



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA
AMAZÔNIA- CITA**

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE
E MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DO IGARAPÉ JUDIA
NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

HÉMILLY CAROLINE DA SILVA PAIXÃO

RIO BRANCO, AC

MARÇO/2020

HÉMILLY CAROLINE DA SILVA PAIXÃO

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DO IGARAPÉ JUDIA NO
MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti

Co-orientadores: Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva

Profa. Dra. Cydia de Menezes Furtado

RIO BRANCO, AC

MARÇO/2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E
TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E
MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DO IGARAPÉ JUDIA NO
MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL

HÉMILLY CAROLINE DA SILVA PAIXÃO

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30 DE MARÇO DE 2020

Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti
Presidente da Banca - Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. Leandro José Ramos
Membro Externo - Universidade Federal do Acre

Prof. Dr. Renato Abreu Lima
Membro Externo – Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

A Jesus, meu querido amigo, que me ama com um amor imensurável, reaviva os meus sonhos, sara as minhas feridas, acredita em mim e sempre me leva mais além.

À minha mãe Tereza, o meu melhor presente, por me conceder todo amor, dedicação, instrução, cuidado e inspiração todos os dias.

Às minhas irmãs Jomara, Thuanne e Daniela por serem minhas melhores amigas.

Aos meus sobrinhos João, Julia e Pedro por serem a alegria da nossa casa.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia, da Universidade Federal do Acre, pela oportunidade de incorporar-me e desenvolver-me nesse curso de pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti, meu orientador, que sempre teve paciência, entusiasmo e dedicação em me ensinar, corrigir e mostrar o caminho. Estar sob sua orientação foi uma honra.

Ao meu colega de pesquisa, Sergio Luiz Prolo Júnior, por sempre estar disposto em compartilhar conhecimentos e me auxiliar durante todo o processo.

Ao Técnico de Laboratório da UTAL, Osmar da Silva Torres, por ser meu companheiro em todas as coletas, pelo entusiasmo, cooperação e assistência dedicada.

À Profa. Dra. Clarice Maia Carvalho, coordenadora do PPG-CITA, por toda orientação e apoio. E a todos os demais docentes do programa, os meus sinceros agradecimentos.

Ao LABMULTI (Laboratório Multifuncional) e ao LABMEDT (Laboratório de Medicina Tropical) da Universidade Federal do Acre por fornecer o espaço, os equipamentos, o aprendizado e as melhores companhias para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Romeu Paulo Martins e à Prof. Dr. Cydia de Menezes Furtado, meus coorientadores, por todo o apoio.

Aos professores que participaram da qualificação e defesa e contribuíram com este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação Nacional de Saúde – FUNASA, pelo financiamento.

RESUMO

Os seres vivos que se abastecem de água contaminada, além de estarem sujeitos a diversas doenças, estão expostos a riscos de potencial genotóxico, caracterizado por qualquer tipo de dano à molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA). O igarapé Judia, situado na região do segundo distrito da cidade de Rio Branco, apresenta perda da mata ciliar e notável poluição das suas águas devido lançamento de diversos efluentes que alcançam seu leito e foz, frequentemente, sem um prévio tratamento. O presente estudo teve como objetivo geral avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do igarapé Judia no município de Rio Branco, Acre, comparando os períodos chuvoso e estiagem. A pesquisa também descreveu as principais técnicas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade e os principais procedimentos para análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos utilizando o sistema de teste *Allium cepa*, através de revisões de literatura. Na análise laboratorial foram coletadas 11 amostras de água do Igarapé Judia em dois períodos do ano, chuvoso (dezembro) e estiagem (Junho). Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação, aplicando-se 3 ml das amostras e posteriormente foram preparadas lâminas para análise microscópica. No período de estiagem, os pontos 3, 4, 6 e 9 foram significantes em relação à nascente ao expressarem, os maiores índices mitóticos. O Ponto 6 representou a única amostra significativa com maior número de aberrações cromossômicas no período de estiagem em relação ao período chuvoso. Quanto à mutagenicidade, foi constatado que os pontos 6, 7, 8, 9 e 10 apresentaram aumento significativo do número de micronúcleos no período de estiagem em comparação ao período chuvoso. Os dados deste estudo sugerem a existência de agentes contaminantes no igarapé Judia com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *A. cepa*.

Palavras-chave: biomonitoramento; ecotoxicologia; *Allium cepa*; poluição ambiental.

ABSTRACT

Living beings that supply contaminated water, in addition to being subject to various diseases, are exposed to risks of potential genotoxicity, characterized by any type of damage to the molecule of deoxyribonucleic acid (DNA). The Judia stream, located in the region of the second district of the city of Rio Branco, presents loss of riparian forest and remarkable pollution of its waters due to the release of various effluents that reach its bed and mouth, often without prior treatment. The present study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential of the waters of the Judia stream in the municipality of Rio Branco, Acre, comparing the rainy and dry periods. The research also described the main techniques for performing the micronucleus test in genotoxicity analyzes and the main procedures for mutagenic analysis of surface waters of Amazonian rivers using the *Allium cepa* test system, through literature reviews. In the laboratory analysis, 11 water samples were collected from Judia stream in two periods of the year, rainy (December) and drought (June). *A. cepa* seeds were submitted to germination, 3 ml of samples were applied and slides were prepared for microscopic analysis. In the dry season, points 3, 4, 6 and 9 were significant in relation to the spring when expressing the highest mitotic indices. Point 6 represented the only significant sample with the highest number of chromosomal aberrations in the dry season compared to the rainy period. As for mutagenicity, it was found that points 6, 7, 8, 9 and 10 showed a significant increase in the number of micronuclei in the dry season compared to the rainy period. The data from this study suggest the existence of contaminating agents in the Judia stream with cytotoxic, genotoxic and mutagenic potential in *A. cepa* cells.

Keywords: biomonitoring; ecotoxicology; *Allium cepa*; environment pollution.

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral	Pág.
Figura 1. Esquema das fases do processo mitótico em células de <i>A. cepa</i>	12
Figura 2. Alterações cromossômicas no processo de divisão mitótica e micronúcleo em células de <i>A. cepa</i>	13
 Capítulo II	
Figura 1. Célula em divisão mitótica e formação de micronúcleos....	40
Figura 2. Mapa demonstrando os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 indicados para a coleta, em um determinado rio	41
Figura 3. Coleta de águas superficiais com auxílio de balde inox acoplado a corda.	42
Figura 4. Germinação de <i>A. cepa</i>	43
Figura 5. Meristemas germinados.	43
Figura 6. A – Células de <i>A. cepa</i> (ocular: 10x, objetiva 10x), B – Micronúcleo em célula de <i>A. cepa</i>	45
Figura 7. Sementes de <i>A. cepa</i>	46
Figura 8. A – Células de <i>A. cepa</i> coradas com orceína acética 2% (ocular: 10x, objetiva 20x), B – Micronúcleo em célula de <i>A. cepa</i> (ocular: 10x, objetiva 40x)	47
 Capítulo III	
Figura 1. Imagens de satélite dos pontos amostrais ao longo do igarapé Judia.....	56
Figura 2. Genotoxicidade e mutagenicidade em células de <i>A. cepa</i> (ocular 10x, objetiva de 40x);.....	59
Figura 3. Comparação dos índices mitóticos entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.....	60
Figura 4. Comparação das aberrações cromossômicas entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.	61
Figura 5. Comparação do potencial mutagênico entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.....	62

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Pág.
Capítulo III	
Tabela 1. Média e desvio padrão das análises amostrais do Período Chuvoso e do Período de Estiagem	58

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1 GENOTOXICIDADE	12
1.2 O TESTE DE <i>Allium cepa</i> E O BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO AMBIENTAL	14
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. CAPÍTULO I: O TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE	22
4. CAPÍTULO II: A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE TESTE <i>Allium cepa</i> PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA	37
5. CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DO IGARAPÉ JUDIA NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL	51
6. ANEXOS	69
Anexo I - ANÁLISES GENOTÓXICAS: MÉTODOS E APLICAÇÕES	70
Anexo II - FATORES PRÓ-CICATRIZANTES E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO	85
Anexo III - Curso de princípios de cultivo de células	100
Anexo IV - Participação como aluna e Comissão Organizadora do I Simpósio em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia	101
Anexo V - Participação na atividade de Investigação de Surto de Doença de Chagas em Cruzeiro do Sul (Boca do Moa) e Rodrigues Alves (Ramal Nova Cintra)	102

1. INTRODUÇÃO GERAL

O acesso à água potável caracteriza-se como um dos direitos humanos fundamentais e necessários, para a sobrevivência e desenvolvimento da sociedade (RIBEIRO; ROLIM, 2017; LIMA et al., 2018). Apesar disso, verifica-se que a sua adequada distribuição entre as populações é deficiente, e a preservação exigida para manutenção da qualidade das águas de mananciais, rios e igarapés ainda é frágil e ineficiente em diversos países (GUPTA; AHLERS; AHMED, 2010; GENTRY-SHIELDS; BARTRAM, 2014; SUBBARAMAN; MURTHY, 2015; BORDALO, 2017).

A disponibilidade adequada de água e a coleta e tratamento de esgoto têm papel fundamental na saúde da população, na produtividade dos trabalhadores, e na diminuição dos custos com saúde, ao promover o bem estar social reduzindo a incidência e a transmissão de doenças relacionadas à veiculação hídrica (SNIS, 2014; SILVA et al., 2017; SNIS, 2018; ANA, 2019).

Os seres vivos que se abastecem de água contaminada, além de estar sujeitos a diversas doenças, estão expostos a riscos de potencial genotóxico, caracterizado por qualquer tipo de dano à molécula do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (MARTINS et al., 2017; COSTA et al., 2018; SPOSITO et al., 2019).

É possível analisar o provável efeito de poluentes através de testes de genotoxicidade (LEME; MARIN-MORALES, 2008; GARRIDO et al., 2016; CASTRO SOUZA et al., 2017). Existem diversos tipos de bioindicadores, como as bactérias, plantas, peixes e mamíferos, que permitirão verificar os impactos desses contaminantes para a saúde ambiental e populacional (KOHATSU; SHIMABUKURO, 2007; SANTOS et al., 2017; FERNANDES et al., 2017; KASPER et al., 2018).

O teste de micronúcleo, dentre os ensaios de genotoxicidade, é o mais evidente por detectar alterações no material genético, sendo útil como biomarcador e instrumento de monitoração de substâncias, ambientes ou indivíduos expostos a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (MENEGUETTI et al., 2014; FARIA et al., 2017; FERNANDES et al., 2018).

A análise de mutagênicidade, fornece uma avaliação do risco ao qual o ser humano se expõe ao entrar em contato com substâncias que possuem o potencial de causar danos ao material genético das células (MARON; AMES, 1983; MORTELMANS; ZEIGER, 2000). Um dos testes mais utilizados, nesse contexto, é o *Allium cepa*, tido como um excelente bioindicador de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade (MENEGUETTI et al., 2012; MACEDA et al., 2015; SPOSITO et al., 2019), principalmente de ecossistemas

aquáticos de água doce, como rios e igarapés, fontes essenciais no abastecimento de água em diversas localidades (PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013; DUARTE et al., 2014; DUSMAN et al., 2014; COELHO et al., 2014; FARIA et al., 2017; COSTA et al., 2018; IQBAL et al., 2019).

1.1.GENOTOXICIDADE

A genotoxicidade ocorre quando um composto genotóxico presente na água, ar ou solo causa uma modificação na estrutura química do DNA (MATEUCA, 2006; KOHATSU; SHIMABUKURO; GATTÁS, 2007; CURADO et al., 2018). Estas variações possuem competência para iniciar um processo de mutação, o qual é descrito por gerar alterações na sequência da informação genética com potencial de desorganizar o funcionamento de uma célula (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011; DUSMAN et al., 2012; SPOSITO et al., 2019), ocorrendo durante o processo de mitose (Figura 1).

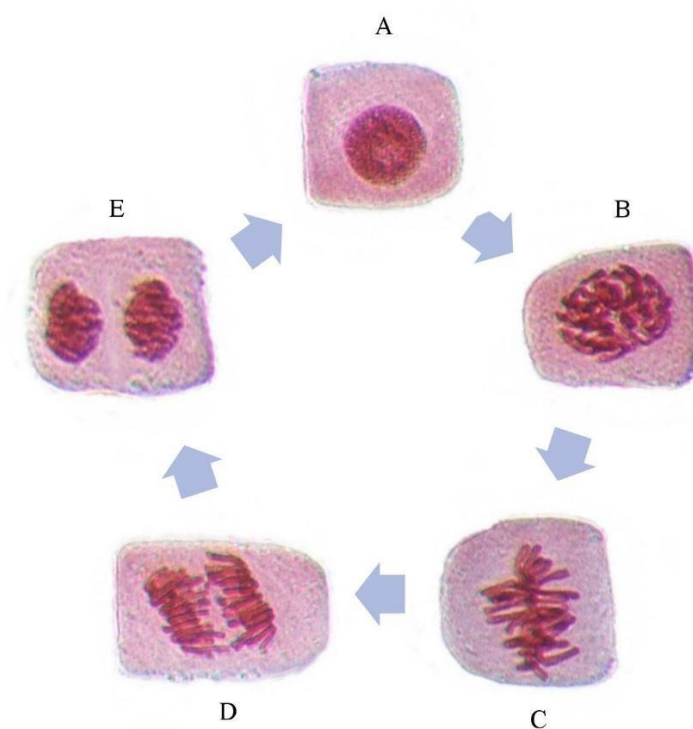


Figura 1. Esquema das fases do processo mitótico em células de *A. cepa*.

(A) Intérfase; (B) Prófase; (C) Metáfase; (D) Anáfase; (E) Telófase.

O agente mutagênico é genotóxico, porém, nem toda genotoxicidade resultará em mutações (VALENTE et al., 2017). Isso ocorre devido ao desempenho de um sistema que repara danos em regiões específicas, corrigindo o DNA (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011;

SANTOS; NARDIN, 2014; FARIA et al., 2017; CURADO et al., 2018; SPOSITO et al., 2019).

Mutações apresentam relevância para a variabilidade genética das espécies, e trazem vantagens ao conferir resistência a algumas enfermidades (SOETEMAN-HERNANDEZ; JOHNSON; SLOB, 2016). Apesar disso, são determinantes cruciais de doenças como o câncer (SANTOS; NARDIN, 2014; NAVES et al., 2018).

Biomarcadores são importantes ferramentas que permitem verificar os potenciais efeitos da exposição a determinadas substâncias, como exemplo, as genotóxicas (PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; DUARTE et al., 2014; COSTA et al., 2018). Nesse caso, o micronúcleo (Figura 2) é um dos mais utilizados (SARGSYAN et al., 2018).

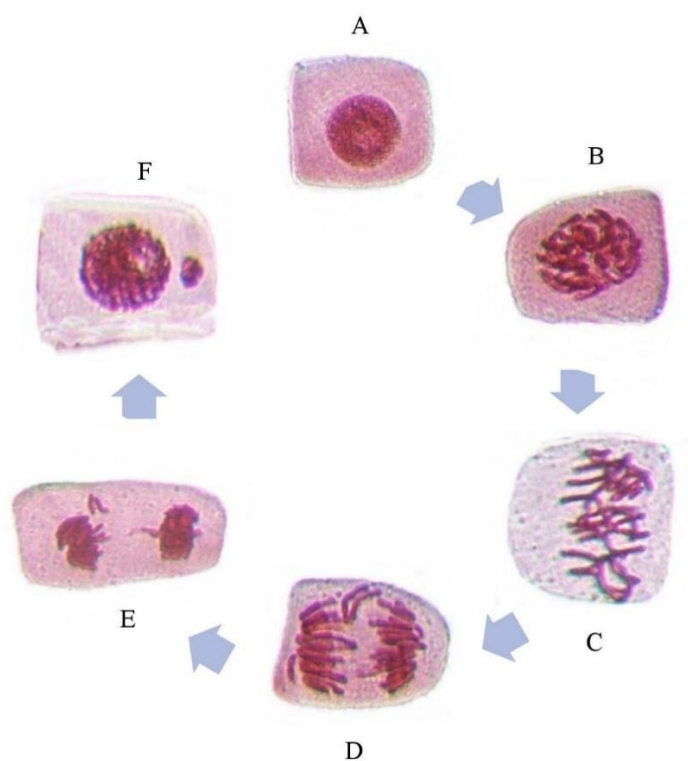


Figura 2. Alterações cromossômicas no processo de divisão mitótica e micronúcleo em células de *A. cepa*.

(A) Intérfase; (B) Prófase; (C) metáfase com C-mitose; (D) Anáfase com perda cromossômica; (E) Telófase com aderência e perda cromossômica; (F) Intérfase com micronúcleo.

Essa anomalia é caracterizada pela presença de uma porção do material genético de uma célula, que no processo de divisão celular, em virtude de quebras ou falhas na separação, não se incorporam ao núcleo principal formando um ou mais núcleos menores adjacentes (FARIA et al., 2017; MARTINS et al., 2017; COSTA et al., 2018; CURADO et al., 2018).

O biomarcador inserido em um local exposto à ação genotóxica, possui competência para identificar os potenciais danos, que o ambiente oferece através da avaliação de micronúcleos presentes em suas células (MENDES et al., 2011; PETRIE et al., 2015; MACHADO et al., 2016). Quanto maior a quantidade de micronúcleos, maior serão os danos ao DNA e consequentemente, os prejuízos à saúde humana (NAVES et al., 2018).

1.2 O TESTE *Allium cepa* E O BIOMONITORAMENTO DA POLUIÇÃO AMBIENTAL

Com intuito de analisar os possíveis efeitos deletérios sobre organismos vivos, causados por substâncias químicas ou tóxicas lançadas no meio ambiente, originou-se o desenvolvimento de métodos de pesquisa genotóxica (BRUSICK, 1987). Desde então, o uso de plantas para biomonitoramento de efeitos genotóxicos através de testes de micronúcleo e aberrações cromossômicas têm sido amplamente utilizados por exibir eficácia e sensibilidade às substâncias nocivas inseridas no solo, água ou ar (IQBAL et al., 2019).

A identificação do potencial de alterações genéticas através do uso de biomarcadores oportunizam a detecção de riscos ambientais, permitindo analisar as ameaças que os seres vivos inseridos em um espaço determinado estão expostos (FERNANDES et al., 2018; KASPER et al., 2018).

Na década de 30, o uso do *A. cepa* como organismo teste foi estabelecido por Levan, com o intuito de investigar o mecanismo citológico da colchicina na mitose de suas raízes (LEVAN, 1938). Posteriormente, pesquisas demonstraram que os resultados obtidos em testes genotóxicos com plantas e com mamíferos apresentaram 91% de concordância, conferindo maior valor e confiabilidade no emprego de vegetais em verificações genotoxicológicas (GRANT, 1978; GRANT, 1982; GROVER et al., 1990; RANK et al., 1997; GRANT, 1999; LESSA; CARIELLO, 2017).

Com células que ostentam cromossomos grandes, de número reduzido ($2n=16$), crescimento rápido de raízes, alta proliferação celular e favorável visualização microscópica, a aplicação deste vegetal superior em diversos estudos é progressiva e notavelmente eficaz ao aferir ações desfavoráveis de produtos químicos em materiais biológicos (FISKEJO, 1993; DUSMAN et al., 2014; MACEDA et al., 2015; LESSA; CARIELLO, 2017; IQBAL et al., 2019).

O teste *A. cepa* apresenta boa correlação com outros testes, ao monitorar os fatores de risco ambientais, a título de exemplo, a verificação do declínio no crescimento de suas raízes,

e a citotoxicidade são um instrumento muito útil na medida do grau de poluição em corpos de água (FISKEJO, 1993; PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; BARBOSA; AMARAL; MEDEIROS, 2011; DUARTE et al., 2014; COSTA et al., 2018).

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

ANA. Agência Nacional de Águas. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2018**, 72 p., 2019.

BARBOSA, J. S.; AMARAL, V. S.; MEDEIROS, S. R. B. **Genotoxicidade dos recursos hídricos no Estado do Rio Grande do Norte**. Investimento do Banco do Nordeste para o desenvolvimento com preservação ambiental, p.73-93, 2011.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional De Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2013**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 181 p. , 2014.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2016**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 218 p. , 2018.

BORDALO, C. A. O paradoxo da água na região das águas: o caso da Amazônia brasileira. **Geosp – Espaço e Tempo**, v. 21, n. 1, p. 120-137, 2017.

BRUSICK, D. J. Implications of treatment-condition-induced genotoxicity for chemical screening and data interpretation. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 1, p. 1-6, 1987.

CASTRO E SOUSA, J. M.; PERON, A. P.; SILVA E SOUSA, L.; HOLANDA, M. M.; LIMA, A. M. V.; OLIVEIRA, V. A. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 189, n. 6, p. 301-314, 2017.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, p. 1-14, 2018.

CURADO, A. N.; OLIVEIRA, C. C.; COSTA, W. R.; ANHÊ, A. C. B. M.; SENHUK, A. P. M. S. Urban influence on the water quality of the Uberaba River basin: an ecotoxicological assessment. **Revista Ambiente e Água**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2018.

DUARTE, M. N.; NOGUEIRA, M. A. A.; PASCHOAL, C. J. F.; MIRANDA, A. G.; MONSORES, G. L.; COSTA, L. A.; BRAGA, E. S.; BRAGA, B. B.; RODRIGUES, W. C. Avaliação da qualidade ambiental através do teste da cebola (*Allium cepa*) Exposta diretamente em leito de rios urbanos. **Revista Eletrônica TECCEN**. v. 7, n. 1/2, p. 1-10, 2014.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINE, V. E. P.; Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 66-81, 2012.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. Allium cepa L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 3, p. 1793- 1800, 2014.

FARIA, M. L. C.; COSTA, F. M.; SILVA, F. C.; BOSSO, R. M. V. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, estado de Rondônia, em células de Allium cepa. **Revista Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2017.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Journal of Heredity**, v. 102, n.1, p. 99 - 112, 1985.

FISKESJO G. The Allium test In: Wastewater Monitoring. **Environmental Toxicology Water**, v. 8, p. 291-298, 1993.

GARRIDO, E.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; MARTÍN, J.; SANTOS, A.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Monitoring of emerging pollutants in Guadamar River basin (South of Spain): analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 2, p. 127-144, 2016.

GRANT, W. F. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 37-43, 1978.

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**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

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

GENTRY-SHIELDS, J.; BARTRAM, J. Human health and the water environment: using the DPSEEA framework to identify the driving forces of disease. **Science of The Total Environment**, v.468, n. 469, p. 306-314, 2014.

GUPTA, J.; AHLERS, R.; AHMED, L. The human right to water: moving toward consensus in a fragmented world. **Review of European Community and International Environmental Law**, v. 19, n. 3, p. 294-305, 2010.

GROVER, I. S. ; DHINGRA, A. K. ; ADHIKARI, N. ; LADHAR, S. S. Genotoxicity of pesticides and plant systems. **Progress in Clinical and Biological Research**, v. 340, n. 20, p. 91-106, 1990.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, M.; NAFIR, A.; QAMAR, A. Bioassays Based on Higher Plants As Excellent Dosimeters for Ecotoxicity Monitoring: A Review. **Chemistry International**, v.5, n.1, p.1-80, 2019.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, n.3, p. 1-9, 2018.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PLAS, L.; ELHAOUJI, U.; LUKAMOWICZ, H.; GONZALES, G.; VANDE, K. L. DECORDIE, E. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 8, p. 873-99, 2011.

KOHATSU, A. G.; SHIMABUKURO, F. Utilização dos testes de mutagenicidade para a avaliação de exposição ocupacional. **Saúde, Ética & Justiça**, v. 12, n.1/2, p. 15-21, 2007.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotóxicidade e mutagenicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, p. 471-486, 1938.

LIMA, W. T.; OLIVEIRA, A. M. L.; SILVA, I. A.; TANANTA, C. T.; COSTA, H.; Et al. Uma geopolítica para as águas continentais na Amazônia Ocidental. **Revista de Geopolítica**, v. 9, n. 1, p. 11-21, 2018.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2015.

MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODR , F. F.; et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138-146, 2016.

MARTINS, V. B.; LUZ, R. M.; ADAMATTI, D. F. Educando e conscientizando crianças a respeito do uso da água potável através de jogos. **Scientia Plena.**, v. 13, n. 4, 2017.

MARON, D. M.; Ames, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, p. 173–215, 1983.

MENDES, B. G.; BUDZIAK, D.; STOLBERG, J.; PEIXER, Z. I.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E. L.; PEDROSA, R. C; et al. Estudo da qualidade das águas do Rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 5, n. 2, p. 43-58, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C. ; RAMOS, L. J. ; ZAN, R. A. . Adaptation of the Micronucleus Technique in Allium Cepa, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Environmental & Analytical Toxicology**, v. 02, n. 2. p. 127-131, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A. ; SILVA, J. B. ; SILVA, R. P. ; PAGOTTO, R. C. ; FACUNDO, V. A. . Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de maytenus guyanensis klotzsch ex reissek (celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 301-309, 2014.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 445, p. 29–60, 2000.

NAVES, M. P. C.; MORAIS, C. R.; SILVA, A. C. A.; DANTAS, N. O.; SPANÓ, M. A.; REZENDE, A. Z. A. Assessment of mutagenic, recombinogenic and carcinogenic potential of titanium dioxide nanocrystals in somatic cells of Drosophila melanogaster. **Food and Chemical Toxicology**, v. 112, p. 273-281, 2018.

OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. **VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**, v. 8. p. 73-88, 2013.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de Allium cepa L. **Revista brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3-27, 2015.

RANK, J; NIELSEN, M. H. Allium cepa anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. ½, p. 121-127, 1997.

RIBEIRO, L. G. G.; ROLIM, N. D. Planeta água de quem e para quem: uma análise da água doce como direito fundamental e sua valoração mercadológica. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**, v. 7, n. 1, p. 7-33, 2017.

SANTOS, C. S.; JÚNIOR, D. S. S; OLIVEIRA, J.S.; CASTRO, K. M. S. A; FEITOSA, M. B. J.; PANTALEÃO, S. M.; et al. Potencial mutagênico de um afluente do Rio Vaza-Barris (SE), por meio do sistema-teste micronúcleo (TMN) em molusco bivalve. **Scientia Plena**, v. 13, n. 10, p. 1-12, 2017.

SARGSYANA, A.; SIMONYAN, A.; HOVHANNISYAN, G.; ARAKELYAN, M.; AROUTIOUNIAN, R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in Darevskializards as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 835, p. 1-8, 2018.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Editora: Blucher, São Paulo, 5ª. ed., 535p., 2017.

SOETEMAN-HERNANDEZ, L. G.; JOHNSON, G. E.; SLOB, W. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the in vivo micronucleus test . **Mutagenesis**, v. 31, n. 3. p. 347-358, 2016.

SPOSITO, J. C. V.; FRANCISCO, L. F. V.; CRISPIM, B. A.; DANTAS, F. G.; SOUZA, J. P.; VIANA, L. F., et al. Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 483-495, 2019.

VALENTE, D.; AMARAL, I. C. C.; CARVALHO, L. V. B.; SANTOS, M. V. C.; CASTRO, S. C.; RODRIGUES, D. R. F. et al. Utilização de biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, n. 1, p. 1- 21, 2017.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

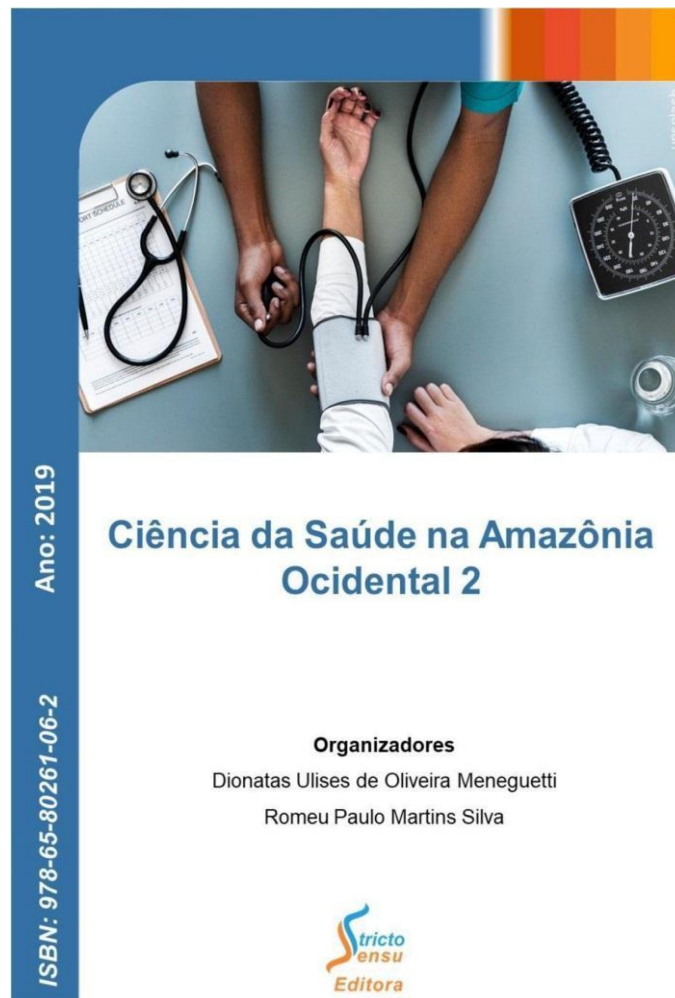
- Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Igarapé Judia no município de Rio Branco, Acre.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Apresentar as principais técnicas aplicadas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade;
- Descrever os principais procedimentos para análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema de teste *Allium cepa*;
- Avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Igarapé Judia, em dois períodos (chuvoso e estiagem).

3. CAPÍTULO I: O TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE

Capítulo publicado no livro Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental 2.



CAPÍTULO 10

O TESTE DE MICRONÚCLEO E SUAS DIFERENTES APLICABILIDADES PARA ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE

Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Sérgio Luiz Prolo Júnior¹, Laura Nadyne da Silva Silvestre¹, Romeu Paulo Martins Silva^{1,2}, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2,3}

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental;

3. Universidade Federal do Acre, Colégio de Aplicação, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Ensaio de micronúcleo têm sido amplamente utilizados em diversos estudos ao longo dos anos, dado sua importância para contribuição no conhecimento citogenético ou em testes de biomonitoramento, conferindo uma significativa reprodutibilidade. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade. Ao permitir analisar distintos sistemas de verificação biológica e sua interação com determinado grupo de células, ensaios para micronúcleo possuem a vantagem da simplicidade e rapidez na identificação de alterações cromossômicas.

Palavras-chave: ensaios para micronúcleos; testes de mutagenicidade; testes de toxicidade genética.

ABSTRACT

Micronucleus assays have been widely used in several studies over the years, given their importance to contribute to cytogenetic knowledge or biomonitoring tests, conferring a significant reproducibility. The present study aimed to perform a literature review demonstrating the main techniques applied to perform the micronucleus test in genotoxicity analyzes. By allowing the analysis of different biological verification systems and their interaction with a particular group of cells, micronuclei assays have the advantage of simplicity and speed in the identification of chromosomal alterations.

Key words: micronuclei tests; mutagenicity test; genetic toxicity tests.

1. INTRODUÇÃO

A genotoxicidade é a competência de causar danos e alterações no processo de segregação do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou do seu conteúdo, decorrente da exposição a agentes nocivos (HERSHMAN et al., 2017). A consequente modificação que

ocorre no material genético da célula, devido ação de substâncias genotóxicas caracteriza a mutagenicidade (BAFANA et al., 2018). Dentre as técnicas utilizadas para identificação do potencial mutagênico desses processos, uma das principais é o teste do micronúcleo (SARGSYAN et al., 2018).

Micronúcleos são pequenos núcleos, que se localizam próximos ao núcleo principal de uma célula (AGOSTINI, 1993). Correspondem a alterações cromossômicas induzidas ou espontâneas, que ocorrem durante o processo de divisão celular (BALLESTRERI et al., 2017).

A existência de micronúcleos tem sido reconhecida há muitos anos (BRENNEKE, 1937; MATHER, 1937; TAYDAY, 1951; RUSSELL; RUSSELL, 1954). Sua utilização para verificar danos citogenéticos surge em torno de 1959, ao ser verificado que as quebras e as trocas incompletas e desreguladas dos cromossomos, dariam origem a fragmentos que, na interfase, não estariam aderidos ao núcleo das células filhas, porém adjacentes, como micronúcleos (EVANS; NEARY; WILLIAMSON, 1959).

Durante a anáfase, penúltima fase da mitose, podem ocorrer danos do fuso mitótico devido a trocas cromossômicas, perda mitótica de fragmentos acêntricos, cromossomos inteiros ou consequências mecânicas de quebras, que poderão resultar, no fim do processo de divisão, em células filhas com a presença de micronúcleos (AGOSTINI, 1993; SILVA, 2017).

O teste do micronúcleo foi primordialmente descrito por Schmid em 1975, utilizando células de medula óssea de pequenos animais, permitindo observar que após a telófase, os elementos que se atrasavam poderiam estar incluídos nas células-filhas, entretanto, uma proporção considerável transformava-se em um ou vários núcleos secundários, menores que o núcleo principal (SCHMID, 1975).

Ensaio do micronúcleo consiste em verificar alterações citogenéticas, através da frequência de micronúcleos em células, que sofreram aguda ou crônica ação de substâncias potencialmente mutagênicas (GARCIA-RODRIGUEZ et al., 2016). Apresenta diversas características importantes como a rápida execução, aplicabilidade *in vivo/in vitro* e a possibilidade de investigação de potencial carcinogênico (SELKAR et. al., 2016).

Ao considerar o mecanismo pelo qual se formam os micronúcleos, sugere-se que, dependendo do nível, a sua presença pode atribuir risco genético (BALLESTRERI et al., 2017). Estudos recentes sugerem que a presença do micronúcleo nas células propicia condições de variação genética que podem estar relacionadas ao câncer (RUSSO; DEGRASSI, 2018). A concentração, o tamanho e a frequência de micronúcleos em células

refletem o grau e a característica do dano que o agente indutor pode representar (CAVALCANTE et al., 2017).

É um teste que envolve diferentes organismos e tecidos nos quais, após induzidos por agentes que interferem na função dos ácidos nucleicos, poderá ser quantitativamente mensurado o dano cromossômico (SOETEMAN-HERNANDEZ; JOHNSON; SLOB, 2016). Este ensaio possibilita a detecção de mutágenos específicos que causam quebras nos cromossomos, denominados de clastógenos, e agentes aneugênicos que geram alterações na divisão celular e no fuso mitótico, com consequente ganho ou perda de material genético (CARVALHO et al., 2017).

Para o emprego do teste de micronúcleo é necessário o uso de células que já tenham experimentado ou ainda estejam em processo de divisão celular (AGOSTINI, 1993; SILVA, 2017). Nos animais, como camundongos, utilizam-se células da medula óssea, fígado de embriões ou células de tumores de ovários (BEKESCHUS et al., 2018). No homem, podem-se empregar linfócitos de sangue periférico, fibroblastos e células epiteliais esfoliadas (BEKESCHUS et al., 2018).

Ensaio de micronúcleo têm sido amplamente utilizados em diversos estudos ao longo dos anos, dado sua importância para contribuição no conhecimento citogenético ou em testes de biomonitoramento, conferindo uma significativa reprodutibilidade (BALLESTRERI, 2018). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização do teste de micronúcleo em análises de genotoxicidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA:

Células da medula óssea foram as pioneiras na realização do teste de micronúcleo, detentoras da capacidade de rápida divisão (SCHMID, 1995). Os micronúcleos podem ser observados em mielócitos, mieloblastos ou eritroblastos, sendo facilmente reconhecido em eritrócitos jovens (SCHMID, 1995). Em humanos, células eritroblásticas são utilizadas para realização do teste, enquanto que em ratos e camundongos os eritrócitos policromáticos são os mais adequados para uso (MENEGUETTI et al., 2015; BAKARE et al., 2016).

De acordo com Schmid et al. (1975) a técnica com eritrócitos policromáticos segue os seguintes passos:

- a) Preencher, para cada indivíduo, um tubo Falcon de 5 ml com soro fetal bovino;
- b) Extrair do animal pós-morto os dois fêmures inteiros em um corte desde a pelve até a tíbia;
- c) Com uma gaze, tracionar suavemente a porção epifisária distal e remover a tíbia e o músculo adjacente;
- d) Com uma tesoura, encurtar cuidadosamente a extremidade proximal do fêmur até visualizar uma pequena abertura do canal medular;
- e) Aspirar com uma seringa de insulina 0,2 ml de soro fetal bovino do tubo Falcon;
- f) Inserir a agulha alguns milímetros na parte proximal do canal medular que ainda está fechado na extremidade distal;
- g) Submergir o fêmur completamente no soro, pressionando dentro do tubo Falcon para evitar que a agulha escorregue;
- h) Aspirar a medula e enxaguar subsequentemente com o soro fetal, as células devem entrar no soro como uma suspensão fina. Após várias aspirações suaves e enxágue, o processo será repetido da extremidade distal do fêmur;
- i) Centrifugar o tubo a 1000 rpm por 5 minutos, remover o sobrenadante com auxílio de uma pipeta Pasteur;
- j) Misturar as células do sedimento por aspiração com uma pipeta Pasteur siliconizada, (se necessário, repetir os passos “i” e “j”).
- k) Colocar uma gota da suspensão na extremidade de uma lâmina estéril previamente identificada;
- l) Realizar o esfregaço com auxílio de outra lâmina posicionada em 45° que irá puxar e distribuir o material uniformemente;
- m) Secar em temperatura ambiente *overnight*;
- n) Com a lâmina em local apropriado, cobrir a extensão do esfregaço com 1 ml do corante May-Grunwald, deixar agir por 3 minutos. Em seguida, acrescentar 1 ml de água destilada, homogeneizar com um bastão de vidro com movimentos de cima para baixo até que os dois líquidos estejam totalmente misturados, deixar agir por 1 minuto;
- o) Escorrer a mistura, e sem lavar, recobrir a lâmina com 2 ml da solução diluída de Giemsa com água destilada 1:6, deixar agir por 15 minutos;

- p) Lavar a preparação abundantemente em água corrente e deixar a lâmina para secar na posição vertical;
- q) Montar a lâmina com Entellan ou com lamínula de vidro;
- r) Analisar no microscópio com objetiva de 100x e ocular de 10x;
- s) Para determinar a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, foram preparadas 3 lâminas para cada indivíduo e analisadas, no total, 2.000 células de eritrócitos policromáticos.

O uso de células eritropoiéticas *in vivo* pode representar vantajosa aplicação em humanos devido a sua rápida diferenciação, principalmente, se comparado ao lento processo que ocorre em linfócitos de sangue periférico (SALES, et al., 2018). Entretanto, testes do micronúcleo em células da medula óssea *in vivo*, têm a desvantagem de metabólitos produzidos no fígado não a atingirem, baixo nível de ativação metabólica de alguns carcinógenos e sensibilidade reduzida na detecção de substâncias com capacidade de induzir micronúcleos, sendo necessário o emprego de doses letais (MAHIOUT, et al., 2018; LIMA et al., 2018).

2.2 TESTES DE MICRONÚCLEO EM LINFÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO:

A utilização de linfócitos de sangue periférico para verificação de dano genético através do teste de micronúcleo teve início na década de 70 (COUNTRYMAN; HEDDLE, 1976). Ganhou notoriedade devido ao longo tempo de vida da cultura, fácil obtenção e distribuição por todo o corpo, seu uso tem sido contínuo em diferentes tipos de pesquisas que visam observar o potencial dano de substâncias tóxicas ao organismo (STURBELLE et al., 2010).

De acordo com Monteiro et al. (2000), a técnica é descrita da seguinte forma:

- a) Coletar 5 ml de sangue periférico de cada indivíduo em tubos de heparina sódica, previamente codificados e mantidos a 4°C;
- b) Cultura de linfócitos - adicionar 0,5 ml do sangue coletado a 4,5 ml de meio F-10 HAM, suplementado com 1% de heparina sódica (50 UI/ml), 1% de L-glutamina, 24% de soro fetal bovino (SFB) e mistura de antibióticos (estreptomicina (50 µg/ml) e penicilina (100 UI/ml));

- c) Para estimular a divisão celular, inserir 80 µl de fitohemaglutinina reconstituída a 2% em água deionizada e homogeneizar a mistura;
- d) Incubar a 37° C durante um período de 44 horas, 2 réplicas para cada indivíduo; após este período, adicionar à cultura 150µL citocalasina B (concentração final desta na cultura: 6 µg/mL) de forma a inibir a citocinese das células;
- e) Incubar por mais 28 horas até completar o total de 72 horas de incubação;
- f) No final do período de incubação, homogeneizar os tubos e separar as células por centrifugação a 1000 rpm (270xg) durante 10 minutos;
- g) Decantar o sobrenadante e tratar as amostras por 2 vezes com 5 ml de solução de lavagem (pH 7,2) RPMI 1640. Suplementar com 2% de SFB e centrifugar a 1000 rpm durante 7 minutos;
- h) No agitador, adicionar 5 ml de solução hipotônica de choque osmótico, RPMI 1640 (meio de cultura), na proporção de 4:1 (água:RPMI), suplementar com 2% de SFB e imediatamente centrifugar por 5 minutos a 1000 rpm;
- i) Desprezar o sobrenadante e utilizar o pellet para realizar os esfregaços nas lâminas;
- j) Preparar cerca de 6 esfregaços (por cada indivíduo) e posteriormente colocar para secar durante 24 horas ao abrigo da luz;
- k) Após secagem ao ar, fixar as lâminas numa tina contendo uma solução fria (-20°C) de metanol: ácido acético (3: 1), por 20 minutos;
- l) Quando as lâminas estiverem secas, corar com Giemsa 4% em tampão fosfato 0,01 M, pH 6,8, por 8 minutos. Após esse período, lavar em água corrente e colocar para secar na posição vertical;
- m) Montar as lâminas com Entellan e colocar para secar na posição horizontal;
- n) Analisar as células com microscópio de campo claro, ampliação de 500x (ocular: 12,5x; objetiva: 40x);
- o) Para cada indivíduo da amostra selecionar duas lâminas e contabilizar os micronúcleos presentes em 1000 células binucleadas (500 por réplica/lâmina).

A detecção de micronúcleos em linfócitos humanos foi aperfeiçoada por métodos que permitem verificar as células que se dividiram ao menos uma vez após exposição à substância mutagênica (HOBBS, et al., 2018). O emprego da citocalasina B mantém o citoplasma íntegro e propicia a identificação de núcleos que sofrem divisão celular por bloqueio da citocinese após a telófase, acumulando células binucleadas na fase G1,

assegurando eficácia na análise de micronúcleos em linfócitos de pessoas expostas, ou substâncias em testes *in vitro* (TOBÓLSKA, et al., 2018).

2.3 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS

Células com origem na camada basal em proliferação, que se tornam esfoliadas ao atingir a camada superficial, expressam alterações cromossômicas em análises citogenéticas (GARCÍA et al., 2018). O uso destas células em testes é aplicável nos tratos pulmonar, urinário, gastrointestinal e na mucosa oral para verificar exposição recente a substâncias carcinogênicas, ou reparos decorrentes de erros espontâneos no material genético (LUCENA et al., 2011).

Conforme Reis et al. (2002), o teste de micronúcleo para células da mucosa oral pode ser realizado da seguinte forma:

- a) Orientar os participantes a realizar um enxágue bucal com água;
- b) Coletar as células com uma escova de cerdas de nylon (cytobrush) girando 5 vezes, suavemente, no lado direito e esquerdo da mucosa bucal maxilar correspondente ao fundo de sulco vestibular posterior;
- c) Inserir a escova em um tubo falcon contendo 5 ml de solução salina (NaCl a 0,9% de concentração em água destilada);
- d) Centrifugar o tubo a 1500 rpm durante 10 minutos;
- e) Descartar o sobrenadante;
- f) Fixar em solução metanol:ácido acético (3:1) e posteriormente transferir para lâminas limpas, úmidas e geladas;
- g) Secar as lâminas durante 24 horas;
- h) Submergir as lâminas, após o período de 24 horas, em solução de HCl 1 N por 30 minutos;
- i) Corar com reação de Feulgen e a contracoloração "Fast Green";
- j) Desidratar as células com etanol e clarificar com xilol;
- k) Montar as lâminas com lamínula, utilizando bálsamo do Canadá;
- l) Analisar as células no microscópio de luz com ampliação de 400 x;
- m) Contar no mínimo 1.000 células de cada sítio para análise de células micronucleadas e de micronúcleo por células.

Meneguetti et al. (2012), também descreve outro método de detecção de micronúcleos em mucosa oral, porém de acordo com o mesmo, de menor custo que o descrito anteriormente. A técnica segue os passos abaixo:

- a) Orientar os participantes a realizar três repetições de enxágue bucal com água destilada;
- b) Coletar as células com uma escova de cerdas de nylon (cytobrush) girando 10 vezes, suavemente, no lado direito e esquerdo da mucosa bucal maxilar;
- c) Inserir a escova em um tubo de ensaio contendo 04 ml de tampão (Cloridrato de Tris 0,01 M Tris HCl, ácido etilenodiaminotetracético 0,1 M EDTA e Cloreto de Sódio 0,02M NaCl) com ph 6,8 e vedar os tubos para transporte;
- d) Homogeneizar o material no vórtice;
- e) Centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante;
- f) Adicionar 04 ml de solução tampão, homogeneizar no vórtice e centrifugar a 1.000 rpm por 10 minutos, descartar o sobrenadante (repetir este passo até completar no total 3 lavagens);
- g) Para fixação, adicionar 2 ml de Triarilmetano a 0,1% e 2 ml de xantenos a 0,1%. Homogeneizar no vórtice e centrifugar a 1000 rpm por 10 minutos;
- h) Descartar o sobrenadante deixando apenas o pellet branco mais três vezes a quantidade de pellet de solução 50% Triarilmetano a 0,1% e 50% xanthenes 0,1%. Homogeneizar no vórtice;
- i) Aspirar o material com uma pipeta Pasteur e gotear 3 gotas em lâmina pré aquecida a 37° C;
- j) Secar em temperatura ambiente durante 30 minutos;
- k) Corar as lâminas mergulhando 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- l) Lavar as lâminas com água destilada para remover excesso de corante;
- m) Secar em temperatura ambiente durante 30 minutos e posteriormente realizar a contagem das células.

A análise de micronúcleos em células da mucosa oral permite a coleta de células esfoliadas em grande quantidade, sendo rotineiramente aplicada em indivíduos fumantes, consumidores de álcool, trabalhadores expostos a material genotóxico ou indivíduos em

tratamento químico ou radioterápico (BATISTA; JÚNIOR, 2014; FARHADI; SOUZA et al., 2014; JOLEHAR; SAFAPOUR, 2018). As células podem ser coradas por diversos métodos, desde os mais elaborados como o estabelecido por Feulgen contracoradas por “Fast Green”, até os mais simples como a coloração do Papanicolau multicromática ou o corante azul de metileno (CAMPOS; GONÇALVES; NOVENTA, 2017; PAZ et. al., 2018).

2.4 TESTES DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS VEGETAIS

Substâncias tóxicas apresentam efeito genotóxico em plantas (AMORIM, et. al., 2018). O uso da *Allium cepa* em citogenética permite identificar potenciais agentes causadores de danos ao DNA em células vegetais, através da verificação de alterações fitotóxicas, citotóxicas e mutagênicas provenientes de extratos de plantas, agroquímicos, fármacos, efluentes industriais ou águas contaminadas (MENEQUETTI et al., 2014; FARIA et. al., 2017).

Para esse teste podem ser utilizadas sementes de *Allium cepa* e segundo Carvalho et al. (2017), o teste ocorre da seguinte forma:

- a) Depositar 30 sementes de *A. cepa*, para cada tratamento, em placa Petri forrada com papel filtro ou de germinação;
- b) Aplicar 3 ml dos tratamentos e do controle nas sementes diariamente, colocar para germinar em temperatura de 25° C com placa Petri fechada;
- c) Coletar os meristemas com 1 a 2 cm de comprimento;
- d) Fixar em Carnoy (3:1, etanol:ácido acético) em frasco de vidro por 2 a 20 horas em temperatura ambiente;
- e) Retirar as raízes do fixador, enxugar levemente com papel filtro;
- f) Colocar em tubo de ensaio com orceína 2%, em quantidade que cubra os meristemas;
- g) Acrescentar uma gota de HCl 1N (ácido clorídrico) para cada nove de orceína (ou cerca de 10% do volume de corante), e agitar;
- h) Aquecer o tubo de ensaio aberto em chama de lamparina a álcool ou bico de Bunsen até que o corante ferva;
- i) Retirar o tubo rapidamente da chama quando o corante borbulhar, tampar o tubo de ensaio e deixar esfriar por 20-30 minutos;

- j) Em uma lâmina limpa colocar uma raiz, seccionar a porção apical (mais escura) e eliminar o restante do material;
- k) Fragmentar o meristema em pedaços menores;
- l) Acrescentar duas gotas do corante, cobrir com uma lamínula e pressionar para espalhar bem as células de cada fragmento;
- m) Pressionar a lamínula com papel toalha para remover vestígios do corante;
- n) Analisar em microscópio óptico com objetiva de 40x;
- o) Verificar micronúcleos contando 1.000 células por lâmina, totalizando 3.000 células por tratamento.

Outro mecanismo para se realizar esse teste é a utilização do bulbo de *Allium cepa*. De acordo com Meneguetti et al., (2012) a técnica pode ser realizada da seguinte forma:

- a) Adquirir 10 bulbos de *A. cepa* (pequenas, uniformes, da mesma origem, não germinadas e sadias) para cada amostra e controle;
- b) Colocar cada bulbo para germinar em frascos de 50 ml, com o fundo imerso na amostra e no controle (água mineral);
- c) Coletar os meristemas após cerca de 72 horas com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento;
- d) Lavar os meristemas em água destilada;
- e) Hidrolisar com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, resfriar os tubos em água corrente;
- f) Lavar os meristemas com água destilada;
- g) Preparar os esfregaços em duas lâminas por bulbo;
- h) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- i) Lavar as lâminas com água desionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- j) Contar 1.000 células por lâmina.

Detentora da capacidade de corresponder ao meio em que está inserida, a *Allium cepa*, representa uma valiosa ferramenta para biomonitoramento (GALVÃO et. al., 2015). De simples manuseio, obtenção, verificação de alterações cromossômicas e micronúcleos

ao microscópio óptico, as células de *A. cepa* configuram satisfatória análise de citotoxicidade e genotoxicidade em pesquisas (ROSA; JÚNIOR; COCCO, 2017).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao permitir analisar distintos sistemas de verificação biológica e sua interação com determinado grupo de células, ensaios para micronúcleo possuem a vantagem da simplicidade e rapidez na identificação de alterações cromossômicas (XINYUE et. al., 2018). Porém, ao se tratar de pesquisa científica, testes com humanos necessitam ser submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e com animais, ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA). No caso de células meristemáticas, como *Allium cepa*, que não necessitam aprovação ou liberação de um comitê, é importante garantir a utilização de sementes ou vegetais livres de agroquímicos.

4. REFERÊNCIAS

AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no homem. **Biotemas**, v.6, n. 2, p. 01 – 19, 1993.

AMORIM, A. S.; FROTA, R. G.; CARNEIRO, J. K. R.; OLIVEIRA, M. A. S. Avaliação citológica, genotóxica e mutagênica do infuso da espécie quebrapetra (*Phyllanthus amarus* – Euphorbiaceae) em diferentes concentrações através do sistema *Allium cepa*. **Revinter**, v. 11, n. 3, p. 1-12, 2018.

BAFANA, A.; KRISHNAMURTHI, K.; SIVANESAN, S.; NAOGHARE, P.K. Mutagenicity and Genotoxicity Testing in Environmental Pollution Control. **Mutagenicity: Assays and Applications**. 1ª edição, 2018.

BAKARE, A. A.; UDOAKANG, A. J.; ANIFOWOSHE, A. T.; FADOJU, O. M.; OGUNSUYI, O. L.; ALABI O. A. et al. Genotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles using the Mouse Bone Marrow Micronucleus and Sperm Morphology Assays. **Journal of Pollution Effects and Control**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2016.

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

BATISTA, C. R.; JÚNIOR, E. O. C. Avaliação da genotoxicidade em células de pacientes fumantes e não fumantes por meio do teste do micronúcleo. **Gestão Tecnologia e Ciências**, v. 3, n. 6, p. 1-10, 2014.

BEKESCHUS, S.; SCHMIDT, A.; KRAMER, A.; METELMANN, H. R.; ADLER, F.; WOEDTKE, T. V. et al. HighThroughput Image Cytometry Micronucleus Assay to Investigate

the Presence or Absence of Mutagenic Effects of Cold Physical Plasma. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 59, n.4, p. 268-277, 2018.

BRENNEKE, H. Strahlenschadigung an mause und ratten sperma, beobachtet an der fruhentwicklung der eier. **Strahlentherapie**, v. 60, p. 214-238, 1937.

CAMPOS, A. A. B.; GONÇALVES, P. C.; NOVENTA, M. A. Efeitos genotóxicos do uso crônico do fumo na mucosa oral. **Investigação**, v. 16, n. 8, p. 82-86, 2017.

CARVALHO, L. G.; BRITTO, F. F.; MARIN-MORALES, M. A.; MAFFEI, E. M. D. Análises citológicas do inseticida Deltametrina usando o Teste de Micronúcleo. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 1-5, 2017.

CAVALCANTE, D. N. C.; SPOSITO, J. C. V.; CRISPIM, B. A.; NASCIMENTO, A. V.; GRISOLIA, A. B. Genotoxic and mutagenic effects of passive smoking and urban air pollutants in buccal mucosa cells of children enrolled in public school. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 27, n.5, p. 346-351, 2017.

EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. **International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine**, v. 01, p. 216-229, 1959.

FARIA, M. L. C.; COSTA, F. M.; SILVA, F. C.; BOSSO, R. M. V. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jarú, Estado de Rondônia, em células de Allium cepa. **Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, p. 1-11, 2017.

FARHADI, S.; JOLEHAR, H.; SAFAPOUR, F. Micronucleus Assay of Buccal Mucosal Cells in Hairdressers: The Importance of Occupational Exposure. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 19, n. 8, p. 2131-2134, 2018.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, 2014.

GALVÃO, M.; MIRANDA, D. P.; COSTA, G. M.; DILVA, A. B.; KARSBURG, I. V. Potencial mutagênico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de alta floresta – MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 21, p. 23-73, 2015.

GARCÍA, A. F.; BERNÉS, S. R.; GARCÍA, P. A.; GUERRERO, V. B.; SOLÍS, M. O. V.; NOYOLA, et al. Micronúcleos y anormalidades nucleares en células de la mucosa bucal de mujeres mexicanas con factores de riesgo para cáncer cervicouterino: estudio piloto. **El Residente**, v. 13, n. 2, p. 56-61, 2018.

GARCIA-RODRIGUES, M. C.; HERNADEZ-CORTES, L. M.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. InVivo Effects of Vanadium Pentoxide and Antioxidants (Ascorbic Acid and AlphaTocopherol) on Apoptotic, Cytotoxic, and Genotoxic Damage in Peripheral Blood of Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, V. 2016, P. 1-11, 2016.

GUERRA, M.; SOUZAS, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002.

HERSHMAN, J. M.; FRANCE, B.; HON, K.; DAMOISEAUX, K. H. Direct quantification of gamma H2AX by cell-based high throughput screening for evaluation of genotoxicity of pesticides in a human thyroid cell lines. **Enviromental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 7, p. 522-528, 2017.

HOBBS, C. A.; KOYANAGI, M.; SWARTZ, C.; DAVIS, J.; MARONPOT, R.; RECIO, L.; et al. Genotoxicity evaluation of the naturally-derived food colorant, gardenia blue, and its precursor, genipin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 695-708, 2018.

KISURINA-EVGENIEVA, O. P.; SUTIAGINA, O. I.; ONISHCHENKO, G. E. Biogenesis of micronuclei. **Biochemistry**, v. 81, n. 5, p. 453-464, 2016.

LIMA, C. F. A.; FERNANDES, A. S.; GOMES, E. M.; OLIVEIRA, L. L.; MACEDO, A. F.; ANTONIASSI, R. et al. Antioxidant Activity and Genotoxic Assessment of Crabwood (Andiroba, *Carapa guianensis* Aublet) Seed Oils. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 11, 2018.

LUCENA, E. E. S.; MIRANDA, A. M.; ARAÚJO, F. A. C.; GALVÃO, C. A. B.; MEDEIROS, A. M. C. Método de coleta e a qualidade do esfregaço de mucosa oral. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 11, n. 2, p. 55-62, 2011.

MAHIOUT, S.; TAGLIABUE, S. G.; NASRI, A.; OMORUYI, L. M.; PETTERSSON, L.; BONATI, L. et al. In vitro toxicity and in silico docking analysis of two novel selective AH receptor modulators. **Toxicology in Vitro**, v. 52, p. 178-188, 2018.

MATHER, K. The analysis of single-factor segregations. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 124, p. 97-106, 1937.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J. Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Environmental and Analytical Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 1-3, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.

PAZ, M. F. C. J.; SOBRAL, A. L. P.; PICADA, J. N.; GRIVICICH, I.; JÚNIOR, A. L. G.; MATA, A. M. O. F. et al. Persistent Increased Frequency of Genomic Instability in Women Diagnosed with Breast Cancer: Before, during, and after Treatments. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 10, 2018.

REIS, S. R. S.; SADIGURSKY, M.; ANDRADE, M. G. S.; SOARES, L. P.; SANTO, A. R. E.; BÔAS, D. S. V. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 221-225, 2002.

ROSA, P. A. F.; JÚNIOR, E. O. C.; COCCO, D. D. A. Biomonitoramento no córrego Olaria, Monte Carmelo - MG utilizando o teste *Allium*. **Gestão, Tecnologia e Saúde**, v. 6, n. 14, p. 1-12, 2017.

RUSSEL, L. B.; RUSSEL, W. E. Cold Spring Harbor. **Quantitative Biology**, v. 19, p. 50-59, 1954.

RUSO, A.; DEGRASSI, F. Molecular Cytogenetics of the micronucleus: Still surprising. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, p. 36-40, 2018.

SALES, I. M. S.; SILVA, J. M.; MOURA, E. S. R.; ALVES, F. D. S.; SILVA, F. C. C.; SOUSA, J. M. C. et al. Toxicity of synthetic flavorings, nature identical and artificial, to hematopoietic tissue cells of rodents. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 11, 2018.

SARGSYANA, A.; SIMONYAN, A.; HOVHANNISYAN, G.; ARAKELYAN, M.; AROUTIOUNIAN, R. Application of the comet assay, micronucleus test and global DNA methylation analysis in *Darevskializards* as a sentinel organism for genotoxic monitoring of soil pollution. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 835, p. 1-8, 2018.

SILVA, H. C. M. Efeito Mutagênico da planta *Coffea Arábica* L. nas células da medula óssea de ratos wistar. **Colloquium Vitae**, v. 9, n. 3, p. 36-39, 2017.

SELKAR, N.; BHAGAT, S.; CHAWADA, M.; VAHALIA, M. K.; PURANIK, .; VANAGE, G. Genotoxic and Mutagenic Activity of Suvarna Bhasma. **Informatic Journals**, v. 23, n. 3, p. 221-228, 2016.

SOETEMAN-HERNANDEZ, L. G.; JOHNSON, G. E.; SLOB, W. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the *in vivo* micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 31, n. 3, p. 347-358, 2016.

SOUZA, A. M.; SILVA, A. M.; RAMOS, L. J.; ZAN, R. A.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do efeito mutagênico em células epiteliais esfoliadas da mucosa oral de fumantes, ex-fumantes e não-fumantes. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 9, n. 3, p. 43-52, 2014.

SCHMID, W. THE MICRONUCLEUS TEST. **Mutation Research**, v.31, n. 1, p. 9-15, 1995.

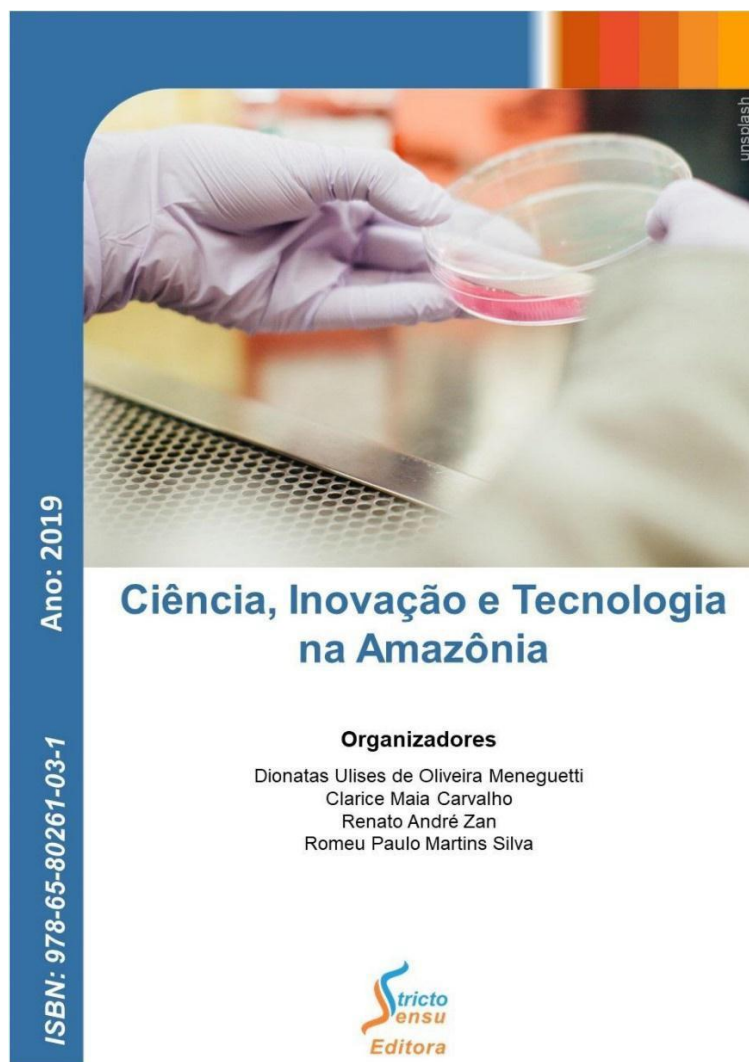
TOBÓLSKA, S.; TERPILOWSKA, S.; JAROSZEWSKI, J.; SIWICKI, A. K. Genotoxicity and mutagenicity of inosine pranobex. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 207-213, 2018.

THODAY, J. M.; The effect of ionizing radiations on the broad bean root, Part IX. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. **British Journal of Radiology**, v. 24, p. 572-628, 1951.

XINYUE, Y.; TOMOKO, A.; JING, X.; YIYI, C.; WEIYING, L.; XINYU, Z. et al. Gene mutation and micronucleus assays in *gpt* delta mice treated with 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether. **Mutagenesis**, v. 33, n. 2, p. 153-160, 2018.

4. CAPÍTULO II: A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA DE TESTE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA

Capítulo publicado no livro Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia.



CAPÍTULO 12

A UTILIZAÇÃO DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa* PARA ANÁLISE MUTAGÊNICA DE RIOS DA AMAZÔNIA

Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Sérgio Luiz Prolo Júnior¹, Renato André Zan²,
Romeu Paulo Martins Silva¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2}

1. Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Rio Branco, Acre, Brasil;

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Ji-paraná, Rondônia, Brasil.

RESUMO

O sistema teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*. A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

ABSTRACT

The micronucleus test system in roots of the *Allium cepa* (onion) species is defined as being one of the best for environmental monitoring and water mutagenesis studies because of its sensitivity and accuracy. The present study aimed to perform a literature review demonstrating the main procedures for the mutagenic analysis of surface waters of Amazonian rivers through the *Allium cepa* test system. The mutagenic analysis of surface water using *A. cepa* does not require elaborate equipment, reagent with high value, the raw material is easily found and throughout the year, and does not require approval in Ethics and Research Committees in Humans or Animals.

Key words: Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

1. INTRODUÇÃO

A hidrografia da região amazônica é a maior, e uma das mais importantes do mundo, concentrando cerca de 15% das águas doces superficiais não congeladas do planeta (SNIF, 2014; NETO; FURTADO, 2015). Formada por grandes rios e pequenos igarapés que correspondem a 81% das águas superficiais do território nacional, a rede hidrográfica

da Amazônia é responsável pelo abastecimento de centenas de cidades e milhares de pessoas (SNIF, 2014; SILVA; NODA, 2016).

O crescimento da urbanização e das fronteiras agrícolas, que têm ocorrido ao longo dos anos, causam prejuízos a rios e igarapés devido exposição a dejetos humanos, agrotóxicos, excretas de laticínios, frigoríficos e, várias outras empresas, que despejam efluentes nestes mananciais, muitas vezes, sem um tratamento prévio (SINGH et al., 2014). Consequentemente, o consumo e a utilização dessas águas contaminadas, podem levar a intoxicações e até mesmo mutações, apresentando o potencial de desencadear a curto e longo prazo sérios problemas de saúde (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015).

As substâncias mutagênicas podem causar danos celulares aos organismos vivos que estão frequentemente expostos a estas, danos que geralmente são induzidos por agentes físicos, químicos ou biológicos que acabam afetando processos como a transcrição e duplicação gênica e alterações cromossômicas, o que leva a processos cancerosos e morte celular (MENEQUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; QUADRA et al., 2018). Compostos que causam lesões nos materiais genéticos são conhecidos como genotóxicos (IQBAL et al., 2019)

Os efeitos mutagênicos podem ser observados por meio da formação de micronúcleos, que são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma (SILVA ET AL., 2011; FATEH et al., 2019). Micronúcleos podem ser resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e, dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (Figura 1) (POLLETO et al., 2011; MENEQUETTI et al., 2012; ZHANG et al., 2018).

O teste de micronúcleos detecta mutagênese em organismos eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (MILLER, 1973; HARA; MARIN-MORALES, 2017). Os micronúcleos são identificados em qualquer tipo de célula, sendo possível aplicar seu uso em análises para diagnóstico de doenças hematológicas, em células epiteliais da boca, do trato urinário e também monitorar ambientes através de testes com roedores e plantas (FENECH, 1993; FÃO et al., 2012; DUSINSKA et al., 2019). Para que o micronúcleo seja visualizado é necessário uma divisão celular após a ocorrência mutagênica, a realização do cultivo celular, ou uso de células que estão se multiplicando constantemente, como a medula óssea e as raízes vegetais (meristemas) (SILVA et al., 2012; PALSIKOWSKI et al., 2017).

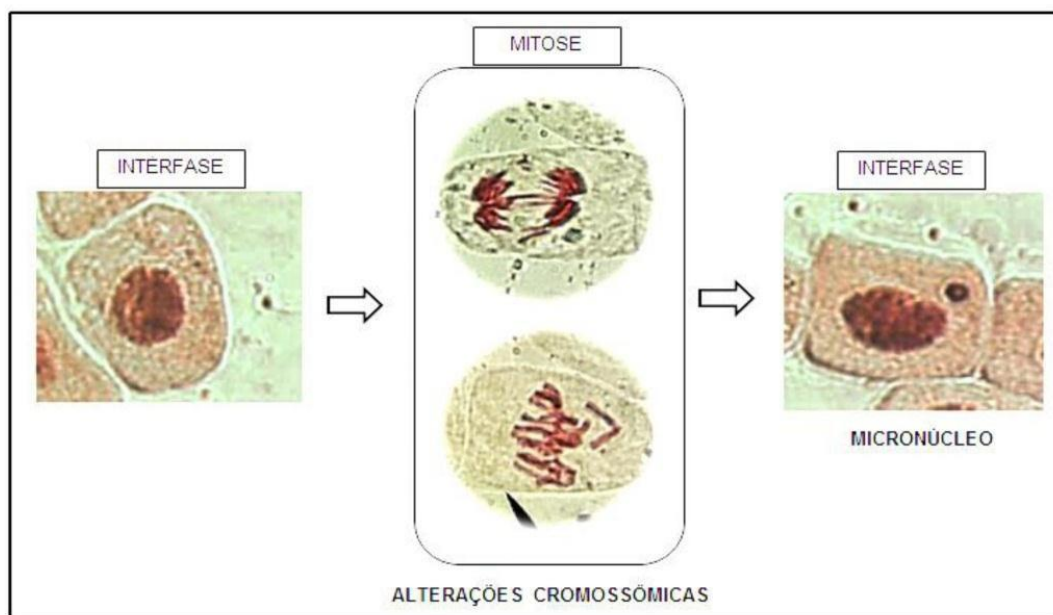


Figura 1. Célula em divisão mitótica e formação de micronúcleos.
Fonte: Elaborado pelos autores

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagenicidade de água, por sua sensibilidade e exatidão (SILVA et al., 2003; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018). As raízes da *A. cepa* possuem processo de divisão celular similar aos do homem, e devido à universalidade do código genético, se um agente pode causar danos ao DNA, apresenta potencial genotóxico em qualquer tipo de célula animal, vegetal ou microrganismos (COSTA; MENK, 2000; GAVRONSKI, 2008; ROBERTO et al., 2016).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura, demonstrando os principais procedimentos para a análise mutagênica de águas superficiais de rios amazônicos através do sistema teste *Allium cepa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 COLETAS DAS AMOSTRAS

As coletas devem ser realizadas em pontos estratégicos, antes e após algumas possíveis causas de interferência na qualidade dos rios, podem ser locais de despejo de

dejetos humanos ou animais, frigoríficos, laticínios, cidades, conjuntos habitacionais dentre outros. Um exemplo de pontos de coletas pode ser observado na (Figura 2).

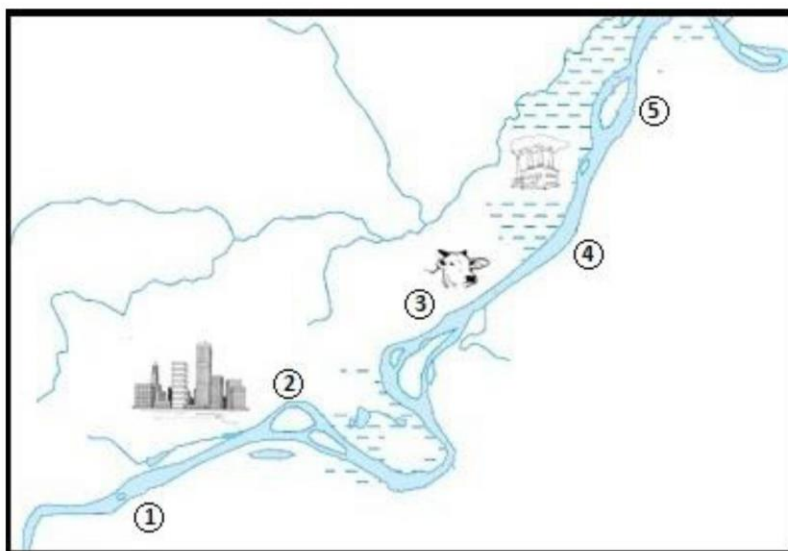


Figura 2. Mapa demonstrando os pontos 1, 2, 3, 4 e 5 indicados para a coleta, em um determinado rio.

Fonte: Elaborado pelos autores

O ponto 1, da figura acima, ou a nascente do rio podem ser utilizados como controle negativo, porém é importante utilizar um segundo controle negativo contendo água mineral, para utilizar como parâmetro de comparação com o controle do ponto 1.

Em alguns casos, é indicada também a utilização de um controle positivo, contendo agentes mutagênicos, esse controle é importante para demonstrar a gravidade da poluição em casos de resultados com significância estatística alta.

As amostras poderão ser coletadas em dois períodos do ano, no de estiagem e de chuva, para observar se há variação nos resultados ao comparar o período da cheia com o período da seca em rios ou igarapés.

As coletas de água são, geralmente, feitas na calha central do rio na profundidade de 15 a 30 cm (CETESB, 1988). O balde normalmente utilizado para amostragem na superfície de corpos d'água (Figura 3), em geral, deve estar acoplado a uma corda e ser confeccionado em aço inox AISI 316L polido, para evitar incrustações nas costuras de solda, e apresentar volume adequado para a finalidade da amostragem (CETESB; ANA, 2011).



Figura 3. Coleta de águas superficiais com auxílio de balde inox acoplado a corda.
Fonte: Arquivo pessoal

Os recipientes mais utilizados para coleta e preservação de amostras são os de plástico autoclavável de alta densidade (polietileno, polipropileno, policarbonato ou outro polímero inerte) e os de vidro, com boca larga (mais ou menos 4 cm de diâmetro) para facilitar a coleta da amostra e a limpeza. As amostras deverão ser transportadas e mantidas sob refrigeração em torno de $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (CETESB; ANA, 2011).

2.2 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO BULBOS DE *Allium cepa*

O experimento utiliza a espécie *Allium cepa*, (conhecida popularmente como cebola de cabeça) de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem (de preferência orgânica), não germinadas e saudáveis, sendo realizadas repetições de 10 espécimes por ponto de coleta (Figura 4a), postos a germinar em frascos transparentes de 50 ml (copos descartáveis ou coletores de fezes) com a parte inferior mergulhada nas águas coletadas (Figura 4b).

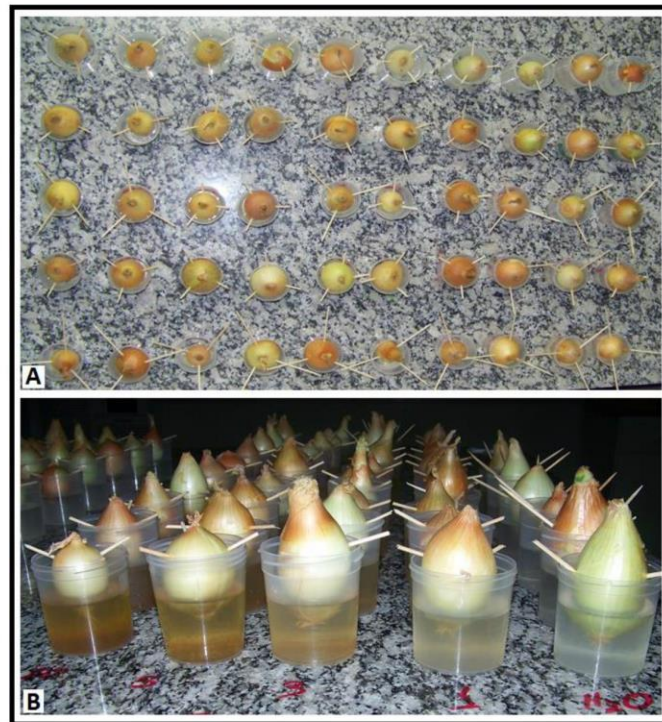


Figura 4. Germinação de *A. cepa*.
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

2.2.1 Preparo das lâminas

As seguintes etapas são adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

Em torno de 72h após o início do teste, os meristemas são coletados com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento (Figura 5), sendo lavados em água destilada.

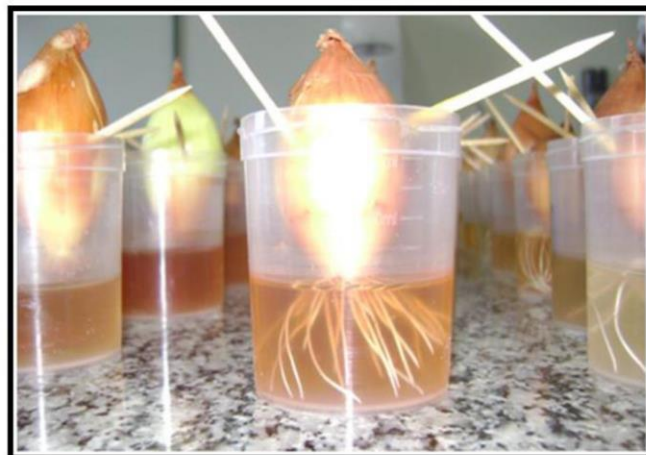


Figura 5. Meristemas germinados
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

- a) Para o preparo de 1 litro de solução 0,1 N de HCl, deve-se transferir 8,36 mL de HCl concentrado e diluir a 1000 mL;

Fórmula para preparo de solução HCL 1 N - Adicionar 3,65g de HCl em um litro de solução, $0,1\text{ N} = 0,1\text{ Normal} = 0,1\text{ equivalente-grama/L} = 0,1\text{ eq-g/L}$, equivale a 3,65g de HCl em 1 L de solução.

A questão é como realizar este procedimento quando não é possível pesar o HCl?

Para isso, são necessárias algumas informações, pois normalmente essa substância é feita a partir de uma solução concentrada de HCl. Informações:

- HCl Fumegante.
- Concentração de HCl = 37%
- Densidade = 1,18 g/mL
- Mol do HCl = 36,5.

Se a densidade é 1,18 g/mL, é possível concluir que 1000 mL = 1180 g. Como a concentração é 37%, deve-se calcular a massa de HCl na solução utilizando uma regra de três:

- $c(\%) = (m\text{ HCL} \times 100) / m\text{ sol}$
 - $c(\%) = \text{concentração porcentual} = 37\%$
 - $m\text{ HCl} = \text{massa de HCl} = \text{valor procurado}$
 - $m\text{ sol} = \text{massa total da solução} = 1,18$
 - $\text{kg mHCl} = c(\%) \times m\text{ sol} / 100 = 37 \times 1,18 / 100 = 0,4366\text{ kg}$ ou 436,6 g de HCl por litro de solução.
 - $n\text{ equivalentes} = 436,6 / 36,5 = 11,96\text{ equivalentes gramas de HCl}$
 - Então a solução é 11,96 N
 - $M_1V_1 = M_2V_2$
 - $V_1 = M_2V_2 / M_1 = 0,1 \times 1000 / 11,96 = 8,36\text{ mL}$;
- b) Inserir os meristemas coletados em tubos de ensaio e adicionar 1N HCL até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos;

- c) Hidrolisar os meristemas com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C e posteriormente resfriar os tubos em água corrente;
- d) Lavar os meristemas com água destilada;
- e) Realizar esfregaços em duas lâminas por bulbo, sendo postas em seguida em gelo seco por 1 minuto para retirada da lamínula e deixado por 30 minutos em temperatura ambiente para secagem;
- f) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- g) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- h) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- i) Em cada lâmina serão contadas mil células em interfase e a quantidade de micronúcleos por mil células (Figura 6).

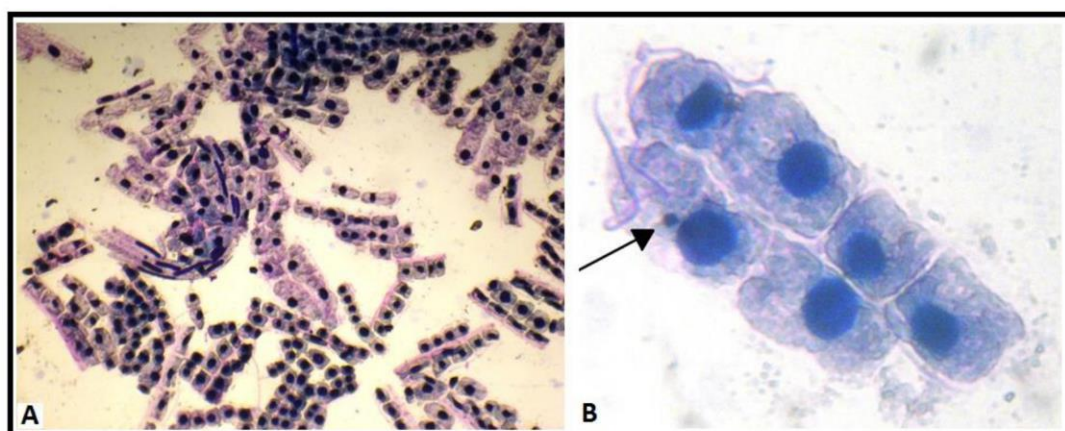


Figura 6. A – Células de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 10x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).
Fonte: Meneguetti et al. (2012)

2.3 GERMINAÇÃO DOS MERISTEMAS UTILIZANDO SEMENTES DE *Allium cepa*

O uso das sementes de *A. cepa* fornece maior praticidade na realização de experimentos devido ocuparem menor espaço, não desprender odor intenso no local em que estão inseridas, de simples manuseio e facilidade de obtenção com boa qualidade e livre de agroquímicos (LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018).

2.3.1 Preparo das lâminas

Será descrito, a seguir, uma adaptação desta técnica utilizando as sementes de *A. cepa*:

- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (Figura 7). Cerca de 50 sementes por placa e duas placas para cada tratamento;



Figura 7. Sementes de *A. cepa*

Fonte: Arquivo pessoal

- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando como meio as amostras (água coletada e controle);
- c) Utilizar como Controle Negativo, água mineral e/ou a nascente do rio/Igarapé;
- d) Aplicar 3 ml das amostras e controle correspondentes, diariamente, utilizando pipeta Pasteur e manter a placa Petri fechada;
- e) Preparo da orceína acética a 2% (100 ml) para fixar e corar os meristemas - usar um béquer de 250 ml e colocar 100 ml de ácido acético 45%. Colocar o béquer no agitador magnético e adicionar 2,0 g de orceína. Deixar agitando por 10 minutos, filtrar a solução utilizando papel filtro e guardar em frasco fechado em temperatura ambiente;

- f) Coletar os meristemas com 1 a 2 cm de comprimento e colocar em tubos de ensaio ou Eppendorf previamente identificados com a amostra correspondente;
- g) Com auxílio de uma pipeta Pasteur, inserir no tubo/Eppendorf a orceína acética até uma quantidade em que os meristemas estejam cobertos, armazenar na geladeira (2 a 8 ° C) no período de 12 a 24 horas para fixação;
- h) Colocar os meristemas em lâminas, seccionar a porção apical (mais escura) e eliminar o restante do material;
- i) Posicionar uma lâmina limpa sobre a bancada e pingar, sobre ela, 3 gotas de orceína acética a 2%;
- j) Cobrir com uma lamínula e segurar a lâmina sobre a chama (bico de Bunsen/vela), a cerca de 5 cm de distância, por cerca de 3 segundos. Repetir esse procedimento por 3 vezes com intervalos de 3 segundos. Se houver necessidade acrescentar mais uma gota de orceína na borda da lamínula.
- k) Esmagar a ponta do meristema pressionando levemente a lamínula com a ponta da pinça. Atenção: cuidado para não deslocar a lamínula do lugar. A pressão deve ser suficiente para esmagar as raízes sem quebrar a lamínula.
- l) Retirar o excesso de orceína lático/acética colocando a lâmina entre um pedaço de papel filtro dobrado e passando o dedo sobre ele;
- m) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- n) Tirar fotos das lâminas em objetivas de 20x ou 40x (Figura 8) utilizando software de processamento e análise de imagens digitais;
- o) Utilizar contador de células para quantificar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.

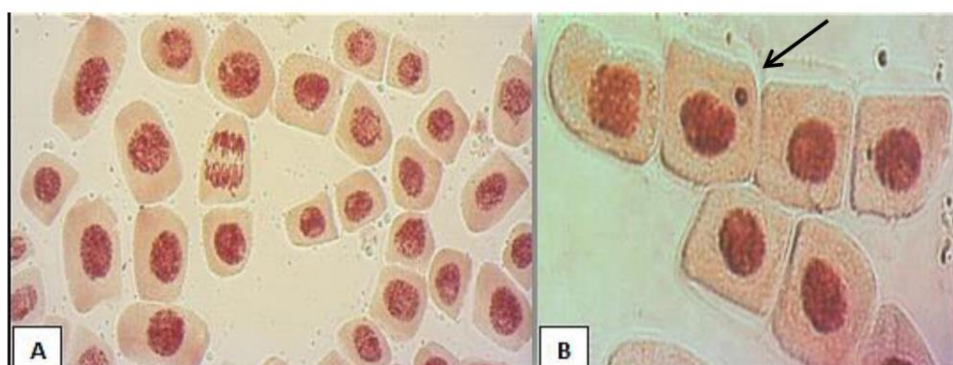


Figura 8. A – Células de *A. cepa* coradas com orceína acética 2% (ocular: 10x, objetiva 20x), B – Micronúcleo em célula de *A. cepa* (ocular: 10x, objetiva 40x).

Fonte: Arquivo pessoal

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste caso é utilizado o teste de Análise de Variância (ANOVA), que é um procedimento paramétrico para analisar três ou mais tratamentos. Esse teste especifica se ocorreu diferença estatística significativa entre os postos, porém ele não especifica entre quais pontos ocorreu essa diferença, por esse motivo utiliza-se também o teste Tukey, que pode ser considerado como uma extensão do ANOVA.

Para essa análise são utilizados vários softwares, sendo indicado o Graphad Prism 5.0 para as pessoas que utilizam Windows XP, e a versão 6.0 para Windows 7, e outros sistemas operacionais.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise mutagênica de águas superficiais empregando *A. cepa* não necessita de equipamentos elaborados, reagente com elevado valor, a matéria prima é encontrada facilmente e durante todo o ano, e não exige aprovação em Comitês de Ética e Pesquisa em Seres Humanos ou em Animais.

O sistema teste de *A. cepa* dispõe de aplicações e adaptações diversificadas que contribuem positivamente na elaboração de experimentos. As técnicas que fazem uso desse sistema são regularmente aprimoradas garantindo satisfatória reprodutibilidade e contribuição científica.

4. REFERÊNCIAS

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, CETESB, 1988.

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.

COSTA, R. M. A; MENK, C. F. M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 24-26, 2000.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE**, v. 66, n. 209, 2018.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of

Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FÃO, F.; ZAN, R.A.; BRONDANI, F.M.M.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise do potencial mutagênico da seiva da casca de *Croton lechleri* (Müll. Arg), no estado de Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista de Saúde e Biologia - Sabios**, v.7, n.1, p.91-98, 2012.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. **Mutation Research**, v. 285, p.35-44, 1993.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, p. 243-260, 1988.

GAVRONSKI, L. **Avaliação da Mutagenicidade de Amostras de Água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa***. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Aplicada) - Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321–330, 2017.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotoxicidade e mutagenicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p.176-181, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22 n. 13, p. 9796-9806, 2015.

MENEGUETTI, D.U.O.; DA SILVA, F.C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, v. 2, n.127, 2012.

MILLER, R.C. **The Micronucleus Test as an *in Vivo* Cytogenetic Method**. Environmental Health Perspectives. Institute for Medical Research Camden, New Jersey, 1973.

NETO, F. R.; FURTADO, L. G. A ribeiridade amazônica: algumas reflexões. **Cadernos de Campo**, n. 24, p.158-182, 2015.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

POLETTI, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; MENEGUETTI, D.U.O. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: Fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.1, p.163-175, 2011.

QUADRA, G. R., ROLAND, F., BARROS, N., MALM, O., LINO, A. S., AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SILVA, J.; EDRTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p.158-159, 2003.

SILVA, F. C.; BARROS, M.A.B.; VIANA, R.R.; ROMÃO, N.F.; OLIVEIRA, M.S.; MENEGUETTI, D.U.O. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p.13-22, 2011.

SILVA, A.M.; SOUZA, A.M.; MACIEL, F. P.; DINIZ, A.P.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J.; BARBOSA, N.V. et al. Analysis Physical-Chemical, Mutagenic and Antimutagenic of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae: Rubioideae) Noni, Germinated in the Region of Brazilian West Amazon. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, n. 569, 2012.

SILVA, S. H.; NODA, S. N. A dinâmica entre as águas e terras na Amazônia e seus efeitos sobre as várzeas. **Ambiente e Água**, v. 11, n. 2, p. 378-386, 2016.

SINGH, M.; DAS, A.; SINGH, D.; MAITI, P.; SHABBIR, M.; DAS, A. High genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, p. 321-327, 2014.

SNIF. Sistema Nacional de Informações Florestais. **Os Biomas e suas florestas**. Brasília, 2014. Disponível em: florestal.gov.br

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere**, v. 217, p. 176-182, 2018.

5. CAPÍTULO III: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DAS ÁGUAS DO IGARAPÉ JUDIA NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL

Artigo será submetido Revista Ambiente e Água após as correções e sugestões da banca.



AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DAS ÁGUAS DO IGARAPÉ JUDIA NO MUNICÍPIO DE RIO BRANCO, ACRE, BRASIL

Hémilly Caroline da Silva Paixão^{1*}, Sérgio Luiz Prolo Júnior¹, Osmar da Silva Torres³, Romeu Paulo Martins Silva⁵, Cydia de Menezes Furtado³ e Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

² Colégio de Aplicação, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil;

³ Unidade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁴ Centro de Ciências da Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

⁵ Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Catalão, Goiás, Brasil.

*E-mail para correspondência: hemillycspaixao@gmail.com

RESUMO

Na cidade de Rio Branco, capital do estado do Acre, os mananciais urbanos têm sofrido, ao longo dos anos, considerável desgaste proveniente da ocupação de suas proximidades. O Igarapé Judia, situado na região do segundo distrito, sendo um dos mais extensos e importantes dessa área, apresenta perda da mata ciliar, fauna e notável poluição das suas águas devido lançamento de diversos efluentes que alcançam seu leito e foz, frequentemente, sem um prévio tratamento. Dessa forma, este trabalho verificou o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do Igarapé Judia. Foram coletadas 11 amostras de água, sendo uma na nascente e outros 10 pontos ao longo do Igarapé Judia em dois períodos do ano, chuvoso (dezembro) e estiagem (Junho). Sementes de *Allium cepa* foram submetidas à germinação, aplicando-se 3 ml das amostras e controle correspondentes, diariamente sobre as sementes. As lâminas foram analisadas e foi verificado o índice mitótico, aberrações cromossômicas e nucleares e micronúcleos. No período de estiagem, os pontos 3, 4, 6 e 9 foram significantes em relação a nascente ao expressarem, os maiores índices mitóticos. O Ponto 6 representou a única amostra significativa com maior número de aberrações cromossômicas no período de estiagem em relação ao período chuvoso. Quando comparado os dois períodos, foi constatado que os pontos 6, 7, 8, 9 e 10 apresentaram aumento significativo do número de micronúcleos no período de estiagem em comparação ao período chuvoso. Os dados deste estudo sugerem que existam agentes contaminantes no igarapé Judia com potencial de causar citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em células de *A. cepa*.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; *Allium cepa*; Poluição ambiental.

1. INTRODUÇÃO

A água é considerada um bem indispensável à sobrevivência das espécies e à manutenção dos ecossistemas (LIMA et al., 2018). Devido ao constante crescimento populacional e industrial, este recurso tem se tornado cada vez mais disputado e a sua presença em caráter potável mais escasso (SINGH et al., 2014). Estima-se que 97,5% da água existente no mundo é salgada, sendo considerada imprópria ao uso, apenas 2,5% da água do planeta é considerada doce, entretanto somente uma pequena proporção deste número, aproximadamente 1%, é acessível e adequada para consumo (ANA, 2012).

A distribuição de água potável e o acesso ao saneamento básico caracterizam um direito humano, que contribui para a saúde e o desenvolvimento da população (WHO, 2017). O saneamento básico é uma ferramenta que atua na melhoria do atendimento do sistema de água e esgoto de uma cidade, gerando benefícios à população quanto à redução de doenças de veiculação hídrica e demais malefícios que a contaminação de afluentes pode causar ao homem e ao meio ambiente (CNI, 2015; CNI, 2017).

A ocupação urbana de forma desordenada nas proximidades de águas superficiais, ao longo dos anos, tem exercido influência direta sobre a composição físico-química e biológica de afluentes devido aos mais diversos tipos de descargas residuais que tornam a água imprópria ao consumo humano, animal, vegetal e para as demais atividades pelas quais sua utilização se faz indispensável (DUSMAN et al., 2014).

No Brasil, apenas 50% do esgoto gerado é tratado e os corpos d'água receptores, distribuídos pelo país, não possuem competência suficiente para diluição dessas substâncias, prejudicando a qualidade da água para consumo e gerando aumento dos custos produtivos (ANA, 2019). O estado do Acre, com cerca de 829 mil habitantes, apresenta os indicadores de abastecimento de água (49,1%), coleta de esgoto (10,7%) e 6 municípios com plano de saneamento, abaixo da média nacional (CNI, 2017; SNIS, 2018).

Frequentemente, as bordas dos rios e igarapés apresentam considerável concentração urbana e populacional, que se utilizam dos afluentes como um meio de abastecimento e transporte, e simultaneamente representam ameaça a qualidade da água devido à escoadura de diversos resíduos líquidos, domésticos, provenientes da agricultura e efluentes industriais, expondo a saúde ambiental e da população inserida nas proximidades ao risco de potenciais contaminantes (DUARTE et al., 2014; FARIA et al., 2017).

A contaminação de afluentes confere potencial mutagênico ao local em que estão inseridos, representando risco de genotoxicidade aos organismos adjacentes, visto que a concentração deste complexo nocivo dependerá, dentre outros fatores, dos efluentes locais, sazonalidade da chuva, índice pluviométrico, vazante, entre outros (COELHO et al., 2014).

Popularmente conhecida como cebola, o *Allium cepa* vem sendo utilizada através dos anos como ferramenta de biomonitoramento ambiental, em testes consideravelmente válidos devido sua compatibilidade com outros mais complexos, rápida execução, baixo custo, verificação combinada da toxicidade e mutagênicidade, que quando positivos em determinada análise, indicam risco biológico a outros organismos (FISKESJÖ 1985; FISKESJÖ 1988). A predileção por este teste deve-se basicamente por este vegetal superior, possuir uma forma simples de plantio, facilidade de acesso e obtenção, apresentar um processo de divisão celular semelhante ao dos seres humanos, cromossomos de tamanho favorável para visualização microscópica e número reduzido (ALVIM et al., 2011; FARIA et al., 2017), além de corresponder às influências químicas ou tóxicas do ambiente em que está inserido permitindo, desta forma, que pesquisadores verifiquem e interpretem a nível celular os potenciais malefícios que estas substâncias representam aos ecossistemas (BRAGA; LOPES, 2015).

Experimentos realizados com esta hortaliça permitem, dentre outras coisas, identificar nas águas de rios e igarapés a presença de substâncias citotóxicas, expressas pela diminuição do índice mitótico de suas raízes, de substâncias genotóxicas através da verificação de alterações cromossômicas em suas células e da mutagênicidade pela identificação de micronúcleos, expressos por material nuclear que se desprende durante o processo de divisão celular e forma pequenos núcleos adjacentes ao núcleo principal (DUARTE et al., 2014).

Substâncias potencialmente tóxicas a organismos vivos possuem, na maioria das vezes, competência genotóxica que se destaca como causadora de danos diretos ao material genético das células (DNA), formando pontes anafásicas, a quebra de fita simples ou dupla, formação de adutos de base, lesão cromossomal, dentre outros (DUSMAN et al., 2012; SPOSITO et al., 2019).

Localizada na região do Baixo Acre, a sub-bacia do igarapé Judia tem sua nascente no município de Senador Guiomard, com uma extensão de aproximadamente 26 km, é um importante manancial da cidade de Rio Branco, que nesta região, representa o principal afluente da margem direita do rio Acre (SANTOS, 2012). Grande parte da concentração populacional nas proximidades do Igarapé Judia, reside nas imediações de Áreas de Preservação Permanente (APP), além de serem zonas que podem apresentar enchentes,

deslizamentos, escorregamentos ou estiagens (PEREIRA et al., 2017).

Classificado como um igarapé com um padrão de drenagem ramificado, característico da região amazônica (SOUSA et al., 2012), a água deste afluente é habitualmente utilizada no abastecimento público na região do segundo distrito de Rio Branco, na dessedentação de rebanho bovino, na agricultura, no comércio de água subterrânea em carros pipas, balneabilidade, uso doméstico e paisagismo (SANTOS et al., 2012). Portanto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e a mutagenicidade do Igarapé Judia no município de Rio Branco, Acre, Brasil.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

O igarapé Judia (Figura 1), localiza-se a sudeste do município de Rio Branco, apresentando suas nascentes no município de Senador Guiomard/AC e a foz na cidade de Rio Branco, confluência com o rio Acre. Localizado entre as coordenadas 10°9'1"S e 67°44'14" W, onde situa-se o alto curso, e o baixo curso entre as coordenadas de 9°58'24" S e 67°47'30" W (LIRA et al., 2010).

A sua nascente principal localiza-se na zona urbana do município de Senador Guiomard a poucos metros da rodovia AC 40, seguindo por três bairros daquela região (Centro, São Francisco e Nary Leite) (SANTOS, 2012). Após percorrer um trecho na zona rural, o Igarapé Judia atinge a zona urbana da cidade de Rio Branco através de 09 bairros: Vila Acre, Cidade do Povo, Loteamento Santo Afonso, Santa Inês, Belo Jardim, Recanto dos Buritis, Areial, Santa Terezinha e Seis de Agosto, onde faz desembocadura no Rio Acre (SOUZA et al., 2012).

Foram coletadas 11 amostras de água, sendo uma na nascente (10°09'14.0"S 67°44'16.6"W) e outros 10 pontos ao longo do Igarapé Judia: Ponto 1 (10°02'41.7"S 67°45'28.9"W); Ponto 2 (10°02'12.0"S 67°45'25.5"W); Ponto 3 (10°01'53.9"S 67°46'10.6"W); Ponto 4 (10°01'28.0"S 67°47'02.3"W); Ponto 5 (10°01'18.2"S 67°47'03.3"W); Ponto 6 (10°00'18.4"S 67°47'22.1"W); Ponto 7 (9°59'42.2"S 67°47'44.2"W); Ponto 8 (9°59'19.0"S 67°47'32.9"W); Ponto 9 (9°58'35.6"S 67°47'40.7"W); Ponto 10 (9°58'28.3"S 67°47'31.2"W) em dois períodos do ano, chuvoso (dezembro, 2018) e estiagem (junho, 2019).

As coletas das amostras foram feitas na calha central do rio na profundidade de 15 a 30

cm (CETESB, 1988; CETESB 2011), com balde de aço inox polido acoplado a uma corda (CETESB, 1988; ANA, 2012; ANA, 2019). As amostras foram armazenadas em frascos de vidro, boca larga, de 600 ml e encaminhadas ao laboratório Multifuncional (UFAC) para análise Genotóxica e Citotóxica.

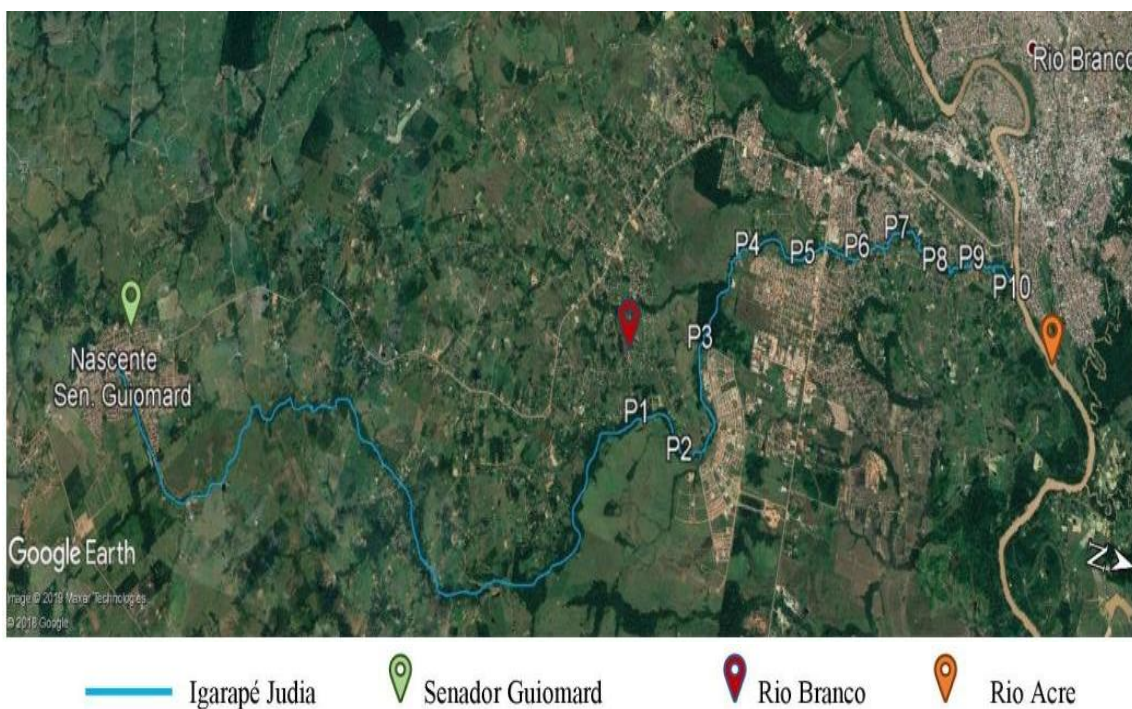


Figura 1. Imagens de satélite dos pontos amostrais ao longo do Igarapé Judia. Figura elaborada utilizando o software Google Earth, 2019.

2.2 ANÁLISE GENOTÓXICA, MUTAGÊNICA E CITOTÓXICA

Foram colocadas sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em placa de Petri revestida com papel filtro. Cerca de 100 sementes por placa e duas placas para cada tratamento. As sementes foram submetidas à germinação, sob a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, utilizando como meio as amostras (água coletada e controle), sendo a Nascente utilizada como controle negativo. Aplicou-se 3 ml das amostras (utilizando pipeta Pasteur) e controle correspondentes, diariamente sobre as sementes, até a germinação das mesmas (CARVALHO et al., 2017; PAIXÃO et al., 2019a).

Após 72h, os meristemas foram coletados com 1 a 2 cm de comprimento e colocados em tubos de ensaio contendo orceína acética, previamente identificados com a amostra correspondente e armazenados na geladeira (2 a 8°C) no período de 12 a 24 horas para

fixação. Após isso, os meristemas foram colocados em lâminas e foi seccionado a porção apical, adicionado 3 gotas de orceína acética e posicionado uma lamínula por cima. Realizou-se o esmagamento do meristema com auxílio de uma pinça (CARVALHO et al., 2017; PAIXÃO et al., 2019b).

As lâminas foram analisadas e fotografadas sob objetivas de 20x e 40 x em microscópio Zeiss® (modelo Scope.A1). Após o registro fotográfico, as células foram contadas utilizando o software ImageJ versão 1.52d com auxílio do plugin Cell Counter.

A análise genotóxica foi avaliada pela presença de alterações cromossômicas. Foram identificadas as células que contém aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, C-metáfase, multipolaridade e pontes anafásicas) e anormalidades nucleares (células binucleadas, trinucleadas e núcleos lobulados), foram utilizadas para este parâmetro 500 células por lâmina, totalizando 5 mil células por amostra (PALSIKOWISK et al., 2018).

Para a análise mutagênica foram identificadas células que continham um ou mais micronúcleos, sendo contadas 500 células por lâmina, totalizando 5 mil células por amostra (FISKEJO, 1988; MENEGUETTI et al., 2012; MENEGUETTI et al., 2014; ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; PAIXÃO et al., 2019a, PAIXÃO et al., 2019b).

Para o cálculo de índice Mitótico na análise citotóxica foi aplicada a seguinte equação: $(\text{Número Total de Células em Mitose} / \text{Número Total de Células} \times 100)$.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos em médias e desvio padrão para cada abordagem. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade dos dados e o teste Mann-Whitney de comparação entre médias, foi aplicado para aferir as diferenças significativas entre os valores encontrados em relação à Nascente (MAZEO et al., 2015). Para a comparação dos pontos entre período chuvoso e de estiagem foram adotados os testes t-Student e Mann-Whitney de acordo com o teste de normalidade realizado. A análise dos dados e a elaboração dos gráficos foi realizada através do programa GraphPad Prism® 8.0, sendo considerado significativo quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir das análises de cada ponto amostral estão representados na Tabela 1, com o valor médio e respectivo desvio padrão para o índice mitótico (IM),

alterações cromossômicas e nucleares (ACN) e micronúcleos (MN).

Tabela 1. Média e desvio padrão das análises amostrais do Período Chuvoso e do Período de Estiagem.

Período Chuvoso	NS	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10
IM	13,48 (±15,31)	2,96 (±2,44)*	3,44 (±3,63)*	5,22 (±4,07)	6,02 (±5,31)	26,46 (±17,21)	8,12 (±6,39)	7,20 (±9,24)	5,68 (±4,39)	4,16 (±5,09)*	2,00 (±2,91)**
ACN	2,40 (±3,92)	1,70 (±2,63)	3,80 (±4,59)	4,20 (±3,64)	7,60 (±5,93)	6,20 (±5,31)	2,50 (±3,75)	0,20 (±0,42)*	3,20 (±2,70)	1,20 (±1,48)	0,60 (±1,90)*
MN	0,80 (±1,87)	0,60 (±1,35)	1,60 (±2,76)	5,10 (±5,63)	7,30 (±8,52)**	2,10 (±4,63)	1,70 (±3,83)	0,70 (±1,25)	2,70 (±3,09)	1,00 (±1,70)	0,90 (±0,99)
Período de Estiagem	NS	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10
IM	1,72 (±1,58)	1,42 (±1,32)	1,06 (±1,71)	10,04 (±3,54)**	16,44 (±6,87)**	9,26 (±9,79)	11,92 (±10,4)*	2,70 (±4,93)	10,54 (±9,37)*	18,06 (±14,8)**	8,74 (±6,94)
ACN	4,90 (±4,25)	3,0 (±2,44)	2,0 (±2,21)	2,80 (±2,48)	6,80 (±7,23)	3,20 (±3,52)	5,80 (±3,67)	1,20 (±1,61)*	1,80 (±1,75)	3,70 (±4,16)	4,0 (±3,12)
MN	7,70 (±14,24)	1,10 (±1,44)	1,90 (±2,88)	5,90 (±3,41)	4,90 (±3,41)	3,80 (±4,66)	11,20 (±9,63)	6,40 (±7,89)	10,40 (±4,76)*	9,30 (±2,83)*	11,70 (±7,39)*

* representa se há diferença entre a Nascente e os pontos; (* p<0,05); (** p<0,01). (NS) Nascente; (IM) Índice Mitótico; (ACN) Alterações Cromossômicas e Nucleares; (MN) Micronúcleos.

Através da verificação do índice mitótico é possível avaliar o nível de citotoxicidade nas células após exposição às amostras, conforme o registro das alterações no índice mitótico das células de *A. cepa* identificou-se significância estatística (p<0,01) no ponto 10 e (p<0,05) nos pontos 1, 2 e 9 ao apresentarem diminuição significativa no IM em relação à nascente. Estudos sugerem que a diminuição significativa dos índices mitóticos comparados à nascente pode estar relacionada à concentração de contaminantes químicos ou biológicos que possam estar presentes na extensão dos cursos de água ou em regiões pontuais, que afetam o crescimento e o desenvolvimento das células (ATHANÁSIO et al., 2014; LV et al., 2015; LI et al., 2016; VASEEM et al., 2016; DUARTE et al., 2017), enquanto que a água da nascente, que é naturalmente filtrada pelo solo, apresenta boa qualidade para o consumo, podendo favorecer o crescimento e o desenvolvimento das células (ZANIN; BONUMÁ; CHAFFE, 2013).

No período de estiagem, os pontos 3, 4, 6 e 9 foram significantes (p<0,01) em relação a nascente ao expressarem, os maiores índices mitóticos. Alguns trabalhos sugerem que tanto a redução quanto o aumento do IM podem indicar a poluição de ambientes aquáticos, dessa forma, IM superiores ao controle podem ocorrer sob influência de substâncias que causam

uma proliferação celular desordenada com potencial de gerar desvantagens ou malefícios a organismos (CARITÁ E MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2009; FERNANDES et al., 2018).

A figura 4 relaciona cada ponto de coleta entre si em relação aos dois períodos avaliados, para verificar as possíveis diferenças estatísticas da citotoxicidade entre os pontos amostrais.

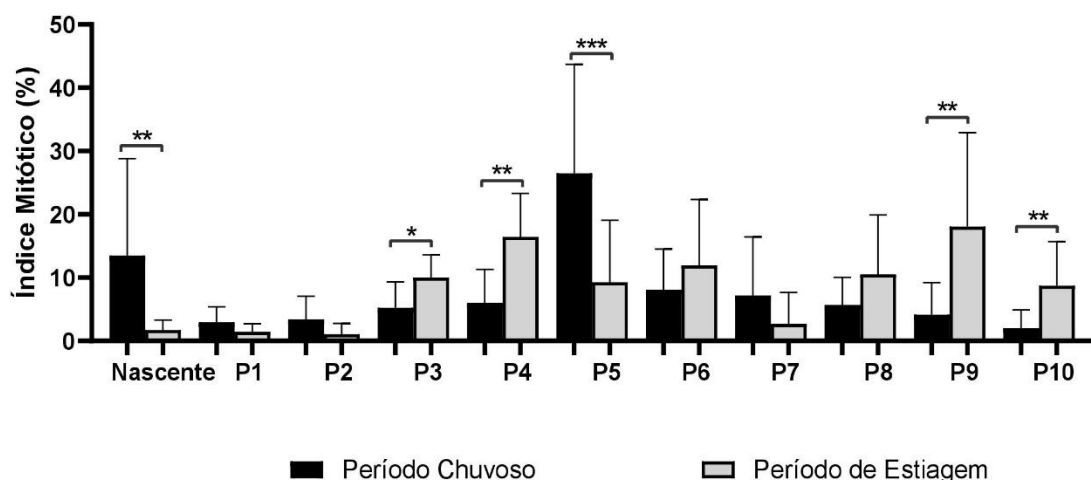


Figura 2. Comparação dos índices mitóticos entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.

* ($p<0,05$); ** ($p<0,01$); *** ($p<0,001$), teste t-Student e Mann-Whitney.

Ao analisar se houve diferença estatística dos pontos amostrais entre período chuvoso e estiagem, os pontos 3, 4, 9 e 10 apresentaram aumento significativo ($p<0,05$) do IM no período de estiagem. Trabalhos demonstram que o volume de água dos rios, através da influência de períodos sazonais tem relação direta com a concentração de substâncias tóxicas e nas diferenças do nível de toxicidade entre as amostras avaliadas, ao evidenciar que valores do IM foram maiores na estação seca (SCALON, 2009; OLIVEIRA et al., 2012), corroborando com os dados da presente pesquisa.

Em pesquisas realizadas em cidades dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Rondônia foi identificado que durante a estação chuvosa o potencial de citotoxicidade não foi estatisticamente significativo em relação ao controle ou à estação seca, provavelmente devido ao maior volume pluviométrico deste período (BIANCHI et al., 2011; CUCHIARA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; FARIA et al., 2017). Estes dados estão de acordo com o presente estudo, visto que 9 dos 10 pontos não apresentaram aumento no período chuvoso.

A genotoxicidade é caracterizada por alterações cromossômicas e nucleares, sendo encontrado no presente estudo, pontes anafásicas, pontes telofásicas, C-metáfase, aderência, anáfases com cromossomos atrasados, quebras cromossômicas, brotamentos (Figura 3).

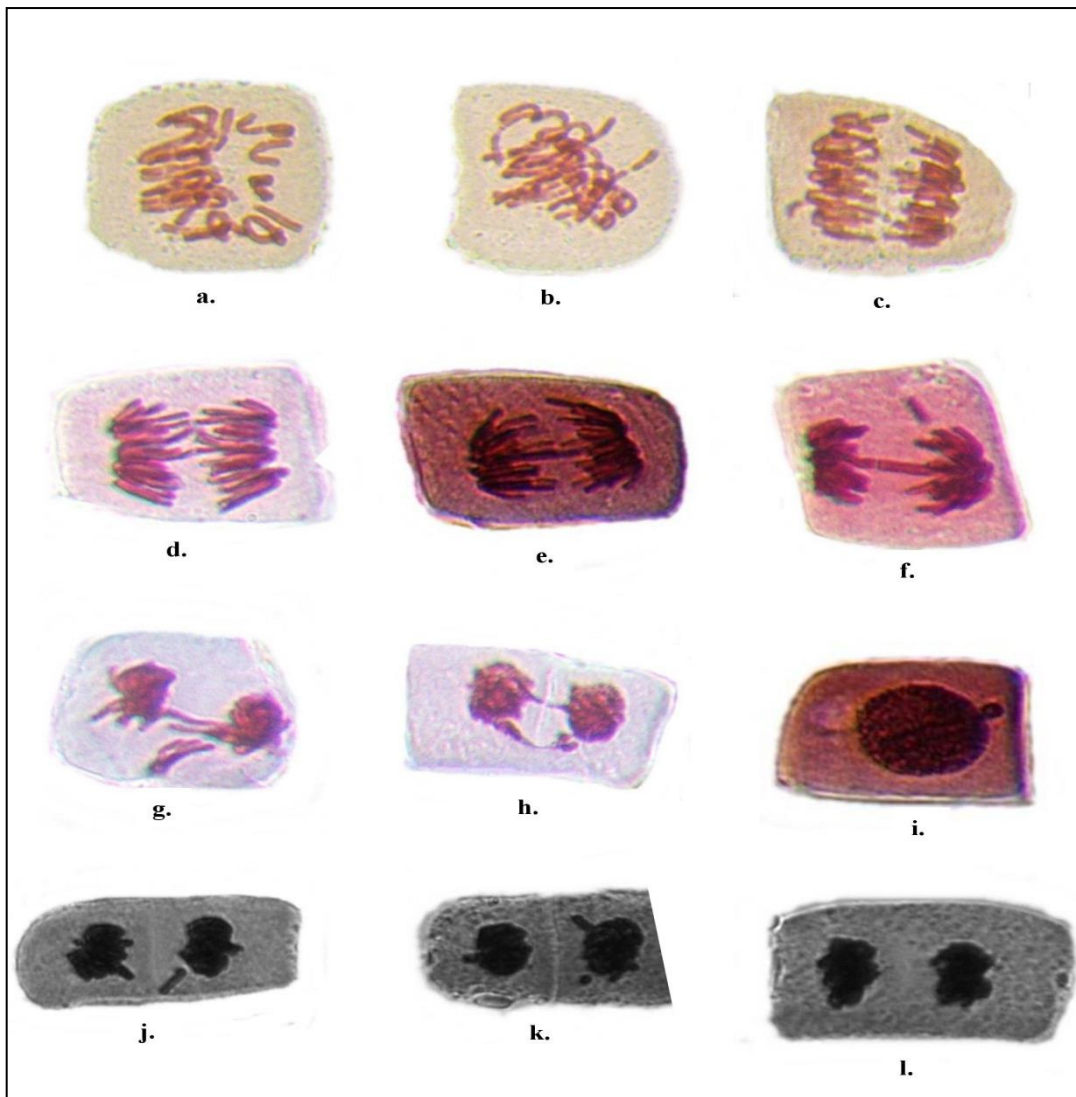


Figura 3. Genotoxicidade e mutagênica em células de *A. cepa*.

a. e **b.** metáfase com alterações; **c.** anáfase com cromossomo vagante; **d.** anáfase tardia; **e.** ponte anafásica; **f.** ponte anafásica com cromossomo isolado; **g.** e **h.** ponte telofásica com cromossomo isolado e aderência; **i.** brotamento; **j.** telófase tardia com cromossomo isolado; **k.** telófase com micronúcleo e cromossomo isolado; **l.** aderência.

No período chuvoso, os pontos 7 e 10 apresentaram menor número de aberrações cromossômicas, quando comparados com a nascente ($p < 0,05$). Dados esses que se mantiveram no ponto 7 durante a estiagem, sendo o único ponto amostral, neste período a apresentar significância estatística. Apesar de ser verificada a ação genotóxica, neste estudo ela não foi significativa pelo aumento e sim pelo menor número de alterações cromossômicas e nucleares. No período chuvoso o ponto 10 apresentou diminuição significativa do IM e consequente redução da proliferação celular, o que eventualmente pode diminuir a quantidade de erros ou alterações cromossômicas e nucleares. Da mesma forma, ainda que o ponto 7 não tenha apresentado significância no IM, foi verificado no período chuvoso diminuição deste

índice em relação à nascente, sugerindo que esta seja a causa de um menor número de alterações cromossômicas. A seguir, a figura 5 relaciona cada ponto entre si nos dois períodos avaliados.

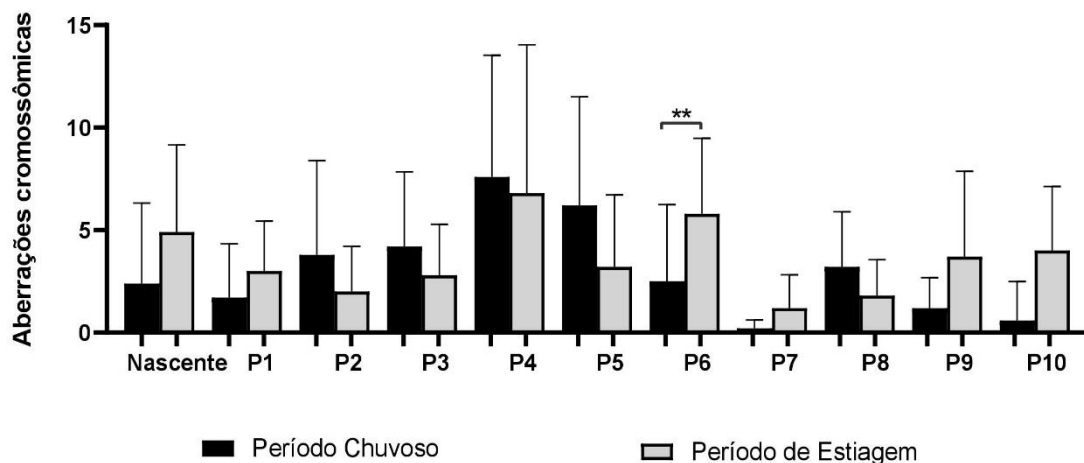


Figura 4. Comparação das aberrações cromossômicas entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.

** ($p < 0,01$), teste t-Student e Mann-Whitney.

Verifica-se que o Ponto 6 representou a única amostra com diferença estatística ($p < 0,05$) ao apresentar maior número de aberrações cromossômicas no período de estiagem em relação ao período chuvoso. Isso pode estar relacionado ao fato de que no período de estiagem esse ponto apresentou aumento significativo ($p < 0,01$) do índice mitótico, com uma possível proliferação celular desordenada e consequente aumento da frequência de erros ou alterações.

As alterações cromossômicas que ocorrem durante o processo de divisão celular, devido influência de substâncias com potencial de causar danos no material genético das células podem ser deletérias para o organismo (PERON et al., 2009; BRAGA; LOPES, 2015). Efeitos clastogênicos que causam alterações cromossômicas do tipo estrutural como pontes anafásicas ou quebras, originam células com inviáveis condições de manter um funcionamento adequado, que continuam se dividindo e propagando os danos da célula mãe, enquanto que os efeitos aneugênicos, como alterações no número de cromossomos, perdas, atrasos, aderência, multipolaridade e C-metafase fragilizam o funcionamento celular e estão relacionados a doenças de origem genética (MALAKHAMAD; ABU; ABD, 2015; SANTOS et al., 2017).

O potencial mutagênico avaliado através do registro de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* apontou que durante o período chuvoso, houve significância ($p < 0,05$) no ponto 4, com o maior número de micronúcleos em relação à nascente.

Enquanto que no período de estiagem, os pontos 8, 9 e 10 demonstraram significância ($p < 0,05$) no potencial mutagênico ao apresentarem um maior número de micronúcleos em

relação à nascente. Quando comparado os dois períodos, foi constatado que os pontos 6, 7, 8, 9 e 10 apresentaram aumento significativo do número de micronúcleos no período de estiagem em comparação ao período chuvoso (Figura 6).

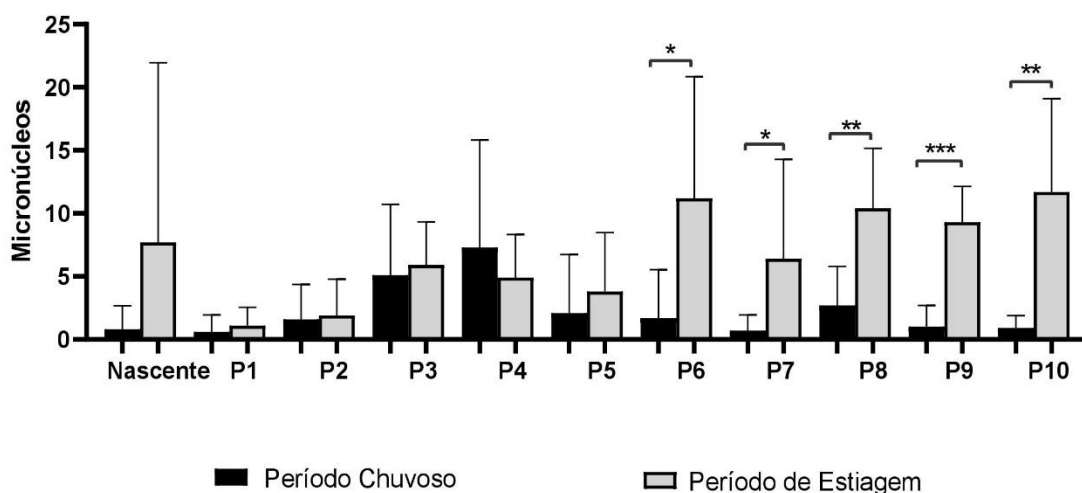


Figura 5. Comparação do potencial mutagênico entre cada ponto amostral em relação ao período chuvoso e de estiagem.

* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$), teste t-Student e Mann-Whitney.

Verificou-se que o potencial mutagênico se fez mais expressivo no período de estiagem, onde pode haver maior interação dos efluentes na água propiciando a concentração de resíduos neste local (ESTEVES, 1998). Os cinco pontos (6 ao 10) que tiveram aumento significativo, localizam-se em regiões mais centrais da cidade de Rio Branco e com maior densidade populacional. Com destaque para o ponto 9, situado no bairro 06 de Agosto, um dos mais antigos e históricos da cidade (mais de 110 anos de fundação), que cresceu em torno do Igarapé Judia e do Rio Acre (SANTOS et al., 2012). Entretanto, o povoamento às margens deste igarapé ocorreu de forma desordenada, e após muitos anos, a cidade ainda não dispõe de um sistema de coleta e tratamento adequado ou suficiente para evitar o despejo de resíduos e esgoto *in natura* neste afluente (CNI, 2017; SNIS, 2018), fato este, que pode corroborar com os resultados desta pesquisa, visto que o lançamento de efluentes contaminados podem causar poluição e afetar a qualidade da água, o que pode desencadear um potencial efeito genotóxico (MORAES; JORDÃO, 2002; MEDEIROS et al., 2016; BOLONHESI; LOPES, 2018).

Além deste, outros trabalhos que utilizaram *A. cepa* para análise de águas superficiais nas regiões sul e nordeste do Brasil também identificaram que amostras provenientes de locais sobre influência de esgoto doméstico apresentaram crescimento do potencial mutagênico

(ATHANÁSIO; PRÁ; RIEGER, 2014; BATISTA et al., 2016).

4. CONCLUSÃO

Os dados deste estudo sugerem a existência de agentes contaminantes no igarapé Judia com potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *A. cepa*. Tais resultados podem ser oriundos do lançamento de efluentes domésticos que, neste trabalho, provavelmente foram a causa do aumento significativo do potencial mutagênico no período de estiagem.

Dessa forma, sugere-se que estudos mais aprofundados acerca dos componentes químicos ou tóxicos presentes na água do Igarapé Judia, além da verificação da sazonalidade e ampliação dos pontos investigados sejam realizados, uma vez que o biomonitoramento deste igarapé é fundamental, pois a água que abastece a população é proveniente deste manancial.

5. REFERÊNCIAS

ALVIM, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, p. 255-265, 2011.

ANA. Agência Nacional de Águas. **Água na medida certa: a hidrometria no Brasil**. Brasília: 72 p., 2012.

_____. Agência Nacional de Águas. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: informe 2018**, 72 p., 2019.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.

ATHANÁSIO, C. G.; PRÁ, D.; RIEGER, A. Water quality of urban streams: the *Allium cepa* seeds/seedlings test as a tool for surface water monitoring. **The scientific World Journal**, v.14, n. 2, p. 1-7, 2016.

BATISTA, N. J. C.; CAVALCANTE, A. A. C. M.; OLIVEIRA, M. G.; MEDEIROS, E.C.; MACHADO, J. L.; EVANGELISTA, S. R.; DIAS, J. F.; SANTOS, C. E.; DUARTE, A.; SILVA, F. R.; SILVA, J.; Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**, vol. 164, p. 134-141, 2016.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 130-140, 2015.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos** 2016. Brasília: SNSA/MCIDADES, 218 p., 2018.

BOLONHESI, I. B. T. M.; LOPES, D. D. Analysis of toxicity from the effluente generated in a furniture industry spray booth using the species *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **Revista Ambiente e Água**, v. 13, n. 6, p. 1-09, 2018.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, n. 72, p.722-725, 2008.

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo, CETESB, 1988.

_____. Companhia de Tecnologia Ambiental do estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.

COELHO, M. B.; MOURÃO, A.; FILGUEIRAS, L.M.B.; MENESES, C. H. S. G. Mutagenicidade aas águas do açude do campus Ii da UEPB em Lagoa Seca, PB, utilizando o teste *Allium cepa*. **Revista de Biologia e Farmácia e Manejo Agrícola**, v. 10, n. 1, p.1-8, 2014.

CNI - Confederação Nacional da Indústria. **Comparações internacionais: Uma agenda de soluções para os desafios do saneamento brasileiro**. Brasília, DF: p. 128, 2017.

CNI - Confederação Nacional da Indústria. **Burocracia E Entraves Ao Setor De Saneamento**. Brasília, DF: p. 36, 2015.

DUARTE, M. N.; NOGUEIRA, M. A. A.; PASCHOAL, C. J. F.; MIRANDA, A. G.; MONSORES, G. L.; COSTA, L. A.; BRAGA, E. S.; BRAGA, B. B.; RODRIGUES, W. C. Avaliação da qualidade ambiental através do teste da cebola (*Allium cepa*) Exposta diretamente em leito de rios urbanos. **Revista Eletrônica TECCEN**. v. 7, n. 1/2, 2014.

DUARTE, M. N.; NOGUEIRA, M. A. A.; PASCHOAL, C. J. F.; MIRANDA, A. G.; DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 3, p. 1793- 1800, 2014.

DÜSMAN, E.; BERTI, A. P.; SOARES, L. C.; VICENTINE, V. E. P.; Principais Agentes Mutagênicos e Carcinogênicos de Exposição Humana. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 66-81, 2012.

FARIA, M. L. C.; COSTA, F. M.; SILVA, F. C.; BOSSO, R. M. V. Potencial de citotoxicidade e mutagenicidade das águas do rio Jaru, estado de Rondônia, em células de *Allium cepa*. **Revista Gaia Scientia**, v. 11, n. 2, 2017.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Journal of Heredity**, v. 102, n.1, p. 99 - 112, 1985.

FISKEJÖ, G. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*. **Amsterdam**, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LIMA, C. F. A.; FERNANDES, A. S.; GOMES, E. M.; OLIVEIRA, L. L.; MACEDO, A. F.; ANTONIASSI, R. et al. Antioxidant Activity and Genotoxic Assessment of Crabwood(*Andiroba*, *Carapa guianensis* Aublet) Seed Oils. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 11, 2018.

LIRA, E. M.; SANTOS, W. L; OLIVEIRA, J. S.; ARCOS, F. O.; NASCIMENTO, F. I. C. Correção da Rede de Drenagem e Morfometria da Bacia do Igarapé Judia – Acre – Brasil. In: **VIII Simpósio Nacional de Geomorfologia, Recife: Universidade Federal do Recife, Anais**. p. 606-616, 2010.

LIU X, SHI Q, ZOU J, WANG J, WU H, WANG J, JIANG W, LIU D. Chromosome and nucleolus morphological characteristics in root tip cells of plants under metal stress. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 25, n. 3, p.2419–2426, 2016.

LV, X., LU, Y., YANG, X., DONG, X., MA, K., XIAO, S., et al. Mutagenicity of drinking water sampled from the Yangtze River and Hanshui River (Wuhan section) and correlations with water quality parameters. *Scientific Report*, v. 5, n. 9572, p. 1- 12, 2015.

MALAKAHMAD, A.; ABD MANAN, T. S.; SIVAPALAN, S. Detection methods of carcinogens in estuaries: A review. **International Journal of Sustainable Development and Planning**, v. 10, n. 5, p. 601-619, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22 n. 13, p. 9796-9806, 2015.

MEDEIROS, S. R. M.; CARVALHO, R. G.; SOUZA, L.; BARBOSA, A. H. S. Índice de qualidade das águas e balneabilidade no Riacho da Bica, Portalegre, RN, Brasil. **Revista Ambiente e Água**, v. 11, n. 3, p. 1-20, 2016.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C. ; RAMOS, L. J. ; ZAN, R. A. . Adaptation of the Micronucleus Technique in *Allium Cepa*, For Mutagenicity Analysis of the Jamari River Valley, Western Amazon, Brazil. **Environmental & Analytical Toxicology**, v. 02, p. 127-131, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A. ; SILVA, J. B. ; SILVA, R. P. ; PAGOTTO, R. C. ; FACUNDO, V. A. Análise citotóxica e mutagênica do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* klotzsch ex reissek (celastraceae) chichuá (xixuá) amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, p. 301-309, 2014.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n 3, p. 1-10, 2002.

PAIXÃO, H. C. S.; PROLO JÚNIOR, S. L.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. **O teste de micronúcleo e suas diferentes aplicabilidades para análise da genotoxicidade**. Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental 2, p. 127-140, 2019.a

PAIXÃO, H. C. S.; PROLO JÚNIOR, S. L.; ZAN, R. A.; R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. **A utilização do sistema teste de *Allium cepa* para análise mutagênica de rios da Amazônia**. Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia, p. 163-175, 2019.b

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R. ; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, n. 3, p. 938–945, 2018.

PEREIRA, D. G. S. P.; PANARELLI, E. A.; PINHEIRO, L. S.; GONÇALVES, A. V. M.; PEREIRA, L. P. Área de preservação permanente e reserva legal: estudo de caso na bacia do Córrego bebedouro. **Ambiente & Sociedade**, v. 20, n. 1, p. 105-126, 2017.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PROLO JÚNIOR, S. L.; PAIXÃO, H. C. S.; SILVESTRE, L. N. S.; SILVA, R. P. M.; MENEGUETTI, D. U. O. **Análise Genotóxica: métodos e aplicações**. Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia, p.149-162, 2019.

SANTOS, W. L.; NASCIMENTO, F. I. C.; ARCOS, F. O. Uso Da Terra Versus Áreas De Nascentes: Análise De Impactos Com Utilização De Geotecnologias No Sudoeste Amazônico – Acre – Brasil. **Revista Geonorte**, Edição Especial, v.2, n. 4, p. 1777-1787, 2012.

SANTOS, C. S.; JÚNIOR, D. S. S; OLIVEIRA, J.S.; CASTRO, K. M. S. A; FEITOSA, M. B. J.; PANTALEÃO, S. M.; et al. Potencial mutagênico de um afluente do Rio Vaza-Barris (SE), por meio do sistema-teste micronúcleo (TMN) em molusco bivalve. **Scientia Plena**, v. 13, n. 10, p. 1-6, 2017.

SINGH, M.; DAS, A.; SINGH, D.; MAITI, P.; SHABBIR, M.; DAS, A. High genotoxicity of shipyard contaminants on *Allium cepa* and calf thymus DNA. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, p. 321-327, 2014.

SOUZA, A. A. C.; BRITO, M. C. W.; FREITAS, G. K. Análise de vulnerabilidade da sub-bacia do Igarapé Judia, diante dos impactos dos eventos extremos e atividades antrópicas na Bacia do Rio Acre, Acre, Brasil. **Trabalho de Iniciação científica do Curso de tecnologia em Gestão Ambiental da Uninorte**, 2012.

SPOSITO, J. C. V.; FRANCISCO, L. F. V.; CRISPIM, B. A.; DANTAS, F. G.; SOUZA, J.P.; VIANA, L. F., et al. Influence of Land Use and Cover on Toxicogenetic Potential of Surface Water from Central-West Brazilian Rivers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 483-495, 2019.

VASEEM, H., BANERJEE, T.K. Evaluation of pollution of Ganga River water using fish as bioindicator. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 188, n. 8, p. 444, 2016.

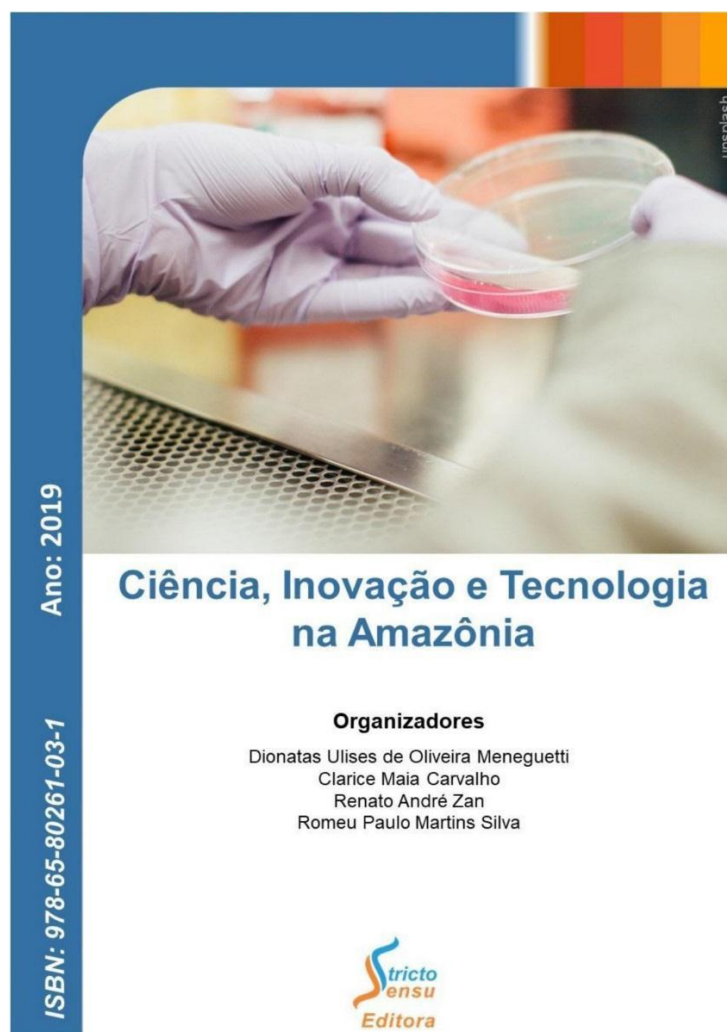
WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum**. Geneva; 631p. , 2017.

ZANIN, P. R.; BONUMÁ, N. B.; CHAFFE, P. L. B. **Características hidrogeológicas de Nascentes situadas em diferentes modelados de relevo**. XX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Rio Grande do Sul, 2013.

6. ANEXOS

Anexo I - ANÁLISES GENOTÓXICAS: MÉTODOS E APLICAÇÕES

Este capítulo foi publicado no livro *Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia*.



CAPÍTULO 11

ANÁLISE GENOTÓXICA: MÉTODOS E APLICAÇÕES

Sérgio Luiz Prolo Júnior^{1,2}, Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Laura Nadyne da Silva Silvestre¹, Romeu Paulo Martins Silva¹, Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti^{1,3}

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Genotoxicidade é a capacidade de um agente causar danos ao material genético das células. Substâncias químicas e agentes físicos derivados de poluição ambiental, drogas e afins podem ser difíceis de serem detectados por testes físico-químicos, então modelos biológicos são adequados uma melhor compreensão dos potenciais danos que oferecem aos seres vivos. O presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura demonstrando as principais técnicas aplicadas para realização de testes de avaliação de genotoxicidade. Dentre as principais técnicas aplicadas para ensaios genotóxicos destacam-se o teste de *Allium cepa*, Ensaio Cometa e SOS Chromotest, sendo estas as mais frequentes utilizadas em experimentos. Estas técnicas apresentam boa correlação quando comparadas a outros testes, permitindo que o pesquisador adote o melhor método para a realização de seu experimento de acordo com sua realidade.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Toxicologia e Métodos de análise.

ABSTRACT

Genotoxicity is the ability of an agent to cause damage to the genetic material of cells. Chemicals and physical agents derived from environmental pollution, drugs and others, may be difficult to detect by physical-chemical tests, so biological models are adequate for a better understanding of the potential damage they offer to living beings. The objective of the present study was to perform a literature review demonstrating the main techniques used to execute genotoxicity evaluation tests. Among the main techniques applied for genotoxic assays, *Allium cepa*, Comet Assay and SOS Chromotest tests are the most frequent tests used in experiments. These techniques present a good correlation when compared to other tests, allowing the researcher to adopt the best method to carry out their experiment according to their reality.

Keywords: Genotoxicity, Toxicology and Analysis methods.

1. INTRODUÇÃO

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é a molécula que armazena as informações genéticas nas células, sendo que sua integridade e estabilidade é fundamental para a sobrevivência dos seres vivos (GAJSKI, 2019). Esta molécula está localizada em

compartimentos celulares, sendo armazenada no citoplasma de procariotos e núcleo em eucariotos, mesmo assim ela pode sofrer alterações mediadas por agentes físicos ou químicos do ambiente, podendo gerar danos que eventualmente levam a mutações, desencadeando patologias, incluindo câncer (LEME; MORALES, 2009; HELLEDAY; ESHTAD; NIK-ZAINAL, 2014; ZHANG et al., 2018; FATEH et al., 2019; GERÍĆ et al., 2019).

Substâncias químicas provenientes da poluição ambiental, tais como compostos orgânicos e metais pesados, podem alterar a atividade celular, inibindo atividades enzimáticas e alterando seu material genético (MACEDA et al., 2015; KASPER et al., 2018).

A genotoxicidade é um termo geral que refere-se a capacidade de um agente provocar alterações genéticas, sejam de ordem estrutural, informacional ou de segregação do DNA, que podem levar a danos no material genético, provocando aberrações cromossômicas, tais como C-Metáfases, metáfase com aderência, metáfase com perdas cromossômicas, pontes anafásicas, anáfases e telófases com atrasos, perdas cromossômicas e anormalidades nucleares, são algumas evidências de alterações desencadeadas por agentes genotóxicos (PALSIKOWSKI et al., 2017; DUSINSKA et al., 2019).

O termo mutagenicidade está associado à genotoxicidade, uma vez que se caracteriza pela indução de mutações no material genético de forma permanente, ou seja, um agente genotóxico leva a mutagenidade (ARAÚJO, 2013; HARA; MARIN-MORALES, 2017).

Ensaio que envolve análises genotóxicas possibilitam a visualização destes efeitos macro e microscopicamente, sendo possível observar, a ação direta no desenvolvimento celular e tecidual (CHANDRA et al., 2005). Essas alterações causadas por agentes genotóxicos podem formar fragmentos cromossômicos que não são incorporados ao núcleo após a mitose, resultando em corpúsculos denominados micronúcleos (OLIVEIRA; YAMASHITA; MENEGUETTI, 2013), que medem cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo principal (PEREIRA JÚNIOR, 2015). Os micronúcleos são componentes citoplasmáticos de material genético nuclear incorporados durante a divisão celular, demonstrando assim que houve erro durante a replicação do DNA cromossômico e ou da divisão celular (FLORES-BRACHO et al., 2019).

As análises genotóxicas são realizadas afim de detectar se agentes químicos, físicos e biológicos, são capazes de alterar o material genético das células, e consequente, produzir mutações que podem comprometer a viabilidade celular (ROBERTO et al., 2016).

A aplicabilidade de testes genotóxicos é bastante ampla, destacam-se testes investigativos para análise de ecossistemas aquáticos (MAZZEO; MARIN-MORALES, 2015; HARA; MARIN-MORALES, 2017; COSTA; MONTEIRO; BATISTA, 2018; GUERREIRA, 2019), análise de componentes fitoquímicos (MENEGUETTI et al., 2015; ROBERTO et al., 2016; LIMAN; CIĞERCI GÖKÇE, 2018; WOLFF et al., 2018; MEDEIROS et al., 2019; FATEH et al., 2019), resíduos laboratoriais e industriais (MAZZEO et al., 2015; ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; ITOH; HATTORI, 2019; KHAN; ANAS; MALIK, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019), nanopartículas (BHAGAT; S; SHYAMA, 2019; DELMOND et al., 2019; DU et al., 2019; DUSINSKA et al., 2019; GHOSH et al., 2019), metais pesados (DELMOND et al., 2019) e metabólitos microbiológicos (GERIĆ et al., 2019; LACERDA et al., 2019).

Muitas análises físico-químicas por vezes podem apresentar certa dificuldade em elucidar se determinado efluente, droga, moléculas, metabólitos e afins, apresentam toxicidade para os seres vivos, pois podem se apresentar em pequenas concentrações, portanto testes genotóxicos vem a complementar tais análises, uma vez que organismos biológicos são susceptíveis a certos agentes, mesmo em baixas concentrações (KHAN; ANAS; MALIK, 2019).

Existe uma ampla gama de ensaios genotóxicos, cada qual com um organismo biológico adequado, dentre os testes, destacam-se o teste de *Allium cepa* (plantas), Ensaio Cometa (animais) e SOS Chromotest (bactérias). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo realizar uma revisão de literatura sobre as principais técnicas de análise genotóxica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TESTE DE *Allium cepa*

A espécie *A. cepa* foi inicialmente utilizada como organismo biológico a partir do ano 1920, e desde então, diversos estudos relacionados a toxicidade e genotoxicidade utilizam essa espécie em experimentos, pois trata-se de um teste de baixo custo e alta eficiência (FISKESJÖ, 1985; PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009; MALINI et al., 2010; LESSA; CARIELLO, 2017; FERNANDES et al., 2018). A utilização de plantas para ensaios de genotoxicidade é de grande importância, pois dispensa a preparação de meios de cultura elaborados, estabelecimento de ambientes extremamente controlados, autorização de Comitês de Ética em Pesquisa, além de apresentarem uma boa correlação quando a outras

metodologias que utilizam animais ou microrganismos para o mesmo tipo análise (FISKESJÖ, 1988; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; MENEGUETTI et al., 2011; MENEGUETTI et al., 2012; HARA; MARIN-MORALES, 2017; IQBAL et al., 2019; QUADRA et al., 2019).

O teste de *A. cepa* possui diversas adaptações, sendo que será apresentado dois protocolos de execução, um utilizando sementes e outro bulbos.

2.1.1 Sementes de *Allium cepa*

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Palsikowski et al. (2017):

- a) Colocar sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme em uma placa de Petri revestida com papel filtro (100 sementes por placa, duas placas para cada tratamento);
- b) Submeter as sementes à germinação, sob temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, utilizando como meio as amostras a serem analisadas (extratos, efluentes, etc).
- c) Utilizar como Controle Negativo, água ultrapura e Controle Positivo, Metanossulfonato de metila em concentração de $4\times 10^{-4}\text{M}$ e Trifluralina em 0,84 ppm (Dois controles positivos, cada qual consiste em um tratamento independente);
- d) Após os meristemas crescerem cerca de 1,5 cm em comprimento, devem ser coletados e fixados em solução Carnoy (3:1 Álcool-Ácido Acético) durante 6h a temperatura ambiente;
- e) Substituir a solução de Carnoy e depois armazenar a 4°C até a preparação;
- f) Submeter os meristemas fixados à Reação de Feulgen (MELO; VIDAL, 1978);
- g) Colocar os meristemas em lâminas, pingar uma gota de solução de Carmim acético 2%.
- h) Cobrir a lâmina com lamínula e pressionar suavemente para realizar o esmagamento do meristema;
- i) Remover a lamínula, colocando e retirando a lâmina rapidamente sobre nitrogênio líquido;
- j) Realizar a preparação permanente da lâmina utilizando resina sintética;
- k) Analisar a lâmina em microscópio de luz, utilizando a objetiva de 100x;
- l) Contar 5000 células por tratamento, sendo 500 células por lâmina e 5 lâminas por cada placa de Petri.

Seguindo o protocolo acima descrito, é possível avaliar os seguintes índices propostos por Palsikowski et al. (2017):

Fitotoxicidade por meio do Índice de Germinação (GI):

$$GI = \frac{\text{Número total de sementes germinadas}}{\text{Número total de sementes expostas}} \times 100$$

Citotoxicidade, avaliando o Índice Mitótico (MI):

$$MI = \frac{\text{Número total de células em divisão (Mitose)}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Genotoxicidade, avaliada por meio do Índice de Alterações Cromossômicas. Consideram-se as células que contêm aberrações cromossômicas (aderência, poliploidia, perda, C-metáfase, multipolaridade e pontes) e anormalidades nucleares (células binucleadas, trinucleadas e núcleos lobulados):

$$CAI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

Mutagenicidade, avaliando o Índice de Mutagenicidade (MutI) por meio da presença de micronúcleos:

$$MutI = \frac{\text{Número total de células alteradas}}{\text{Número total de células observadas}} \times 100$$

2.1.2 Bulbos de *Allium cepa*

O protocolo apresentado segue a metodologia e adaptações propostas por Meneguetti et al. (2012):

- a) Adquirir 10 bulbos de *A. cepa* (pequenas, uniformes, da mesma origem, não germinadas e sadias) para cada amostra e controle;
- b) Colocar cada bulbo para germinar em frascos de 50 ml, com o fundo imerso na amostra e no controle (água mineral);

- c) Coletar os meristemas após cerca de 72 horas com aproximadamente 0,5 a 3,0 cm de comprimento;
- d) Lavar os meristemas em água destilada;
- e) Hidrolisar com 1N HCL por 10 minutos em banho-maria a 60 °C, resfriar os tubos em água corrente;
- f) Lavar os meristemas com água destilada;
- g) Realizar a preparar em duas lâminas por bulbo, utilizando a técnica de esmagamento;
- h) Corar com o kit Panótico rápido LB mergulhando as lâminas 10 vezes em cada recipiente com a duração da imersão de 1 segundo na seguinte ordem: triarilmetano a 0,1%, xantenos a 0,1% e tiazina a 0,1%;
- i) Lavar as lâminas com água deionizada pH 7,0. Secar em temperatura ambiente;
- j) Visualizar ao microscópio de Luz na objetiva de 40x;
- k) Contar 1.000 células por lâmina;

Para uma melhor conservação da lâmina, Lopes (2016) sugere a colocação de uma gota verniz vitral incolor Acrilex® (PAIVA et al., 2006), posteriormente a colocação de uma lamínula e secagem *overnight*, desta forma a lâmina se torna permanente, facilitando sua visualização por um longo período de tempo.

O teste de *A. cepa* modificado de Meneguetti et al. (2012), permite a realização desta metodologia de uma forma rápida, mais econômica e já foi comprovada sua eficiência por meio dos trabalhos realizados por Ancia e Romão (2016), Meneguetti et al. (2014) Vanuchi et al. (2015) Lopes (2016).

Para ambos os protocolos descritos podem ser utilizados os índices de Palsikowski et al. (2017) previamente apresentados, com exceção do Índice de Germinação.

2.2 ENSAIO COMETA

Esta metodologia foi introduzida pelos cientistas suecos Ostling and Johanson em 1984, ela consiste na análise do dano causado por um agente a molécula de DNA, que foi nomeada a partir da semelhança da imagem que o DNA analisado deixa após uma eletroforese (RAJAPAKSHA; WIJAYARATHNA, 2017).

Esta técnica é relativamente simples, sensível, confiável e de baixo custo, sendo que diferentes organismos biológicos podem ser utilizados para sua realização, tais como

células humanas e de outros animais, leveduras, plantas e protozoários (GAJSKI, 2019; LIMAN; ACIKBAS; CIĞERCI, 2019).

2.2.1 Ensaio Cometa com sangue periférico de peixes

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Caritá (2010), baseado na metodologia de Singh et al. (1988):

- a) Submergir as lâminas em agarose normal 1,5% a 60°C, secar e armazenar em geladeira;
- b) Coletar amostras de 3µL de sangue de peixes e diluir em 1000µL de solução fisiológica de vertebrados;
- c) Colocar 10µL da suspensão celular nas lâminas e adicionar 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) a 37°C;
- d) Incubar em uma solução de lise (1mL triton X-100, 10mL de DMSO e 89mL de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução de estoque: NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, ~8,0g de NaOH sólido, 10g de Lauryl sarcosinato sódico para 1L), em geladeira por, no mínimo, uma hora.
- e) Após a lise, transferir as lâminas para cuba de eletroforese, contendo solução tampão (NaOH 300mM + EDTA 1mM, pH 12,1) à 4°C, em corrente 49V e 300mA, por 20 minutos;
- f) Neutralizar as lâminas em solução tampão (Tris 0,4M-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secar a temperatura ambiente e fixar com etanol 100% durante dez minutos.
- g) Realizar a coloração foi com Brometo de Etídio (0,02 mg/mL);
- h) Visualizar em microscópio de fluorescência, aleatoriamente, 100 nucleoides de cada peixe;
- i) Os nucleoides são classificados visualmente, segundo a classificação de Kobayashi et al. (1995) e de acordo com a migração dos fragmentos, em: classe 0 (ausência de dano visível); classe 1 (pequeno dano - cauda menor que uma vez o tamanho do nucleoide); classe 2 (médio dano – cauda com tamanho de uma a duas vezes o tamanho do nucleoide); e classe 3 (grande dano - cauda com tamanho maior que duas vezes o tamanho do nucleoide).

2.2.2 Ensaio Cometa com *A. cepa*

O protocolo apresentado a seguir é descrito por Liman, Acikbas e Ciğerci, (2019), baseado no protocolo de Tice et al. (2000):

- a) Submeter a germinação bulbos de *A. cepa* contendo as amostras a serem analisadas (seguir as orientações do experimento com *A. cepa* do referido trabalho);
- b) Selecionar 10 meristemas de cada tratamento;
- c) Realizar a extração nuclear, colocando 500 µL por meio de solução gelada de tampão Tris-MgCl₂ (4 mM MgCl₂–6H₂O; 0,2 M Tris, 0,5% v/v Triton X-100, pH 7,5);
- d) Suspender 50 µL da solução e misturar com 50 µL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C;
- e) Colocar a suspensão sobre lâminas previamente cobertas por agarose normal (1%), sendo 3 lâminas para cada tratamento;
- f) Submergir as lâminas em tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13) a 4 °C por 20 minutos;
- g) Realizar a eletroforese a 25 V e 300 mA at 4 °C por 20 minutos;
- h) Neutralizar as lâminas com solução Tris (0,4 M pH 7,5) três vezes e realizar a coloração com 70 µL de Brometo de Etídio (20 µg/mL) por 5 min;
- i) Visualizar o material com microscópio de fluorescência com objetiva de 40x.
- j) Contar aleatoriamente 50 cometas por lâmina e classificar em cinco classe, 0-sem danos até 4-dano completo.

2.2.3 Ensaio Cometa sangue periférico humano

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Gerić et al. (2019):

- a) Coletar sangue periférico e submeter as diferentes amostras (para orientações sobre a coleta e condições de incubação vide o referido trabalho);
- b) Utilizar como controle positivo Peróxido de Hidrogênio (1mM durante 10 minutos);
- c) Após a exposição (4 a 24h), deixar as amostras *overnight* em tampão de lise (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% sarcosinato de sódio, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10);
- d) Realizar a desnaturação por meio de solução desnaturante (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 13) durante 20 minutos;
- e) Realizar a eletroforese (1v/cm) durante 20 minutos;

- f) Neutralizar em solução tampão (0,4 M Tris; pH 7,5) por 15 minutos a 4°C;
- g) Efetuar a coloração com Brometo de Etídio (10 µg/mL);
- h) Visualizar o material com microscópio de fluorescência, com aumento de 250x;
- i) Contar aleatoriamente 100 cometas por lâmina, sendo duas lâminas para cada tratamento;
- j) Sugere-se repetir o experimento duas vezes.

2.3 SOS CHROMOTEST

O método SOS Chromotest foi desenvolvido e validado por Quillardet e Hofnung em 1985 e baseia-se nas respostas metabólicas de *Escherichia coli* frente à agentes genotóxicos (OTHMEN et al., 2019)

Trata-se de um ensaio quantitativo, colorimétrico, de dose-resposta que verifica se uma determinada substância causa dano ao genoma bacteriano, influenciando assim a produção da enzima β -galactosidase, utilizando como parâmetro de comparação, a produção natural de alcalino fosfatase (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985).

O protocolo apresentado a seguir foi baseado na metodologia utilizada por Othmen et al. (2019):

- a) Cultivar *overnight* cultura de *E. coli* de linhagem PQ37 em caldo Luria com ampicilina (30 µg/mL) a 37°C sob agitação de 250 rpm;
- b) Diluir a cultura até uma densidade óptica de 0,6;
- c) Colocar 190 µl da cultura e 10 µl da amostra a ser testada em placa de 96 micropoços;
- d) Incubar sob agitação de 1200g a 37°C durante 3 horas;
- e) Descartar o sobrenadante e suspender o pellet 200 µl em tampão (Tris (hidroximetil) Aminometano 2,43%);
- f) Transferir 100 µl para a placa e adicionar 100 µl de tampão SOS Chromogênico (QUILLARDET; HOFNUNG, 1985);
- g) Incubar durante 2 horas a 37°C sob agitação de 100g;
- h) Realizar o ensaio de atividade de β -galactosidase e de alcalino fosfatase, seguindo o protocolo de Quillardet e Hofnung (1985);
- i) Calcular a razão entre a atividade de β -galactosidase/alcalino fosfatase, sendo maior que 1,5, considera-se atividade genotóxica.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem diversas técnicas para a avaliação da atividade genotóxica de um agente, sendo que uma mesma técnica pode ser aplicada com a mesma finalidade, seja avaliando uma um princípio ativo, efluente, metal pesado, nanopartículas, etc.

Dentre os métodos para avaliação genotóxica, destaca-se o teste de *A. cepa*, pois sua aplicabilidade é ampla na investigação de inúmeros agentes, baixo custo, fácil execução, dispensa autorização em Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e apresenta boa correlação quando comparado a testes realizados com animais.

A utilização de modelos biológicos para avaliação genotóxica apresenta-se complementar às avaliações químicas e físicas, uma vez que muitas substâncias podem estar presentes em baixas concentrações, dificultando a identificação de sua presença, todavia pode ser notada pelas células.

4. REFERÊNCIAS

ANCIA, J. P.; ROMÃO, N. F. Análise da atividade citotóxica e mutagênica do extrato aquoso das partes aéreas de *Uncaria tomentosa* em teste de *Allium cepa*. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological.**, v. 3, n. 5, p.16-26, 2016.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO. M. M., MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere.**, v. 173, p. 31-42, 2017.

BHAGAT, J.; S, G. S.; SHYAMA, S. K. Genotoxicity of Cerium Oxide Nanoparticle in Zebrafish and Green Mussel *Perna viridis* Using Alkaline Comet Assay. **LIFE: International Journal of Health and Life-Sciences.**, v. 4, n. 3, p. 118-127, 2019.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de Amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da Cidade de Santa Gertrudes – SP.** (Dissertação) Mestrado em Ciências Biológicas: Biologia Celular e Molecular - Universidade Estadual Paulista, 2010.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere.**, n. 72, p.722-725, 2008.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L. K.; MURTHY, R. C.; SAXENA, P. N.; PANDE, P. N.; GUPTA, S. K. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Science of the Total Environment.**, v. 347, p. 46–52, 2005.

COSTA, V. M.; MONTEIRO, C. A. B.; BATISTA, N. J. C. Avaliação genotóxica e mutagênica de amostras de efluentes tratados por lagoas de estabilização em Teresina-Piauí. **Revista DAE.**, v. 66, n. 209, 2018.

DELMOND, K.A.; VICARI, T.; GUILOSKI, I.C.; DAGOSTIM, A. C.; VOIGT, C. L.; SILVA DE ASSIS, H. C. et al. Antioxidant imbalance and genotoxicity detected in fish induced by titanium dioxide nanoparticles (NpTiO₂) and inorganic lead (PbII). **Environmental Toxicology and Pharmacology.**, v. 67, p. 42-52, 2019.

DUSINSKA, M.; MARIUSSEN, E.; RUNDÉN-PRAN, E.; HUDECOVA, A. M.; ELJE, E.; KAZIMIROVA, A. et al. In Vitro Approaches for Assessing the Genotoxicity of Nanomaterials. In: Zhang Q. (eds) Nanotoxicity. **Methods in Molecular Biology.**, v. 1894. Humana Press, New York, NY, 2019.

FATEH, A. H.; MOHAMED, Z.; CHIK, Z.; ALSALAH, A.; MD ZAIN, S. R.; ALSHAWSH, M. A. Mutagenicity and genotoxicity effects of *Verbena officinalis* leaves extract in Sprague-Dawley Rats. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 235, p. 88-99, 2019.

FERNANDES, J. F. N.; SILVA, B. S. S.; FONTES, R. M. S.; CÂNDIDO, W. P.; MALAVASI, N.; V.; et al. Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico/genotóxico do látex de janaúba (*Synadenium grantii* Hook. f., Euphorbiaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 2018.

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

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research.** Amsterdam, v. 197, p. 243-260, 1988.

FLORES-BACHO, M. G.; TAKAHASHI, C. S.; CASTILLO, W. O.; SARAIVA, M. C. P.; KÜCHLER, E. C.; MATSUMOTO, M. A. N. et al. Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. **Clinical Oral Investigations**, *in press*, 2019.

GAJSKI, G.; ŽEGURA, B.; LADEIRA, C.; POURRUT, B.; DEL BO', C.; NOVAK, M. et al. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 1 Invertebrates). **Mutation Research-Reviews in Mutation Research.**, v. 779, p. 82–113, 2019.

GERIĆ, M.; GAJSKI, G. DOMIJAN, AM.; GARAJ-VRHOVAC, V.; FILIPIC, M.; ŽEGURA, B. Genotoxic effects of neurotoxin β-N-methylamino-L-alanine in human peripheral blood cells. **Chemosphere.**, v. 214, p. 623-632, 2019.

GHOSH, M.; GHOSH, I.; GODDERIS, L.; HOET, P.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, *in press*, 2019.

GUERRERA, E.; DOMICINI, L.; LEVORATO, S.; VANNINI, S.; ACITO, M.; FATIGONI, C. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of size-fractionated particulate matter collected in underground workplaces. **Air Quality, Atmosphere & Health.**, p. 1-9, 2019.
HARA, R.; MARIN-MORALES, M.A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State - Brazil). **Chemosphere.**, v. 174, p. 321–330, 2017.

HELLEDAY, T.; ESHTAD, S.; NIK-ZAINAL, S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. **Nature Reviews Genetics.**, v. 15, n. 9, p.585–598, 2014.

IQBAL, M.; ABBAS, M.; NISAR, J. NAZIR, A.; QAMAR, A. Z. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. **Chemistry International.**, v. 5, n. 1, p.1-80, 2019.

ITOH, S.; HATTORI, C. In vivo genotoxicity of 1,4-dioxane evaluated by liver and bone marrow micronucleus tests and Pig-a assay in rats. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.**, v. 837, p. 8-14, 2019.

KHAN, S.; ANAS, M. MALIK, A. Mutagenicity and genotoxicity evaluation of textile industry wastewater using bacterial and plant bioassays. **Toxicology Reports.**, v. 6, p. 193-201, 2019.

KASPER, N.; BARCELOS, R. P.; MATTOS, M.; BARONI, S.; et al. Impact of anthropic activities on eukaryotic cells in cytotoxic test. **Revista Ambiente & Água.**, Taubaté, v. 13, n. 3, 2018.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAMA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the cell gel electrophoresis. **MMS Communication.**, v.3, p.103-115, 1995.

LACERDA, G. R. S.; CANTALICE, J. C. L.; LIMA, G. M. S.; ALBUQUERQUE, L. E. F. SILVA, I. DE. G.; MELO, M. E. B. et al. Genotoxic activity of l-asparaginase produced by *Streptomyces ansochromogenes* UFPEDA 3420. **World Journal of Microbiology and Biotechnology.**, p. 35-41, 2019

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research.**, v. 692, p. 71-81, 2009.

LESSA, L. R.; CARIELLO, F. M. R. Adsorção do paracetamol em carvão ativado: regressão da citotóxicidade e mutagênicidade no sistema *Allium cepa*. **Revista Hórus.**, v. 12, n. 1, p. 44-54, 2017.

LIMAN, R., ACIKBAS, Y., & CIĞERCI, İ. H. (2019). Cytotoxicity and genotoxicity of cerium oxide micro and nanoparticles by *Allium* and Comet tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety.**, v. 168, p. 408–414, 2019.

LIMAN, R., CIĞERCI, İ. H., & GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 121, p. 444-449, 2018.

LOPES, R. M. **Avaliação de metodologias moleculares e citogenéticas para detectar níveis de deterioração em sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.).** (Tese) Doutorado em Botânica - Universidade de Brasília, 2016.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S.; et al. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente & Água.**, v.10, n.1, 2015.

MALINI, M.; MARIN-MORALES, M. A.; MANTOVANI, M. S.; JAMAL, C. M.; NATI, N.; PASSOS, T. S. et al. Determination of the antimutagenicity of an aqueous extract of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae), using in vivo and in vitro test systems. **Genetics and Molecular Biology**, v.33, n.1, p.176-181, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22 n. 13, p. 9796-9806, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; LEVY, C. E.; FONTANETTI, C. S.; MARIN-MORALES, M. A. Monitoring the natural attenuation of sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecological Indicators**, v. 56, p. 60–69, 2015.

MEDEIROS, I. U.; MEDEIROS, R. A.; BORTOLIN, R. H.; QUEIROZ, F. M.; SILBINGER, V. N.; PFLUGMACHER, S. et al. Genotoxicity and pharmacokinetic characterization of *Cereus jamacaru* ethanolic extract in rats. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 1, 2019.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30: p. 665-676, 1978.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETO, P. O.; RAMOS, L. J. et al. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. **Revista Pesquisa & Criação**, v.10, n.2, p.181-187, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; et al. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v.2, n.2, 2012.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, J. B.; SILVA, R. P.; PAGOTTO, R. C.; FACUNDO, V. A. Análise Citotóxica e Mutagênica do Extrato Aquoso de *Maytenus guyanensis* Klotzsch Ex Reissek (Celastraceae) Chichuá (Xixuá) Amazônico. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, p. 301-309, 2014.

MENEGUETTI, D. U. O.; LIMA, R. A.; SILVA, F. C.; PASSARINI, G. M.; FACUNDO, J. B.; PAGOTTO, R. C. et al. Análise de genotoxicidade aguda *in vivo* do extrato aquoso de *Maytenus guyanensis* Chichuá amazônico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 164-169, 2015.

OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. In: **VIII Jornada Científica Centro de Estudos Interdisciplinar em Desenvolvimento Sustentável da Amazônia**. E-book VIII Jornada Científica do CEDSA, v. 8, p. 73-88, 2013.

OUANES-BEN OTHMEN, Z.; BARKA, S.; ADELJELIL, Z.B.; MOUELHI, S.; KRIFA, M.; KILANI, S. et al. In situ genotoxicity assessment in freshwater zooplankton and sediments from different dams, ponds, and temporary rivers in Tunisia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, p. 1435–1444, 2019.

PAIVA, J. G. A.; FANK-DE-CARVALHO, S. M.; MAGALHÃES, M. P.; GRACIANO-RIBEIRO, D. Verniz vitral incolor 500®: uma alternativa de meio de montagem economicamente viável. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n. 2, p. 257-264, 2006.

PALSIKOWSKI, P. A.; ROBERTO, M. M.; SOMMAGGIO, L. R. D.; SOUZA, P. M. S.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicity Evaluation of the Biodegradable Polymers PLA, PBAT and its Blends Using *Allium cepa* as Test Organism. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 26, p. 938–945, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, J. L. **Avaliação do potencial citotóxico e mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do teste de micronúcleo em *Allium cepa***. (Monografia) Bacharelado em Ciências Biológicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de Biociências**, v.7, n.2, p.155-159, 2009.

QUADRA, G. R.; ROLAND, F.; BARROS, N.; MALM, O.; LINO, A. S.; AZEVEDO, G. M., et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753-757, 2018.

QUILLARDET, P.; HOFNUNG, M. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n. 3, p. 65–78, 1985.

RAJAPAKSHA, R. P. N. H.; WIJAYARATHNA, C. D. Determination of genotoxicity of aqueous extracts of *Flueggea leucopyrus* willd. (Katupila) using the optimized “Alkaline Comet Assay”. **Pharmaceutical Journal of Sri Lanka**, v. 7, p. 23–33, 2017.

ROBERTO, M. M.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Antigenotoxicity and antimutagenicity of ethanolic extracts of Brazilian green propolis and its main botanical source using *Allium cepa* test system. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 257-269, 2016.

SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R., SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, 1988.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

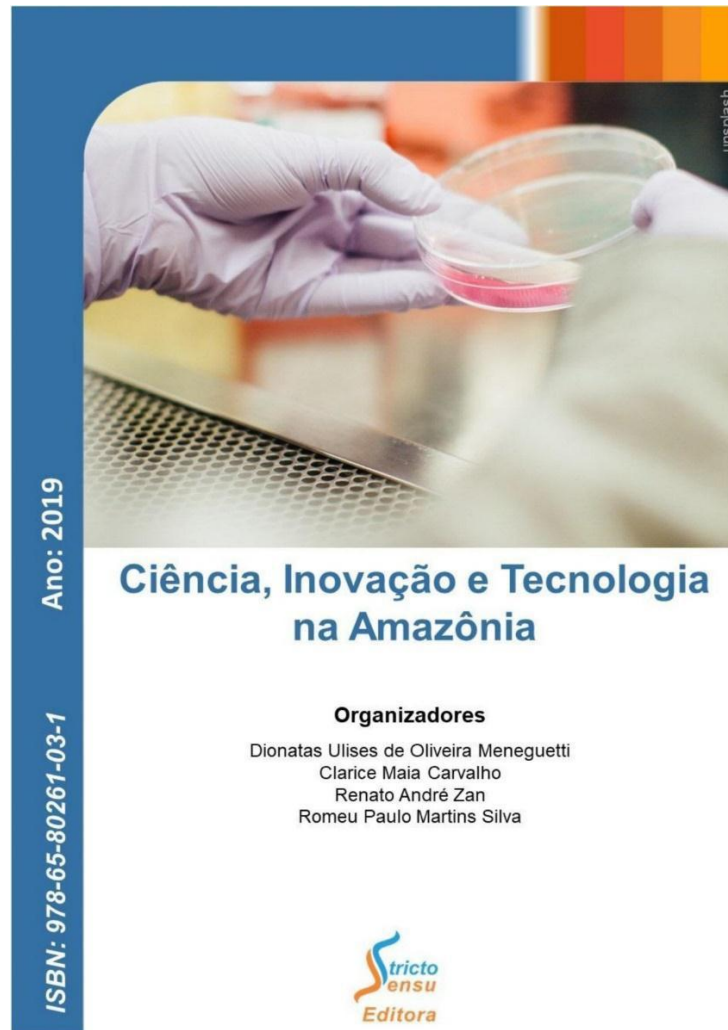
VANUCHI, V. C. F.; SOUZA, A. S. H.; SILVA, J. R.; BAPTISTA, J. A. A.; MENEGUETTI, D. U. O.; ZAN, R. A. Análise do potencial mutagênico em afluentes do rio Ji-Paraná influenciados pela emissão de rejeitos de uma indústria de laticínios e um curtume no município de Presidente Médici – RO, Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 68-73, 2015.

WOLFF, F. R.; BROERING, M. F.; JURCEVIC, J. D.; ZERMIANI, T.; BRAMORSKI, A.; VITORINO, J. C. et al. Safety assessment of *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) leaves extract: Acute, sub-acute toxicity and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 230, p. 109-116, 2019.

ZHANG, A.; JIA, A.; PARK, M.; LI, Y.; SNYDER, S.A. Genotoxicity assay and potential byproduct identification during different UV-based water treatment processes. **Chemosphere**, v. 217, p. 176-182, 2018.

Anexo II - FATORES PRÓ-CICATRIZANTES E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO

Este capítulo foi publicado no livro Ciência, Inovação e Tecnologia na Amazônia.



CAPÍTULO 2



FATORES PRÓ-CICATRIZANTES E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS PARA O TRATAMENTO DE FERIDAS: UMA REVISÃO

**Laura Nadyne da Silva Silvestre¹ , Hémilly Caroline da Silva Paixão¹, Sérgio Luiz
Prolo Júnior¹ e Dionatas Ulises de Oliveira Meneguetti¹**

1. Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, Acre, Brasil.

RESUMO

Desde a antiguidade, o homem utiliza plantas e extratos vegetais com o propósito de estancar hemorragia, proteger contra infecção e para a cicatrização de feridas. Atualmente, há o predomínio de substâncias sintéticas para a cobertura de lesões, porém, observa-se interesse crescente por alternativas naturais que alcancem o mesmo propósito. Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos principais fatores pró-cicatrizantes de feridas tratadas com plantas medicinais. Realizou-se uma revisão de literatura nas bases Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e National Institute of Health (PUBMED), utilizando os descritores "Medicinal plants" ANO "Wound healing". Foram selecionados um total de 39 artigos, os quais foram organizados em um quadro de resumo descritivo, apresentando informações pertinentes dos trabalhos. Observou-se que o principal fator pró-cicatrizante presente no tratamento com plantas medicinais é a atividade anti-inflamatória, a qual está diretamente relacionada com ação antibacteriana e antioxidante.

Palavras-chave: Extratos vegetais, cicatrização e anti-inflamatório.

ABSTRACT

Since ancient times man has used plants and vegetal extracts for the purpose of stopping bleeding, protecting against infection and wound healing. Currently, there is the predominance of synthetic substances to cover lesions, however, there is increasing interest in natural alternatives that achieve the same purpose. Thus, the present study aimed to perform a literature review of the main pro-healing factors of wounds treated with medicinal plants. A review of the literature was conducted in the Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Virtual Health Library (VHL) and National Institute of Health (PUBMED) databases, using the descriptors "Medicinal plants" AND "Wound healing". A total of 39 articles were selected, which were organized in a descriptive summary table, presenting pertinent information of the works. It was observed that the main pro-healing factor present in the treatment with medicinal plants is the anti-inflammatory activity, which is directly related to antibacterial and antioxidant action.

Key words: Plant extracts, healing e anti-inflammatory.



1. INTRODUÇÃO

As feridas são uma interrupção da continuidade dos tecidos da pele e podem ser causadas por estímulos físicos, químicos ou biológicos que desencadeiam de imediato uma série de respostas fisiológicas (CAPELLA et al., 2016). O processo de cicatrização de lesões cutâneas consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem em eventos bioquímicos e fisiológicos para que ocorra a reparação tecidual (VITORINO-FILHO et al., 2007). Trata-se de um processo que envolve fases interdependentes que se sobrepõem de forma contínua e temporal, as quais podem ser definidas como: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (SARMENTO et al., 2014).

As lesões de pele são recorrentes causadoras de incapacidade, dor e alterações psicossociais. Logo, reforça-se a necessidade do desenvolvimento de novas técnicas e coberturas para favorecer e acelerar o processo de cicatrização (LIEDKE; JOHANN; DANSKI, 2014).

Desde a antiguidade, observa-se grande preocupação do homem em manter a sua integridade física, através do tratamento de feridas e utilização de plantas e extratos vegetais, com o propósito de estancar a hemorragia, proteger contra infecção e favorecer o processo de cicatrização (PIRIZ et al., 2015).

O uso popular de plantas medicinais é recorrente no Brasil, sendo aplicado com diversas finalidades clínicas por se tratarem de elementos naturais, de baixo custo e de fácil acesso à população (CAPELLA et al., 2016). Embora haja o predomínio de substâncias sintéticas para o tratamento de feridas, observa-se crescente interesse por alternativas naturalistas que promovam a cicatrização das lesões e incentivo na busca de recursos mais simples, eficientes, de fácil aplicabilidade e oriundos de matérias-primas encontradas em regiões menos desenvolvidas (VITORINO-FILHO et al., 2007; SARMENTO et al., 2014).

Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão de literatura dos principais fatores pró-cicatrizantes de feridas tratadas com plantas medicinais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo trata-se de uma revisão da literatura, baseada em Galvão e Pereira (2014), seguindo os seguintes passos:



a) Elaboração da pergunta de pesquisa: Quais os principais fatores pró-cicatrizantes envolvidos no processo fisiológico de cicatrização de feridas tratadas com plantas medicinais?

b) Busca na literatura: Foram pesquisados artigos científicos nas bases: Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e National Institute of Health (PUBMED), utilizando os descritores previamente consultados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde): "Medicinal plants" AND "Wound healing". Foram incluídos no estudo, artigos redigidos nos idiomas inglês, português e espanhol e que atendessem aos seguintes filtros: texto completo disponível, assunto principal (cicatrização; extratos vegetais; plantas medicinais) e ano de publicação (2010 a junho de 2018). A quantidade de artigos encontrados na busca nas bases SCIELO, BVS e PUBMED, foram respectivamente 73, 220 e 147, totalizando, 440 artigos.

c) Seleção dos artigos: Essa seleção foi realizada por três pesquisadores, sendo que os artigos rejeitados por dois ou três destes, foram excluídos da revisão. Os critérios para exclusão foram artigos duplicados (encontrados em mais de uma base de busca), fora do objetivo da pesquisa, baixa qualidade metodológica e quando apresentaram resultados negativos para potencial cicatrizante.

d) Extração dos dados: Após a avaliação dos artigos foram selecionados um total de 39 trabalhos, conforme descrito no quadro 1, os quais foram utilizados nos resultados do presente estudo. Além dos artigos selecionados, também foram utilizados outros trabalhos para elaboração da introdução e enriquecimento da discussão deste artigo.

Quadro 1. Quantidade de artigos selecionados na busca da literatura

Artigos	SCIELO	BVS	PUBMED	Total
Total encontrado	73	220	147	440
Selecionados	4	22	13	39

e) Síntese dos dados: Os dados foram organizados em quadros e descritos no texto de acordo com o seu potencial cicatrizante.



f) Redação e discussão dos resultados: A descrição e discussão dos dados, estão no tópico 3 e 4 do presente trabalho.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, no quadro 2, apresenta-se o resumo descritivo dos estudos que atenderam aos critérios e que foram selecionados pelos pesquisadores. Estes artigos foram desenvolvidos em vários países nos últimos 8 anos e apresentaram como objetivo geral avaliar a atividade cicatrizante de plantas medicinais, utilizadas popularmente, por meio de estudos experimentais e clínicos.

Constatou-se que as espécies da família Asteraceae, com 12 citações dentre os artigos científicos encontrados, foram nesta pesquisa as plantas medicinais com a maior quantidade de estudos publicados com potencial terapêutico anti-inflamatório. As espécies da família Fabaceae aparece em seguida com 5 diferentes plantas estudadas devido sua capacidade anti-inflamatória e antibacteriana. Tal aplicabilidade pode ser explicada pela presença de metabólitos secundários como os terpenos e flavonóides que atuam reforçando a ação cicatrizante de feridas (MAVER et al., 2015).

Analisando os dados encontrados na presente revisão, percebe-se que a maioria dos estudos realizados nesta linha de pesquisa são de caráter experimental, por meio de animais, geralmente ratos *wistar* através da indução de lesões cutâneas na região dorsal, havendo poucos relatos de ensaios clínicos randomizados. Em relação aos fatores pró-cicatrizantes, nota-se que o mais frequente é a atividade anti-inflamatória, a qual está diretamente relacionada com ação antibacteriana e antioxidante.

O processo de cicatrização de feridas é composto por três fases: inflamação, proliferação e remodelação, as quais irão proporcionar características específicas para as lesões. A aplicabilidade de agentes que visam contribuir com o processo de reparação tecidual necessita ser direcionado especificamente para uma destas fases, favorecendo o processo fisiológico desenvolvido pelo organismo (AKKOL et al., 2012).



Quadro 2. Plantas medicinais utilizadas para a cicatrização de feridas.

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Amaranthaceae	<i>Pilea glomerata</i>	Extrato hidroalcoólico.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SILVA et al., 2010
Asphodelaceae	<i>Bulbine frutescens</i>	Gel fresco das folhas maduras.	<i>In vivo</i> , em porcos domésticos com feridas de controle espelhado.	Atividade anti-inflamatória e síntese de colágeno	PATHER; VILJOENB; KRAMER, 2011
	<i>Bulbine natalensis</i>	Gel fresco das folhas maduras	<i>In vivo</i> , em porcos domésticos com feridas de controle espelhado.	Atividade anti-inflamatória e síntese de colágeno	PATHER; VILJOENB; KRAMER, 2011
Pinaceae	<i>Pinus caribaea</i> var. <i>caribaea</i>	Pasta de clorofila-caroteno	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Não elucidado	OORVIGNY et al., 2011
	<i>Pinus pinea</i> L.	Pomada do óleo essencial.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SÜNTAR et al., 2012
	<i>Pinus halepensis</i> Mill.	Pomada do óleo essencial	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	SÜNTAR et al., 2012
Portulacaceae	<i>Punica granatum</i>	Pomada do extrato etanólico da flor.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado	PIRBALOUTI A21ZI; KOOHPAYEH, 2012
Rosaceae	<i>Amygdalus</i>	Pomada do extrato etanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas.	Não elucidado	PIRBALOUTI A21ZI; KOOHPAYEH, 2012
	<i>Orientalis</i>	Extrato bruto metanólico obtido de partes aéreas (folhas e galhos).	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i> , o efeito cicatrizante foi avaliado em lesões cirúrgicas na pele de camundongos.	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	TONIN et al., 2016
Ranunculaceae	<i>Ranunculus pedatus</i>	Extrato metanólico, aquoso, n-hexânico, éter dietílico e acetato de etila.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	AKKOL et al., 2012
Ranunculaceae	<i>Ranunculus constantinopolitanus</i>	Extrato metanólico, aquoso, n-hexânico, éter dietílico e acetato de etila.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória.	AKKOL et al., 2012
Campanulaceae	<i>Michauxia campanuloides</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia aegyptiaca</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia tchihatchewii</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia thyrsoidea</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante	GÜVENÇ et al., 2012
	<i>Michauxia nuda</i>	Pomada do extrato metanólico da raiz e erva	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e antioxidante.	GÜVENÇ et al., 2012
Fabaceae e Scrophulariaceae	<i>Astragalus Radix</i> e <i>Rehmannia Radix</i>	Extrato aquoso das ervas combinadas	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferação de fibroblastos	LAU et al., 2012
	<i>Cenostigma macrophyllum</i> Tui.	Emulsão óleo em água	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	COELHO et al., 2013

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Fabaceae	<i>Albizia lebeck</i>	Extrato etanólico da raiz.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana e antioxidante.	JOSH et al., 2013
	<i>Caesalpinia mimosoides</i> Lam.	Extrato aquoso etanólico do broto e folhas	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BHAT et al., 2016
	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	Gel a 1% do extrato bruto da casca.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas.	Aumento da produção das fibras de colágeno.	PINTO et al., 2015
	<i>Parkia biglobosa</i>	Extrato aquoso e etanólico da casca do tronco.	<i>In vitro</i> utilizando ensaios de cicatrização de feridas	Atividade antioxidante antibacteriana	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
Scrophulariaceae	<i>Scrophularia deserti</i>	Pomada do extrato etanólico do caule.	<i>In vivo</i> utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas	Não elucidado	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
	<i>Bacopa monnieri</i>	Extrato metanólico e o seu constituinte isolado, Bacosta-A	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Atividade anti-inflamatória e aumento da reticulação de fibras de colágeno	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012.
Equisetaceae	<i>Equisetum sp.</i> Yamicale	Extrato etanólico e pomada das partes superiores	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas	Atividade anti-inflamatória	CORRÊA et al., 2013
Amaranthaceae	<i>Pupalia lappacea</i>	Extrato metanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas contaminadas	Atividade antibacteriana	UDEGBUNAM et al., 2014
Euphorbiaceae	<i>Mallotus philippinensis</i> Muehl. Arg	Extrato dos pelos glandulares do fruto	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antioxidante a aumento da síntese de colágeno	GANGWAR et al., 2015
	<i>Sebastiania hispida</i> (Mart.) Pax	Pomada do extrato metanólico das folhas	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Atividade anti-inflamatória, aumento da síntese de colágeno e angiogênese	RIZZI et al., 2017
	<i>Acahypha wilkesiana</i>	Extrato aquoso etanólico das folhas	<i>In vitro</i> utilizando as nove plantas mais comuns, dadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante antibacteriana	ADETUTU, MORGANA CORCORANA, 2011
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita pepo</i> L.	Oleod da semente.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BARDAA et al., 2016
Blechnaceae	<i>Blechnum orientale</i> Linn.	Hidrogel com base de tanino.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos diabéticos para o modelo experimental de úlceras cutâneas	Atividade antibacteriana e antioxidante.	LA et al., 2016
Boraginaceae	<i>Ambelia euchroma</i>	Pomada do extrato de ervas e raízes	Ensaio clínico randomizado com tratamento de pacientes com queimadura de segundo grau	Atividade antibacteriana e anti-inflamatória	NASIR et al., 2016
Apiaceae	<i>Cenfeffa asiatica</i>	Spray do extrato de partes inteiras da planta.	<i>In vivo</i> utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Não elucidado	SAWATDEE et al., 2016
Elatinaceae	<i>Bergia ammannioides</i>	Pomadas do extrato etanólico das partes aéreas fracionado em n-hexano, clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol.	<i>In vivo</i> utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	EZZAT; CHOUCRY KANDIL, 2016
Anacardiaceae	<i>Pistacia lentiscus</i>	Oleod do fruto.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras de segundo grau induzidas por ácidos.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	KHEDIR et al., 2017
Malvaceae	<i>Malva sylvestris</i>	Pomada do extrato etanólico da flor.	<i>In vivo</i> utilizando ratos para o modelo experimental de queimaduras cutâneas	Não elucidado	PIRBALOUTI; AZIZI KOOHPAYEH, 2012



Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Matvaceae	<i>Hibiscus micranthus</i>	Extrato metanólico da folha.	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	BEGASHAW et al., 2017
	<i>Sida acuta</i>	Extrato aquoso etanólico das folhas	<i>In vitro</i> utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Calophyllum inophyllum</i> Linn	Aplicação tópica de Calophyllolide isolado	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cirúrgicas.	Atividade anti-inflamatória	NGUYEN et al., 2017
Loranthaceae	<i>Struthanthus vulgaris</i>	Pomada	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas	Atividade anti-inflamatória e aumento na produção de fibroblastos e óxido nítrico.	GRAMMA et al., 2016
Meleaceae	<i>Cinamomo</i>	Extrato aquoso etanólico.	<i>In vitro</i> plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
Nyctaginaceae	<i>Mrabilis jalapa</i>	Extrato aquoso etanólico	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
Asteraceae	<i>Maceia</i>	Extrato aquoso etanólico	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
	<i>Camomila</i>	Extrato aquoso etanólico	<i>In vitro</i> , plantas popularmente utilizadas para a cicatrização de feridas no Estado do Rio Grande do Sul.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e queratinócitos.	ALERICO et al., 2015
	<i>Ageratina pichinchensis</i>	Extrato aquoso e fração acetato de etila e fração aquosa	<i>In vitro</i> (efeito na proliferação celular) e <i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Atividade anti-inflamatória e proliferativa	CERECERO et al., 2011
	<i>Ageratum conyzoides</i>	Extrato aquoso etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> . Utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Tridax procumbens</i>	Extrato aquoso etanólico das folhas.	<i>In vitro</i> utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Vernonia amygdalina</i>	Extrato aquoso etanólico das folhas	<i>In vitro</i> utilizando as nove plantas mais comuns, citadas pelos curandeiros tradicionais da região, que foram identificadas e testadas em ensaios de cicatrização de feridas.	Atividade antioxidante antibacteriana.	ADETUTU; MORGANA CORCORANA, 2011
	<i>Achillea kellalensis</i>	Extrato aquoso da flor	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferativa	PIRBALOUTI; KOOHPAYEH; KARIMI, 2010.
	<i>Centaurea sadleriana</i>	Extrato metanólico, aquoso e n-hexânico	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Atividade anti-inflamatória e proliferativa	CSUPOR et al., 2010
	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Extrato hidroalcoólico.	<i>In vivo</i> , utilizando ratas para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante.	PRICHOA; ROMAN MANFREDINI, 2011
	<i>Siegesbeckia pubescens</i>	Extrato metanólico das partes aéreas.	<i>In vitro</i> para avaliação do crescimento dos fibroblastos e <i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas	Ativação de fibroblastos, efeito adstringente, antioxidante e antimicrobiana	WANG et al., 2011

Família	Espécie	Forma farmacêutica	Tipo de estudo	Possíveis fatores pró-cicatrizantes	Referências
Convolvulaceae	<i>Argyrea speciosa</i>	Pomada simples, desenvolvida por inclusão de etanol, etanol-água e extrato aquoso	<i>In vivo</i> , utilizando camundongos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória, aumento na produção de fibroblastos e período de cicatrização reduzido.	YAOA Vetal., 2014
Betulaceae	<i>Betula</i>	Extrato de triterpeno da casca exterior de bétula	<i>In vivo</i> , em modelos de cicatrização de feridas em porcos.	Atividade anti-inflamatória, estímulo da migração de queratinócitos, supostamente aumentando a formação de actin filopodia e fibras de stress	EBELING et al., 2014
Lythraceae	<i>Punica</i> <i>Granatum</i>	Extrato etanólico da flor	<i>In vivo</i> , utilizando ratos para o modelo experimental de feridas cutâneas.	Atividade anti-inflamatória e proliferativa	PIRBALOUTI; KOOHPAYEH; KARIMI, 2010

A primeira descrição do processo cicatricial de forma sequencial e organizada ocorreu em 1910 pelo biólogo francês Alexis Carrel que discriminou este fenômeno em quatro períodos (CARREL, 1910). Posteriormente, Clark com o intuito de oferecer uma elucidação mais didática deste processo o dividiu em três fases, que são utilizadas atualmente: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de maturação ou remodelagem (CLARK, 1985).

A fase inflamatória é a resposta imediata a uma lesão com período de duração entre 01 a 04 dias, onde ocorre a liberação de substâncias vasoconstritoras, ativação do sistema de coagulação sanguínea formada por colágeno, plaquetas e trombina e consequente resposta inflamatória que desencadeará a vasodilatação e a liberação de mediadores químicos. Nesta fase, poderá verificar-se a presença dos sinais cardinais: dor, edema, rubor, calor e possível perda de função (LAUREANO; RODRIGUES, 2011).

A fase de proliferação tem duração de 5 a 20 dias e é caracterizada pela formação de novos vasos sanguíneos, síntese do colágeno pelos fibroblastos e a ação de citocinas sintetizadas pelos queratinócitos que atuarão estimulando a cicatrização da lesão (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008).

A fase de remodelagem é a última deste processo e pode durar meses, onde ocorre uma deposição organizada de colágeno com intuito de melhorar a resistência tecidual e o aspecto cicatricial. Neste período verifica-se um equilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno (CAMPOS; BORGES-BRANCO; GROTH., 2007).

A inflamação é essencial para a defesa local e sistêmica contra patógenos e a reparação tecidual após a lesão. Esta reconstituição da pele é determinada inicialmente por uma resposta inflamatória através de um intenso infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares

e macrófagos. Essas células são estimuladas por prostaglandinas e produzem mediadores inflamatórios e prostaglicanos que irão estimular a remodelação da matriz extracelular (AKKOL et al., 2012). No entanto, exagerado mecanismo inflamatório podem comprometer o processo de regeneração tecidual, especialmente onde há deiscência de tecido mole ou exposição à membrana celular (CHAUSHU et al., 2015)

Um processo inflamatório controlado proporciona uma rápida cicatrização de feridas, através dos eventos de reepitelização, proliferação de queratinócitos e fibroblastos, deposição de matriz extracelular e angiogênese (CHAUSHU et al., 2015). Assim, a atividade anti-inflamatória é essencial para o favorecimento da reepitelização da lesão, em vista que o prolongamento da fase inflamatória proporciona o retardamento da cura (AKKOL et al., 2012).

Os extratos metanólicos de *Ranunculus Pedatus* e *Ranunculus constantinopolitanus* apresentaram uma resposta cicatrizante positiva nas feridas de ratos, assim como eficazes no ensaio de atividade anti-inflamatória. Estes fatos podem ser atribuídos aos flavonóides e terpenóides presentes nas partes aéreas da planta, fornecendo evidência científica para as características etnomedicinais turcas das referidas espécie (AKKOL et al., 2012).

Os pacientes com diabetes mellitus (DM) apresentam redução na permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, alterando a reparação tecidual e formação de fibras de colágeno. A aplicação tópica da emulsão óleo-em-água de *Cenostigma macrophyllum* Tui. em uma ferida cirúrgica em ratos com DM induzido apresentaram redução no número de células inflamatórias e aumento da fibroplasia, demonstrando os efeitos positivos do extrato na cicatrização de feridas em ratos diabéticos (COELHO et al., 2013).

As feridas infectadas são caracterizadas pela presença de agente infeccioso local e com evidências de intensa resposta inflamatória e destruição dos tecidos. O tratamento destas lesões possui o objetivo de proporcionar condições ideais para que ocorra o processo fisiológico de cicatrização, em vista que a multiplicação bacteriana prolonga a fase inflamatória e proporciona uma cura tardia da lesão. Assim, a aplicação tópica de antimicrobianos pode proporcionar uma reepitelização mais rápida e diminuir a resposta inflamatória inicial (BHAT et al., 2016).

A aplicação tópica do extrato de *Caesalpinia mimosoides* proporcionou uma completa reepitelização da camada epidérmica em um curto espaço de tempo. Este fato pode estar associado com a capacidade antioxidante e propriedades antimicrobianas, reduzindo a fase inflamatória de cicatrização, através do sequestro de radicais livres. As espécies reativas de oxigênio produzidas no local da ferida atuam como mecanismo de



defesa contra patógenos, entretanto, quando excessiva leva ao estresse oxidativo causando uma cicatrização tardia da lesão (BHAT et al., 2016).

O extrato da folha de *Hibiscus micranthus* demonstrou atividade antibacteriana significativa para a maioria dos organismos testados, sendo mais eficiente para *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Esta proteção da ferida contra patógenos proporciona a formação de um leito mais próximo ao estado natural e favorece a contração da ferida e epitelização em ratos através da migração de células epiteliais e ação dos miofibroblastos, os quais podem ser atribuídos também a propriedades antioxidantes (BAGASHAW, 2017).

4. CONCLUSÃO

Com base no exposto, percebe-se que o processo de cicatrização de feridas é um evento fisiológico complexo e que necessita de uma intervenção específica voltada para as fases de reconstituição tecidual. Os estudos a respeito da utilização de plantas medicinais como cobertura de lesão relatam que um dos fatores pró-cicatrizantes mais recorrentes é a atividade anti-inflamatória, a qual frequentemente está associada com a atuação antimicrobiana e antioxidativa.

5. REFERÊNCIAS

- ADETUTU, A.; MORGANA, W. A.; CORCORANA, O. Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n.3, p.50-56, 2011.
- AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; ERDOGAN, T. F.; KELES, H.; GOENÇ, T. M.; KIVÇAK, B. Wound healing and anti-inflammatory properties of *Ranunculus pedatus* and *Ranunculus constantinopolitanus*: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, n.2, p.478-484, 2012.
- ALERICO, G. C.; BECKENKAMP, A.; SILVA, M. V.; BUFFON, A.; VONPOSER, G. L. Proliferative effect of plants used for wound healing in Rio Grande do Sul state, Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, v.176, n.[s.i.], p.305-310, 2015.
- BARDAA, S.; HALIMA, N. B.; ALOUI, F.; MANSOUR, R. B.; JABEUR, H.; BOUAZIZ, M. Oil from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds: evaluation of its functional properties on wound healing in rats. **Lip. Heal. Deseas.**, v.15, n.73, p.1-12, 2016.



BAGASHAW, B.; MISHRA, B.; TSEGAW, A.; SHEWAMENE, A. Methanol leaves extract *Hibiscus micranthus* Linn exhibited antibacterial and wound healing activities. BMC Complement. Altern. Med., v.17, n.337, p.1-11, 2017.

BHAT, P. B.; HEGDE, S.; UPADHYA, V.; HEGDE, G. R.; HABBU, P. V.; MULGUND, G. S. Evaluation of wound healing property of *Caesalpinia mimosoides* Lam J. Ethnopharmacol., v.193, n. [s.i.], p.712-724, 2016.

CAMPOS, A. C. L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A. K.; Cicatrização de Feridas. Arq. Bras. Cir. Dig., v.20, n.1, p.51-58, 2007.

CAPELLA, S. O.; TILLMANN, M. T.; FÉLIX, A. O. C.; FONTOURA, E. G.; FERNANDES, C. G.; FREITAG, R. A.; SANTOS, M. A. Z.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.68, n.1, p.104-112, 2016.

CARREL, A. The treatment of wounds. J. A. M. A., v.55, n.[s.i.], p.2148-2150, 1910.

CERECERO, O. R.; ÁLVAREZ, A. Z.; MORA, A. R.; CORTÉS, D. A.; FERRER, J. E. J.; REYES, M. E. H.; TORTORIELLO, J. Effect on the Wound Healing Process and *In vitro* Cell Proliferation by the Medicinal Mexican Plant *Ageratina pichinchensis*. Plant. Med., v.77, n.10, p.979-983, 2011.

CHAUSHU, L.; WEINREB, M.; BEITLITUM, I.; MOSES, O.; NEMCOVSKY, C. E. Evaluation of a topical herbal patch for soft tissue wound healing: an animal study. J Clin. Periodontol., v.42, n.3, p.288-293, 2015.

CLARK, R. A. F. Cutaneous tissue repair: Basic biologic considerations. J. Am. Acad. Dermatol., v.13, n.5, p.701-725, 1985.

COELHO, N. P. M. F.; NOGUEIRA, V. C.; CARDOSO, M. A.; LOPES, L. S.; NASCIMENTO, P. P.; ROCHA, E. S.; SILVA, C. L. P. S.; ARISAWA, E. A. L. *Cenostigma macrophyllum* Tui. on the healing of skin wounds in rats with Diabetes mellitus. Acta Cirúrgica Brasileira., 2013; 8(28).

CORREIA, A. C. L.; HANS-FILHO, G.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; SILVA, I. S.; SARRAGIOTTO, M. H. Healing Effect of the Ointment Made of *Equisetum pyramidale* in the Treatment of Cutaneous Lesions in Diabetic Rats. Braz. Arch. Biol. Technol., v.56, n.3, p.377-382, 2013.

CSUPOR, D.; BLAZSÓ, G.; BALOG, A.; HOHMANN, J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. J. Ethnopharmacol., v.127, n.1, p.193-195, 2010.

DORVIGNY, B. M.; PERERA, L. M. S.; AGUIRRE, S. D.; GOUCOHEA, C. B. REGALADO, A. I.; MEDINA, A. E.; MACHADO, E. C. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. Rev. Cubana Plant. Med., v.16, n.1, p.24-33, 2011.

EBELING, S.; NAUMANN, K.; POLLOK, S.; WARDECKI, T.; VIDAL, S.; NASCIMENTO, J. M.; BOERRIES, M.; SCHMIDT, G.; BRANDNER, J. M.; MERFORT, I. From a Traditional



Medicinal Plant to a Rational Drug: Understanding the Clinically Proven Wound Healing Efficacy of Birch Bark Extract. *Plos One.*, v.9, n.1, p.1-18, 2014.

EZZAT, S. M.; CHOUCRY, M. A.; KANDIL, Z. A. Antibacterial, antioxidant, and topical anti-inflammatory activities of *Bergia ammannioides*: A wound-healing plant. *Pharmac. Biol.*, v. 54, n.2, p.215-224, 2016.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. *Epidemiol. Serv. Saúde*, v.23, n.1, p.183-184, 2014.

GANGWAR, M.; GAUTAM, M. K.; GHILDIYAL, S.; NATH, G.; GOEL, R. K. *Mallotus philippinensis* Muell. Arg fruit glandular hairs extract promotes wound healing on different wound model in rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, v.15, n.123, p. 1-9, 2015.

GRAMMA, L. S. S.; MARQUES, F. M.; VITTORAZZI, C.; ANDRADE, T. A. M.; FRADE, M. A. C.; ANDRADE, T. U.; ENDRINGER, D. C.; SCHERER, R.; FRONZA, M. *Struthanthus vulgaris* ointment prevents an over expression of inflammatory response and accelerates the cutaneous wound healing. *J. Ethnopharmacol.*, v.190, n.[s.i.], p.319-327, 2016.

GÜVENÇ, A.; AKKOL, E. K.; HURKUL, M. M.; SUNTAR, I.; KELES, H. Wound healing and antiinflammatory activities of the *Michauxia L'Hérit* (Campanulaceae) species native to Turkey. *J. Ethnopharmacol.*, v.139, n.2, p.401-408, 2012.

JOSHI, A.; SENGAR, N.; PRASAD, S. K.; GOEL, R. J.; SINGH, A.; HEMALATHA, S. Wound-Healing Potential of the Root Extract of *Albizia lebeck*. *Planta Med.*, v.79, n.9, p.737-743, 2013.

KHEDIR, S. B.; BARDAA, S.; CHABCHOUB, N.; MOALLA, D.; SAHNOUN, Z.; REBAI, T. The healing effect of *Pistacialentiscus* fruit oil on laser burn, *Pharmac. Biol.*, v.55, n.1, p.1407-1414, 2017.

LAI, J. C.; LAI, H.; RAO, N. K.; NG, S. Treatment for diabetic ulcer wounds using a fern tannin optimized hydrogel formulation with antibacterial and antioxidative properties. *J. Ethnopharmacol.*, v.189, n.[s.i.], p.277-289, 2016.

LAU, K.; LAI, K.; LIU, C.; TAM, J. C.; TO, M.; KWOK, H.; LAU, C.; KO, C.; LEUNG, P.; FUNG, K.; POOND, S. K.; LAU, C. B. Synergistic interaction between *Astragal Radix* and *Rehmanniae Radix* in a Chinese herbal formula to promote diabetic wound healing. *J. Ethnopharmacol.*, v.141, n.1, p.250-256, 2012.

LAUREANO, A.; RODRIGUES, A. M.; Cicatrização de Feridas. *Revista da S.P.D.V.*, v.69, n.3, p.355-365, 2011.

LIEDKE, D. C. F.; JOHANN, D. A.; DANSKI, M. T. R. Consultório de enfermagem para tratamento de feridas em Hospital de ensino. *Cogitare Enferm.*, v. 19, n.3, p.590-596, 2014.

MAVER, T.; MAVER, U.; KLEINSCHKE, K. S.; SMRKE, D. M.; KREFT, S. A review of herbal medicines in wound healing. *Inter. Journ. Derm.*, v.54, n.7, p.740-751, 2015.

NASIRI, E.; HOSSEINIMEHR, S. J.; HOSSEINZADEH, A. Z.; AZADBAKHT, M.; ARAKBARI, J.; AZADBAKHT, M. The effects of *Arnebia euchroma* ointment on second-



degree burn wounds: a randomized clinical trial. **J. Ethnopharmacol.**, v.189, n.[s.i.], p.107-116, 2016.

NGUYEN, V.; TRUONG, C.; NGUYEN, B. C. Q.; VO, T. V.; DAO, T.; NGUYEN, V.; TRINH, D. T.; HUYNH, H. K.; BUI, C. Anti-inflammatory and wound healing activities of calophyllolide isolated from *Calophyllum inophyllum* Linn. **Plos One.**, v.12, n.10, p.1-16, 2017.

PARENTE, L. M. L.; SILVA, M. S. B.; BRITO, L. A. B.; LINO-JÚNIOR, R. S.; PAULA, J. R.; TREVENZOL, L. M. F.; ZATTA, D. T.; PAULO, N. M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v.11, n.4, p.383-391, 2009.

PATHER, N.; VILJOEN, A. M.; KRAMER, B. A biochemical comparison of the in vivo effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **J. Ethnopharmacol.**, v.133, n.[s.i.], p.364-370, 2011.

PINTO, S. C. G.; BUENO, F. G.; PANIZZONI, G. P.; MORAIS, G.; SANTOS, P. V. P.; BAESSO, M. C.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. *Stryphnodendron adstringens*: Clarifying Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Planta Med.** v.81, n.12/13, p.1090-1096, 2015.

PIRBALOUTI, A. G.; KOOHPAYEH, A.; KARIMI, I. The wound healing activity of flower extracts of *punica granatum* and *achillea kellalensis* in wistar rats. **Acta Polon. Pharm.**, v.67, n.1, p.107-110, 2010.

PIRIZ, M. A.; ROESE, A.; LOPES, C. V.; SILVA, M. M.; HECK, R. M.; BARBIERI, R. L. Uso popular de plantas medicinais na cicatrização de feridas: implicações para a enfermagem. **Rev. Enferm. UERJ**, v.23, n.5, p.674-679, 2015.

PRICHOA, F. C.; ROMAN, S. S.; MANFREDINI, V. Tissue injuries of wistar rats treated with hydroalcoholic extract of *Sonchus oleraceus* L. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.47, n.3, p.605-613, 2011.

RIZZI, E. S.; DOURADO, D. M.; MATIAS, R.; MULLER, J. A. I.; GUILHERMINO, J. F.; GUERRERO, A. T. G.; MOREIRA, D. L.; SILVA, B. A. K.; BARBOSA-FERREIRA, M. Wound-Healing potential of *Sebastiania hispida* (Mart.) Pax (Euphorbiaceae) ointment compared to low power laser in rats. **Braz. J. Biol.** v.77, n.3, p.480-489, 2017.

SARATH, R.; HARISH, B. G.; KRISHNA, V.; SATHYANARAYANA, B. N.; SWAMY, H. M. K. Wound Healing and Protease Inhibition Activity of Bacoside-A, Isolated from *Bacopa monnieri* Wettst. **Phytoter. Res.**, v.24, n.[s.i.], p.1217-1222, 2010.

SARMENTO, P. A.; ATAÍDE, T. R.; PINTO, A. P. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; LÚCIO, I. M. L.; BASTOS, M. L. A. Avaliação do extrato da *Zeyheria tuberculosa* na perspectiva de um produto para cicatrização de feridas. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.22, n.1, p.1-8, 2014.

SAWATDEE, S.; CHOOCHUAY, K.; CHANTHORN, W.; SRICHANA, T. Evaluation of the topical spray containing *Centella asiatica* extract and its efficacy on excision wounds in rats. **Acta Pharm.**, v.66, n.2, p.233-244, 2016.

SILVA, M. I.; RIBAS-FILHO, J. M.; MALAFAIA, O.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, M. M.; VARASCHIM, M.; CZECKO, L. E. A utilização da *Pfaffia glomerata* no processo de cicatrização de feridas da pele. **Arquiv. Bras. Cirur. Digest.**, v.23, n.4, p.228-233, 2010.

SÜNTAR, I.; TUMEN, I.; USTUN, O.; KELES, H.; AKKOL, E. K. Appraisal on the wound healing and anti-inflammatory activities of the essential oils obtained from the cones and needles of *Pinus* species by in vivo and in vitro experimental models. *J. Ethnopharmacol.*, v.139, n.2, p.533-540, 2012.

TAKZAREE, N.; HADJIAKHONDI, A.; HASSANZADEH, G.; ROUINI, M. R.; MANAYI, A.; ZOLBIN, M. M. Transforming growth factor-13 (TGF-13) activation in cutaneous wounds after topical application of *aloe vera* gel. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.94, n.12, p. 1285-1290, 2015.

TAZIMA, M. F. G. S.; VICENTE, Y. A. M. V. A.; MORIYA, T. Biologia da Ferida e Cicatrização. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v.41, n.3, p.259-264, 2008.

TONIN, T. D.; THIENSEN, L. C.; NUNES, M. L. O.; BROERING, M. F.; DONATO, M. P.; GOSS, M. J.; PETREANU, M.; NIERO, R.; MACHADO, I. D.; SANTIN, J. R. *Rubus imperialis* (Rosaceae) extract and pure compound niga-ichigoside F1: wound healing and anti-inflammatory effects. *Arch. Pharmacol.*, v.389, n.11, p.1235-1244, 2016.

TUMEN, I.; AKKOL, E. K.; SUNTAR, I.; KELES, H. Wound repair and anti-inflammatory potential of essential oils from cones of *Pinaceae*: Preclinical experimental research in animal models. *Journ. Ethnopharm.*, v.137, n.3, p.1215-1220, 2011.

UDEGBUNAM, S. O.; UDEBUGNAM, R. I.; MUOGBO, C. C.; ANYANWU, M. U.; NWAHEJUR, C. O. Wound healing and antibacterial properties of methanolic extract of *Pupalia lappacea* Juss in rats. *BMC Complement. Altern. Med.*, v.14, n.157, p.1-8, 2014.

VITORINO-FILHO, R. N. L. BATISTA, M. C. S.; VERÇOSA, B. L. A.; SILVA, S. M. M. S.; MACHADO, A. S. F.; BONFIM, J. M.; BRANDÃO, A. A. C.; SOUSA, J. B. B. Avaliação do uso de pomada à base de sementes de jaqueira (*Artocarpus heterophyllus* Lam) na terapêutica tópica de feridas. *Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v.28, n.3, p.279-286, 2007.

WANG, R.; LECHTENBERG, M.; SENDKER, J.; PETEREIT, F.; DETERS, A.; HENSEL, A. Wound-healing plants from TCM: in vitro investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoter.*, v.84, n.[s.i.], p.308-317, 2013.

YADAV, K. S.; YADAV, N. P.; RAWAT, B.; RAI, V. K.; SHANKER, K.; RAO, C. V. An Assessment of Wound Healing Potential of *Argyreia speciosa* Leaves. *Scien.Worl. Journ.*, v.2014, n.[s.i.], 2014.

PIRBALOUTI, A.G; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A. Healing potential of Iranian traditional medicinal plants on burn wounds in alloxan-induced diabetic rats. *Rev Bras. Farmacogn Braz. J. Pharmacogn.* 22(2): Mar./Apr. 201 397-403.



Anexo III - Curso de Princípios de cultivo de células realizado no período de 16 a 18 de outubro de 2018, na Universidade Federal do Acre.



Anexo IV - Participação como aluna e Comissão Organizadora do I Simpósio em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia no período de 24 a 26 de Abril de 2019 na Universidade Federal do Acre.



Anexo V - Participação na atividade de Investigação de Surto de Doença de Chagas em Cruzeiro do Sul (Boca do Moa) e Rodrigues Alves (Ramal Nova Cintra) no período de 10 a 19 de Julho de 2019.



CERTIFICADO



O Instituto de Ciências Biomédicas 5- USP (Núcleo de Rondônia), certifica que o (a) Acadêmico (a) MSc. **Enf. Hemilly Paixão (UFAC-Rio Branco- Mestranda)**, participou de atividade de pesquisa "Investigação de Surto de Doença de Chagas em Cruzeiro do Sul (Boca do Moa) e Rodrigues Alves (Ramal Nova Cintra), entre 10 e 19/7/2019" com carga horária de 80 horas.

Monte Negro, 20 de julho de 2019.

Prof. Dr. Luis Marcelo Aranha Camargo

CRM/RO 938

ICB&USP/UNISL/CEPEM/INCT



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE (UFAC)
Programa de Pós-graduação Mestrado em Ciência da Saúde na
Amazônia Ocidental (MECS)

Certificado

O Programa de Pós-graduação Mestrado em Ciência da Saúde na Amazônia Ocidental, da Universidade Federal do Acre, certifica que a **Enf. Hemilly Paixão (UFAC-Rio Branco- Mestranda)**, participou de atividade de extensão intitulada "Campanha de profilaxia e Investigação de Surto de Doença de Chagas no Alto Juruá, Acre, entre 10 e 19/07/2019" com carga horária de 80 horas.

Prof. Dr. Dionatas Ulises O. Meneguetti
Coordenador do Projeto

Prof. Dr. Romeu Paulo Martins Silva
Coord. MECS

