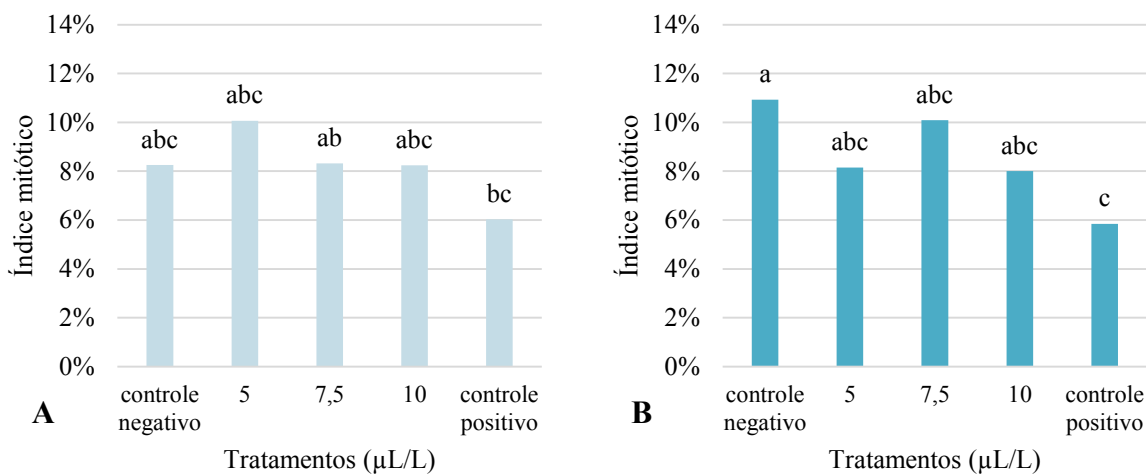
Fonte: Autor (2019).

Através de uma maior frequência de anormalidades cromossômicas, principalmente em metáfase e anáfase, em sua maioria de origem aneugênica, assim como a indução do processo de divisão celular, é possível sugerir que os efeitos do glifosato, assim como do formaldeído sobre o *P. taeda*, agem em sua maioria sobre a formação do fuso mitótico, que são as estruturas responsáveis pela migração dos cromossomos na célula.

4.3 CITOGENOTOXICIDADE DO GLIFOSATO EM *Allium cepa*

Como explanado anteriormente, o índice mitótico avalia a influência do mutagênico na inibição ou indução da divisão celular, influenciando assim o crescimento do indivíduo. Através da figura 11, é possível observar os índices mitóticos de *A. cepa* entre os diferentes tratamentos e períodos de exposição.

Figura 11 – Índices mitóticos de *Allium cepa* entre os respectivos tratamentos em A) 24 horas e B) 48 horas de exposição.



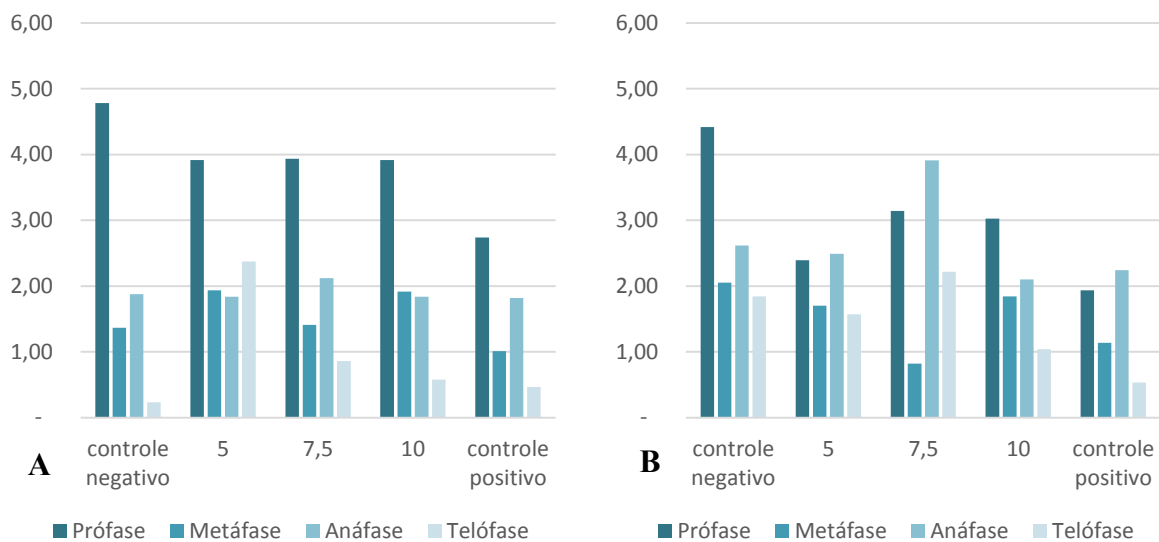
Legenda: Controle negativo - 0 µL/L de glifosato, controle positivo - 100 µL/L de formaldeído. Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2. Medias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
Fonte: Autor.

É possível observar que o índice mitótico de *A. cepa* diminui significativamente conforme aumentam as concentrações de glifosato, principalmente entre o período de exposição de 48 horas, sendo observado esse comportamento em diversos estudos (BEZERRA; SILVA OLIVEIRA, 2016, FACHINETTO *et al.*, 2007, SANTANA *et al.*, 2018, STURBELLE *et al.*, 2008), entretanto, não houve uma diferença significativa entre os períodos de exposição de 24 horas. O controle positivo com período de exposição de 48 horas apresentou o menor índice

mitótico, no qual diferenciou do controle negativo, que apresentou o maior valor de índice. Para Bezerra e Silva Oliveira (2016), que avaliaram os infusos de folhas de malva-santa (*Plectranthus barbatus*) em diferentes concentrações sobre o ciclo celular de *A. cepa*, observaram no controle negativo após 24 horas o índice mitótico de 18%, já Fachinetto *et al.* (2007) que avaliaram os infusos de marcela (*Achyrocline satureioides*) sobre o ciclo celular de *A. cepa* encontraram valores de 3,45% e 12,9% também para o controle negativo, mostrando assim que o índice mitótico pode ser influenciado pelo tempo de exposição de realização dos bioensaios, mas que normalmente ele segue uma distribuição decrescente conforme aumenta a concentração da substâncias mutagênicas.

Analisando a genotoxicidade através das atividades do processo de mitose, através da proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular, apresentado na figura 12, assim como as médias estatísticas da tabela 4, é possível observar qual fase do ciclo celular é mais frequente e tem o período mais duradouro, sabendo assim como pode ter se comportado o índice mitótico.

Figura 12 – Proporção média da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Allium cepa* em A) 24 horas e B) 48 horas de exposição.



Legenda: Controle negativo - 0 $\mu\text{L/L}$ de glifosato, controle positivo - 100 $\mu\text{L/L}$ de formaldeído. Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

Tabela 5 – Média e desvio padrão da frequência absoluta de cada fase da divisão celular de *Allium cepa*.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
A1-24	0,05 ± 0,0480 abcdefghi	0,01 ± 0,0242 abceghikl	0,02 ± 0,0362 ^j	0,00 ± 0,0120 ^m
A2-24	0,04 ± 0,0443 abcdefghi	0,02 ± 0,0397 abcdefghik	0,02 ± 0,0311 defj	0,02 ± 0,1300 ciklm
A3-24	0,04 ± 0,0425 abdefghj	0,01 ± 0,0226 abcdeghik	0,02 ± 0,027 ^{fj}	0,01 ± 0,0384 klm
A4-24	0,04 ± 0,0578 abcdefghik	0,02 ± 0,0385 abcdefghi	0,02 ± 0,0353 ^{efj}	0,01 ± 0,0150 iklm
A5-24	0,03 ± 0,0230 ^{adejf}	0,01 ± 0,0149 abcghi	0,02 ± 0,0199 ^{fj}	0,00 ± 0,0196 lm
A1-48	0,04 ± 0,0652 ^{adejf}	0,02 ± 0,0407 abcdefghi	0,03 ± 0,0323 defj	0,02 ± 0,0506 bchiklm
A2-48	0,02 ± 0,0324 abcdeghij	0,02 ± 0,0378 abcdghikl	0,02 ± 0,0469 adeefghj	0,02 ± 0,0459 bchiklm
A3-48	0,03 ± 0,0421 abcdeghj	0,01 ± 0,0211 bciklm	0,04 ± 0,0972 adeefj	0,02 ± 0,0761 bchiklm
A4-48	0,03 ± 0,0389 abcdefghi	0,02 ± 0,0482 abcghiklm	0,02 ± 0,0476 adeefj	0,01 ± 0,0231 bcghiklm
A5-48	0,02 ± 0,0220 adeefgj	0,01 ± 0,0174 abcghik	0,02 ± 0,0300 adeefgj	0,01 ± 0,0245 klm

Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

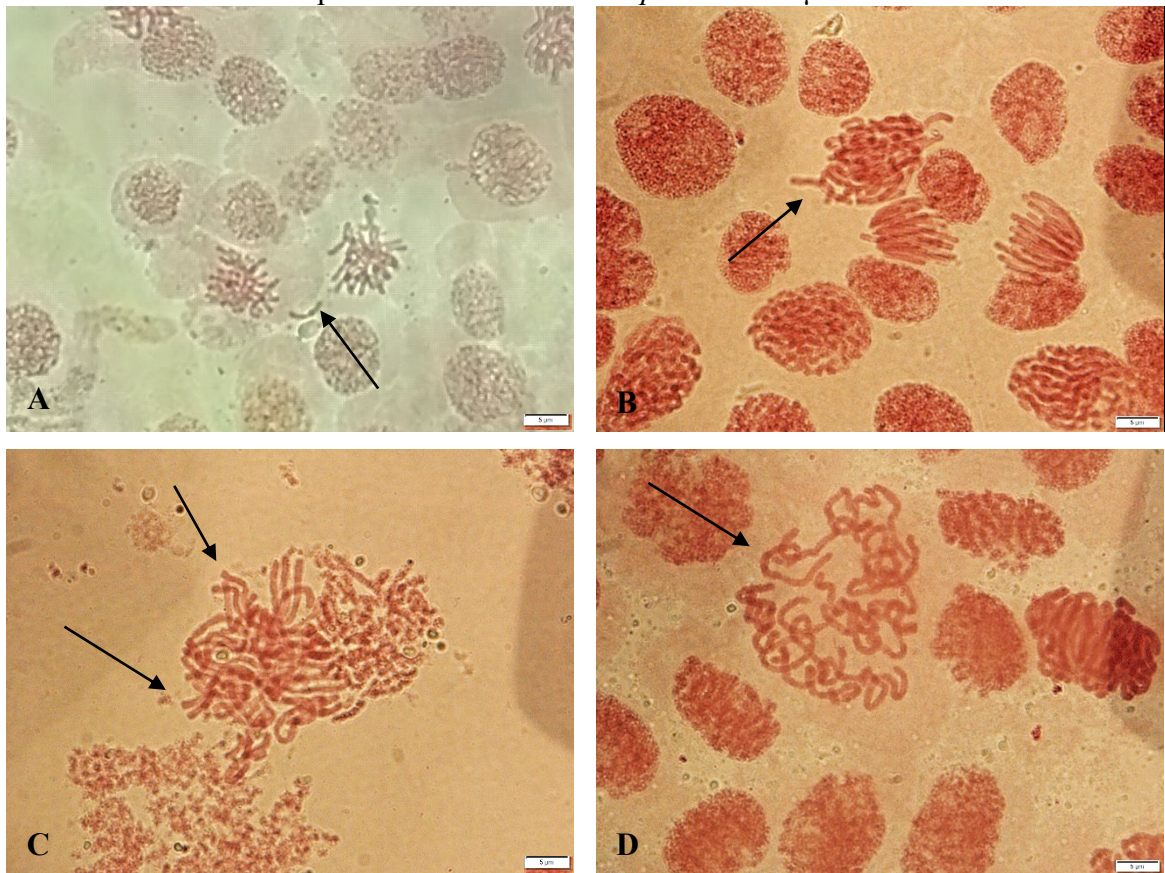
Através da proporção e dos valores médios observados, e comparando com o índice mitótico, é possível observar que *A. cepa* também apresentou, na maioria dos tratamentos, uma maior concentração de células profásicas. Entretanto a diferença entre a frequência de células em prófase em relação às outras fases da divisão diminui significativamente conforme aumentam as concentrações dos agentes mutagênicos, ocorrendo assim a diminuição da frequência da prófase principalmente no controle positivo. Além disso, é possível observar que a frequência de prófases em *A. cepa* também segue uma distribuição semelhante ao observado no índice mitótico, mostrando também que as células em prófase são as principais influenciadoras no índice mitótico, ou seja, as células em divisão celular encontram-se em maior frequência em prófases, mostrando assim que esta fase apresenta a maior duração entre as outras, e que é a fase mais influenciada pelos tratamentos. Em *A. cepa* foi observado que com o aumento das concentrações do glifosato e no controle positivo houve uma redução significativa na frequência de células em divisão celular.

Assim, os resultados indicam que *A. cepa* apresenta uma sensibilidade ao agroquímico semelhante em todas as fases de divisão celular, havendo um comportamento similar entre as

fases celulares. Outros autores relataram resultados similares em *A. cepa* (BEZERRA; SILVA OLIVEIRA, 2016, FACHINETTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA; VOLTOLINI; BARBÉRIO, 2011, TÜRKOĞLU, 2007), Santana (2018) foi o único que apresentou a média de células em cada fase de divisão celular, apresentando valores semelhantes aos encontrados neste trabalho, onde as células prófasicas apresentavam a média de $2,08 \pm 0,85$ células, a metáfase apresentava $0,80 \pm 0,44$ células, anáfase $1,20 \pm 0,65$ células e telófase $0,93 \pm 0,71$ células, sendo estes um arranjo semelhante ao desempenhado por *A. cepa* no controle negativo. Já Kruger (2009) encontrou uma média de $12,4 \pm 3,3$ de células com anormalidades em comparação ao teste controle para teste com agroquímico a base de glifosato para *A. cepa*, no entanto, em seu trabalho foram analisadas 2000 células por lâmina, desta forma estes valores são proporcionalmente semelhantes as quantidades médias encontradas no presente trabalho.

Dentre a prófase, o tipo de anormalidade que mais se apresentou frequente foram efeitos aneugênicos, como cromossomos não orientados ou cromossomos perdidos, conforme apresenta figura 13 em células de prometáfase de *A. cepa*.

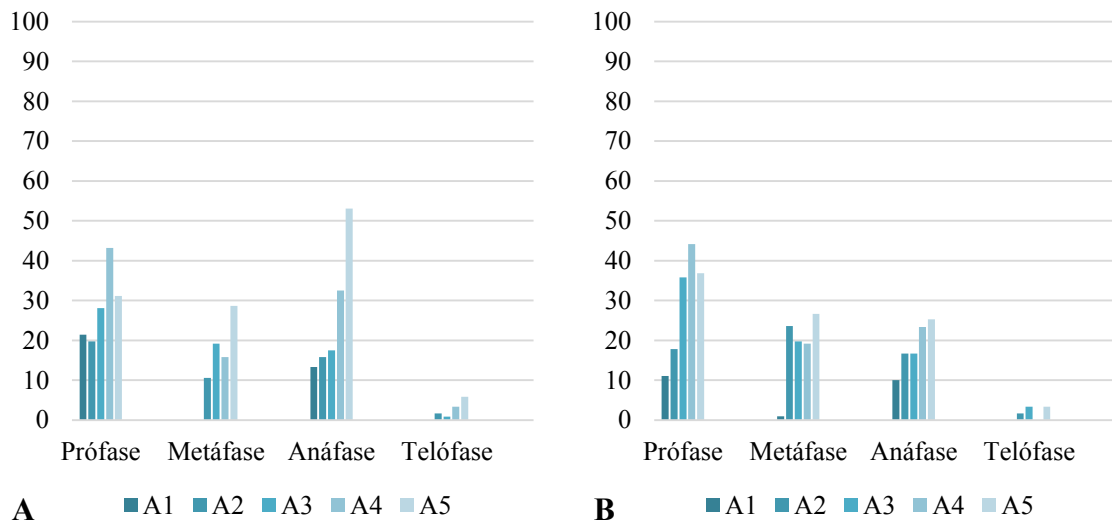
Figura 13 – Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de prometáfase de *Allium cepa*. Barra= 5 μ m.



Fonte: Autor (2019).

Entretanto, se observarmos a relação destas anormalidades em relação ao número de células em divisão celular, ou seja, uma frequência relativa (FR) de anormalidades em cada fase de divisão, apresentados na figura 14 e nas médias estatísticas da tabela 6, é possível observar que a prófase também apresenta a maiores frequências de células anormais na maioria dos tratamentos, além de apresentar maior duração e frequência absoluta na observação de células em divisão celular. Esta observação dentre as células observadas de *A. cepa* mostra que as metáfases e anáfases também apresentaram expressivas proporções de células com alguma anormalidade cromossômica nesta espécie, mostrando também assim que a interação do glifosato ocorre possivelmente na prófase ou até mesmo em etapas anteriores da intérfase, e que a maior duração da prófase é resultado da inviabilização do progresso do processo mitótico, devido a erros na formação e/ ou organização do fuso mitótico.

Figura 14 – Frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em *Allium cepa* por A. 24 horas e B. 48 horas.



Legenda: Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.
Fonte: Autor (2019).

Tabela 6 – Média e desvio padrão da frequência relativa (FR) de cada fase da divisão celular de células com alguma anormalidade cromossômica em *Allium cepa*.

Tratamento	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
A1-24	21,4 ± 37,937 abcde fgh	0 ± 0 ^d	13,3 ± 33,163 abfghij	0 ± 0 ^d
A2-24	19,7 ± 38,017 abcde fgh	10,6 ± 28,944 abcde fgh	15,8 ± 36,233 abce fghij	1,7 ± 12,910 ^{cde}
A3-24	28,1 ± 42,526 abcde fgh	19,2 ± 36,928 abcde fgh	17,5 ± 37,479 afhij	0,8 ± 6,455 ^{de}
A4-24	43,2 ± 45,682 ^{afhij}	15,8 ± 36,233 abcde fgh	32,5 ± 45,970 ^{ij}	3,3 ± 18,10 bcde g
A5-24	31,2 ± 44,183 ⁱ	28,6 ± 44,265 ^{afhij}	53,1 ± 48,275 afhij	5,8 ± 22,721 bcde fgh
A1-48	11,1 ± 28,937 abcde fgh	1,0 ± 5,335 ^{bcde}	10,0 ± 28,819 abcde fgh	0 ± 0 ^d
A2-48	17,8 ± 34,936 abcde fgh	23,6 ± 37,992 ^{afhij}	16,7 ± 36,437 abce fgh	1,7 ± 12,910 ^{cde}
A3-48	35,8 ± 45,496 abcde fgh	19,7 ± 39,116 abcde fgh	16,7 ± 36,437 abce fgh	3,3 ± 18,102 bcde g
A4-48	44,2 ± 46,113 afghij	19,2 ± 39,156 abcde fgh	23,3 ± 39,201 ^{ij}	0 ± 0 ^d
A5-48	36,9 ± 42,608 abce fgh	26,7 ± 44,95 ^{abce fgh}	25,3 ± 42,904 hij	3,3 ± 18,102 bcde g

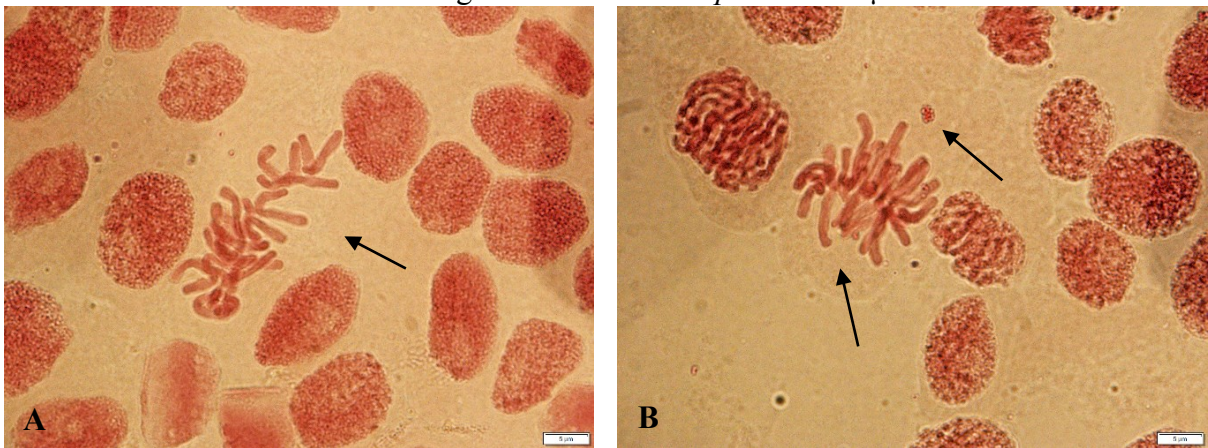
Legenda: Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

Também é possível observar que conforme aumenta-se a concentração de glifosato até o controle positivo, *A. cepa* apresenta uma maior variação entre a proporção de anormalidades cromossômicas entre as fases, mas expressa a afirmativa de que o glifosato e o formaldeído tem maior afinidade pelas estruturas necessárias para formação do fuso mitótico. Não é possível realizar a comparação destas frequências relativas com a literatura por não haver referências que assim o fazem.

Entre a frequência relativa de anormalidades cromossômicas em cada fase da divisão celular, a *A. cepa* apresentou a metáfase como uma das fases que mais apresentou algum tipo de anormalidade, sendo que estas anormalidades foram de origem aneugênicas, como cromossomos desorientados ou cromossomos perdidos, como observado na figura 15.

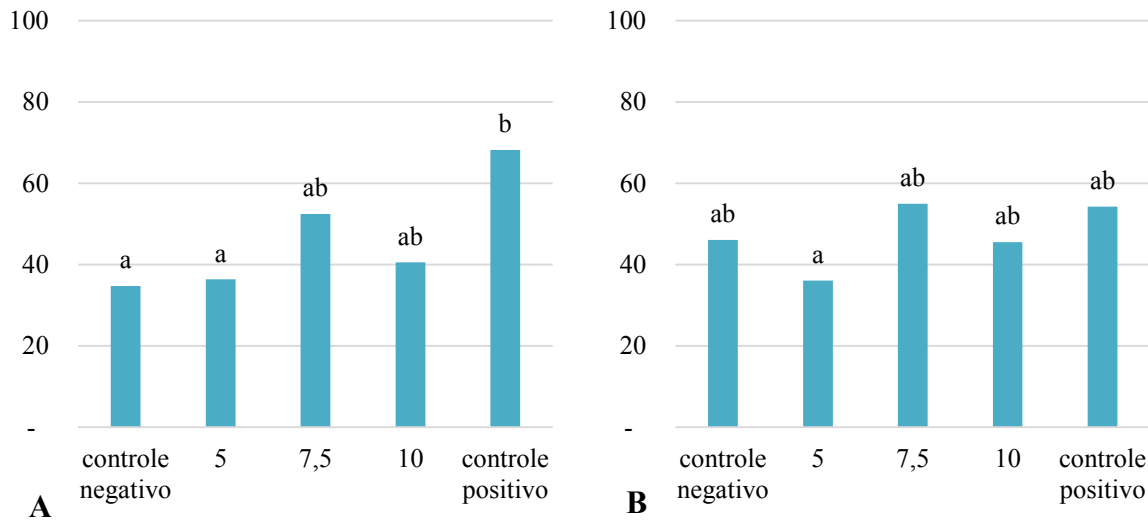
Figura 15 – Cromossomos perdidos ou desorientados (indicados pela seta) em células de metáfase irregulares de *Allium cepa*. Barra=5 μ m.



Fonte: Autor (2019).

Como abordado anteriormente, a anáfase e a telófase são as fases mais críticas por constituírem as etapas finais do processo de divisão. Assim, é possível observar, como exposto na figura 16, que a porcentagem média absoluta de células anormais em anáfase–telófase de *A. cepa* apresenta diferenças significativas somente no período de 24 horas, comportamento diferente das encontradas por Andrioli, Wulff e Mudry (2006), que avaliaram o efeito de metronidazol (antibiótico) em *A. cepa*, onde encontraram anáfases- telófases anormais com médias de 0,24% de células para o controle negativo, além de que as análises seguiam uma frequência crescente conforme se aumentava a concentração do mutagênico.

Figura 16 – Porcentagem média de células anormais em estágio de anáfase- telófase de *Allium cepa* entre os respectivos tratamentos em A. 24 horas e B. 48 horas de exposição.



Legenda: Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

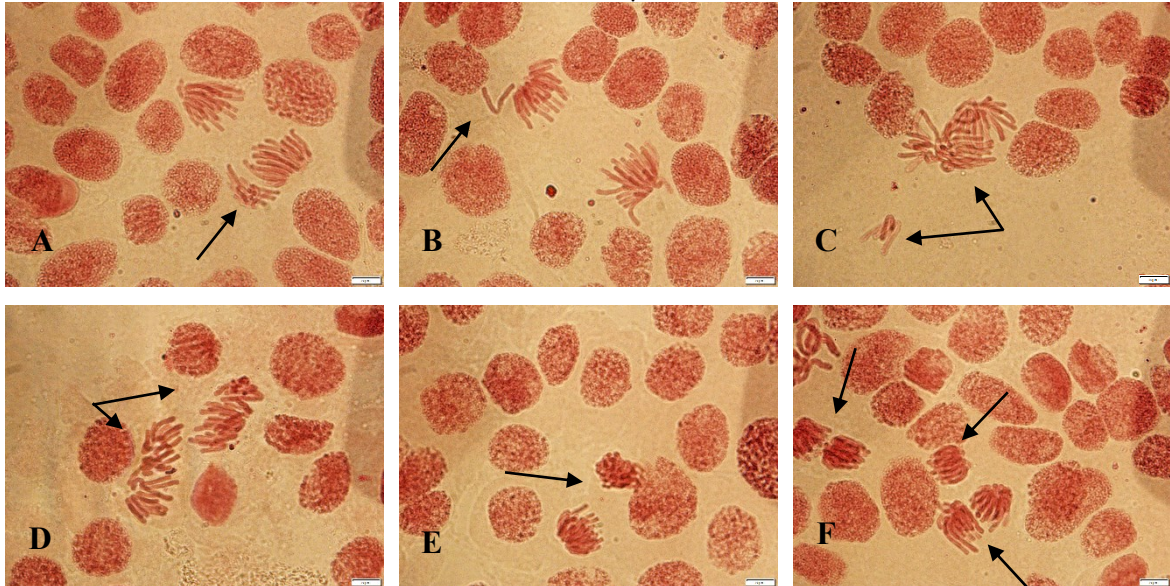
Fonte: Autor (2019).

Em relação à frequência de anormalidades, o controle positivo apresentou médias superiores que os demais tratamentos, com presença de até 68% de anáfases e telófases com alguma anormalidade cromossômica, assemelhando-se aos tratamentos com 7,5 e 10 $\mu\text{L/L}$ de glifosato que apresentaram desempenho semelhante.

As anormalidades mais frequentes nestas fases foram de origem aneugênica e clastogênica, como pontes cromossômicas, cromossomos fragmentados, anáfase multipolar, stickiness cromossômico e micronúcleos, conforme observado na figura 17

Figura 17 – Cromossomos fragmentados (A, C), cromossomos desorientados (B), pontes cromossômicas (C), polos desalinhados (D), stickiness cromossômico (E) e anáfase multipolar (F) (indicados pela seta) em células de anáfase- telófase de *Allium cepa*.

Barra=5 μ m.

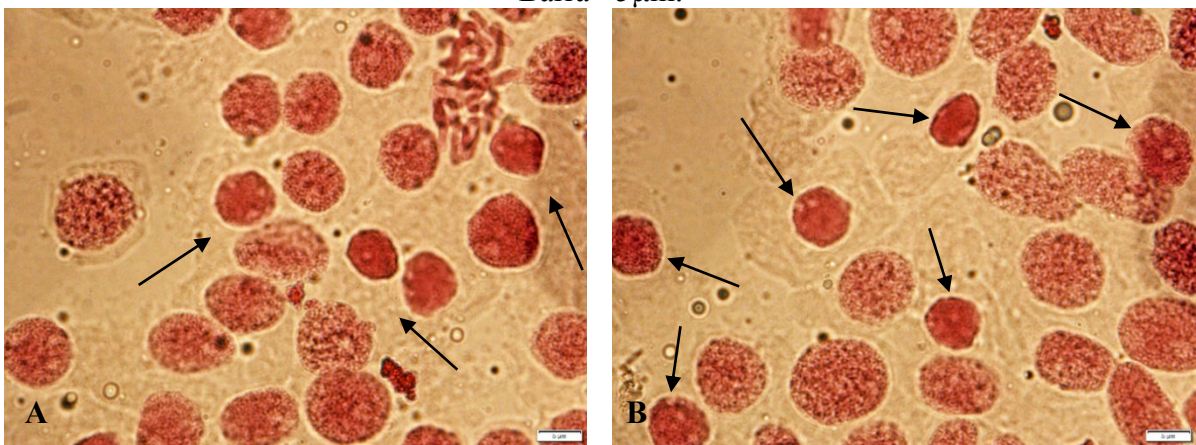


Fonte: Autor (2019).

Resultante deste teste e das implicações que os agentes mutagênicos mostraram ocasionar, principalmente pela inibição do processo de divisão celular em *A. cepa*, assim como uma maior frequência de anormalidades cromossômicas, foi possível observar a formação de morte celular (figura 18).

Figura 18 – Formação de morte celular (indicadas pela seta) em células de *Allium cepa*.

Barra= 5 μ m.



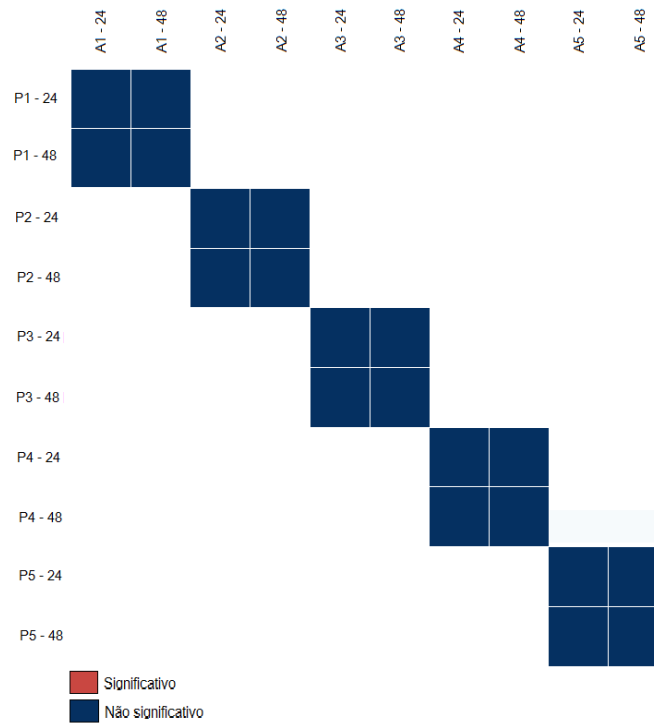
Fonte: Autor (2019).

Os tipos de anormalidades cromossômicas relatadas para *A. cepa* na literatura mostram que os efeitos clastogênicos, como rupturas cromossômicas, pontes cromossômicas, cromossomos fragmentados e efeitos aneugênicos, como cromossomos perdidos, cromossomos desorientados, anáfases desorganizadas, multipolares e células poliploides são os mais frequentes (ANDRIOLI; WULFF; MUDRY, 2006, LEME, MARIN- MORALES, 2009), algumas das quais semelhantes aos encontrados neste estudo. Grant (1982) vai além e também afirma que ensaios de aberrações cromossômicas com *A. cepa* apresenta uma resposta confiável aos agentes mutagênicos avaliados, sendo esta uma característica que deveria incluir o teste entre os rotineiramente utilizados para avaliar danos cromossômicos induzidos por produtos químicos.

4.4 SENSIBILIDADE ENTRE *A. cepa* E *P. taeda*

Através das comparações aos pares realizadas em relação aos tratamentos com ambas as espécies, no qual foi possível observar que em relação ao número proporcional de células em divisão celular, ou seja, aquelas não inibidas pelos tratamentos, apresentados na figura 19, não foram observadas diferenças significativas entre os pares, ou seja, não ocorre diferença entre estas espécies em relação a frequência proporcional de células em divisão celular, significando que a que a frequência observada em *A. cepa* também é observada em *P. taeda*, entretanto as frequências variam entre as espécies.

Figura 19 – Comparação aos pares entre a proporção de células em divisão celular entre os diferentes tratamentos submetidos a *Pinus taeda* e *Allium cepa*.



Legenda: Significativo – Diferença estatística ($p < 0,05$); Não Significativo – Sem diferença estatística ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

É possível observar na tabela 7 que a proporção mediana de células em divisão celular do controle positivo com *A. cepa* foi mais sensível e apresentou a menor proporção de células mitóticas em relação ao controle negativo que *P. taeda*.

Tabela 7 – Média, desvio padrão e mediana da proporção de células em divisão celular entre os respectivos tratamentos e períodos de exposição para ambas espécies, *Allium cepa* e *Pinus taeda*.

Tratamento	24 horas		48 horas	
	Média \pm Desv. padrão	Mediana	Média \pm Desv. padrão	Mediana
A1	0,08 \pm 0,003	0,06 ^{ab}	0,11 \pm 0,011	0,08 ^a
A2	0,10 \pm 0,019	0,07 ^{ab}	0,08 \pm 0,009	0,05 ^{ab}
A3	0,08 \pm 0,002	0,07 ^{ab}	0,10 \pm 0,013	0,06 ^{ab}
A4	0,08 \pm 0,009	0,06 ^{ab}	0,08 \pm 0,006	0,07 ^{ab}
A5	0,06 \pm 0,001	0,06 ^b	0,06 \pm 0,001	0,05 ^b
P1	0,11 \pm 0,017	0,08 ^{ab}	0,10 \pm 0,016	0,05 ^{ab}
P2	0,10 \pm 0,014	0,06 ^{ab}	0,12 \pm 0,023	0,06 ^{ab}
P3	0,11 \pm 0,008	0,08 ^{ab}	0,09 \pm 0,007	0,06 ^{ab}
P4	0,12 \pm 0,027	0,07 ^{ab}	0,08 \pm 0,012	0,05 ^{ab}
P5	0,07 \pm 0,008	0,05 ^b	0,13 \pm 0,039	0,07 ^{ab}

Legenda: Kruskal Wallis- Medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$);
Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

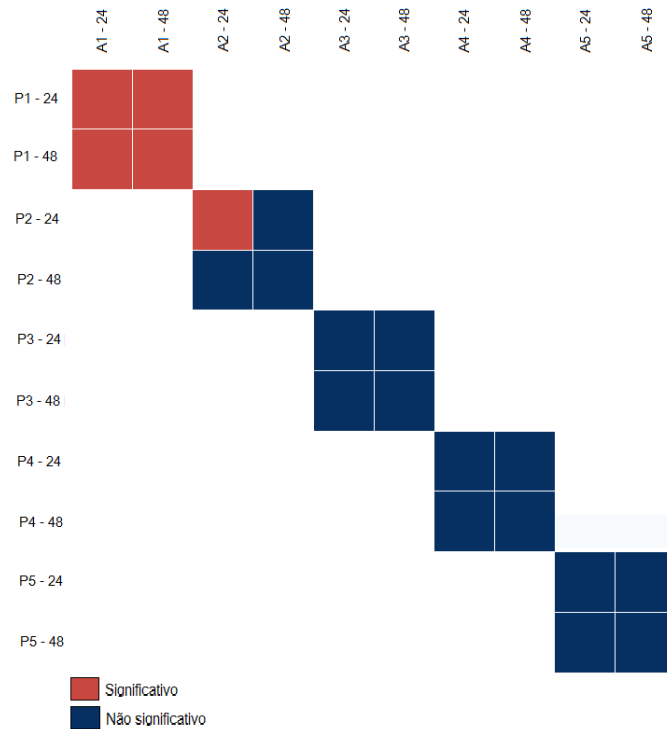
Através desta análise estatística também é possível observar que as proporções medianas de células em divisão de *P. taeda* não diferenciaram-se entre si, ou seja, estatisticamente todas as concentrações de glifosato e formaldeído e entre os períodos de exposição apresentaram semelhanças significativas em relação a proporção de células em divisão, concluindo desta forma que os tratamentos e os períodos de exposição não influenciam na quantidade de células em divisão para a espécie.

O controle negativo de *A. cepa* com período de exposição de 48 horas apresentou as maiores proporções de células em divisão e diferenciou-se significativamente do controle positivo, que apresentou as menores proporções. Entretanto, esses tratamentos não se diferenciaram dos demais. Para *A. cepa* é possível concluir que para essa espécie, a concentração e o tempo de exposição do controle positivo foram suficientes para influenciar e inibir proporcionalmente a frequência de células em divisão, o que não foi observado em *P. taeda*.

Dentre as células que progrediram para o processo de divisão celular, como já abordado, há as que apresentam algum tipo de anormalidade cromossômica, no qual é analisado através do mesmo ranqueamento aplicado à proporção de células anormais observadas em todas

as fases da divisão celular, ou seja, com a presença de algum tipo de anormalidade cromossômica em alguma fase da divisão celular, apresentado na figura 20.

Figura 20 – Comparação aos pares de similaridade da proporção de células com algum tipo de anormalidade cromossômica entre os diferentes tratamentos submetidos a *Pinus taeda* e *Allium cepa*.



Legenda: Significativo – Diferença estatística ($p < 0,05$); Não Significativo – Sem diferença estatística ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

É possível observar um número maior de testes com diferença significativa, sendo que o controle negativo em *A. cepa* e *P. taeda* divergiram estatisticamente entre si, ou seja, o controle negativo assim como o período de exposição resulta em diferenças entre as espécies, como observado na tabela 8 na qual o controle negativo de *P. taeda* apresentou menores proporções de células anormais que *A. cepa*. Valores diferentes foram encontrados por Oliveira, Voltolini e Barbério (2011), $12,13 \pm 1,83$ células com alguma anormalidade cromossômica para o controle negativo em *A. cepa*, os quais analisaram a citogenotoxicidade de poluentes da água de rios. Entretanto, esta diferença entre as médias pode ser minimizada devido a metodologia utilizada pelo autor ser de pelo menos 72 horas de exposição, e neste trabalho observou-se $1,12 \pm 0,4$ células anormais para 24 horas e $1,45 \pm 0,1$ células anormais para 48 horas.

Também é possível observar que o tratamento com 5 $\mu\text{L/L}$ de glifosato por 24 horas com *A. cepa* também foi estatisticamente diferente do mesmo tratamento e período de exposição com *P. taeda*, evidenciando assim que *A. cepa* foi mais influenciado pelo agroquímico neste tratamento, apresentando maior proporção de células com anormalidades cromossômicas. Entretanto não diferenciou-se do período de exposição de 48 horas com *P. taeda*, concluindo assim que este período de exposição não difere para as espécies.

Tabela 8 – Média, desvio padrão e mediana da proporção de células com algum tipo de anormalidade cromossômica entre os respectivos tratamentos e períodos de exposição para ambas espécies, *Allium cepa* e *Pinus taeda*.

Tratamento	24 horas		48 horas	
	Média \pm Desv. Padrão	Mediana	Média \pm Desv. padrão	Mediana
A1	0,026 \pm 1,3E-03	0,02 ^c	0,041 \pm 2,1E-03	0,03 ^{abcd}
A2	0,040 \pm 1,6E-03	0,03 ^{abc}	0,042 \pm 2,5E-03	0,02 ^{abcd}
A3	0,052 \pm 1,1E-02	0,04 ^{ab}	0,063 \pm 1,1E-02	0,03 ^a
A4	0,042 \pm 2,3E-03	0,03 ^{abc}	0,045 \pm 2,5E-03	0,04 ^{ab}
A5	0,039 \pm 6,9E-04	0,04 ^{ab}	0,035 \pm 8,3E-04	0,03 ^{abcd}
P1	0,013 \pm 6,9E-03	0,00 ^{ef}	0,004 \pm 7,4E-03	0,00 ^f
P2	0,035 \pm 4,3E-03	0,00 ^{de}	0,040 \pm 6,5E-03	0,01 ^{cde}
P3	0,056 \pm 5,4E-03	0,02 ^{abcd}	0,045 \pm 4,7E-03	0,02 ^{bcd}
P4	0,079 \pm 2,2E-02	0,03 ^{ab}	0,042 \pm 4,0E-03	0,02 ^{bcd}
P5	0,050 \pm 6,9E-03	0,03 ^{abc}	0,084 \pm 2,8E-02	0,03 ^{abc}

Legenda: Kruskal Wallis- Medianas seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); Classificação dos tratamentos exposto no item 3.2.

Fonte: Autor (2019).

Através da estatística descritiva apresentada na tabela 8 é possível observar que a proporção de células com anormalidades cromossômicas para *P. taeda* com período de exposição de 24 horas é inferior nos tratamentos de 0 e 5 $\mu\text{L/L}$ de glifosato, referentes a P1- 24 e P2- 24, respectivamente, diferenciando significativamente entre as maiores proporções referentes aos tratamentos de 10 $\mu\text{L/L}$ de glifosato e o controle positivo, referente a P4- 24 e P5- 24. Em relação ao período de exposição de 48 horas, a menor proporção foi observada no controle negativo, referente a P1- 48, diferenciando de todos os outros tratamentos, sendo que a maior frequência foi observada no controle positivo. Para *P. taeda* houve uniformidade entre os tratamentos e a frequência de células com anormalidades cromossômicas, conforme há uma

relação proporcional ao aumento da concentração do glifosato e formaldeído com a frequência de anormalidades observadas.

Já *A. cepa* apresentou as menores frequências de células anormais no período de exposição de 24 horas no controle negativo, que diferenciou-se do tratamento com 7,5 µL/L de glifosato e o controle positivo, que apresentaram as maiores frequências, concluindo que para este período de exposição há influência dos tratamentos na proporção de células com anormalidades cromossômicas. Já para o período de 48 horas não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, significando que para este período não há diferença estatística ocasionada pelos tratamentos.

Através destes resultados, é possível observar que para testes de citogenotoxicidade *A. cepa* apresenta uma proporção de células em divisão celular muito semelhante a que ocorre com *P. taeda*, havendo influência do glifosato e formaldeído sobre ambas espécies. No entanto, *A. cepa* parece apresentar o ciclo celular inibido pelo glifosato, enquanto *P. taeda* não. Além disso, a frequência de células em divisão com algum tipo de anormalidade aumentou conforme a ampliação da concentração dos agentes testados, diferente do observado para *A. cepa* em diversos tratamentos. É possível concluir que a influência do glifosato sobre os processos de divisão celular das espécies utilizadas como modelo, ocorre mediante inibição do processo de divisão celular em *A. cepa*, possivelmente pela fase G2 da intérfase, o que explica as observações de células em processo de morte celular comentadas no tópico anterior observadas nessa espécie. Também foi possível observar que o glifosato interfere na normalidade do processo mitótico, conforme exposto em itens anteriores, possivelmente pela interação que ocorre com estruturas formadoras do fuso mitótico, que prejudica a finalização do processo de divisão celular.

5 CONCLUSÃO

Os bioensaios com *Pinus taeda* L. apresentaram ser excelentes avaliadores para testes de citogenotoxicidade, apresentando características muitas vezes superiores a *Allium cepa*, espécie modelo já reconhecida, principalmente quando relacionado aos tipos de anormalidades cromossômicas, podendo ser reconhecido como espécie viável para modelo para teste de citogenotoxicidade.

Devido ao porte reduzido das sementes de *P. taeda* há uma facilidade com o manuseio, as lâminas são de fácil confecção por apresentarem meristemas maiores que favorecem até a dissecação da coifa, facilitando o processo de montagem das lâminas. Em relação a aspectos citogenéticos, *P. taeda* apresenta um maior número de cromossomos com comprimentos maiores quando comparados a *A. cepa*, favorecendo a localização das células na lâmina, a contagem, a visualização e identificação das fases da divisão celular, além das anormalidades cromossômicas. As desvantagens do uso de *P. taeda* L são que suas sementes necessitam de superação da dormência para início dos testes, o que acrescenta uma etapa ao processo de confecção do bioensaio, além disso, o período de emissão das radículas é superior e o número de radículas/ semente ou bulbo é menor em comparação a *A. cepa*.

As análises demonstraram que as principais anormalidades encontradas em radículas expostas ao glifosato foram de origem clastogênica (pontes cromossômicas, cromossomos fragmentados e micronúcleos) e principalmente aneugênicas (cromossomos desorientados, cromossomos perdidos, anáfase multipolar e stickiness cromossômicos). Também foi observado um anel cromossômico em *P. taeda* e morte celular em *A. cepa*.

O índice e atividade mitótica evidenciaram que o glifosato inibe o processo de divisão celular de *A. cepa*, algo que não ocorre em *P. taeda*, mas que, porém, aumenta a frequência e duração das fases de divisão, em especial a prófase. As anormalidades cromossômicas mais frequentes são referentes principalmente a metáfase e anáfase, em sua maioria de origem aneugênica, sendo possível sugerir que os efeitos do glifosato, assim como do formaldeído sobre as espécies, agem em sua maioria sobre a formação do fuso mitótico ou então pela migração dos cromossomos pela célula.

REFERÊNCIAS

- ALVIM, L. B. *et al.* Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, [S. l.], v. 6, n. 2, p.255-265, ago. 2011. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.198>.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; RODRIGUES SANTOS, T. C. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Revista Química Nova**, [S. l.], v. 25, n.4, p. 589-593, 2002.
- ANDRIOLI, N. B.; WULFF, A. F.; MUDRY, M. D. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazol. **Theoria**, Chillán, v. 15, n. 2, p. 9-16, 2006.
- ANVISA. **Consulta Pública nº 84 de 31 de outubro de 2003**. Disponível em: <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B5780-1-0%5D.PDF>. Acesso em: 04 maio 2017.
- ARDUINI, I.; GODBOLD, D. L.; OTINIS, A. Cadmium and copper change root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* seedlings. **Physiologia Plantarum**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 675-680, 1994.
- ARNAIZ, R. R. **Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos**. 1995. Disponível em: bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html. Acesso em 18 de maio de 2017.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 444-447, jul/ set. 2007.
- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, [S. l.], v. 20, n. 4, p.927-935, fev. 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0602-8>.
- BCRJ. **Testes de Citotoxicidade**. Disponível em: <http://bcRJ.org.br/servicos/testes-de-citotoxicidade/>. Acesso em 03 de maio de 2017.
- BELOUSOV, M.; MASHKINA, O.; POPOV, V. Cytogenetic response of Scots pine (*Pinus sylvestris* Linnaeus, 1753) (Pinaceae) to heavy metals. **Comparative Cytogenetics**, [S. l.], v. 6, n. 1, p.93-106, mar. 2012. <http://dx.doi.org/10.3897/compcytogen.v6i1.2017>.
- BEZERRA, C. M.; SILVA OLIVEIRA, M. A. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Electronic Journal of Pharmacy**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 220-228, dez. 2016. <https://doi.org/10.5216/ref.v13i4.36887>
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. **Ciência Florestal**, [S. l.], v. 15, n. 3, p.241-248, set. 2005. <http://dx.doi.org/10.5902/198050981861>.
- BOLOGNESI, C. *et al.* Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 45, n. 5, p.1957-1962, mai 1997. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9606518>.

BOMBAIL, V. *et al.* Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. **Chemosphere**, [S. l.], v. 44, n. 3, p.383-392, jul. 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(00\)00300-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00300-3).

BRASIL. **Instruções para análises de sementes de espécies florestais**. MAPA/SDA, Brasília, 2013, 98 p.

BRASIL. **Regras para análise de sementes**. MAPA/ACS, Brasília, 2009, 399 p.

BUTORINA, A. K. *et al.* Cytogenetic monitoring of the Usmansky and Khrenovskoy autochthonic pine stands. **Biology Bulletin**, [S. l.], v. 34, n. 4, p.423-426, ago. 2007. <http://dx.doi.org/10.1134/s1062359007040152>.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [S. l.], v. 426, n. 2, p.211-214, mai 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00070-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00070-6).

CAMPAROTO, M. L. *et al.* Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 25, n. 1, p.85-89, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572002000100016>.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, [S. l.], v. 42, n. 3, p.181-189, dez. 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/s0098-8472\(99\)00033-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0098-8472(99)00033-7).

DIMITROV, B. D. *et al.* Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, [S. l.], v. 21, n. 6, p.375-382, set. 2006. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gel044>.

FACHINETTO, J. M. *et al.* Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 17, n. 1, p.49-54, jan/ mar. 2007.

FAO. **Global Forest Resources Assessment**. FAO, Rome, 2015, 253 p.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, [S. l.], v. 102, n. 1, p.99-112, mar. 1985. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>.

FOWLER, A. J. P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Embrapa Florestas, Colombo, 2000, 27 p.

GADANO, A. *et al.* In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], v. 81, n. 1, p.11-16, jun. 2002. [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00418-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00418-4).

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, [S. l.], v. 99, n. 3, p.273-291, nov. 1982. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1110\(82\)90046-x](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-x).

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p.13-16.

GROFF, A. A. **O Tabaqui (*Colossoma macropomum*) e o Pirarucu (*Arapaima gigas*) como organismos bioindicadores do efeito genotóxico da radiação ultravioleta (UVA e UVB)**. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, UFRGS, Porto Alegre, 2008.

GROVER, I. S. *et al.* Genotoxic Effects of Some Organophosphorous Pesticides – *In vivo* Chromosomal Aberration Bioassay in Root Meristems of *Allium* and *Hordeum*. **Citology**. [S. l.], v. 53, n.9, p. 181 -191, 1990.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. FUNPEC, São Paulo, 2002. 131p.

HAUSCHILD, M. Z. Chromium content of leaves reveals chromium(III)-stress of higher plants before sensitive biomarkers do. **The Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 134, n.1, p.1345-1352, jan. 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697\(05\)80141-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0048-9697(05)80141-x).

HESS, S.C.; NODARI, R. **CONTAMINANTES NA ÁGUA DE ABASTECIMENTO PÚBLICO.**, 2015. 19 p. Disponível em: <https://www.defensoria.sp.def.br/dpesp/Repositorio/23/Documentos/Santo%20Andre%20agua%20parecer%20Sonia%20Hess%2003%20outubro.pdf>. Acesso em 09 de abril de 2019.

IGANCI, J.R.V. *et al.* Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p.79-82, jan/ mar. 2006.

KIER, L. D.; KIRKLAND, D. J. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. **Critical Reviews In Toxicology**, [S. l.], v. 43, n. 4, p.283-315, mar. 2013. <http://dx.doi.org/10.3109/10408444.2013.770820>.

KNOLL, M. F. *et al.* Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p.539-542, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572006000300024>.

KOLLING, D. J. *et al.* **Padronização *in vitro* da técnica do micronúcleo em células vero para detecção de genotoxicidade**. 58ª Reunião Anual da SBPC – Florianópolis/SC, 2006.

KRUGER, R. A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Qualidade Ambiental, Universidade Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, [S. l.], v. 682, n. 1, p.71-81, jul. 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>.

LI, A. P.; GRANDES, T. J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. **Fundamental and Applied Toxicology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 537-546, abr. 1988. [http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590\(88\)90300-4](http://dx.doi.org/10.1016/0272-0590(88)90300-4).

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, [S. l.], v. 117, n. 1, p. 23-29, ago. 1992. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.1992.tb00003.x>.

MA, T. *et al.* The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, [S. l.], v. 334, n. 2, p.185-195, abr. 1995. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1).

MAÑAS, F. *et al.* Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 72, n. 3, p.834-837, mar. 2009a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.09.019>.

MAÑAS, F. *et al.* Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p.37-41, jul. 2009b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>.

MARIANI, C. F. **Ecotoxicologia**. Depto. Ecologia- USP. Disponível em: http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=143&Itemid=419 >. Acesso em 18 de maio de 2017.

NOLDIN, V.F. *et al.* Composição química e atividade biológica de *Cynara scolymus* L. cultivada no Brasil. **Química Nova**, [S. l.], v.26, n.3, p.331-334, 2003.

PRUS-GŁOWACKI, W. *et al.* Effects of heavy metal pollution on genetic variation and cytological disturbances in the *Pinus sylvestris* L. population. **Journal of Applied Genetics**, [S. l.], v. 47, n. 2, p.99-108, jun. 2006. <http://dx.doi.org/10.1007/bf03194607>.

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

RANK, J. *et al.* Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, [S. l.], v. 300, n. 1, p. 29-36, jun. 1993. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(93\)90136-2](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(93)90136-2).

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. A célula vegetal e o ciclo celular. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. Cap. 3. p. 39-76.

SANTANA, D. A. *et al.* Efeito citogenotóxico do conteúdo de atratores luminosos em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 107-114, 2018.

SAX, H. J.; SAX, K. Chromosome number and morphology in the conifers. **Journal of the Arnold Arboretum**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 356-375, out. 1933.

SBS. **Fatos e números do Brasil Florestal**. SBS, São Paulo, 2007, 106 p.

SILVA, A. F. *et al.* Composição florística e grupos ecológicos das espécies de um trecho de floresta semidecídua subMontana da Fazenda São Geraldo, Viçosa-MG. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 27, n. 3, p. 311-319, mai/ jun. 2003.

STURBELLE, R. T. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 409 -415, jun/ jul. 2010.

TEIXEIRA, R. O. *et al.* Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, [S. l.], v. 26, n. 4, p.551-555, dez. 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-47572003000400021>.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [S. l.], v. 626, n. 1-2, p.4-14, jan. 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>.

VICENTINI, V. E. P. *et al.* *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: **medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems**. Maringá, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001.

VIEIRA, D.; VICENTINI, V. E. P. Estudo do efeito mutagênico da floxacina em *Allium cepa*. **Genetics Molecular Biology Supplement**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 115-115, 1997.

YÜCEL, E. *et al.* The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of Anatolian Black Pine (*Pinus nigra* ssp. *pallasiana*). **Biological Diversity And Conservation**, [S. l.], v. 2, n. 1, p.124-129, 2008.
