
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - INTEGRAL

ANNELISE FRANCISCO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CLORETO DE
NÍQUEL UTILIZANDO *Allium cepa* COMO
ORGANISMO TESTE**

ANNELISE FRANCISCO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CLORETO DE NÍQUEL
UTILIZANDO *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE

Orientadora: PROF^a DR^a CARMEM S. FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

Co-orientadora: PROF^a CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção dos graus de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2011

628.42 Francisco, Annelise
F817a Avaliação da toxicidade do cloreto de níquel utilizando
Allium cepa como organismo teste / Annelise Francisco. - Rio
Claro : [s.n.], 2011
63 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado
- Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Co-Orientador: Cintya Aparecida Christofolletti

1. Resíduos perigosos. 2. Mutagênese ambiental. 3. Metais
pesados. 4. Genotoxicidade. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos podem ser demasiadamente injustos. Algumas pessoas podem ser esquecidas, enquanto outras podem ser lembradas sem tantos motivos. Muita gente conviveu comigo durante esses anos de graduação e pude aprender muito com cada uma destas pessoas, de forma que não posso deixar de lembrar e agradecer a pelo menos algumas delas.

Primeiramente agradeço aos meus pais por me ajudarem a chegar até aqui em todos os sentidos possíveis e imagináveis. Aos meus familiares que sempre me apoiaram cada qual a seu modo; minhas avós por sempre me acharem incrível independente do que eu estivesse fazendo e aos meus tios, tias, primos e primas por torcerem por mim.

Ao meu namorado Diego, pelos palpites, por ser positivo sempre e me ajudar a esquecer um pouco das coisas nas horas livres.

Agradeço à minha orientadora Carmem por ser sempre atenciosa e preocupada, mesmo com muitos orientados atazanando ao mesmo tempo. E à Cintya pela paciência, ajuda e coorientação irretocável.

Ao Tatu por ficar ao meu lado, quietinho, enquanto eu estudava.

À Grazieli Marinho, Mariana Frachia, Raissa Scopinho e Thaisa Garcia pelos melhores chás das cinco, por me apoiarem e alegrarem em momentos difíceis.

À Amanda Picelli, Raissa Fonseca e Rebeca M. S. Alves pelo companheirismo e parceria durante toda a graduação; as risadas, os trabalhos, as diversões, e os ombros... Sentirei falta de vocês! Também pela conversa sempre amiga de André Silva, Carlos Otávio Gussoni, Danilo Barêa Delgado, Fellipe Chaves Nominato, Ricardo Luis Dalia e Tauana Campos.

Ao pessoal do laboratório de mutagênese e demais colegas de estágio pela eventual ajuda, companhia e também pelos momentos de descontração.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Biologia pela manutenção de um bom ambiente de trabalho, especialmente à Sandra por manter o laboratório em ordem e fazer as soluções. Também a

todos os professores que me ajudaram a construir conhecimentos durante toda a minha formação; dentre esses, agradeço especialmente ao Prof. Dr. Victor José Mendes Cardoso que foi muito solícito quando precisei de ajuda.

Agradeço também àqueles que não foram citados, mas que conviveram comigo positivamente durante esse tempo todo. Muito obrigada a todos!

“Na vida, não existem soluções. Existem forças em marcha: é preciso criá-las e, então, a elas seguem-se as soluções.”

(Antoine De Saint-Exupéry)

RESUMO

O impacto das atividades antropogênicas sobre o meio ambiente é um tema de grande relevância atualmente, atraindo a atenção da comunidade científica em geral, visto que essas atividades têm causado alterações significativas na qualidade da água, do solo e do ar. Dentre a ampla gama de poluentes resultantes das atividades humanas, merece destaque a classe dos metais pesados, os quais possuem propriedades tóxicas e genotóxicas, constituindo fatores de risco para o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas, artrite e câncer nas populações expostas a estes contaminantes, bem como alterações nos ecossistemas contaminados. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do níquel como contaminante, utilizando *Allium cepa* (Liliaceae) como organismo-teste, a fim de detectar possíveis efeitos deletérios em seu material genético. Estas avaliações foram feitas por meio da exposição de sementes de *A. cepa* a três soluções, com diferentes concentrações de níquel. Os resultados obtidos no primeiro biensaio e na repetição estão apresentados na forma de artigo científico, a ser submetido para revista especializada. O estudo dos efeitos do níquel em *A. cepa* foram importantes, uma vez que os dados da avaliação dos danos induzidos neste organismo modelo podem ser utilizados para a comparação com modelos animais, sendo possível assim, a inferência dos perigos aos ecossistemas e à população que está exposta a esse contaminante.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	06
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	08
2.1 Contaminação aquática.....	08
2.2 Níquel como contaminante.....	09
2.2.1 Toxicidade do níquel em plantas.....	12
2.3 <i>Allium cepa</i> como bioindicador.....	15
2.3.1 Parâmetros mensurados pelos testes com <i>A. cepa</i>	17
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
ARTIGO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos constituem um local conveniente para o descarte do grande volume de resíduos gerados pelas indústrias e residências, já que promovem o transporte deste para longe de sua origem, adicionando-se a outras propriedades da água como grande capacidade de solubilização (ODUM, 1988; BERGON et al., 2007).

O acúmulo de subprodutos tóxicos no meio ambiente, resultantes das atividades humanas, tem chamado a atenção da comunidade científica. A presença desses xenobióticos no meio ambiente tem causado alterações significativas na qualidade da água, do solo e do ar, prejudicando assim a saúde dos organismos e dos ecossistemas aquáticos e terrestres.

Dentre a ampla gama de poluentes resultantes das atividades humanas, merece destaque a classe dos metais pesados, os quais possuem propriedades tóxicas e genotóxicas, constituindo, portanto, fatores de risco para o desenvolvimento de uma infinidade de patologias nas populações expostas aos contaminantes, bem como alterações nos ecossistemas contaminados (MORAES; JORDÃO, 2002; BARBOSA et al., 2009).

O níquel é um metal pesado de crescente importância na poluição dos ecossistemas aquáticos e terrestres, frente aos efeitos tóxicos e carcinogênicos induzidos nos seres vivos (SUNDERMAN, 1984; WUNSCH FILHO, 1995). Trata-se de um metal de grande aplicação industrial, sendo utilizado nos processos de galvanoplastia, fabricação de aço inoxidável, manufatura de baterias Ni-Cd, pigmentos, dentre outras finalidades (SILVA, 2001).

Enquanto análises químicas apenas detectam a presença ou ausência de substâncias na água, existe uma grande diversidade de bioensaios que podem ser realizados com o intuito de avaliar efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos de substâncias presentes em uma amostra de água, sendo essas conhecidas ou não. Dentre os vários bioensaios existentes, o teste de *Allium cepa* é reconhecido pelo

seu baixo custo, rapidez, facilidade de manuseio e alta sensibilidade; por isso, tem sido utilizado correntemente no monitoramento de amostras ambientais (RANK, 2003). Aditivamente a essas vantagens, organismos vegetais apresentam uma maior sensibilidade a metais pesados e apresentam boa correlação com modelos animais (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008, FISKESJÖ, 1988).

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do níquel como contaminante, utilizando *A. cepa* (Liliaceae) como organismo-teste, a fim de detectar possíveis efeitos deletérios em seu material genético.

O estudo dos efeitos do níquel em *A. cepa* é de suma relevância, uma vez que os dados obtidos por meio da avaliação dos danos induzidos neste organismo modelo podem ser utilizados como fundamento para a comparação com modelos animais, sendo possível assim, a inferência dos perigos aos ecossistemas e à população que está exposta a esse contaminante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Contaminação aquática

Compostos químicos genotóxicos utilizados em muitos processos industriais podem ser achados em vários compartimentos ambientais, como ar, água, solo e sedimentos (RANK, 2003).

As propriedades únicas da água fazem com que ela seja ideal para uma infinidade de atividades humanas, como a irrigação de plantações, geração de energia elétrica, além da participação em uma grande variedade de processos industriais e atividades domésticas (WHITE; RASMUSSEN,1998). Grande parte dessa água, utilizada para atender as necessidades humanas, retorna para o seu curso natural sem modificações, como é o caso daquelas utilizadas para geração de energia elétrica. No entanto, sendo a água um solvente versátil e conveniente para transportar resíduos produzidos para locais distantes de sua fonte de produção, na maioria das vezes, esta pode sofrer alterações severas em sua qualidade, principalmente quando utilizada para atividades domésticas e industriais (WHITE; RASMUSSEN,1998).

É bem estabelecido que a poluição diminui a qualidade de vida em vários aspectos, afetando a saúde e longevidade dos organismos. Além dos efeitos diretos na saúde, o perigo sutil dos poluentes reside no fato que eles podem ser tóxicos ou mutagênicos e induzir várias enfermidades humanas, como câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce (GROVER; KAUR, 1999).

Nas últimas décadas, com a intensificação dos processos de urbanização e industrialização, o despejo de contaminantes na natureza foi intensificado, principalmente nos ecossistemas de água doce e estuários, que propiciam um descarte barato e cômodo para os efluentes gerados pelas atividades humanas (ODUM, 1988). Muitas cidades do terceiro mundo possuem rede de esgoto incompleta, e muitas vezes o seu esgoto e resíduos líquidos são descartados em

lagos, rios e canais, sem nenhum tratamento prévio (GROVER; KAUR, 1999). Neste sentido, a poluição pode ter seus efeitos bem distantes da fonte original; por exemplo, os efluentes tóxicos de uma mina ou usina podem penetrar em um curso de água, contaminando toda a sua extensão até sua jusante, afetando sua flora e fauna. De acordo com Bergon et al. (2007), os efluentes de complexos industriais podem poluir e alterar a flora e fauna de muitos rios e lagos de uma região.

Sendo assim, o controle inadequado de efluentes industriais constitui, indiscutivelmente, a maior fonte antrópica de compostos químicos lançados nos corpos d'água, bem como os esgotos domésticos tratados de forma inadequada. Tal problema decorre também pela perda e destruição das bacias de captação, localização errada de unidades industriais e desmatamento (MORAES; JORDÃO, 2002; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009). Dessa forma, a contaminação dos ecossistemas aquáticos, pode colocar em risco a saúde das populações ribeirinhas, que muitas vezes utilizam essas águas para a pesca, consumo e lazer.

Muitos dos efluentes transportados pela água constituem misturas tóxicas, tais como agrotóxicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais pesados e uma enorme gama de substâncias que, conjuntamente, podem agravar ainda mais as condições ambientais e, conseqüentemente, todo o ecossistema (VEGA et al., 1996; WHITE; RASMUSSEM, 1998; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

O nível de poluição ou qualidade de águas superficiais ou subterrâneas pode ser determinado por análises físicas, químicas, saprobiológicas, radiológicas, e recentemente, também por análises de citotoxicidade e genotoxicidade (SMAKA-KINCL et al., 1996).

2.2 Níquel como contaminante

Metais são componentes naturais dos ecossistemas, sendo naturalmente incorporados aos sistemas aquáticos por meio de processos geoquímicos. São elementos importantes e até indispensáveis para muitos processos bioquímicos e fisiológicos nos organismos vivos; no entanto, muitos desses elementos, quando em grande quantidade, podem trazer efeitos adversos para a saúde humana. Diversos metais, com propriedades tóxicas, genotóxicas e potencialmente mutagênicas, são liberados na natureza por atividades domésticas ou industriais, constituindo assim

fatores de risco para o desenvolvimento de desordens neurodegenerativas, artrite e câncer em organismos experimentais e humanos expostos (MISSINI; LOMBI, 1999; MORAES; JORDÃO, 2002; BARBOSA et al., 2009).

São designados metais pesados o grupo de elementos que ocorrem em sistemas naturais, em pequenas concentrações e que apresentam densidade igual ou superior a 5 g/cm^3 (ADRIANO, 1986; POVINELLI, 1987; EGREJA FILHO, 1993; FADIGAS et al., 2002). Esses elementos são caracterizados como persistentes, tóxicos e bioacumulativos. Em ambientes aquáticos existem em solução, na forma de íons hidratados livres ou complexados por ligantes orgânicos e inorgânicos. Podem ainda estar presentes na forma sólida, devido às várias associações com sedimentos ou material particulado suspenso (STUMM; MORGAN, 1996).

A contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente em consequência do desenvolvimento da indústria moderna, de forma que as pesquisas com metais pesados têm ganhado importância e destaque (STEINKELNER et al., 1998; POMPEU et al., 2008). Segundo a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (2009), os metais pesados surgem nas águas naturais devido aos lançamentos de efluentes industriais tais como os gerados em indústrias extrativistas de metais, indústrias de tinta e pigmentos e, especialmente, às de galvanoplastia, que se espalham em grande número nas periferias das grandes cidades. Além destas, os metais pesados podem ainda estar presentes em efluentes de indústrias químicas, como as de formulação de compostos orgânicos, indústria de couro, pele e produtos similares, indústrias de ferro e aço, lavanderias e indústrias de petróleo.

O níquel (Ni) é o 24º metal em abundância na crosta terrestre, caracterizado como metal pesado, de densidade de $8,5 \text{ g/cm}^3$, peso atômico de 58,68 e número atômico 28. Na forma metálica é branco prateado, dúctil e maleável e possui grande resistência a corrosão e oxidação pelo ar, água e agentes alcalinos (SILVA, 2001). Dentre os vários compostos de níquel, os principais são óxido de níquel (NiO), hidróxido de níquel (NiOH), sulfato de níquel (Ni_3S_2) e cloreto de níquel (NiCl_2). Os sais de níquel de ácidos fortes e ácidos orgânicos são solúveis em água, enquanto os sais de níquel de ácidos inorgânicos fracos são insolúveis (VILAPLANA et al., 1991). Nos sistemas naturais há o predomínio de níquel na forma Ni^{2+} a qual é estável sob a ampla variação de pH e condições redox existentes nesses ambientes (MCGRATH, 1995; PYLE; COUTURE, 2011).

As fontes mais importantes de níquel são os minérios na forma de sulfeto de níquel. Os compostos de níquel são utilizados industrialmente em processos de galvanoplastia e eletroformação, na produção de baterias de níquel-cádmio e equipamentos eletrônicos; além disso, ligas de níquel, como o aço inoxidável, são utilizados para a fabricação de uma ampla gama de produtos (SILVA, 2001; MAGALHÃES, 2005). As principais fontes de contaminação ambiental por níquel são a produção e processamento de níquel e subprodutos, bem como a reciclagem de produtos e eliminação de resíduos contendo esse metal (CETESB, 2009). De acordo com Denkhaus e Salnokow (2002) a queima de combustíveis fósseis é responsável pela maior parcela de compostos de níquel presentes na atmosfera.

O metabolismo de níquel é essencial para a atividade de certas enzimas, mantendo o potencial redox da célula apropriado e integrando respostas fisiológicas, bioquímicas e de crescimento (YUSUF et al., 2011). Sabe-se que o Ni é um constituinte da urease e em pequenas quantidades (0,001 a 5 µg/g de peso seco) é um elemento traço essencial para muitas plantas e bactérias, mas em grandes concentrações, pode ser tóxico para plantas e humanos (AKBAS et al., 2009).

Segundo dados da CETESB (2009), a principal via de exposição para a população não exposta ocupacionalmente ao níquel e não fumante, se dá por meio do consumo de alimentos. A ingestão de elevadas doses de sais de níquel pode causar irritação gástrica. Todavia, dentre os efeitos adversos decorrentes da exposição ao níquel, a mais comum é a reação alérgica, uma vez que 10 a 20% da população apresenta alguma sensibilidade ao metal.

Estudos epidemiológicos mostraram um aumento no risco de câncer no trato nasal e respiratório, em mineiros e trabalhadores de refinarias de níquel (WUNSCH FILHO, 1995). Em estudos feitos com animais, compostos de níquel induziram tumores em praticamente todos os locais de aplicação (SUNDERMAN, 1984). A atividade carcinogênica depende, porém, da solubilidade dos compostos de níquel. Compostos insolúveis como sulfeto de níquel II (NiS), óxido de níquel (NiO) e sulfeto de níquel (Ni₃S₂) não são facilmente removidos dos tecidos e por isso, são mais carcinogênicos do que compostos solúveis como acetato de níquel (Ni(OAc)₂), cloreto de níquel (NiCl₂) e sulfato de níquel (NiSO₄) (DENKHAUS; SALNOKOW, 2002).

Estudos realizados por Käkela et al. (1999) mostraram que a adição de NiCl₂, em concentrações de 10 a 100 ppm, à água ingerida por ratos machos da linhagem

Wistar foi capaz de provocar redução no número de gestações e filhotes nascidos. Demonstraram também que o NiCl_2 induz o encolhimento dos túbulos seminíferos, provocando o fechamento de alguns deles, bem como uma diminuição no número de espermatogônias basais. Ainda de acordo com estes mesmos autores, a exposição das fêmeas provocou uma elevada mortalidade das crias durante a lactação.

Segundo estudos realizados em linhagem de células transgênicas GPT1 de hamster chinês por Lee et al. (1995), o níquel pode induzir hipermetilação e condensação do DNA em certas regiões do genoma por meio de um efeito indireto, no qual seria induzida primeiramente a condensação da cromatina. Esse mecanismo epigenético pode estar envolvido na carcinogênese induzida por níquel, cujos compostos não tem se mostrado classicamente mutagênicos em uma extensão compatível com a sua carcinogenicidade.

2.2.1 Toxicidade do níquel em plantas

O níquel é um micronutriente requerido em concentrações muito baixas pelas plantas; no entanto, quando em concentrações elevadas é conhecido por inibir o crescimento destas, causar clorose nas folhas de muitas espécies e induzir aberrações cromossômicas e efeitos tóxicos no nucléolo (LIU et al., 1994).

Segundo Akbas et al. (2009), além da clorose, a inibição do crescimento e a redução da composição de água dos tecidos vegetais são comumente observados em plantas expostas a quantidades fitotóxicas de níquel. Em seus experimentos, o Ni^{2+} inibiu o crescimento da raiz de *A. cepa* em todas as concentrações testadas, sendo que o efeito fitotóxico, ou seja, a concentração mínima efetiva que diminuiu o crescimento da raiz em 50%, foi encontrado na concentração 0,25 mM por meio de extrapolação.

Da mesma forma, Tuna et al. (2002) apontaram o Ni^{2+} como responsável pela inibição do crescimento do tubo polínico em *Nicotiana tabacum*; essa inibição se dá por mecanismos ainda pouco esclarecidos.

Estudos realizados por Lin e Kao (2005), com plântulas de arroz, indicaram que o Ni^{2+} é acumulado principalmente nas raízes destas, nas quais houve diminuição progressiva do crescimento com o aumento da concentração de Ni presente nas raízes. Em tal estudo, ainda foi apontado que esta alteração no crescimento

radicular pode ser decorrente de alterações na peroxidase, observadas após exposição ao NiSO_4 . Peroxidases influenciam no crescimento das plantas pela síntese de lignina, de forma que os resultados obtidos pelos autores sugerem que a rigidez da parede celular e lignificação são reforçados pelo NiSO_4 , levando à redução do crescimento de raízes do arroz. Além do aumento na atividade das peroxidases, o excesso de Ni^{2+} pode aumentar a concentração de ácidos orgânicos nos tecidos (YANG et al., 1997).

Nove diferentes íons metálicos, dentre os quais Ni^{2+} , em diferentes concentrações foram testadas por Fiskesjö (1988) em *A. cepa*. Em seus resultados ele observou que o níquel, além de induzir o aparecimento de C-metáfase típica, com cromossomos uniformemente espalhados pelo citoplasma, havia a indução de uma C-metáfase peculiar, na qual os cromossomos possuíam a aparência típica de quando estão em C-metáfase, mas a estrutura do fuso não parecia completamente inativada, de forma que os cromossomos permaneciam na região equatorial da célula. Essa forma específica de C-metáfase não foi observada pelo autor em nenhum outro tratamento, com qualquer outro metal.

Contudo, a tolerância a Ni^{2+} é encontrada em certas plantas, principalmente naquelas que habitam solos que possuem naturalmente elevadas concentrações deste íon, como os solos serpentínicos. Em muitas dessas plantas, o níquel é acumulado nas folhas, onde é seqüestrado no vacúolo na forma de complexos de malato e citrato (AKBAS et al., 2009). Dessa forma, fica claro que as respostas das plantas à exposição aos metais pesados variam de acordo com a espécie de planta, tecido, estágio de desenvolvimento, concentração e tipo de metal, as quais podem envolver componentes enzimáticos e não enzimáticos (GRATÃO et al., 2005).

A absorção de Ni pelas plantas é feita principalmente pelo sistema radicular por meio de difusão passiva e transporte ativo. A quantidade de Ni absorvida depende do pH e concentração de Ni^{2+} presente na solução do solo (CATALDO et al., 1978), metabolismo da planta, composição da matéria orgânica e presença de outros íons metálicos, os quais podem competir com o Ni^{2+} , exercendo efeito inibitório em sua absorção e translocação (YUSUF et al., 2011). Nesse âmbito, os íons Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} são apontados como inibidores da absorção de Ni^{2+} , possivelmente devido à afinidade pelos mesmos sítios carregadores (CATALDO et al., 1978). Da mesma forma, o excesso de Ni^{2+} pode inibir a absorção de cátions

metálicos bivalentes, podendo levar a deficiências, como é o caso da clorose por deficiência de Fe^{2+} (FOY et al., 1978; YUSUF et al., 2011).

Dentro da planta, a trajetória de transporte do Ni^{2+} se dá da raiz para as folhas. Nesse contexto, aminoácidos orgânicos são apontados como possíveis quelantes desse íon, de forma que evitariam a toxicidade deste para a planta e facilitariam a sua translocação através do xilema (FOY et al., 1978). Logo, a especificidade dos seus efeitos tóxicos provavelmente esteja relacionada à facilidade que esse íon possui de chegar à parte aérea (YUSUF et al., 2011).

As plantas superiores podem adotar basicamente duas estratégias para lidar com o excesso de íons metálicos absorvidos: exclusão ou acumulação (YUSUF et al., 2011). Algumas espécies são conhecidas por serem acumuladoras, como *Sebertia acuminata* (Sapotaceae), planta da Nova Caledônia, capaz de acumular níquel em até 25% do peso seco de seu látex (JAFFRE et al., 1976). Yusuf et al. (2011) afirmaram que em plantas acumuladoras há uma maior concentração de Ni na parte aérea.

Entretanto, dados obtidos por Page e Feller (2005), a partir de estudos feitos em trigo (*Triticum aestivum*), mostraram uma rápida redistribuição do níquel contido nas folhas mais velhas para as mais novas, indicando uma alta mobilidade deste pelo floema, mostrando que este elemento tende a se acumular nas partes vegetais recém formadas de algumas espécies.

Espécies exclusoras por sua vez, tendem a acumular níquel mais pronunciadamente em seu sistema radicular. Em concentrações tóxicas, tal mecanismo leva a uma inibição mais acentuada na raiz do que na parte aérea (YUSUF et al., 2011). Estudos ultra-estruturais realizados por Liu e Kottke (2003) em células meristemáticas de *A. cepa* expostas à duas diferentes concentrações de Cr+Ni revelaram que há um acúmulo de Ni na parede celular e vacúolo das células corticais da raiz de *A. cepa*. De acordo com Srivastava et al. (1999), os vacúolos são os locais de armazenamento de ácidos orgânicos nas células, onde o Ni e o Cr são quelados na forma de complexos orgânico-metálicos.

Metais de transição, como o níquel, também são apontados como responsáveis pela indução de estresse oxidativo nos organismos vivos, graças a sua habilidade de produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) (YUSUF et al., 2011). Tais compostos danificam componentes celulares como membranas, ácidos nucléicos e pigmentos de cloroplastos. Acredita-se que o níquel contribua para a

produção de ROS via reação de Haber-Weiss, na qual há a reação com H_2O_2 formando OH^\cdot (BRIAT;LEBRUM,1999; MAKSYMIEC, 2007).

2.3 *Allium cepa* como bioindicador

Testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental complexa a qual estão submetidos, bem como para a indicação de efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes, enquanto as análises físicas e químicas apenas determinam a presença e concentração de diferentes poluentes (SMAKA-KINCL et al., 1996).

A importância desse tipo de análise fez com que fossem desenvolvidos mais de 200 ensaios rápidos para avaliar a genotoxicidade de agentes ambientais desconhecidos (GROVER; KAUR, 1999). Entre eles está, por exemplo, o ensaio de mutagenicidade de *Salmonella* que é um sistema teste comumente aplicado para misturas complexas (RANK, 2003). No entanto, outros ensaios, como àqueles em que se utilizam animais, de maneira geral são custosos, de forma que sua utilização em uma rotina de monitoramento se torna inviável.

Plantas superiores, por sua vez, são organismos-teste muito adequados para monitorar a presença de substâncias mutagênicas no ambiente, bem como para o estudo dos efeitos prejudiciais de um mutágeno específico em concentrações conhecidas (MISSINI; LOMBI, 1999; RUIZ et al.,1992). Bioensaios com vegetais como *A. cepa*, *Vicia fava* e *Tradescantia paludosa* são consideravelmente mais baratos, sendo constantemente propostos para o monitoramento de poluição ambiental (GROVER; KAUR, 1999; SMAKA-KINCL et al., 1996). Em adição a isto, plantas são comumente mais sensíveis a metais pesados (FISKESJÖ, 1988).

Tais testes foram usados inicialmente para o estudo dos efeitos mutagênicos da radiação ionizante e mutágenos químicos; entretanto, recentemente eles também vêm sendo aplicados e se mostrado eficientes na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de poluentes ambientais (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; CHRISTOFOLETTI, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2009; BIANCHI et al., 2011). Além de apresentarem vantagens em relação ao baixo custo dos equipamentos e materiais necessários, bioensaios com vegetais são mais sensíveis e simples do que muitos métodos usados para a detecção dos efeitos genotóxicos

de químicos e amostras ambientais complexas. Além disso, as plantas se adaptam bem à estudos *in situ*, podem ser facilmente manipuladas e possuem ainda grande similaridade morfológica com os cromossomos de mamíferos; logo, a resposta das plantas às mutações são similares às observadas nestes animais (GROVER; KAUR, 1999; YI et al., 2007). Sendo assim, é possível estabelecer uma boa correlação entre o sistema teste vegetal com o sistema teste de mamíferos, apresentando boa preditividade também para efeitos em seres humanos (FISKESJÖ, 1988; MINISSI, LOMBI, 1999; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Essa concordância entre sistemas teste de plantas de mamíferos foi estimada em 91,5% por Grover e Kaur (1999), a partir de seus experimentos com *A. cepa*.

A espécie *A. cepa* tem sido utilizada por vários autores como Fiskesjö (1988), Smaka-Kincl et al. (1996), Grover e Kaur (1999) e Yi et al. (2007) como organismo teste eficiente para detecção da mutagenicidade de compostos químicos. A grande utilização desse organismo teste deve-se à características de sua cinética de proliferação celular, ao rápido crescimento de suas raízes, grande número de células em divisão, tolerância às diversas condições de cultivo, disponibilidade de sementes o ano todo, fácil manuseio e por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (QUINZANI-JORDÃO, 1987; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Segundo Fiskesjö (1988), meristemas radiculares de cebola têm sido empregados para o estudo de efeitos biológicos de agentes químicos desde que Levan introduziu o primeiro teste com *A. cepa*, em 1938. As raízes de cebola são fáceis de armazenar, seu manuseio é fácil e rápido e as células de seu meristema radicular constituem um sistema conveniente para avaliação de parâmetros macroscópicos, como crescimento e sobrevivência, bem como para parâmetros microscópicos, como as anormalidades mitóticas e cromossômicas (RANK, 2003). Os meristemas radiculares são comumente utilizados já que são usualmente os primeiros a serem expostos aos químicos espalhados na natureza, no solo e na água (FISKESJÖ, 1988).

Estudos realizados em *A. cepa* e *Vicia faba* expostos a efluentes de curtume contendo Ni e Cr mostraram que estes elementos afetam os aminoácidos e/ou a molécula de DNA, acarretando em um decréscimo nos valores de índice mitótico e, conseqüentemente, do crescimento das raízes (CHANDRA, GUPTA, 2002; CHANDRA et al., 2004).

2.3.1 Parâmetros mensurados pelos testes com *A. cepa*

De acordo com Ateeq et al. (2002), as células de meristemas radiculares de *A. cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para avaliações citogenéticas, sendo indicadas para estudos de poluentes ambientais. Muitos *endpoints* podem ser monitorados por meio das análises destas células, tais como alterações no índice mitótico (IM), indução de aberrações cromossômicas (AC) e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs e formação de micronúcleos (MN) (MIGID et al., 2007).

A citotoxicidade pode ser determinada pelo aumento ou diminuição nos valores do IM ou ainda pela quantificação de células em processo de morte celular. Se o valor encontrado para o IM for significativamente maior que o observado no controle negativo, isto indica que está ocorrendo um aumento da divisão celular, que pode levar a uma proliferação celular desordenada (LEME; MARIN-MORALES, 2009). A diminuição no índice mitótico também demonstra efeito citotóxico (MOREIRA et al., 2004). Segundo Aiub e Felzenszwalb (2011), a diminuição deste índice marca danos ocorridos principalmente durante a fase G1 da mitose; numa tentativa de reparar o dano no DNA, o ciclo celular leva mais tempo a se completar.

A genotoxicidade de uma substância ou amostra ambiental é quantificada pelo teste de AC em células meristemáticas deste vegetal. As AC são caracterizadas por mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002), por meio de diferentes mecanismos, envolvendo ações aneugênicas ou clastogênicas.

A ação aneugênica provoca a inativação de estruturas citoplasmáticas, como o fuso mitótico (FENECH, 2000), levando à uma segregação anormal dos cromossomos, resultando em células aneuplóides ou poliplóides (ALBERTINI et al., 2002). Por outro lado, a ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular (FENECH, 2000), ocasionando alterações cromossômicas estruturais (ALBERTINI et al., 2002).

Segundo Fiskejö (1985) e Vidakovic-Cifrek et al. (2002), a atividade aneugênica de compostos químicos é caracterizada pela presença de AC tais como células bi-nucleadas, polinucleadas, C-metáfases e perdas cromossômicas, as quais são originárias do mau funcionamento ou inativação do fuso mitótico. Entretanto, a

presença de fragmentos cromossômicos pode ser originada de quebras causadas por efeitos clastogênicos induzidos por compostos químicos (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

As anormalidades nucleares são alterações morfológicas no núcleo interfásico tais como núcleos lobulados, células polinucleadas e núcleo portando brotos nucleares. Segundo Fernandes et al. (2007) e Leme e Marin-Morales (2009), brotos nucleares podem ser resultado da eliminação do material genético derivado de processo de poliploidização.

A indução de micronúcleo nos meristemas de *A. cepa* é o resultado de danos cromossômicos e alteração do processo mitótico. A quantificação de MN e quebras cromossômicas nas células meristemáticas e, de apenas MN nas células da região F_1 , é utilizada na avaliação da mutagenicidade. Os MNs são resultantes de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que não foram incorporados ao núcleo principal durante o ciclo de divisão celular. Dessa forma, micronúcleos podem derivar tanto de fragmentos acêntricos resultantes de atividade clastogênica, quanto de cromossomos inteiros, indicando atividade aneugênica de compostos químicos (FENECH, 2000).

No experimento realizado por Yi et al. (2007), os micronúcleos induzidos pela exposição a arsênico indicaram que as células das raízes de *A. cepa* podem entrar na fase M da mitose com danos no DNA, passar pelo ciclo celular e então formar micronúcleos, o que, segundo os autores, demonstra uma disfunção no *checkpoint* da mitose e regulação do ciclo celular após a exposição ao arsênico. Tal teste vem sendo considerado, por muitos autores, como uma das mais promissoras técnicas de avaliação de efeitos mutagênicos induzidos por agentes químicos (RIBEIRO et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2006).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do projeto foi avaliar o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do níquel em células meristemáticas e da região F₁ de *A. cepa* (cebola).

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o potencial citotóxico do níquel pela avaliação da presença de células com alterações morfológicas indicativas de processo de morte celular e alterações no índice mitótico, em células meristemáticas de cebola;
- Avaliar o potencial genotóxico do níquel por meio do teste de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de cebola;
- Avaliar o potencial mutagênico do níquel pela presença de micronúcleos e quebras cromossômicas em células meristemáticas das raízes de cebola e micronúcleos, em células da região F₁;
- Comparar duas concentrações de sal de níquel com a concentração limite de níquel em corpos de água, estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material Biológico

Sementes de *A. cepa* (cebola), de mesmo lote, variedade Baia periforme, foram submetidas à germinação em três concentrações de cloreto de níquel, para a avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico dessa substância.

4.2. Níquel como substância tóxica

O tóxico utilizado é caracterizado como metal pesado. Para a montagem dos bioensaios foi utilizado o cloreto de níquel hexahidratado PA, da marca Synth, CAS number C.1055.01.AF e peso molecular 237,70.

No Brasil é utilizada a resolução do CONAMA, nº 357 de 25 de março de 2005, para controlar e taxar os limites máximos de contaminantes nos corpos hídricos. Segundo essa resolução, o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni.

Foram então utilizadas três concentrações de níquel nos testes em cebola. A primeira (N1) de 0,0125 mg/L, ou seja, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração (N2) utilizada, 0,025 mg/L é o próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. A terceira concentração (N3) foi 0,050 mg/L, que consiste no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce.

4.3. Bioensaios com *A. cepa*

As sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação em temperatura controlada 22°C, em placas de Petri recobertas com papel filtro, umedecidos com as soluções de cloreto de níquel. O teste controle positivo foi feito submetendo-se as sementes a dois agentes, cujas concentrações são potencialmente citotóxicas e mutagênicas: o herbicida trifluralina, de ação aneugênica, na concentração de 0,019 ppm (FERNANDES et al., 2007) e o MMS (metil metanosulfonato), de ação

clastogênica, na concentração de 4×10^{-4} M (RANK; NIELSEN, 1997). O controle negativo foi feito com sementes submetidas à germinação em água ultrapura.

Após a germinação das sementes e o crescimento de cerca de 2 cm das raízes, parte destas foi coletada e fixada em Carnoy (3 partes de etanol para 1 de ácido acético). A outra parte foi transferida para placas contendo água ultrapura, para um período de recuperação de 48 horas. Posteriormente, estas radículas também foram coletadas e fixadas em Carnoy.

Após fixadas, as radículas foram submetidas à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), com uma hidrólise ácida por 9 minutos. As pontas das radículas foram seccionadas, em lâmina, para extrair as regiões meristemática e F_1 . Com o intuito de realizar contra-coloração e facilitar o espalhamento das células, foi adicionada ao material uma gota de carmim acético (2%). Todas as lâminas foram obtidas submetendo o material a um esmagamento suave entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em Enthelan. O material foi analisado em microscópio de luz, sob aumento de 400 x.

Para confirmação dos resultados, realizou-se um bioensaio de repetição, no qual toda a metodologia descrita acima foi reaplicada.

4.4. Análise dos Resultados

4.4.1. Células da região meristemática

Foram analisadas 5000 células para cada amostra investigada, em ambos os tratamentos. O mesmo número de células foi analisado para os testes controle negativo e positivo.

A toxicidade foi avaliada pelo índice de germinação dessas sementes. O índice de germinação foi obtido pela razão entre o número de sementes germinadas e o total de sementes expostas à germinação. Para tal variável, a análise estatística foi realizada por ANOVA bilateral, com nível de significância de 0,05.

A citotoxicidade foi verificada pela análise de alterações celulares morfológicas indicativas de morte celular e pela frequência do índice mitótico, segundo a fórmula:

$$\text{IM (índice mitótico)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Para a avaliação do potencial genotóxico, foram observadas células portadoras de alterações cromossômicas, segundo a fórmula:

$$\text{IAC (índice de alterações cromossômicas)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células alteradas}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

Para a análise do potencial mutagênico foi registrada a ocorrência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas. O índice foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{IMt (índice de mutagenicidade)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células com MN e quebras}}{\text{Total de células observadas}} \times 100$$

A análise estatística foi realizada pelo método não paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

4.4.2. Células da região F₁

Para verificar a fixação e/ou reparo dos danos nas células da região meristemática, a indução de micronúcleos em células da região F₁ também foi contabilizada. Foram analisadas cerca de 5000 células da região F₁ para cada amostra e tratamento. Os valores obtidos em todos os testes foram comparados com os obtidos ao controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigo científico, o qual será enviado para publicação em revista especializada.

ARTIGO

ANEUGENICIDADE E CLASTOGENICIDADE DO CLORETO DE NÍQUEL EM SEMENTES DE *Allium cepa*

Annelise Francisco, Cintya Aparecida Christofolletti, Carmem Silvia Fontanetti

ANEUGENICIDADE E CLASTOGENICIDADE DO CLORETO DE NÍQUEL EM SEMENTES DE *Allium cepa*

Annelise Francisco¹, Cintya Aparecida Christofolletti¹, Carmem Silvia Fontanetti*¹

¹Laboratório de Mutagênese Ambiental, Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, SP, Brasil. Av.24-A, 1515 – CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil. *autora correspondente: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

O níquel é um metal pesado de grande aplicação industrial. Seus compostos são descartados em grandes quantidades no ambiente, fazendo dele um contaminante de relevância ecotoxicológica, uma vez que estes podem se bioacumular ao longo da cadeia trófica e/ou induzir danos genéticos aos organismos expostos. Nesse sentido, a legislação brasileira estabelece o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce em 0,025 mg/L. Alguns trabalhos foram feitos com o intuito de avaliar os efeitos do níquel nos organismos; a maioria deles baseia-se nos efeitos deste em concentrações elevadas, muito acima do estabelecido pela lei. Logo, o presente trabalho avaliou três concentrações de níquel, na forma de cloreto de níquel (NiCl₂), tendo como referência àquela estabelecida como limite pela resolução 357/2005 do CONAMA, utilizando sementes de *Allium cepa*, com o intuito de mensurar o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico deste elemento. Em tais concentrações não foi verificada toxicidade ou citotoxicidade, ao passo que, para as três concentrações empregadas, observou-se a indução de efeitos genotóxicos e potencialmente mutagênicos, principalmente de células portadoras de micronúcleos, brotos e aderências cromossômicas. Por meio da avaliação de genotoxicidade e das aberrações cromossômicas encontradas infere-se que o cloreto de níquel possui ação aneugênica e/ou clastogênica. Esse estudo também serve de alerta para a contaminação aquática por metais, visto que a menor concentração utilizada e a permitida pela legislação brasileira induziram danos no organismo testado.

Palavras-chave: mutagênese ambiental, metais pesados, genotoxicidade.

1. Introdução

Metais são componentes naturais dos ecossistemas, sendo naturalmente incorporados aos sistemas aquáticos por meio de processos geoquímicos. O grupo de elementos, designados por metais pesados, ocorrem em sistemas naturais, em pequenas concentrações e apresentam densidade igual ou superior a 5 g/cm^3 (ADRIANO, 1986; POVINELLI, 1987; EGREJA FILHO, 1993; FADIGAS et al., 2002). Esses elementos são caracterizados como persistentes, tóxicos e bioacumulativos. Em ambientes aquáticos existem em solução, na forma de íons hidratados livres ou complexados por ligantes orgânicos e inorgânicos. Podem ainda estar presentes na forma sólida, devido às várias associações com sedimentos ou material particulado suspenso (STUMM; MORGAN, 1996).

A contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente em consequência do desenvolvimento da indústria moderna (STEINKELNER et al., 1998).

Dentre os metais pesados, merece destaque o níquel (Ni), o qual representa o 24º metal em abundância na crosta terrestre. As mais importantes fontes de níquel são os minérios na forma de sulfeto de níquel. Os compostos de níquel são utilizados industrialmente em processos de galvanoplastia e eletroformação, na produção de baterias de níquel-cádmio e equipamentos eletrônicos; além disso, ligas de níquel, como o aço inoxidável, são utilizadas para a fabricação de uma ampla gama de produtos (SILVA, 2001; MAGALHÃES, 2005). As principais fontes de contaminação ambiental por níquel são a produção e processamento de níquel e subprodutos, bem como a reciclagem de produtos e eliminação de resíduos contendo esse metal. De acordo com Denkhaus e Salnokow (2002), a queima de combustíveis fósseis é responsável pela maior parcela de compostos de níquel presentes na atmosfera.

Em estudos feitos com animais, compostos de níquel induziram tumores em praticamente todos os locais de aplicação. A atividade carcinogênica depende, porém, da solubilidade dos compostos de níquel. Compostos insolúveis como sulfeto de níquel II (NiS), óxido de níquel (NiO) e sulfeto de níquel (Ni_3S_2) não são facilmente removidos dos tecidos e por isso, são mais carcinogênicos do que compostos solúveis como acetato de níquel ($\text{Ni}(\text{OAc})_2$), cloreto de níquel (NiCl_2) e sulfato de níquel (NiSO_4) (DENKHAUS; SALNOKOW, 2002).

Em plantas, o níquel é um micronutriente requerido em concentrações muito baixas; no entanto, quando em concentrações elevadas, é conhecido por inibir o crescimento destas. Segundo Akbas et al. (2009), a inibição do crescimento, clorose e redução da composição de água dos tecidos vegetais são comumente observados em plantas expostas a quantidades fitotóxicas de níquel. Em seus experimentos, o Ni^{2+} inibiu o crescimento da raiz de *A. cepa* em todas as concentrações testadas, sendo que o efeito citotóxico foi encontrado na concentração 0,25 mM. Liu e Kottke (2003) observaram acúmulo de Ni na parede celular e vacúolo das células corticais da raiz de *A. cepa*.

Bioensaios com vegetais têm-se mostrado eficientes para o monitoramento da genotoxicidade e mutagenicidade de poluentes ambientais (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; CHRISTOFOLETTI, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2009). Além de serem mais sensíveis e simples do que muitos métodos usados para detectar efeito genotóxico, bioensaios com vegetais apresentam vantagens em relação ao baixo custo dos equipamentos e materiais necessários, bem como a adaptação de plantas para estudos *in situ*. Apresentam ainda grande similaridade morfológica com os cromossomos de mamíferos, logo, a resposta das plantas às mutações são similares às observadas nestes animais (GROVER; KAUR, 1999; YI et al., 2007); sendo assim, é possível então estabelecer uma boa correlação entre o sistema teste vegetal com o sistema teste de mamíferos (GRANT, 1982).

A espécie *Allium cepa* tem sido utilizada por vários autores como Fiskesjö (1988), Smaka-Kincl et al. (1996), Grover e Kaur (1999) e Yi et al. (2007) como organismo teste eficiente para detecção da mutagenicidade de compostos químicos. A grande utilização desse organismo teste deve-se à características de sua cinética de proliferação celular, ao rápido crescimento de suas raízes, grande número de células em divisão, tolerância às diversas condições de cultivo, disponibilidade de sementes o ano todo, fácil manuseio e por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (QUINZANI-JORDÃO, 1987; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Levando em consideração que o níquel é um metal pesado de crescente importância na poluição dos ecossistemas aquáticos e terrestres e de efeitos tóxicos e carcinogênicos nos seres vivos, este trabalho buscou avaliar os efeitos

genotóxicos e mutagênicos deste metal, em três concentrações, utilizando o bioensaio com *A. cepa*.

2. Material e Métodos

2.1 Níquel como contaminante

Para a montagem dos bioensaios foi utilizado o cloreto de níquel hexahidratado PA, da marca Synth, CAS number C.1055.01.AF e peso molecular 237,70.

No Brasil, para controlar e taxar os limites máximos de contaminantes nos corpos hídricos, é utilizada a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), nº 357 de 25 de março de 2005. Segundo essa resolução, o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni.

Foram então utilizadas três concentrações de níquel nos testes em cebola. A primeira (N1) de 0,0125 mg/L, ou seja, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração (N2) utilizada, 0,025 mg/L é o próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. A terceira concentração (N3) foi 0,050 mg/L, que consiste no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce.

2.2 Material biológico

As sementes de *A. cepa* de mesmo lote, variedade Baia periforme, foram submetidas à germinação em temperatura controlada 22°C, em placas de Petri recobertas com papel filtro, umedecidos com as soluções testadas.

2.3 Bioensaios com *A. cepa*

O teste controle positivo foi feito submetendo-se as sementes a dois agentes, cujas concentrações são potencialmente citotóxicas e mutagênicas: o herbicida trifluralina, de ação aneugênica, na concentração de 0,019 ppm (FERNANDES et al., 2007) e o MMS (metil metanosulfonato), de ação clastogênica, na concentração de 4

$\times 10^{-4}$ M (RANK; NIELSEN, 1997). O controle negativo foi feito com sementes submetidas à germinação em água ultrapura.

Após a germinação das sementes e o crescimento de cerca de 2 cm das raízes, parte destas foi coletada e fixada em Carnoy I (3 parte de etanol para 1 parte de ácido acético). A outra parte foi transferida para placas contendo água ultrapura, para um período de recuperação de 48 horas. Posteriormente, estas radículas também foram coletadas e fixadas em Carnoy I.

Foram confeccionadas lâminas pela técnica comum de esmagamento, com meristemas radiculares e com tecidos da região F1 da raiz, submetidos à reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978). Com o intuito de realizar contra-coloração e facilitar o espalhamento das células, foi adicionada ao material uma gota de carmim acético (2%).

Foram analisadas alterações potencialmente tóxicas, citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas para as células da região meristemática, contabilizando-se 5.000 para cada amostra investigada. O mesmo número de células foi analisado para os controles negativo e positivo.

Para confirmação dos resultados, realizou-se um bioensaio de repetição, no qual toda a metodologia descrita acima foi reaplicada.

2.4 Análise dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos

A toxicidade foi avaliada pelo índice de germinação dessas sementes. O índice de germinação é obtido pela razão entre o número de sementes germinadas e o total de sementes expostas à germinação. Para tal variável, a análise estatística foi realizada por ANOVA bilateral, com nível de significância de 0,05.

A citotoxicidade foi verificada pela análise de alterações celulares morfológicas indicativas de morte celular e pela frequência do índice mitótico (IM), segundo a equação: $IM = (\text{número de células em divisão} / \text{número total de células observadas}) \times 100$.

O potencial genotóxico foi avaliado pelo índice de alterações cromossômicas (IAC), para o qual foram computadas células portadoras de brotos nucleares, pontes e perdas cromossômicas, c- metáfases, aderência cromossômica e células poliplóides. A frequência de IAC foi obtido de acordo com $IAC = (\text{número de células}$

portadoras de aberrações cromossômicas/número total de células observadas) x 100.

O potencial mutagênico foi avaliado pelo índice de mutagenicidade (IMt), que leva em conta o número de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas. O índice foi calculado segundo a fórmula: $IMt = (\text{número total de células com MN e quebras} / \text{número total de células observadas}) \times 100$.

Para verificar a fixação ou reparo dos danos nas células da região meristemática, a indução de micronúcleos em células da região F₁ também foi contabilizada. Foram analisadas cerca de 5000 células da região F₁ para cada amostra e tratamento.

Os valores obtidos em todos os testes foram comparados com os obtidos ao controle negativo, por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

3. Resultados

As alterações cromossômicas e nucleares potencialmente citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas foram analisadas nas células da região meristemática das raízes de *A. cepa*.

Os valores obtidos para o índice de germinação nas diferentes concentrações de Ni não foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo (Figura 1). Sendo assim, o Ni não se mostrou tóxico nas concentrações testadas.

Da mesma forma, as alterações celulares morfológicas indicativas de morte celular (Figura 5A) e o índice mitótico não obtiveram valores estatisticamente significativos, demonstrando que também não houve citotoxicidade para nenhuma das concentrações de Ni utilizadas. Esses resultados foram observados nos dois bioensaios realizados (Tabelas 1 e 2).

A observação de células portadoras de alterações cromossômicas (Figura 5B - H), numericamente expressada pelo IAC resultou, no entanto, em valores estatisticamente significativos em relação ao controle negativo, para todas as concentrações de Ni avaliadas. A significância foi mantida após tratamento de recuperação e confirmada pela repetição do experimento (Tabela 2), demonstrando que o Ni possui potencial genotóxico. A somatória das alterações potencialmente

genotóxicas (Figura 2), evidenciou uma resposta dose-dependente para o bioensaio de repetição.

Dentre os efeitos genotóxicos observados (Tabelas 3 e 4), os brotos nucleares (Figura 5B) apresentaram significância estatística para as três concentrações de Ni avaliadas no primeiro bioensaio e, somente para a maior concentração (0,050 mg/L) na repetição, embora os valores obtidos para as demais concentrações sejam numericamente semelhantes aos observados no primeiro bioensaio. Sendo assim, brotos nucleares ocorreram em grande número em ambos os bioensaios, embora sua significância estatística tenha aparentado padrões distintos entre os dois, além disso, principalmente o primeiro bioensaio mostrou que o tratamento de recuperação não é efetivo para a atenuação deste efeito. Células poliplóides (Figura 5C) também foram observadas, embora não em número significativo. O número de aderências cromossômicas (Figura 5D) obteve significância estatística apenas para as menores concentrações de Ni e após o tratamento de recuperação, tendência afirmada em ambos os ensaios. Perdas cromossômicas (Figura 5E) e C-metáfases (Figura 5F) não expressaram valores significativos para as concentrações testadas. Da mesma forma, pontes cromossômicas (Figura 5G - H) também foram mais significativas nas menores concentrações de Ni testadas, no primeiro bioensaio e, na repetição, para a menor concentração testada.

O potencial mutagênico (Tabelas 1 e 2), por sua vez, foi detectado para todas as concentrações de Ni testadas e se mostraram estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, excetuando-se a menor concentração (0,0125 mg/L), na qual houve menor significância estatística no primeiro bioensaio. Tais valores permaneceram significativos após a recuperação, em ambos os ensaios.

Dentre as duas alterações potencialmente mutagênicas computadas na região meristemática, apenas micronúcleos (Figura 5I) apresentaram significância, sendo que esta se manteve para todas as concentrações, mesmo após a recuperação, conforme mostram as tabelas 5 e 6. Pode ser observado ainda que o aumento na concentração de Ni é acompanhado de um aumento no número de micronúcleos, tanto no tratamento contínuo quanto na recuperação, o que ocorreu em ambos bioensaios. Essa tendência também foi observada na avaliação de micronúcleos presentes na região F_1 da raiz (Figura 5J), conforme as tabelas 7 e 8. Também foi observado uma redução na quantidade de micronúcleos da região F_1

em relação a meristemática em todos os tratamentos, embora os valores se mantiveram significativos. Esse efeito é evidenciado na figura 4, demonstrando a fixação dos micronúcleos na região F1, induzidos na região meristemática.

4. Discussão

Bioensaios com vegetais superiores tem sido freqüentemente utilizados para o monitoramento de genotoxicidade e mutagenicidade de poluentes ambientais. Em adição as vantagens da utilização deste tipo de bioindicador, plantas são comumente mais sensíveis a metais pesados (FISKEJÖ, 1988).

Estudos têm demonstrado que a quantidade de níquel absorvida pelo sistema radicular é proporcional a concentração do mesmo presente no meio (CATALDO et al., 1978; PAIVA et al., 2003; YUSUF et al., 2011). Akbas et al. (2009) observaram efeito fitotóxico (EC_{50}) na concentração 0,25 mM de Ni; tal valor é equivalente à 14,67 mg/L de Ni ou 239,5 vezes a maior concentração aqui testada. Em experimentos realizados com feijão guandu (*Cajanus, cajan*), foi atestada a toxicidade do Ni. Neste estudo, a germinação diminuiu com o aumento da concentração deste elemento em solução, sendo que a menor concentração aplicada foi 0,5 mM (RAO; SRESTY, 2000). No entanto, a toxicidade pode ser evitada em plantas por mecanismos que mantêm os íons metálicos intracelulares em forma não tóxicas (BRIAT; LEBRUM, 1999), como aminoácidos orgânicos, os quais representam possíveis quelantes desses íons, evitando a toxicidade e citotoxicidade destes para a planta (FOY et al., 1978). A indução de efeito citotóxico por Ni^{2+} é mais severo que àquele induzido por outros íons metálicos como cobre e zinco (CHAKRAVARTY; SRIVASTAVA, 1992). Entretanto, neste estudo, mesmo o dobro da concentração máxima de Ni permitida pela legislação brasileira não é capaz de causar efeitos tóxicos ou citotóxicos em *A. cepa*.

Em contrapartida, a genotoxicidade do Ni^{2+} foi constatada até na menor concentração avaliada, a qual representa metade da concentração máxima de Ni permitida pela legislação. Segundo Briat e Lebrum (1999), metais de transição, tais como o Ni^{2+} , possuem elétrons não pareados que são bons catalisadores da reação de redução de oxigênio, a qual gera O_2^- , que em solução aquosa formará H_2O_2 produzindo OH^- pela reação de Haber-Weiss. Os radicais hidroxila produzidos em excesso oxidam moléculas biológicas, podendo levar a danos celulares maiores e

em última instância, conduzir à morte celular (MAKSYMIEC, 2007; YUSUF et al., 2011). Sabe-se ainda que ligações de metais ao núcleo da célula causam danos pró-mutagênicos, incluindo modificações de base do DNA, *crossing* inter e intra-molecular de DNA e proteínas, rearranjo e depurinação, sendo que as reações químicas envolvidas nesses danos são características de um ataque oxidativo (BRIAT; LEBRUM, 1999).

Dentre os efeitos genotóxicos observados, aderências cromossômicas, as quais foram observadas mais significativamente após tratamento de recuperação, são consideradas resultantes de efeito aneugênico (LEME et al., 2008). A alteração mais expressiva, no entanto, foram brotos nucleares. Brotos nucleares podem ser decorrentes de eventos de poliploidizações, cujo material excedente é expulso da célula (FERNANDES, 2005), essas derivam de efeito aneugênico, a medida que pela inativação do fuso mitótico, a divisão do centrômero é bloqueada, não havendo distribuição dos cromossomos entre células filhas, formando então uma célula com material genético duplicado (FERNANDES et al., 2007).

Estudos realizados por Fiskejö (1988), bulbos de *A. cepa* tratados com NiCl_2 , apresentaram além da C-metáfase característica, com cromossomos uniformemente espalhados pelo citoplasma, também a indução de uma C-metáfase peculiar, na qual os cromossomos possuem aparência de C-metáfase, mas a estrutura do fuso não foi completamente inativada, de forma que os cromossomos permanecem no equador da célula. Além disso, nesse mesmo estudo, os efeitos do Ni^{2+} também foram caracterizados pela ocorrência de C-metáfases com aderência. Contudo, segundo o autor, a combinação dessas anormalidades é incomum. No presente estudo, no entanto, não foram observadas C-metáfases em quantidade significativa. Essa discrepância com a literatura pode ser atribuída às concentrações utilizadas, sendo que a maior concentração aqui empregada (0,05 mg/L), foi igual a menor concentração utilizada por Fiskejö (1988), na qual as C-metáfases também foram observadas em baixas frequências.

Fiskejö (1988) caracterizou o Ni^{2+} como um elemento mutagênico, devido a capacidade deste em induzir quebras cromossômicas no material genético de *A. cepa*. Nas concentrações aqui testadas, quebras cromossômicas ocorreram em pequena quantidade e valores não significativos. Quebras e pontes cromossômicas são consideradas como resultantes de efeito clastogênico (GRANT, 1978; LEME et al., 2008). Da mesma forma que as quebras, pontes cromossômicas foram pouco

expressivas, sendo observadas em quantidade significativa apenas na menor concentração testada para ambos os bioensaios, de forma que por esse parâmetro, não seria caracterizada ação clastogênica.

Entretanto, o potencial mutagênico do níquel aqui encontrado, tem sua significância na quantidade de micronúcleos observados. Micronúcleos podem derivar tanto de fragmentos acêntricos resultantes de atividade clastogênica, quanto de cromossomos inteiros, indicando atividade aneugênica de compostos químicos (FENECH, 2000). No entanto, segundo Yamamoto e Kikuchi (1980) é possível analisar a ação local de agentes indutores de micronúcleos com base no tamanho relativo deles. Embora não tenham sido feitas medidas efetivas do diâmetro dos micronúcleos, o presente trabalho contou com dois controles positivos de ações distintas e conhecidas; a trifluralina de efeito aneugênico (FERNANDES, 2005) e o MMS de efeito clastogênico.

Micronúcleos de dimensões diminutas semelhantes aos obtidos pelo MMS foram observados, indicando um possível efeito clastogênico resultante de quebra cromossômica derivada da ação de tal íon. Em seus experimentos com *Helianthus annuus*, Chakravarty e Srivastava (1992) observaram efeitos clastogênicos, concentração e tempo dependentes relacionados ao Ni^{2+} . A ruptura de fragmentos do DNA também pode estar relacionada ao ataque oxidativo induzido por metais de transição (BRIAT; LEBRUM, 1999). O ataque de espécies reativas de oxigênio a bases púricas e pirimídicas e na desoxiribose do DNA pode aumentar a probabilidade de fragmentação cromossômica, levando ao aumento na formação de micronúcleos (YI et al., 2007). Alguns micronúcleos observados, no entanto, assemelhavam-se mais aos presentes no controle realizado com a trifluralina, sendo esses maiores, provavelmente derivados das anormalidades ocasionadas pela inativação e/ou disfunção do fuso mitótico.

O estudo das aberrações cromossômicas se faz importante devido a eficiência em prever o mecanismo de ação dos xenobióticos, como os metais pesados, sobre o material genético dos organismos vivos, uma vez que estes podem ter ações nocivas, mesmo em concentrações não tóxicas, como as aqui testadas. Tal estudo foi de suma relevância, visto que por meio do teste de aberrações cromossômicas foi possível prever que o Ni^{2+} apresenta ação aneugênica e clastogênica para o organismo teste empregado. A genotoxicidade e mutagenicidade deste elemento foi comprovada mesmo após o período de

recuperação. Tais dados permitem inferir, portanto, que a concentração de níquel em água, permitida atualmente pela legislação brasileira, apresenta potencial genotóxico e mutagênico ao organismo empregado, o que sugere, portanto, maior cautela quanto ao descarte desse metal no meio ambiente. Graças à boa correlação entre este sistema teste vegetal e os modelos animais, é possível inferir que o Ni^{2+} apresenta perigo aos ecossistemas e à população exposta a este contaminante.

5. Conclusão

Diante do exposto, é possível concluir que o níquel, embora em concentrações traço seja essencial para os organismos vivos, pode apresentar efeitos nocivos em maiores concentrações, ainda que elas não apresentem toxicidade, como aquela permitida pela legislação brasileira em corpos de água doce. Essa observação demonstra tanto a sutileza da ação dos metais pesados como xenobióticos no meio ambiente, chamando atenção para o seu descarte, como também mostra a sensibilidade do teste de *A. cepa*, o qual foi capaz de fornecer respostas, mesmo sob uma baixa concentração de Ni^{2+} .

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Dr. José Carlos Marconato do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, do Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro/SP pelo auxílio nos cálculos para o preparo das soluções e a Sandra Veloso pelo apoio técnico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer-Verlag, 533p, 1986.

AKBAS, H; DANE, F.; MERIÇ, Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, p. 332 – 336, 2009.

BRIAT, J. F.; LEBRUM, M. Plant responses to metal toxicity. **Plant Biology and Pathology**, n. 332, p.43-54, 1999.

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**, v.72, p.722-725, 2008.

CATALDO, D.A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Nickel in plants – Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiology*, v.63, p. 563-565, 1978

CHAKRAVARTY, B.; SRIVASTAVA, S. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. **Mutation Research**, v. 239, n. 4, p.287-284, 1992.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 118 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro. 2008.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357/2005**. Disponível em:< http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf> Acessado em 27 abr.2010

DENKHAUS, E. SALNOKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v.42, p35 – 56, 2002.

EGREJA FILHO, F.B. **Avaliação da ocorrência e distribuição dos metais pesados na compostagem de lixo domiciliar urbano**. 176p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.

FADIGAS, F. S.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia** [online], v. 61, n.2, pp. 151-159, 2002.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes.** 211f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro. 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.252-259, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FISKESJÖ, G. The Allium test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v.197, p 134-260, 1988.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology*, n.29, p. 511-566, 1978.

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, pp. 37-43, 1978

GRANT, W. F. Chromosome aberrations assay in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, GenoTox Program, **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p 183-188, 1999.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.2090-2095, 2009.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p. 214-219, 2008.

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

LIU,D.; KOTTKE, I. Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. **Cell Biology and Toxicology**, v. 19, p. 299-311, 2003.

MAGALHÃES, L.F. Níquel: uma riqueza de Goiás. In: SEPLAN. Conjuntura econômica goiana. Boletim trimestral. Goiânia: Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento, 2005. p. 16-19.

MAKSYMIEC, W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. **Acta Physiol Plant**, n.29, p. 177-187, 2007.

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

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas.** 1987. 276f. Tese (Doutorado) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G; SIQUEIRA, J. O.; FERNANDES, A.R.; MIRANDA, J.R.P.M. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley). **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 158-166, 2003.

POVINELLI, J. **Ação dos metais pesados nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias.** p.285. Tese (Livre Docência em

Engenharia/Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1987.

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**, v.390, p.121-127, 1997.

RAO K.V.M.; SRESTY T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, n. 157, p.113–128, 2000.

SILVA, C. S. Níquel. **Balanço Mineral Brasileiro**, 2001. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/niquel.pdf>. Acessado em 24 abr. 2010

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1363-1368, 2009.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.183-191, 1998.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic chemistry – Chemical Equilibria and Rates in Natural waters**. Nova Iorque. John Wiley & Sons, 3ed. 1022p. 1996.

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

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1980.

YUSUF, M. Fariduddin, Q.; Hayat, S. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. **Bull Environmental Contamination Toxicology**, n. 86, p.1–17, 2011.

Tabela 1 - Índice mitótico e média das aberrações celulares observadas após exposição das células meristemáticas de *A. cepa* a diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, no primeiro bioensaio.

Tratamento	IM			IAC			IMt			MC		
	TC	Rec	TC	TC	Rec	TC	TC	Rec	TC	TC	Rec	
CN	12,74 ± 2,81	13,88±5,13	1,17±0,16	0,85±0,24	0,58±0,14	0,35±0,15	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	
MMS	14,94 ± 3,20	17,19±3,34	9,22±2,28 ^{*a,b}	8,10±3,26 ^{*a,b}	7,34±2,49 ^{*a,b}	6,04±3,28 ^{*a,b}	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	
TRIF	11,34±2,52	11,82±1,62	4,24±1,27 ^{*a,b}	5,18±0,88 ^{*a,b}	2,07±1,02 ^{*a,b}	3,11±0,67 ^{*a,b}	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	
N1	14,88±3,11	12,70±3,42	3,716±1,32 ^{*a,b}	1,88±0,53 ^{*a,b}	1,16±0,47 ^{*a}	0,76±0,27 ^{*a,b}	2,2±4,92	1,4±3,13	2,2±4,92	1,4±3,13	1,4±3,13	
N2	18,82±7,13	12,58±1,38	4,016±0,48 ^{*a,b}	3,44±0,57 ^{*a,b}	2,33±0,82 ^{*a,b}	1,32±0,41 ^{*a,b}	1,2±2,68	5,4±6,50	1,2±2,68	5,4±6,50	5,4±6,50	
N3	11,79±1,08	14,20±1,94	4,02±0,58 ^{*a,b}	2,96±0,67 ^{*a,b}	2,60±0,90 ^{*a,b}	1,45±0,23 ^{*a,b}	0,4±0,84	3,2±4,44	0,4±0,84	3,2±4,44	3,2±4,44	

^{*a} valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$, em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para $p < 0,01$, em relação ao CN.

IM: Índice mitótico; **IAC**: Índice de alterações cromossômicas; **IMt**: Índice de mutagenicidade; **MC**: Morte Celular; **TC**: Tratamento contínuo; **Rec**: Recuperação; **CN**: Controle negativo; **MMS**: Metil metanosulfonato; **TRIF**: Trifluralina; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 2 - Índice mitótico e média das aberrações celulares observadas após exposição das células meristemáticas de *A. cepa* a diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, na repetição do bioensaio.

Tratamento	IM		IAC		IMt		MC	
	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec
CN	13,92±2,60	12,10±2,20	1,63±0,74	1,72±0,34	0,84±0,47	0,86±0,39	0,0±0,0	0,2±0,45
MMS	13,35 ± 2,87	14,35±2,38	5,69±1,36 ^{*a,b}	6,76±1,61 ^{*a,b}	4,36±1,01 ^{*a,b}	4,46±1,29 ^{*a,b}	2,4±2,61	0,2±0,45
TRIF	15,11±2,51	11,94±2,77	5,23±0,76 ^{*a,b}	5,45±1,02 ^{*a,b}	2,54±0,52 ^{*a,b}	3,43±1,42 ^{*a,b}	0,0±0,0	0,0±0,0
N1	15,45±1,11	15,41±3,95	4,48±1,74 ^{*a,b}	5,73±1,78 ^{*a,b}	2,41±1,22 ^{*a,b}	1,34±1,60 ^{*a,b}	0,6±0,89	1,2±1,79
N2	14,01±1,40	13,43±2,91	4,94±0,83 ^{*a,b}	6,19±0,81 ^{*a,b}	3,46±0,92 ^{*a,b}	3,12±0,78 ^{*a,b}	0,0±0,0	3,8±7,43
N3	15,22±1,39	12,42±2,39	6,13±1,20 ^{*a,b}	7,12±0,84 ^{*a,b}	3,99±0,45 ^{*a,b}	4,94±0,48 ^{*a,b}	0,6±1,34	0,2±0,45

^{*a} valores estatisticamente significativos para $p < 0.05$ em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para $p < 0.01$ em relação ao CN.

IM: Índice mitótico; **IAC**: Índice de alterações cromossômicas; **IMt**: Índice de mutagenicidade; **MC**: Morte Celular; **TC**: Tratamento contínuo; **Rec**: Recuperação; **CN**: Controle negativo; **MMS**: Metil metanosulfonato; **TRIF**: Trifluralina; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 3 - Alterações potencialmente genotóxicas (pontes e perdas cromossômicas, C-metáfases, aderência cromossômica e brotos nucleares) encontradas em célula meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, no primeiro bioensaio.

Tratamento	Efeitos Genotóxicos														
	Brotos nucleares			Pontes cromossômicas			Perdas Cromossômicas			C-metáfases			Aderência Cromossômica		
	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec			
CN	1.0±1.22	1.0±0.70	1±0.71	2.6±1.82	0.2±0.45	0.2±0.45	0.2±0.45	0.2±0.45	0.4±0.55	0.2±0.45	3.0±1.87	1.0±0.71			
MMS	7.4±1.52 ^{*a,b}	6.4±2.97 ^{*a,b}	4.4±1.52 ^{*a,b}	8.2±4.14 ^{*a}	4.2±1.64 ^{*a,b}	2.4±2.30	2.4±2.30	1.2±1.79	1.2±1.79	0.0±0.0	3.8±1.79	6.0±1.41 ^{*a,b}			
TRIF	12.8±7.12 ^{*a,b}	13.2±6.10 ^{*a,b}	3.0±2.91	4.2±2.28	1.6±1.95	0.8±0.45	0.8±0.45	0.8±1.79	0.8±1.79	0.0±0.0	2.2±1.64	4.2±1.92 ^{*a,b}			
N1	8.2±3.56 ^{*a,b}	3.0±1.73 ^{*a}	4.8±2.77 ^{*a}	3.2±1.30	1.4±1.67	0.0±0.0	0.0±0.0	0.4±0.55	0.4±0.55	0.0±0.0	9.6±2.97 ^{*a,b}	4.2±1.64 ^{*a,b}			
N2	6.4±3.36 ^{*a,b}	3.6±3.36	3.6±1.34 ^{*a,b}	4.8±1.92	1.6±1.14	1.4±0.55 ^{*a}	1.4±0.55 ^{*a}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.2±0.45	2.2±1.3	6.0±3.08 ^{*a,b}			
N3	5.8±4.20 ^{*a,b}	10.6±19.80	2.6±2.30	3.4±1.95	0.8±0.45	1.0±0.71	1.0±0.71	0.2±0.45	0.2±0.45	0.2±0.45	4.0±2.0	5.2±2.49 ^{*a}			

^{*a} valores estatisticamente significativos para p<0.05 em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para p<0.01 em relação ao CN.

TC: Tratamento contínuo; Rec: Recuperação

CN: Controle negativo; **TRIF:** Trifluralina; **MMS:** Metil metanosulfonato; **N1:** Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2:** Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3:** Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 4 - Alterações potencialmente genotóxicas (pontes e perdas cromossômicas, C-metáfases, aderência cromossômica e brotos nucleares) encontradas em célula meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, na repetição do bioensaio.

Tratamento	Efeitos Genotóxicos											
	Brotos nucleares		Pontes cromossômicas		Perdas Cromossômicas		C-metáfases		Aderência Cromossômica			
	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec	TC	Rec		
CN	2,8±3,56	4,0±1,73	1,4±0,89	2,6±1,51	0,2±0,45	0,2±0,45	0±0	2,2±1,79	2,0±1,22			
MMS	2,8±1,64	10,4±3,91 ^{*a,b}	2,4±2,79	6,6±3,13	1,6±0,55 ^{*a,b}	0,6±0,55	1,0±1,22	0,6±1,34	3,8±2,28			
TRIF	12,6±6,80 ^{*a}	10±2,55 ^{*a,b}	6,8±1,78 ^{*a,b}	3,6±2,88	1,4±1,14	0,4±0,55	0,2±0,45	0,0±0,0	5,2±2,28 ^{*a,b}			
N1	7,4±3,58	6,8±4,44	4,4±2,30	8,8±1,92 ^{*a,b}	0,4±0,55	0,8±0,84	0,4±0,55	0,0±0,0	6,4±1,14 ^{*a,b}			
N2	6,2±3,27	12,8±4,66 ^{*a,b}	4,6±3,91	6,8±3,70	0,6±0,55	0±0	0,4±0,55	0,6±0,89	7,4±4,16 ^{*a,b}			
N3	9,4±7,09 ^{*a}	11,8±3,49 ^{*a,b}	5,2±3,83	2,4±1,94	1,2±1,30	0,8±1,30	0,4±0,55	0,6±0,89	5,4±4,72			

^{*a} valores estatisticamente significativos para $p < 0.05$ em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para $p < 0.01$ em relação ao CN.

TC: Tratamento contínuo; Rec: Recuperação

CN: Controle negativo; **TRIF:** Trifluralina; **MMS:** Metil metanosulfonato; **N1:** Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2:** Solução com 0,025 mg/L de Ni;

N3: Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 5 - Alterações potencialmente mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) encontradas em célula meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, no primeiro bioensaio.

Tratamento	Efeitos Mutagênicos					
	Micronúcleos		Quebras Cromossômicas			
	TC	Rec	TC	TC	Rec	Rec
CN	2,9±1,64	3,6±2,07	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
MMS	69,8±23,99 ^{*a,b}	59,8±29,24 ^{*a,b}	0,2±0,45	0,2±0,45	0,8±1,13	0,8±1,13
TRIF	22,8±8,58 ^{*a,b}	31,0±6,81 ^{*a,b}	0,2±0,45	0,2±0,45	0,2±0,45	0,2±0,45
N1	10,8±3,70 ^{*a}	7,8±2,95 ^{*a}	0,2±0,45	0,2±0,45	0,0±0,0	0,0±0,0
N2	24,0±5,30 ^{*a,b}	13,0±5,00 ^{*a,b}	0,4±0,55	0,4±0,55	0,0±0,0	0,0±0,0
N3	26,0±8,45 ^{*a,b}	14,4±2,79 ^{*a,b}	0,4±0,55	0,4±0,55	0,0±0,0	0,0±0,0

^{*a} valores estatisticamente significativos para p<0.05 em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para p<0.01 em relação ao CN.

TC: Tratamento contínuo; Rec: Recuperação

CN: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metilmetano sulfonato;

N1: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni;

N3: Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 6 - Alterações potencialmente mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) encontradas em célula meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações de Ni, no tratamento contínuo e após recuperação, na repetição do bioensaio.

Tratamento	Efeitos Mutagênicos					
	Micronúcleos			Quebras Cromossômicas		
	TC	Rec	TC	TC	Rec	TC
CN	9,0±5,52	8,6±3,91	0,6±1,34	0,2±0,44		
MMS	43,8±10,03 ^{*a,b}	43,6±11,93 ^{*a,b}	0,0±0,0	1,6±1,14		
TRIF	24,0±5,10 ^{*a,b}	33,0±13,00 ^{*a,b}	1,6±1,52	1,8±2,16		
N1	23,4±11,59 ^{*a}	32,8±16,42 ^{*a,b}	0,8±0,83	1,0±1,0		
N2	35,2±8,23 ^{*a,b}	30,4±7,16 ^{*a,b}	0,6±0,54	2,2±1,09 ^{*a,b}		
N3	39,0±3,81 ^{*a,b}	48,8±4,89 ^{*a,b}	1,0±1,73	1,0±1,41		

^{*a} valores estatisticamente significativos para p<0.05 em relação ao CN

^{*b} valores estatisticamente significativos para p<0.01 em relação ao CN

TC: Tratamento contínuo; Rec: Recuperação

CN: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metil metanosulfonato;

N1: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni;

N3: Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 7 - Comparação na quantidade de micronúcleos observada em células das regiões meristemática e F₁ de *A. cepa*, tratadas com água ultrapura, MMS, trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações, no tratamento contínuo e na recuperação, no primeiro bioensaio.

Micronúcleos					
Tratamento contínuo			Recuperação		
	Meristemática	F ₁	Meristemática	F ₁	
CN	2,9±1,64	2,8±0,84	3,6±2,07	3,4±1,14	
MMS	69,8±23,99 ^{*a,b}	36,8±6,68 ^{*a,b}	59,8±29,24 ^{*a,b}	19,4±8,41 ^{*a,b}	
TRIF	22,8±8,58 ^{*a,b}	17,6±8,02 ^{*a,b}	31,0±6,81 ^{*a,b}	18,2±1,64 ^{*a,b}	
N1	10,8±3,70 ^{*a}	9,6±1,14 ^{*a,b}	7,8±2,95 ^{*a}	9,2±4,55 ^{*a}	
N2	24,0±5,30 ^{*a,b}	19,4±4,39 ^{*a,b}	13,0±5,00 ^{*a,b}	10,0±3,32 ^{*a,b}	
N3	26,0±8,45 ^{*a,b}	21,0±5,89 ^{*a,b}	14,4±2,79 ^{*a,b}	10,4±3,64 ^{*a,b}	

^{*a} valores estatisticamente significativos para p<0.05 em relação ao CN.

^{*b} valores estatisticamente significativos para p<0.01 em relação ao CN.

CN: Controle negativo; **TRIF:** Trifluralina; **MMS:** Metil metanosulfonato;

N1:Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2:**Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3:**Solução com 0,050 mg/L de Ni

Tabela 8 - Comparação na quantidade de micronúcleos observada em células das regiões meristemática e F₁ de *A. cepa*, tratadas com água ultrapura, MMS, trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações, no tratamento contínuo e na recuperação, na repetição do bioensaio.

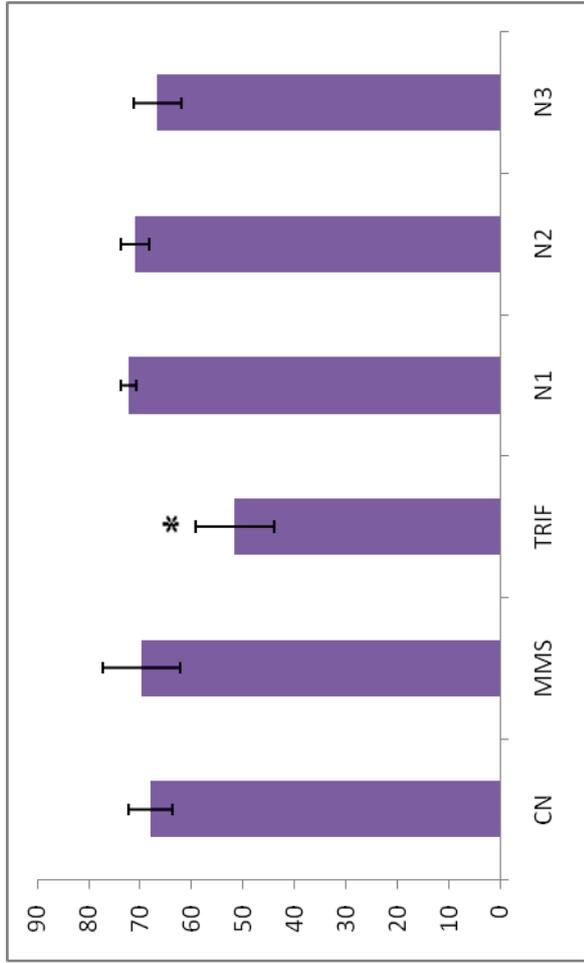
Micronúcleos				
		Recuperação		
Tratamento contínuo				
		F1	Meristemática	F1
CN	9,0±5,52	4,8±1,92	8,6±3,91	3,0±1,73
MMS	43,8±10,03 ^{a,b}	25,0±3,39 ^{a,b}	43,6±11,93 ^{a,b}	10,4±1,34 ^{a,b}
TRIF	24,0±5,10 ^{a,b}	13,8±2,17 ^{a,b}	33,0±13,00 ^{a,b}	14,0±4,30 ^{a,b}
N1	23,4±11,59 ^a	12,0±2,82 ^{a,b}	32,8±16,42 ^{a,b}	14,6±4,83 ^{a,b}
N2	35,2±8,23 ^{a,b}	14,2±2,95 ^{a,b}	30,4±7,16 ^{a,b}	13,4±2,51 ^{a,b}
N3	39,0±3,81 ^{a,b}	14,6±2,51 ^{a,b}	48,8±4,89 ^{a,b}	23,0±4,00 ^{a,b}

^a valores estatisticamente significativos para p<0.05 em relação ao CN.

^b valores estatisticamente significativos para p<0.01 em relação ao CN.

CN: Controle negativo; **TRIF:** Trifluralina; **MMS:** Metil metanosulfonato; **N1:** Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2:** Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3:** Solução com 0,050 mg/L de Ni

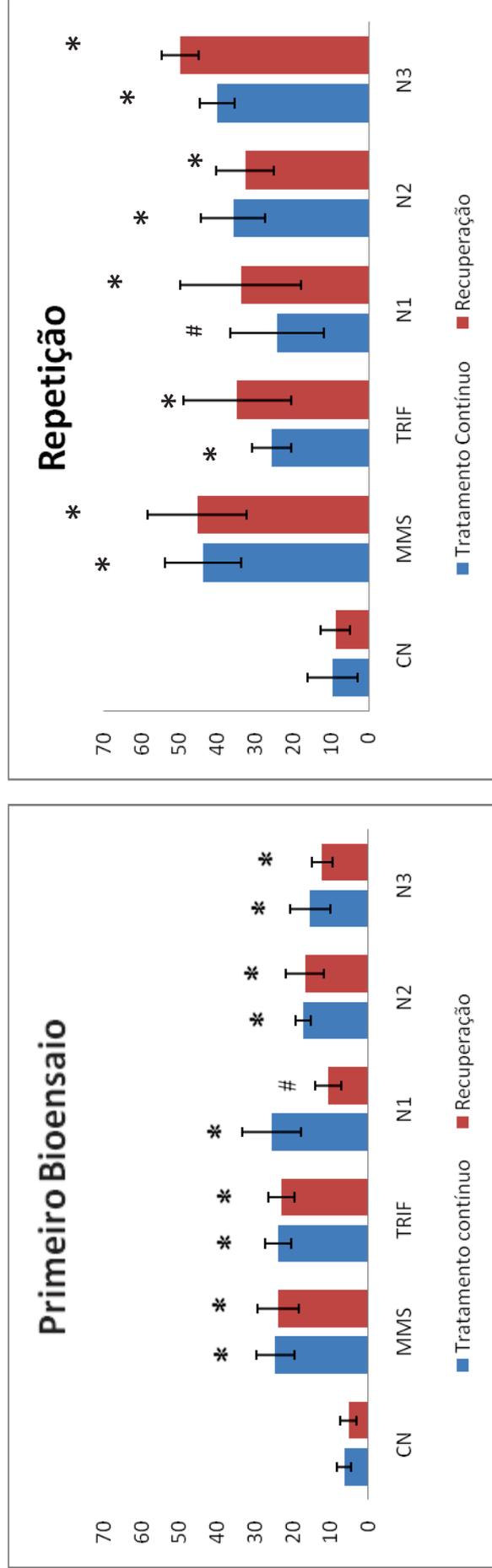
Figura 1



* Valores estatisticamente significativos com significância de 0,05, por ANOVA bilateral.

Figura 1 - Índice de germinação de sementes de *A. cepa* tratadas com água ultrapura, MMS, trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações. **CN**: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metil metanosulfonato; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni.

Figura 2

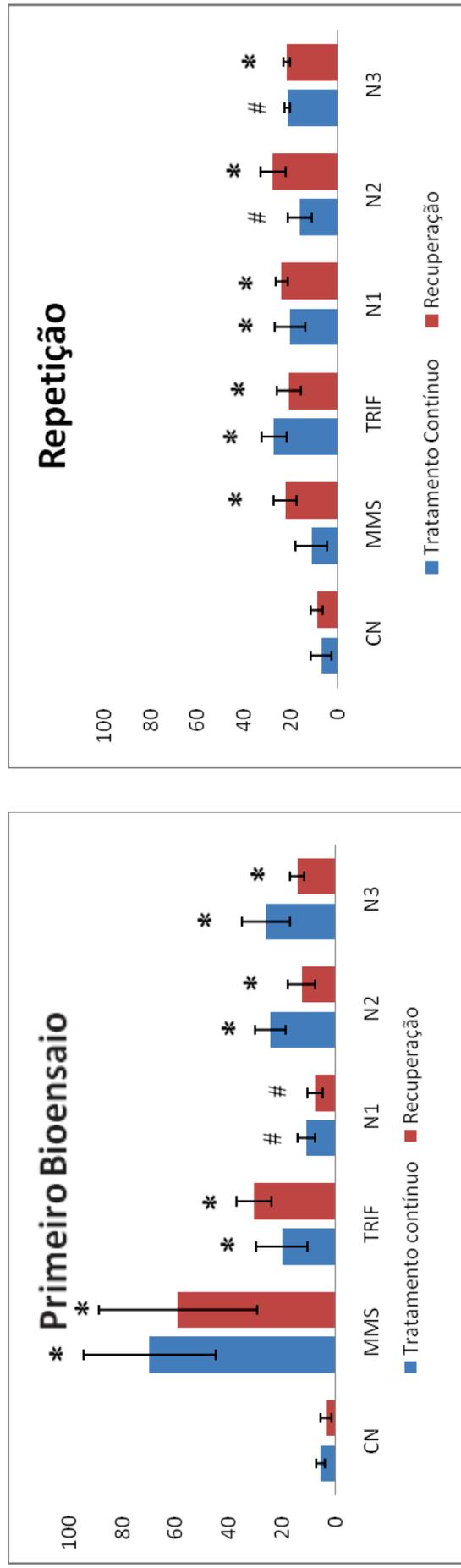


* Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao CN, pelo método de Mann-Whitney.

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ em relação ao CN, pelo método de Mann-Whitney.

Figura 2 - Somatória das alterações potencialmente genotóxicas (brotos nucleares, pontes e perdas cromossômicas, C-metáfases e aderência cromossômica) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com água ultrapura, MMS, trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações. **CN**: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metil metanosulfonato; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni.

Figura 3

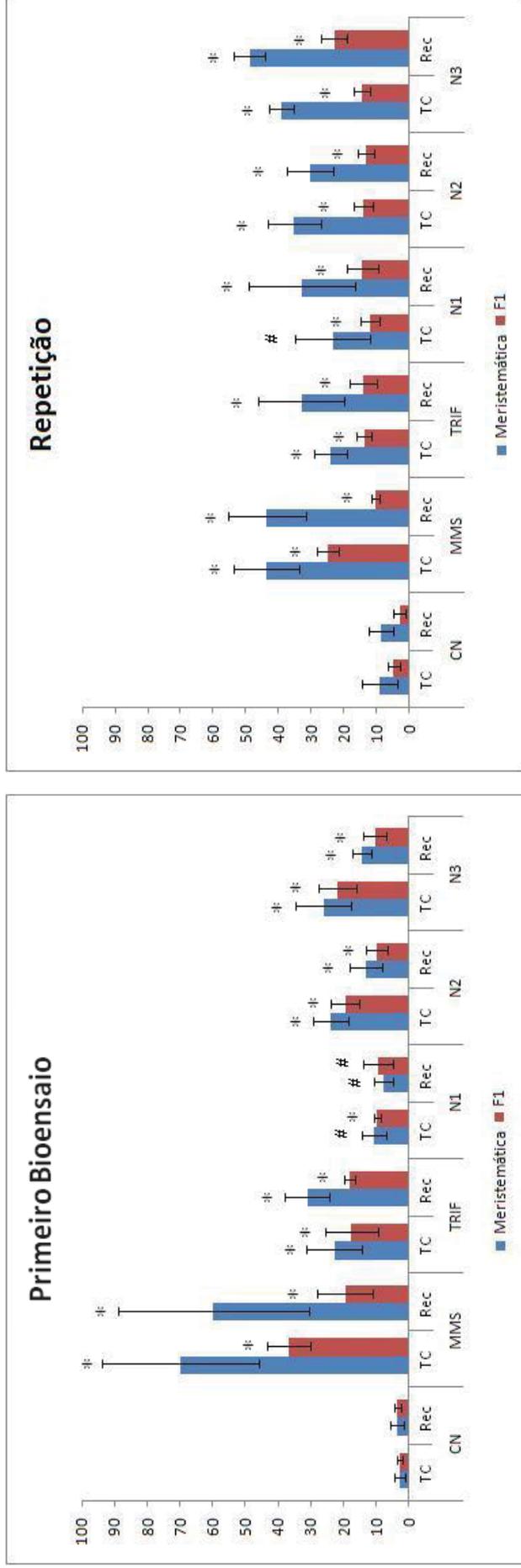


* Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao CN, pelo método de Mann - Whitney.

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ em relação ao CN, pelo método de Mann-Whitney.

Figura 3 - Somatória das alterações potencialmente mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) encontradas em células meristemáticas de *A. cepa*, tratadas com água ultrapura, MMS, Trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações. **CN**: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metil metanosulfonato; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni.

Figura 4



* Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao CN, pelo método de Mann - Whitney.

Valores estatisticamente significativos para $p < 0,05$ em relação ao CN, pelo método de Mann -Whitney.

Figura 4 - Comparação na quantidade de micronúcleos observada em células das regiões meristemática e F_1 de *A. cepa*, tratadas com água ultrapura, MMS, Trifluralina e soluções de Ni em diferentes concentrações, no tratamento contínuo e na recuperação. **CN**: Controle negativo; **TRIF**: Trifluralina; **MMS**: Metil metanosulfonato; **N1**: Solução com 0,0125 mg/L de Ni; **N2**: Solução com 0,025 mg/L de Ni; **N3**: Solução com 0,050 mg/L de Ni.

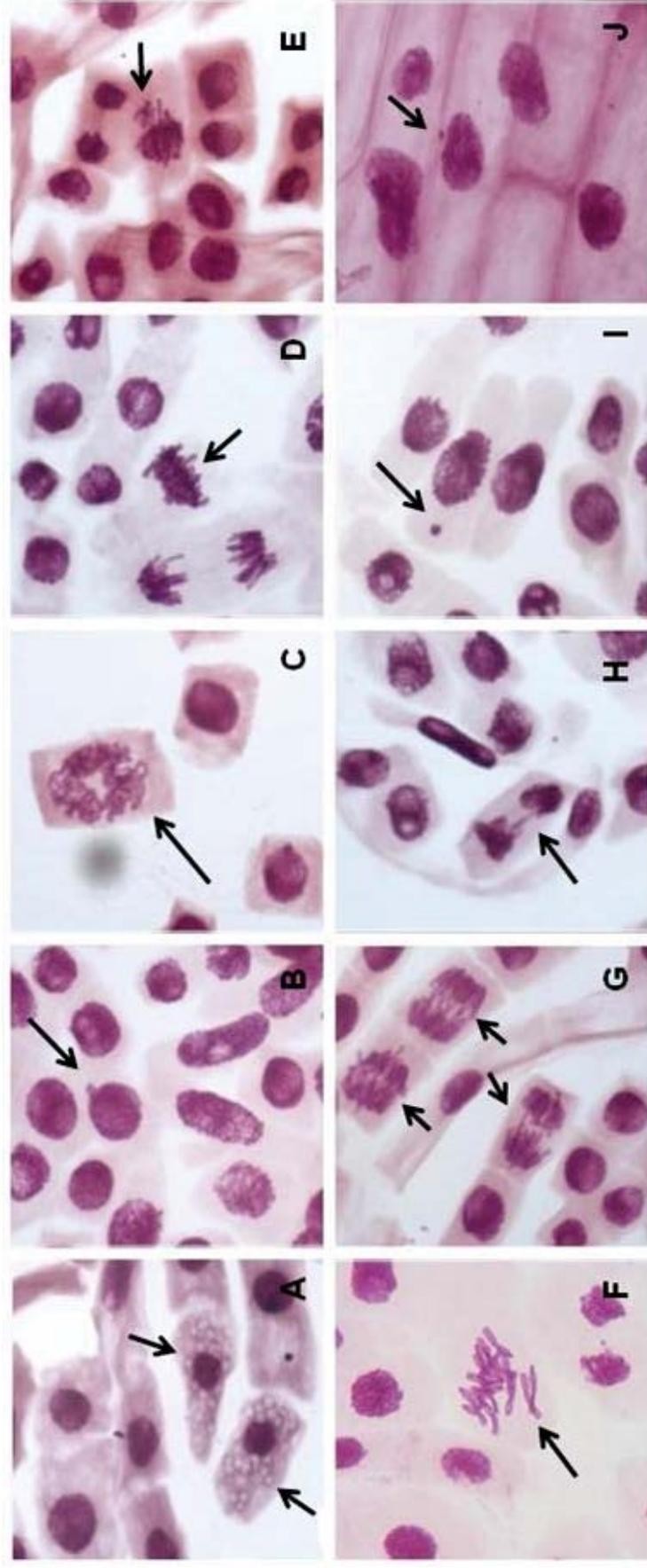


Figura 5 - Alterações nucleares e aberrações cromossômicas em *Allium cepa*, exposto a diferentes concentrações de Ni. **A.** Vacuolização do citoplasma - célula em processo de morte celular (seta); **B.** Célula portadora de broto nuclear (seta); **C.** Metáfase poliplóide (seta); **D.** Metáfase com aderência cromossômica (seta); **E.** Metáfase com perda cromossômica (seta) **F.** C-metáfase (seta); **G.** Anáfases com pontes cromossômicas (setas); **H.** Telófase com ponte cromossômica (seta); **I.** Célula micronucleada (seta); **J.** Micronúcleo em célula da região F_1 (seta).

6. CONCLUSÕES

Pode-se concluir perante o estudo realizado:

- A concentração de níquel permitida pela resolução 357/2005 do CONAMA não apresenta toxicidade ou citotoxicidade para o organismo teste utilizado.
- Tal concentração apresentou potencial genotóxico e mutagênico, mesmo após o período de recuperação.
- As principais alterações observadas foram brotos nucleares, aderências e pontes cromossômicas.
- Concentrações de Ni^{2+} que não apresentam toxicidade ou citotoxicidade, como as testadas, podem apresentar potencial genotóxico e mutagênico.
- O níquel apresenta tanto ação clastogênica quanto aneugênica nas concentrações testadas
- *Allium cepa* é um bioindicador eficiente para avaliação dos efeitos de metais pesados, apresentando elevada sensibilidade a esse tipo de substância.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer-Verlag, 533p., 1986.

AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Genética na Escola**, ano 6, v.1, p.12-15, 2011.

AKBAS, H; DANE, F.; MERIÇ, Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 46, p. 332-336, 2009.

ALBERTINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, Amsterdam, v.463, p.111-172, 2002.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; ALI, M.N.; AHAMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v.518, p.135-144, 2002.

BARBOSA, J. S. ; CABRAL, T. M. ; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F. ; BASTISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.73, n.3, p.320-325, 2009.

BERGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER J. L. **Ecologia**: de indivíduos a ecossistemas. 4. ed. Porto Alegre : Artmed, p. 50- 52, 2007.

BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E.L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of waters samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, n.4 , p. 826-833, 2011.

BRIAT, J. F.; LEBRUM, M. Plant responses to metal toxicity. **Plant Biology and Pathology**, n. 332, p.43-54, 1999.

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**, v. 72, p. 722-725, 2008.

CATALDO, D.A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E. Nickel in plants – Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiology*, v. 63, p. 563-565, 1978.

CETESB. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2009. p.20. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/> Acessado em 21 de julho de 2011.

CHANDRA, S.; GUPTA, S.K. Genotoxicity of leachates of tannery solid waste in root meristem cells of *Allium cepa*. **Journal of Ecophysiology and Occupational Health**, v.2, p.225-234, 2002.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.K.S.; PANDE, P.N.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of *Vicia faba*. **Environmental Toxicology**, New York, v.19, p.129-133, 2004.

[CHAKRAVARTY, B.](#); [SRIVASTAVA, S.](#) Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. **Mutation Research**, v. 239, n. 4, p. 287-284, 1992.

CHRISTOFOLETTI, C.A. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*.** 118 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro. 2008.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357/2005.** Disponível em:< http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf> Acessado em 27 de abril de 2010.

DENKHAUS, E.; SALNOKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, p. 35-56, 2002.

EGREJA FILHO, F.B. **Avaliação da ocorrência e distribuição dos metais pesados na compostagem de lixo domiciliar urbano.** 176p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 1993.

FADIGAS, F. S.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia**, v. 61, n.2, p. 151-159, 2002.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes.** 211f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rio Claro. 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.252-259, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as standart in enviromental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v.197, p 134-260, 1988.

FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. The physiology of metal toxicity in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology*, n.29, p. 511-566, 1978.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, pp. 37-43, 1978

GRANT, W. F. Chromosome aberrations assay in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency, GenoTox Program, **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

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

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, v.426, p 183-188, 1999.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.2090-2095, 2009.

JAFFRE, T.; BROOKS, R. R.; LEE, J., REEVES, R. D. *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. **Science**, v. 193, p.579-80, 1976.

KÄKELÄ, R.; KÄKELÄ, A.; HYVÄRINEM, H. Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.123, p.27- 37, 1999.

LEE, Y.-W.; KLEIN, C. B.; KARGACIN, B.; SALNIKOW, K.; KITAHARA, J.; DOWJAT, K.; ZHITKOVICH, A.; CHRISTIE, N. T.; COSTA, M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n.5, p.2547-2557, 1995.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p. 214-219, 2008.

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

LIN, Y.C.; KAO, C.H. Nickel Toxicity of rice seedlings: cell wall peroxidase lignin, and NiSO₄-inhibited Root Growth. **Crop, Environment & Bioinformatics**, v. 2, p.?? , 2005.

LIU, D.; JIANG, W.; WANG, W.; ZHAO, F.; LU, C. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, Barking, v.86, p.1-4, 1994.

LIU, D.; KOTTKE, I. Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. **Cell Biology and Toxicology**, v. 19, p. 299-311, 2003.

MAGALHÃES, L.F. Níquel: uma riqueza de Goiás. In: SEPLAN. Conjuntura econômica goiana. Boletim trimestral. Goiânia: Secretaria do Planejamento e Desenvolvimento, 2005. p. 16-19.

MAKSYMIEC, W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. **Acta Physiol Plant**, n.29, p. 177-187, 2007.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated

with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips.

Genetics Molecular Biology, Ribeirão Preto, v.29, n.1, p.148-158, 2006.

MCGRATH, S.P. Chromium and Nickel. In: ALLOWAY, B. J. **Heavy metal in soils**. 2 ed. Glasgow: Blackie academic and professional, p.152-172, 1995

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

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.66, p.57-64, 2007.

MISSINI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v. 393, p. 17-21, 1999.

MORAES, D.S.L.; JORDÃO, B.Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MOREIRA, L. M. A.; ARAÚJO, L. M. P.; CORDEIRO, A. P. B.; GUSMÃO, F. A. F. Teste de linfócitos humanos no reconhecimento do efeito clastogênico e citotóxico da 5-fluorouracil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2004.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas**. 1987. 276f. Tese (Doutorado) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

PAGE, V.; FELLER, U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. **Annals of Botany**, n. 96, p.425-434, 2005

PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G; SIQUEIRA, J. O.; FERNANDES, A.R.; MIRANDA, J.R.P.M. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standley). **Scientia Forestalis**, n. 63, p. 158-166, 2003.

POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; VITORELLO, V. A.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. **Scientia Agricola**, v.65, n.5, p.548-552, 2008

POVINELLI, J. **Ação dos metais pesados nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias.** p.285. Tese (Livre Docência em Engenharia/Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1987.

PYLE, G.; COUTURE, P. Nickel. In: **Fish Physiology** - Homeostasis and Toxicology of Essential Metals. v. 31, part 1, p. 253-289, 2011.

ODUM, E.P. Breve descrição dos principais tipos de ecossistema natural na biosfera. **In: Ecologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.367-369, 1988.

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**, v.390, p.121-127, 1997.

RANK, J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Ekologija**, Nr1, p. 38-42, 2003.

RAO K.V.M.; SRESTY, T.V.S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, n. 157, p.113–128, 2000.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SAVLADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.21-27.

RUIZ, E.F.; RABAGO, V. M.E.; LECONA, S. U.; PEREZ, A.B.; MA, T.H. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 270, n.1, p. 45-51, 1992.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In: CUMMINGS, B. (Org.), **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc, 2002, p. 595-621.

SILVA, C. S. Níquel. **Balanco Mineral Brasileiro**, 2001. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/niquel.pdf>.
Acessado em 24 abr. 2010

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P. ; LOVKA, L.; TOMAM, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research**, v.368, p.171-179, 1996.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate ladfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1363-1368, 2009.

SRIVASTAVA, K.; MISHA, K. K. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochesmistry and Physiology**, v.93, p.8-12, 2009.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.183-191, 1998.

STUMM, W.; MORGAN, J.J. **Aquatic chemistry – Chemical Equilibria and Rates in Natural waters**. Nova Iorque. John Wiley & Sons, 3ed. 1022p. 1996.

SUNDERMAN F.W. Jr. Recent advances in metal carcinogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 14, n. 2, p.93-122, 1984.

TUNA, A. L.; YOÇAS, I.; ÇOBAN, E. The Effects of Heavy Metals on Pollen Germination and Pollen Tube Length in the Tobacco Plant. **Turkish Journal of Biology**, n. 26, p.109-113, 2002.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, n. 410, p. 223-236, 1998.

WUNSCH FILHO, V. Riscos ocupacionais e câncer de pulmão. **Jornal de pneumologia**, v. 21, n. 1, p. 34-42, 1995.

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. **Mutation Research**, v.71, p.127-131, 1980.

YANG, X.; BALIGAR, V.C.; FOSTER, J.C.; MARTENS, D.C. Accumulation and transport of nickel in relation to organic acids in ryegrass and maize grown with different nickel levels. **Plant and soil**, v.196, n.2, p.271-276, 1997.

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

YUSUF, M. FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. **Bull Environmental Contamination Toxicology**, n. 86, p.1–17, 2011.

VEGA, M.M., FERNANDEZ, T.B., TARAZONA, J.V., CASTAÑO, A. Biological and Chemical Tools in the Toxicological Risk Assessment of Jarama River, Madrid, Spain. **Environmental Pollution**, v. 93, p.135-139. 1996.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z.; PAVLICA, M.; REGULA, I.; PAPES, D. Cytogenetic damage in Shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.43, p.284-291, 2002.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C.; GRIMALT, F., CORNELLANA F. New trends in the use of metals in jewelery. **Contact Dermatitis**, v.25, p.145–148, 1991.