

**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 13 (3)

March 2020

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/1332020823>

Article link

<http://sea.ufr.edu.br/index.php?journal=SEA&page=article&p=view&path%5B%5D=823&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discoursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico das células radiculares do alho (*Allium sativum* L.) após exposição em solução contaminante

### Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effect of the garlic cells (*Allium sativum* L.) after exposure in contaminant solution

L. P. N. Ramos, L. S. D. Nascimento, J. dos S. Lima, C. B. M. Farias, V. dos S. de Mello, I. V. Karsburg

Universidade do Estado de Mato Grosso - Campus Alta Floresta

Author for correspondence: [leila\\_pereiramos@hotmail.com](mailto:leila_pereiramos@hotmail.com)

**Resumo.** A contaminação hídrica é muito mais comum do que se imagina, pois nos dias atuais é praticamente impossível que haja um ecossistema que não tenha sofrido de forma direta ou indireta dos seres humanos. Estudos com o objetivo de genotoxicidade e mutagêneses, utilizam bioindicadores como base de realização de testes, os mais utilizados são da família *Allium* ssp.. Quando mencionamos o dano citogenético, a intensidade depende principalmente do grau de exposição, da quantidade, da natureza química e das possíveis combinações entre os contaminantes, também influenciado pelas características e condições do ambiente em que os organismos considerados bioindicadores são submetidos. O presente trabalho possui o objetivo de analisar os efeitos citotóxicos, genotóxico e mutagênicos induzidos por material contaminante que causam alterações cromossômicas por meio da análise de índice mitótico utilizando como bioindicador *Allium sativum* (alho). O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) do Campus de Alta Floresta – MT, o solo foi coletado e armazenado separadamente utilizando 200 gramas de cada amostra com três tratamentos: superfície, 20 cm e 40 cm de profundidade, confeccionando um chá, com 200 ml de água destilada e em seguida a medição do pH. Utilizando método direto onde o bioindicador é submetido diretamente a solução chá, aguardando a emissão de raízes, e o método indireto, onde o bioindicador é submetido primeiramente, a estimulação de formação de raízes por 72 horas e em seguida é submetido a solução contaminante. As leituras das placas para observar o interior da célula, utilizando técnicas de esmagamento, foi realizado em 24, 48 e 72 horas de experimento montado (método indireto) e 24 horas (método direto, medindo também as raízes). Com os resultados, podemos afirmar que, o material utilizado como contaminante (amostra do solo) possui potencial citotóxico e genotóxico no material bioindicador, apresentando potencial elevado na indução do ciclo celular, provocando variadas aberrações cromossômicas.

**Palavras- chave:** Citogenética, cromossomos mitóticos, mutagênese

**Abstract.** Water contamination is much more common than imagined, because it is practically impossible today to have an ecosystem that has not suffered directly or indirectly from humans. Studies with the aim of genotoxicity and mutagenesis use bioindicators as a basis for testing, the most used are from the *Allium* ssp family. When we mention cytogenetic damage, the intensity depends mainly on the degree of exposure, quantity, chemical nature and of the possible combinations between the contaminants, also influenced by the characteristics and conditions of the environment in which the organisms considered bioindicators are submitted. The work had the objective of analyzing the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects induced by contaminating material that cause chromosomal alterations through the analysis of mitotic index using as bioindicator *Allium sativum* (garlic). The experiment was carried out at the Laboratory of Cytogenetics and Culture of Vegetable Tissues at the University of the State of Mato Grosso (UNEMAT) at the Alta Floresta Campus - MT. The soil was collected and stored separately using 200 grams of each sample with three treatments: surface, 20 cm and 40 cm deep, making a tea with 200 ml of distilled water and then measuring the pH. Using a direct method where the bioindicator is submitted directly to the tea solution, awaiting the emission of roots, and the indirect method, where the bioindicator is submitted first, the stimulation of root formation for 72 hours and then is submitted to contaminating solution. The plates were read in 24, 48 and 72 hours of experiment (indirect method) and 24 hours (direct method, also measuring the roots) to observe the interior of the cell using crushing techniques. With the results, we can affirm that the material used as pollutant (soil sample) has a cytotoxic and genotoxic potential in the bioindicator material, presenting high potential in the cell cycle induction, provoking various chromosomal aberrations.

**Keywords:** Cytogenetics, mitotic chromosomes, mutagenesis

## Introdução

Atualmente é praticamente impossível que haja um ambiente que não tenha sofrido de forma direta ou indireta alterações por parte dos seres humanos. Grande parte dos problemas de saúde incluindo tipos de câncer, são atribuídos à presença de muitos contaminantes presentes no meio ambiente e na água (BARBÉRIO et al., 2009).

Todos os dias soluções contaminantes são despejadas no ambiente de forma irracional. Segundo Egito et al. (2007) resíduos industriais e agrícolas são lançados indiscriminadamente nos cursos d'água, acrescentando vários contaminantes às águas superficiais e sedimentos.

Em relação a avaliação, monitoramento e detecção de contaminantes no ambiente vários bioindicadores tem sido utilizado rotineiramente em vários laboratórios como forma de detecção de alterações no comportamento celular, sendo esse a alface (*Lactuca sativa* L.), cebola (*Allium cepa* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), e alho (*Allium sativum* L.).

De acordo com Younes (2000), bioindicadores são definidos como componentes biológicos, células, processos bioquímicos, estruturas e funções biológicas, alteradas quando em contato com compostos xenobióticos.

Os ensaios realizados com bioindicadores vegetais, por sua vez são considerados mais sensíveis e simples, mostram que a utilização desses bioindicadores são considerados eficientes para o estudo da genotoxicidade de poluentes da água e do solo (GRANT, 1999; MA, 1999). E quando expostos a contaminantes há atividade denominada mutagênica de compostos químicos e utilizam vegetais como: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana* e *Hordeum vulgare* (FISKEJÖ & LEVAN, 1994).

Além disso, quanto maior a concentração substâncias contaminantes e maior período de tempo de exposição, aumentam as chances dos impactos negativos, e quando um estresse dura tempo suficiente para levar à morte uma população de organismos, afetando as taxas de crescimento e de reprodução e impedindo o recrutamento de novas espécies, ela é então capaz de alterar a estrutura da comunidade (AGROFIT, 2009).

Quando há ação de moléculas contaminantes, podem ser compostas por moléculas com poder oxidante que podem formar radicais livres nos sistemas biológicos (LUZ et al., 2003), que por sua vez, são moléculas altamente instáveis, que podem reagir com as estruturas celulares modificando a estrutura de lipídios e proteínas de membrana, alterando a permeabilidade da célula (ANDRADE Jr., 2005), com essas alterações de grande importância para o estudo da genotoxicidade, que podem chegar ao núcleo celular e atingir a dupla fita de DNA e podendo causar danos no desenvolvimento do DNA, os quais podem desencadear graves problemas à saúde humana e

alterações irreversíveis ao meio ambiente (FERREIRA, 1997).

Quando mencionamos o dano citogenético, a intensidade depende principalmente do grau de exposição, da quantidade, da natureza química e das possíveis combinações entre os contaminantes, também influenciado pelas características e condições do ambiente em que os organismos considerados bioindicadores são submetidos.

Como mencionado anteriormente, Carvalho (2009) menciona que a caracterização citogenética tem proporcionado resultados importantes aos melhoristas sobre a diversidade genética de acessos presentes em bancos de germoplasma de diversas culturas, pois essas análises permitem a realização de mapeamento físico cromossômico e identificar polimorfismos cromossômicos numéricos e estruturais dentro e entre os cariótipos (GUERRA, 2000).

Para estudo cromossômico no melhoramento de plantas, a citogenética é uma ferramenta na caracterização da diversidade dos recursos genéticos, utilizando como corante Giemsa é um dos mais empregados, junto com a orceína acética, quando o objetivo é o estudo dos cromossomos metafásicos, que são corados por igual sem nenhuma preferência por determinado tipo de cromatina, composição de DNA ou de proteínas (GUERRA; SOUZA, 2002), mas também permite observar o tipo de núcleo interfásico e o padrão de condensação na prófase.

Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito citotóxico e genotóxico induzidos pela solução contaminante de solo, por meio do sistema teste (*A. sativum*) como bioindicador, verificando os danos causados em células meristemáticas radiculares.

## Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Citogenética e Cultura de Tecidos Vegetais na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT) do Campus de Alta Floresta - MT, localizado no Bairro Jardim Flamboyant. As amostras de solo foram coletadas em três diferentes níveis de profundidades: superfície, 20 cm e 40 cm no município de Alta Floresta - MT, com as coordenadas de Sul: "09°51'16.1316" "Oeste:56°3'39.7872".

O solo foi coletado em três profundidades diferentes: superfície, 20 cm e 40 cm de profundidade, essa profundidade foi determinada tratamento, em seguida foram armazenados e devidamente identificados e etiquetados. Para o experimento foram pesados 200 gramas de cada tratamento, em balança de precisão, logo em seguida adicionou-se 200 ml de água destilada, realizou-se a peneiração para retirada de solo de maior granulidade, com o objetivo de se obter uma solução aquosa (Figura 01). O índice hidrogeniônico (pH) foi aferido para todas as amostras.

Foram realizados três tratamentos, com oito repetições, com controle negativo e positivo. O bioindicador (alho), em cada tratamento e repetição, foram colocados em contato com a solução aquosa do solo em copos plásticos descartáveis de 50 ml por 24, 48 e 72 horas, sendo coletadas as radículas com aproximadamente 5-10 mm de comprimento de cada horário referenciado e fixadas em etanol-ácido acético (3:1) Posteriormente, foram conservadas no refrigerador até o uso.

O experimento utilizou dois métodos, o direto e o indireto. Para o método indireto, o bioindicador foi colocado para o processo de enraizamento em copos plástico descartáveis de 50ml, por três dias, após esse período o material vegetal foi exposto à solução aquosa preparada. Já para o método direto o bioindicador o processo de enraizamento diretamente na solução aquosa preparada com o solo. No momento da coleta das raízes utilizando este método (72h) as mesmas foram cortadas e medidas utilizando um paquímetro digital para a comparação de crescimento das raízes entre os tratamentos.

A análise citogenética foi realizada segundo a técnica de esmagamento (GUERRA & SOUZA, 2002), hidrolisadas em HCl 1N por 15 minutos a 60°C, em seguida foram lavadas em água destilada por 10 minuto cada lavada e coradas com orceína acética 2%.

Os dados de índice mitótico (IM) pelo método indireto foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott em nível de 5% de probabilidade. Enquanto que os dados do índice mitótico (IM) do método direto foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade. As duas análises foram realizadas pelo programa R, versão 3.3.2 (R CORE TEAM, 2016), com o auxílio do pacote ExpDes, versão 1.1.2 (FERREIRA et al., 2013).

## Resultados e discussão

Com a utilização do alho como o bioindicador, foi possível a verificação de eficiência, onde todos

os tratamentos apresentaram algum tipo de alteração nas células do bioindicador, o que pode indicar a existência de substâncias capazes de causarem alterações no organismo, principalmente nos cromossomos destes.

Para este estudo de acordo com a tabela 1 o tratamento 3 de 48 horas no método indireto, apresentou resultado similar ao controle positivo (CP) não diferindo estatisticamente entre si. Demonstrando maior número de células interfásicas. Para o controle positivo deste trabalho utilizou-se o medicamento comercial líquido Paracetamol, pois de acordo com os testes realizados o mesmo inibe a divisão celular. No entanto outros produtos podem serem utilizados como CP. O Tratamento com 24 horas de exposição, tratamento 1 com 48 horas de exposição, controle negativo e tratamento 3 com 72 horas de exposição não há diferença para a variável índice mitótico no método indireto. Para o efeito mutagênico, considerando as células em interfase, os tratamentos com 24 horas de exposição, tratamento 1 com 48 horas de exposição e tratamento 3 com 72 horas de exposição, não apresentavam esse efeito, pois o total de células aberrantes não diferiu do controle negativo.

Fernandes et. al. (2007) utilizou como controle positivo o herbicida trifluralina (0.84 ppm), conhecido por ser um potente indutor de anormalidades mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*.

Alguns estudos indicando a cebola como bioindicador, observa-se que, estudos de sensibilidade entre as plantas superiores têm demonstrado a cebola é mais sensível que outras espécies, como *Vicia faba* (MA et al., 1995). E estudos após a exposição determinado em um período de tempo curto ou longo, a solução podemos avaliar efeitos citotóxicos, utilizando como base a redução do crescimento das raízes ou da diminuição do índice mitótico, e avaliar também os efeitos genotóxico, com análise de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÓ & LEVAN, 1994).

Tabela 01. Números de células em interfase, número de células em divisão normal e índice mitótico (IM) encontrados em raízes de *A. sativum* mantidos em três diferentes tempos de exposição pelo método indireto, analisando 2500 células, com controle negativo e positivo.

Tempos de exposição	Tratamentos	Células em interfase	Células em divisão normal	IM (%)
24	1	913	1455	58,10a
	2	841	1638	65,52a
	3	734	1757	70,28a
48	1	717	1762	70,48a
	2	1665	802	32,08c
	3	1986	245	9,80d
	CN	943	1557	62,28a
72	CP	2490	0,00	0,00d
	1	1843	657	26,28c
	2	1341	1131	45,24b
	3	865	1622	64,88a
CV (%)		32,87		

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de significância.

Podemos observar através dos dados obtidos apresentados na tabela 01, que os valores percentuais de índice mitótico das células em divisão normais do bioindicador, que foram obtidos dos tratamentos com o solo, analisado em diferentes tempos de exposição 24, 48 e 72h. Quando verificamos as raízes, o índice de células em interfase em todos os períodos de exposição do tratamento.

Na tabela 2 podemos observar a porcentagem de células anormais por meio dos tratamentos utilizando o método direto, testando o

bioindicador *A. sativum*. Verificando-se que o tratamento 3 seguido do tratamento 2 obtiveram os maiores índices de células anormais nas fases da prófase e da anáfase.

Bezerra et al. (2016), analisou os efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do infuso de folhas de *Plectranthus barbatus* em diferentes concentrações sobre o ciclo celular de *Allium cepa*, verificou que todos os tratamentos analisados apresentaram diminuição significativa na divisão celular e a diminuição no índice mitótico das células.

**Tabela 2.** Números de células anormais e percentual de anormalidades (PA), encontradas em raízes de *A. sativum* tratados em três diferentes concentrações de solo (superfície, 20 cm e 40 cm) pelo método direto (72 h).

Tratamentos	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	PA
1	0	1	1	0	0	0,08
2	0	7	1	8	1	0,68
3	0	11	2	2	3	0,72

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Com relação à porcentagem de células anormais todos os tratamentos com o método indireto usando o *A. sativum* apresentaram diferença estatística entre si quando comparados aos controles negativo e positivo. É visto que para o tratamento 3 por 48 h e o tratamento 1 por 24 h houve os maiores percentuais de células anormais. Observa-se ainda que houve um grande número de células em anáfase anormais para o tratamento 3 em 48 horas de exposição.

O índice mitótico (IM), apresentado na Tabela 3, corresponde à relação quanto ao número de células em interfase, número de células em divisão normal e índice mitótico (IM) encontrados em raízes de *A. sativum*, tratados com diferentes concentrações de solo contaminado. Observa-se que após 72 horas o tratamento 1 obteve maior valor de índice mitótico (IM) em comparação com os

demais tratamentos, o tratamento 3 obteve o maior número de células com divisões normais e o ponto 1 apresentou os maiores índices de células interfásicas.

De acordo com Faschineto et al. (2007), a ocorrência de um grande número de células interfásicas pode estar relacionado à decorrência antiproliferativa de células mitóticas.

Para este tipo de experimento o teste com *Allium cepa* (cebola comum) também é considerado adequado por oferecerem parâmetros microscópicos que podem ser caracterizadas com evidências de mutações no conteúdo genético celular (MASCHIO, 2009).

O bioindicador *Pisum sativum* também pode ser utilizado, visando à detecção de genotoxicidade (MELLO et al., 2015).

**Tabela 3.** Números de células em interfase, número de células em divisão normal e índice mitótico (IM) encontrados em raízes de *A. sativum* tratados com diferentes concentrações de solo (superfície, 20 cm e 40 cm) pelo método direto.

Tratamentos 72 horas	Número de células em interfase	Número de células em divisão normal	IM (%)
1	2445	53	30,88a
2	2384	99	3,96b
3	1710	772	30,88b
<b>CV (%)</b>		58,02	

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Com relação à porcentagem de células anormais todos os tratamentos com o método indireto usando o *A. sativum* apresentaram diferença estatística entre si quando comparados aos controles negativo e positivo. É visto que para o tratamento 3 por 48 h e o tratamento 1 por 24 h houve os maiores percentuais de células anormais. Observa-se ainda que houve um grande número de células em anáfase anormais para o tratamento 3 em 48 horas de exposição.

Segundo EL SHAHABY et al. (2003), relata que testes com o bioindicador *Allium cepa* cebola, por conta da facilidade e fácil detecção é considerado adequado para detecção de toxicidade e genotoxicidade na avaliação de níveis de poluição ambiental, os quais representam riscos diretos ou indiretos para a população humana. Mas com os dados obtidos nesse trabalho, podemos também afirmar que o *Allium sativum* (alho), também é uma

adequada para a realização de testes para a detecção de toxicidade e genotoxicidade para verificação de poluição ambiental.

Valores de índice mitótico baixo foram encontrados tanto no método direto quanto indireto, isso pode ser explicado porque metais pesados como chumbo (Pb) e cádmio (Cd) diminuem o índice mitótico (IM) e reduzem o número de células em metáfase e anáfase. Adicionalmente, estes metais induzem C-metáfases, aderência cromossômica e pontes cromossômicas (ZHANG; XIAO, 1998; FUSCONI et al., 2006).

**Tabela 4.** Números de células anormais e percentual de anormalidades (PA), encontradas em raízes de *A. sativum* tratados com diferentes concentrações de *A. sativum*, mantidos em três diferentes tempos pelo método indireto.

Tempos de exposição	Tratamentos	Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	PA
24	1	1	41	25	25	40	5,28
	2	0	7	10	0	4	0,84
	3	6	0	2	1	0	0,12
48	1	0	1	7	10	3	0,84
	2	0	9	10	10	4	1,32
	3	16	34	82	107	30	10,76
	CN	0	0	0	0	0	0,00
72	CP	0	2	2	4	2	0,40
	1	0	0	0	0	0	0,00
	2	0	9	9	9	1	1,12
	3	0	1	7	5	0	0,52

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas nas colunas não diferem pelo teste de scott-knott a nível de 5% de significância.

Neste trabalho, foram registradas altas frequências destas alterações, o que indicou que as substâncias presentes neste solo apresentam afinidade de interação com o fuso mitótico.

As anáfases com pontes cromossômicas e os brotos nucleares foram algumas alterações nucleares observadas em todos os horários nas três profundidades. Segundo Salvadori et al. (2003), os brotos nucleares são estruturas semelhantes aos micronúcleos, mas que permanecem ligados ao núcleo principal por uma conexão nucleoplasmática.

Foi observada, pelo teste do micronúcleo (MN) em *Vicia faba*, uma alta indução de micronúcleos na maioria dos sedimentos coletados no rio Tibre na área urbana de Roma e em seus principais tributários, a elevada mutagenicidade detectada nos sedimentos foi atribuída à alta concentração de HPAs e metais, revelado pelas análises químicas (MINISSI et al., 1998).

Elementos-traço são substâncias potencialmente mutagênicas e estão seriamente envolvidos com a poluição ambiental. Alguns elementos-traço induzem, comprovadamente, a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos eventualmente expostos. Os elementos Fe, Se, Cd, Cr e Ni, por exemplo, são encontrados normalmente na alimentação em quantidades baixas, mas, quando em excesso, são considerados mutagênicos e/ou carcinogênicos (MINISSI; LOMBI, 1997; FRIBERG et al., 1985; MATSUMOTO, 2004).

No presente trabalho o solo coletado apresentou os seguintes valores para o pH: superfície – 7,5; 20cm de profundidade – 6,3; 40cm de profundidade – 6,2. Esteves (2011), afirma que a presença de ácidos orgânicos na água, como ácidos húmicos e fúlvicos, encontrados em águas escuras e ricas em substâncias húmicas geralmente apresentam pH abaixo de 7,0. Os valores encontrados podem ser explicados pelo fato do local onde foi coletada a amostra estar em contato direto com substâncias orgânicas, sendo estes dejetos de animais e outros.

Confirmando o que Campos (2009) diz a respeito das principais atividades responsáveis pela

contaminação por elementos-traços em solos e águas são por atividades industriais, agrícolas e urbanas, decorrendo em sérios problemas ambientais.

O despejo de esgoto doméstico *in natura* e de efluentes provenientes do esgoto animal pode representar um risco para os recursos hídricos, uma vez que estas misturas complexas substâncias que podem interagir e agir por sinergismo ou antagonismo, prejudicando toda a biota exposta, além de alterar, drasticamente, a qualidade da água e do solo do córrego. Desta forma, este estudo serve de alerta para os impactos que esses efluentes podem promover sobre os recursos naturais, principalmente quando impactados por substâncias de ação desconhecidas.

### Conclusões

Com os dados obtidos, pode-se afirmar que o material utilizado como contaminante possui potencial citotóxico e genotóxico no material bioindicador, apresentando potencial elevado quando se refere a indução do ciclo celular, provocando variadas aberrações cromossômicas. Com isso, podemos indicar um estudo sobre os compostos presentes na solução contaminante que podem ocasionar os problemas apresentados, indicando também o grau de toxicidade desse solo.

### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

### Referências

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. São Paulo: Agrofit, p. 1 e 2. 2000.  
Disponível em [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons) Acesso em: 09 de setembro de 2018.
- ANDRADE JR., D. R. et al. Os Radicais Livres de Oxigênio. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Rio de Janeiro, v.31, n.1, 2005.

- BARBÉRIO, A.; BARROS, L.; VOLTOLINI, J.C.; MELLO, M.L.S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 837-842, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjb/v69n3/v69n3a10.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2018.
- BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D. & STRIBLING, J.B. 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2a ed. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C.
- BENKO-ISEPPON, A. M. Estudos moleculares e citogenéticos no Caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. EMBRAPA - Documentos 56, p.327- 332, 2001.
- BEZERRA, C. M.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de malva-santa (*Plectranthus barbatus*-lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016.
- BLOCK, E. Garlic and other Alliums: The lore and the science. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. 434p. 2010.
- CAMPOS, C.R. Monitoramento da microbiana e dos parâmetros físico-químico do vinhoto. Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola - Universidade Federal de Lavras, 2009.
- CARVALHO, R.; SILVA, K. V. P.; OLIVEIRA, I. F.; ALVES, A. A. C. Citogenética como ferramenta para o melhoramento genético vegetal: análise mitótica e meiótica em espécies de Manihot. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*, Botucatu, v.5, p.645-650, 2009.
- DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C. M. A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T. M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, D. A. K. Extraction and characterization of carbohydrates present in the garlic (*Allium sativum* L.): proposal of alternative methods. *Food Science and Technology*, Campinas, n. 29, v. 4, p.793-797, 2009.
- EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; DE MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 435-441, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/gmb/v30n2/a23v30n2.pdf>>. Acesso em: 15 set. 2018.
- EL-SHAHABY, A. O. et al. Genotoxicity Screening of Industrial Wasterwater Using the *Allium Cepa* Chromosome Aberration Assay. *Pak. Journ. Biol. Sci.*, Baltimore, v. 42, n. 6, p. 181-189, Dec. 2003.
- ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.
- FASCHINETO, J. M.; BAGATINI, M. D.; DURIGON, J.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Efeito antiproliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v. 17, p. 49-54, 2007.
- FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.
- FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais Livres: Conceitos, Doenças Relacionadas, Sistema de Defesa e Estresse Oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p. 61-68, Jan. 1997.
- FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. ExpDes: Experimental Designs package. R package version 1.1.2. 2013.
- FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the Firstten MeIC Chemicals in the *Allium cepa*. *Atlas*, New York, v. 21, p.139 – 149, Dec. 1994.
- FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. Handbook on the Toxicology of Metals. Amsterdam: 2ed, 1985.
- FRITSCH, R. M.; BLATTNER, F. R.; GURUSHIDZE, M. New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel) Rouy (Alliaceae) based on molecular and morphological characters. *Phyton*, v. 49, p.45-220, 2010.
- FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS GAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, v.58, p.253–260, 2006.
- GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. *Mutation Research*, Orlando, v. 99, n.3, p. 273 -29, Sep. 1982.
- GRANT, W. F. Higher Plant Assays for the Detection of Chromosomal Aberations and Gene Mutations – a Brief Historical Background on Their Use for Screening and Monitoring Environmental Chemicals.

- Ramos et al. Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico das células radiculares do alho (*Allium sativum* L.) após exposição em solução contaminante  
Mutation Research, Orlando, v. 426, n.6, p. 107 - 112, 1999.
- GREGER, M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. Heavy Metal Stress in Plants. India: Springer. p.1-12, 2004.
- GUERRA, M. Patterns of heterochromatin in plant chromosomes. Genetics and Molecular Biology, v. 23, n. 4, p.1029-1041, 2000.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. de. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 201, 2002.
- KONVICKA, O.; LEVAN, A. Chromosome studies in *Allium sativum*. Hereditas, v. 72, p.129-148, 1972.
- LEVAN, A. Cytological studies in *Allium*, VI - the chromosome morphology of some diploid species of *Allium*. Hereditas, XX, 1932.
- LEVAN, A.; K. FREDGA; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, v. 52, p. 201-220, 1964.
- LIJTEROFF, R., LIMA, L., PRIERI, B. Uso de líquenes como bioindicadores de contaminação atmosférica em la ciudad de San Luis, Argentina. San Luis, v.3. n.1, p.3-6, 2008.
- LUZ, N. B.; SANTOS, H. P.; MELO, G. W. Avaliação da Resposta Espectral de Folhas de Aveia Preta (*Avena Strigosa*) Cultivadas em Diferentes Solos da Serra Gaúcha, com Adição de Cobre e Matéria Orgânica. In: ANAIS DO SBSR, 11, 2003, Belo Horizontes. Resumos. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 2343-2349. 2003.
- MA, T. H. et al. The Improved *Allium/Vicia* Root Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental Pollutants. Mutation Research, Orlando, v. 334, n.5, p. 185 -195, 1995.
- MATSUMOTO, S.T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. Tese de Doutorado em Genética, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 216p. 2004.
- MELLO, V. dos S. de.; MIRANDA, D. P.; SILVA, D. D. da. MACHADO, D.; SILVA, A. B. da.; DAHMER, N.; KARSBURG, I. V. Efeito Genotóxico de Lico Pirolenhoso de Teca pelo Bioindicador Ervilha. Estudos, v. 41, p. 141-146, 2015.
- MINISSI, S; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 393, n. 1, p. 17-21, 1997.
- MOTA, J. H.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M. Evolução da produção de alho no período de 2000 a 2010. Revista Nosso Alho. Distribuição gratuita da ANAPA, n. 15, p.41-43, 2012.
- MUKHERJEE, A.; ROY, S. C.; Karyotype analysis of five species of *Allium*. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences, v. 2, p.374-383, 2012.
- PEREIRA, T. N. S. Germoplasma: conservação, manejo e uso no melhoramento de plantas. 1ª edição. Viçosa, MG: editora Arca. 250p. 2010.
- PRIMACK, R.B; RODRIGUES, E. Biologia da conservação. 10.ed. Londrina: Planta, 2010.
- PUIATTI, M.; Ferreira, F. A. Cultura do alho. In: FONTES, P. C. R. (Ed.). Olericultura: teoria e prática, Viçosa: Suprema, p. 299-322. 2005.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2016.
- RICKLEFS, R.E. A Economia da Natureza. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- ROA, F. Citotaxonomia molecular do gênero *Callisia Loeffl.* (Commelinaceae). Dissertação de Mestrado (Biologia Vegetal) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 60p. 2007.
- SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.; MARQUES, E.K. (Org.). Mutagênese Ambiental. Canoas: ULBRA, 2003. p.201-223.
- SILVA, K. M. P.; LEITE, R. S. A.; RESENDE, F. V. Cultivares de alho comum para sistemas orgânicos de produção nas condições do cerrado. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 26, n. 2, 2008.
- TRANI, P. E.; TAVARES, M.; SIQUEIRA, W. J.; SANTOS, R. R.; BISÃO, L. G.; LISBÃO, R. S. Cultura do alho: recomendações para seu cultivo no estado de São Paulo. Boletim técnico 170, CDD 635.262. Campinas, Instituto Agrônomo, 39p. 1997.
- VAVLIOV, N. I. Centro de origem das plantas cultivadas. Jaboticabal: Funep, 1992.
- YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Food Chemistry. Toxicology. Philadelphia, v.38. 2000.

**Ramos et al.** Avaliação do efeito citotóxico e genotóxico das células radiculares do alho (*Allium sativum* L.) após exposição em solução contaminante

ZHANG, Y., XIAO, H. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutation Research*, Amsterdam, v.420, p.1-6, 1998.