

# Testes Para Avaliação De Genotoxicidade Com Allium Cepa: Estado Da Arte

## ARTIGO DE REVISÃO

CARVALHO, Tassia <sup>[1]</sup>, MIUCCI, Mariana Azevedo <sup>[2]</sup>, FROES, Gabriela <sup>[3]</sup>, OLIVEIRA, Carlos Rocha <sup>[4]</sup>, SANTOS, Stefanie Alves <sup>[5]</sup>

CARVALHO, Tassia. Et al. **Testes Para Avaliação De Genotoxicidade Com Allium Cepa: Estado Da Arte**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento. Ano 03, Ed. 12, Vol. 03, pp. 131-139 Dezembro de 2018. ISSN:2448-0959

## RESUMO

O nível de toxicidade de uma substância pode ser determinado pelo aumento ou decréscimo do índice miótico, caracterizado pelo número de células em divisão no ciclo celular em um organismo teste, como também pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromotídicas, perdas de cromossomos inteiros ou a formação de micronúcleos. O estudo da genotoxicidade em espécies vegetais é uma alternativa viável no levantamento do potencial mutagênico de diversas substâncias e, também, no controle ambiental da água, solo e o ar, dentre os bio ensaios mais utilizados, o sistema *Allium cepa*, desenvolvido por Levan em 1938, merece papel de destaque pela sua simplicidade metodológica, baixo custo operacional e eficácia comprovada por diversos órgãos internacionais. O presente trabalho realizou o levantamento dos principais artigos publicados entre os anos 2000 e 2018 nas bases de dados SciELO e PubMed, comparando as metodologias utilizadas e resultados alcançados. Não houve um padrão entre a forma do teste utilizada, original ou modificada, nem no tempo de contato dos bulbos com a substância teste, no tipo de fixador e corante empregado ou número de amostras analisadas. O único procedimento que foi observado em todos os trabalhos foi o esmagamento da amostra para a análise no microscópio.

Palavras-chave: *Allium cepa*, bioindicador, melhores práticas, genotoxicidade.

## INTRODUÇÃO

Com a crescente evolução na descoberta de novos fármacos, juntamente com a automedicação e o uso de plantas medicinais pela população mundial nos cuidados primários à saúde, é necessário que sejam realizados testes de detecção de genotoxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade, além de fornecer informações importantes para avaliar os mecanismos de ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos destes compostos, pois muitos deles não foram suficientemente estudados por seus potenciais efeitos tóxicos no nível celular <sup>(1, 2, 3)</sup>.

Os estudos citogenéticos em espécies vegetais é uma alternativa viável no levantamento destas informações, pois indicam possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos em sua composição ou decorrentes do seu metabolismo <sup>(1)</sup>. Do ponto de vista citológico, alterações cromossômicas, estruturais ou numéricas, bloqueio do ciclo celular e interrupções metafásicas, são formas pelas quais os agentes mutagênicos podem ser detectados <sup>(4)</sup>.

Em 1991 os biosensaio de alteração cromossômica de *Allium cepa*, o ensaio *Tradescantia micronucleus* e o ensaio de mutação *Tradescantia stamen* foram validados pelo Programa Internacional de Química e Segurança Social (IPCS) sob os auspícios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) como eficientes para a triagem química e especialmente para o monitoramento da genotoxicidade de poluentes ambientais <sup>(5,6)</sup>.

Dentre estes três métodos de bioensaio, o ensaio de alteração cromossômica ou sistema teste *Allium cepa* é o mais utilizado nos laboratórios de pesquisa, isso se deve pelo fato da cebola ser de fácil manuseio e armazenamento e também devido a convivência das células da ponta raiz para testes macroscópicos, como crescimento e EC<sub>50</sub>, bem como para parâmetros microscópicos, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, formação de micronúcleo, ou mesmo a destruição total do cromossomo, ou outras de alterações no processo de divisão celular <sup>(6,7,8)</sup>.

O teste de *Allium cepa* foi desenvolvido por Levan (1938), este teste avalia basicamente os efeitos de produtos químicos nos cromossomos de plantas, através da análise das células das pontas das raízes, que permanecem por um determinado período em contato direto com a substância a ser testada. Em 1985 foram realizadas as primeiras adaptações do teste proposto por Levan, para o monitoramento ambiental e efeitos de misturas complexas nos seres vivos <sup>(6,9)</sup>.

Acredita-se que mais de 60% da terapêutica farmacológica do câncer e de doenças infecciosas, são de moléculas oriundas de fontes naturais e que, o desenvolvimento e estudos de seus princípios ativos contribuem para garantia da segurança e eficácia destas drogas <sup>(10,11,12)</sup>. Para determinar o risco genético de determinado composto, a avaliação da toxicidade gênica idade se torna muito importante não só para seres humanos, mas também para microssistemas de determinados locais <sup>(13)</sup>. Desta maneira, a detecção e o entendimento das propriedades desses agentes permitem avaliar os efeitos hereditários deletérios, ou mesmo letais, para os organismos <sup>(12,14)</sup>.

Este trabalho tem por objetivo realizar um levantamento bibliográfico, demonstrando quais metodologias utilizadas pelos autores no teste de genotoxicidade com *Allium cepa*, de modo que os estudantes de graduação possam encontrar neste material as melhores práticas adotadas e possam ser mais assertivos em suas pesquisas.

Para a realização desta pesquisa, foram realizadas buscas em artigos científicos, dissertações e teses relacionados à temática de interesse, publicados em revistas indexadas nas bases de dados do PubMed e do Scientific Electronic Library Online (SciELO) e com a utilização do espaço temporal de 2000 a 2018.

Foram utilizados os termos “*Allium cepa*”, bioindicador e genotoxicidade como estratégia de delimitação dos parâmetros de busca. Após a coleta dos artigos, o material foi analisado e as metodologias compiladas e discutidas.

## DISCUSSÃO

Os principais artigos encontrados durante a busca nas bases de dados foram compilados na tabela 1. Apesar da busca ser iniciada em 2000, o artigo mais antigo encontrado foi de Bagatini et al. (2007) que estudou a genotoxicidade de infusões de plantas medicinais utilizando *Allium cepa* como bioindicador.

Apesar do espaço temporal de busca iniciar no ano 2000, a consulta aos artigos originais de Levan (1938) e Fiskesjö (1988) foram considerados importantes, uma que o primeiro introduz o teste de *A. cepa* no meio acadêmico e o segundo cria a primeira modificação do teste.

Todos os artigos selecionados demonstram o fato de que o sistema teste de *A. cepa*, é um ensaio de grande importância na avaliação da genotoxicidade, tanto de extratos e infusões de plantas medicinais como de diversos compostos químicos, inclusive na determinação da qualidade da água de rios e lagos.

De acordo com Fiskesjö (1988), parâmetros diferentes podem ser relevantes para diferentes tipos de tratamentos. No entanto, certos efeitos são de interesse comum e devem ser pontuados em todas as triagens de rotina. Assim, os efeitos c-mitóticos podem, em certos casos, revelar riscos de geração de aneuploidia. Por exemplo, se o tratamento com colquicina for usado, não será possível estudar se um determinado tratamento pelos efeitos c-mitóticos nas células. Portanto, tratamento com colquicina adicional deve ser utilizado apenas para o estudo específico de quebras de cromossomos e de cromátides.

De acordo com Levan (1938) na forma original do teste de *A. cepa*, o crescimento da raiz é iniciado em água pura. Quando as raízes alcançaram o comprimento de 1-2 cm, os tratamentos são realizados em determinados intervalos de tempo, por exemplo, 4 ou 24 horas. Para um estudo detalhado de configurações cromossômicas, como a quebra de cromossomo ou cromátide, um tratamento adicional por 1 ou 2 horas com colchicina a 0,1% pode ser realizado antes da preparação das lâminas para estudos microscópicos.

Fiskesjö (1985) comenta que na forma modificada do teste de *A. cepa* as cebolas são colocadas diretamente nos líquidos de teste sem a germinação anterior das pontas das raízes. As substâncias teste devem ser trocadas regularmente todos os dias, e se houver escassez da substância teste, apenas as quantidades evaporadas podem ser substituídas.

Tabela 1 - Comparação das diferentes metodologias do teste de genotoxicidade com *A. cepa*

Ano	Autor	Tempo de contato	Forma do teste	Metodologia		
				Fixador	Esmagamento	Aumento ótico
2007	Bagatini et al. (1)	24 h	Original	Orceína acética 2%	Sim	40X
2008	Fachinetto et al. (17)	24 h	Original	Orceína acética 2%	Sim	40X
2008	Pinho et al. (18)	48 h	Original	ni	Sim	1000X
2009	Grippa (19)	72 h	Original	Reativo de Schiff	Sim	ni
2011	Poletto et al. (20)	96 h	Modificado	Kit Panótipo Rápido LB	Sim	400X
2012	Silva e Bohm (21)	120 h	Modificado	Orceína aceto clorídrica	Sim	400 X
2013	Siva et al. (6)	ni	Original	Carnoy/ Orceína acética	Sim	400 X

2014	Braga e Lopes (22)	72 h	Modificado	2% Carnoy/ Reativo de Schiff	Sim	ni
2018	Pandir (23)	72 h	Modificado	Carnoy/acetoca rmina	Sim	40X

ni: Não informado

Fonte: Baseado em Lessa et al. (2007)

O teste original foi aplicado por Bagatini et al. (2007), Fachinetto et al. (2007), Pinho et al. (2008), Grippa (2009) e Silva et al. (2013), onde ocorreu a retirada das raízes dos bulbos das cebolas com auxílio de uma lâmina e posterior re-enraizamento em água destilada, para então os bulbos serem colocados nas soluções teste.

O tempo em que os bulbos ficam em contato com a substância teste varia de acordo com o experimento, Bagatini et al. (2007), Fachinetto et al. (2007) deixaram os bulbos em contato com a substância teste por 24 horas, enquanto Pinho et al. (2008) deixou em contato por 48 horas, Braga e Lopes (2014), Silva e Bohm (2012) 120 horas, Grippa (2009), Pandir (2018) e Braga e Lopes (2014), já Poletto et al. (2011) utilizou o comprimento das raízes como parâmetro de contato e não o tempo.

Após o tempo de contato, retirada da parte apical das raízes com auxílio de uma lâmina, fixação e coração com diferentes substâncias, como a orceína acética a 2% (Fachinetto et al. (2007), o reagente de Feulgen (Bagatini et al., 2007), Carnoy (Grippa, 2009), Kit Panótipo Rápido LB (Poletto et al., 2011), Carnoy, reagente de Feulgen e Reativo de Schiff (Braga e Lopes, 2014). Vale a pena ressaltar que independente do fixador e do corante utilizado, todos os trabalhos apresentaram resultados satisfatórios no teste de genotoxicidade.

Durante o levantamento bibliográfico que não houve uma padronização no tamanho ideal das amostras de bulbos e das suas raízes nas análises ??com o teste de *A. cepa*. Barbério et al. (2011) ao revisar 44 artigos científicos publicados nas últimas três décadas, os autores utilizaram em média seis bulbos, e de uma a vinte raízes, contando com uma média de 1700 células para investigação do micronúcleo e 490 células para análise de aberrações cromossômicas. Pinho et al. (2008) analisou 8000 células, Fachinetto et al. (2007) 6000, Pandir (2018) 5000 células, Silva et al. (2013) 2000, Braga e Lopes (2014) 1500 células, Grippa (2009) e Poletto et al. (2011) 1000 células, Silva e Bohm (2012) não informaram na metodologia o número de células analisadas.

Foi observado que após a fixação, uma etapa importante do procedimento é o esmagamento das amostras, onde todos os autores citam esta etapa, para a observação das amostras em microscópio ótico, normalmente foi utilizado o aumento de 40X, 400X e 1000X de aumento.

O sistema *A. cepa* pode ser considerado um bioindicador ideal, possuindo confiabilidade comprovada por órgãos internacionais e também sensibilidade e exatidão. Contando ainda com metodologia simples, de baixo custo e de fácil execução, características essa que a tornam o principal instrumento utilizado pela comunidade científica num primeiro *screening* da citogenotoxicidade de infusões. Tanto o método

original quanto o modificado apresentaram resultados satisfatórios, o número de células analisadas, tipo de fixador e corante e o tempo de contato com a substância teste variaram de autor para autor, porém o esmagamento da amostra para a análise microscópica ocorreu em todos os casos.

## CONCLUSÃO

O sistema *Allium cepa* mostra-se claramente como uma metodologia eficaz, por ser sensível as possíveis variações da determinação de toxicidade através das observações das células de suas raízes no que diz respeito aos efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos. Apesar de ser um teste simples, alguns cuidados são necessários para a que o resultado do trabalho seja efetivo. Princípios básicos manipulação das amostras para não ocorrer contaminação cruzada, número suficiente de amostras para poder ser feita a análise estatística do resultado e a para a etapa de análise no microscópio, realizar à técnica de esmagamento, sendo este o procedimento encontrado em todos os artigos pesquisados.

## REFERÊNCIAS

1- Bagatini MD; Silva ACF.; Tedesco SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacologia*; v.17, n. 3. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010295X2007000300019&lng=em](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010295X2007000300019&lng=em). Acesso em: 30/10/2018.

2- Meyerl; Quadros KE; Zeni ALLB. Etnobotânica na comunidade de Santa Bárbara Ascurra, Santa Catarina, Brasil. *Ver. Bras.Bioc.* v. 10, n.3, p. 258-266. 2007. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/viewFile/1651/1131>. Acesso em: 31/10/2018.

3- Frescura VD; Laughinghouse IV.; Tedesco SB. 2012. Antiproliferative effect of the tree and c. *Caryologia*. v.65, n. 1, p. 27-33. 2012. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00087114.2012.678083>. Acesso em: 31/10/2018.

4- Knoll MF et al. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. *Genet. Mol. Biol.* v. 29, n. 3, p. 539-542. 2006. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141547572006000300024&lng=em](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572006000300024&lng=em). Acesso em: 30/10/2018.

5- Cabrera, GL; Rodriguez, DMG. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutation Research*. 1999, v. 426, n.2, p.211-214. 1999. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510799000706>. Acesso em 30/10/2018.

6- Silva CR et al. Absence of mutagenic and citotoxic potentiality of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) evaluated by microbiological tests. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 14, n.1, p.1-3. 2013. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2004000300001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2004000300001). Acesso em: 30/10/2018.

- 7- Fiskesjo G. The allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3340086>. Acesso em: 31/10/2018.
- 8- Silva BM et al. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de citotoxicidade de substâncias usadas na conserva de *Olea europaea L.* In: Anais do I Seminário de Biodiversidade e Agrossistemas Amazônicos, 2013, Alto Floresta. Alta Floresta, 2013. Disponível em: <http://portal.unemat.br/media/files/sistema%20teste%20de%20allium%20cepa%20como%20bioindicador%20de%20citotoxicidade%20de%20substancias%20usadas%20na%20conserva%20de%20olea%20europaea%20l.pdf>. Acesso em 31/10/2018.
- 9- Pinho DS et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de Baccharistrimera (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 20, n. 20, p. 165-170, 2008. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2010000200005&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2010000200005&script=sci_abstract). Acesso em: 30/10/2018.
- 10- Levan A. The effect of colchicines on root mitoses in *Allium*. *Hereditas*. XXIV, p 471-486, 1938. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x>. Acesso em: 30/10/2018.
- 11- Newman DJ; Cragg GM; Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. v. 66, n.7, p. 1022-1037, 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880330>. Acesso em: 29/10/2018.
- 12- Gadano A et al. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides L.* *Journal of Ethnopharmacology*. v. 81, n.1, p.11-6, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020922>. Acesso em: 29/10/2018.
- 13- Krüger RA. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*. (Mestrado em Química Ambiental). Novo Hamburgo: Centro Universitário Feevale, 2009.
- 14- Dallegrave E. *Toxicologia Clínica: Aspectos Teórico-Práticos*. Porto Alegre: UFRGS, 2006, 20 p.
- 15- Leme DM, Marin-Morales MA. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. *Mutation Research*. v. 650, n.1, p. 80-86, 2008. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383-5718\(07\)00294-X](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383-5718(07)00294-X). Acesso em 29/10/2018.
- 16- Espósito AV et al. Evaluation of the genotoxic potential of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system *in vivo*. *Genet. Mol. Biol.* v. 28, n.1, p. 152-155, 2005. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S141547572005000100026&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141547572005000100026&lng=en). Acesso em: 02/11/2018.
- 17- Fachinetto JM. et al. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides DC*

(Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2007000100011&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102695X2007000100011&script=sci_abstract&tlng=pt). Acesso em: 30/10/2018.

18- Pinho DS. et al. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 20, n.2, p. 165-170, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102695X2010000200005](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102695X2010000200005). Acesso em: 30/10/2018.

19- Grippa GA. Avaliação genotóxica e mutagênica do óleo essencial de *Schinus molle* estudo de sua ação antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e *in vivo*. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Vitória. Universidade Federal do Espírito Santo, 2009.

20- Poletto PO et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris ariflora* (Mart. ex Benth. J. F. Macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. *Revista Pesquisa & Criação*. v. 10, n. 1, p. 163-175, 2011. Disponível em: <http://www.periodicos.unir.br/index.php/propeq/article/viewFile/402/433>. Acesso em: 29/10/2018.

21- Silva AA, Bohm FMLZ. Estudos dos efeitos do chá do *Agaricus blazei* (cogumelo do sol) no índice mitótico das células meristemáticas do *Allium cepa*. *Diálogos & Saberes*. v.8, n.1, p. 25-39. Disponível em:

<http://seer.fafiman.br/index.php/dialogosesaberes/article/download/267/259>. Acesso em: 29/10/2018.

22- Braga JRM, Lopes DM. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. *Ver. Ambient. Água*. v.10, n., p. 130-140, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ambiagua/v10n1/1980-993X-ambiagua-10-01-00130.pdf>. Acesso em: 02/11/2018.

23- Pandir D. Assesment of the Genotoxic Effect of the Diazinon on Root Cells of *Allium cepa* (L.). *Braz. arch. biol. technol.* v. 61: e18160390.2018. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132018000100406&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132018000100406&lng=en). Acesso em: 03/11/2018.

24- Lessa, L. R.; et al. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* L. como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. *Revinter*. v. 10, n.03, p. 39-48, out. 2017. Disponível em:

<http://www.revistarevinter.com.br/minhas-revistas/2017/v-10-n-3-2017-volume-10-numero-3-outubro-de-2017-sao-paulo/200fundamentos-e-aplicacoes-do-allium-cepa-como-bioindicador-de-mutagenicidade-e-citotoxicidade-de-plantas-medicinais/file>. Acesso em 03/11/2018.

<sup>[1]</sup> Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi Morumbi – Campus Centro (Mooca), graduada em Biomedicina e discente do curso de Farmácia.

<sup>[2]</sup> Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi Morumbi – Campus Centro (Mooca), discente do curso de Farmácia.

<sup>[3]</sup> Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi Morumbi – Campus Centro (Mooca), discente do curso de Farmácia.

<sup>[4]</sup> Doutor em Biotecnologia, Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Universidade Anhembi Morumbi.

<sup>[5]</sup> Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi Morumbi – Campus Centro (Mooca), discente do curso de Farmácia.

Enviado: Novembro, 2018

Aprovado: Novembro, 2018