



Efeito citogenotóxico do conteúdo de atratores luminosos em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* L.

Daliléia Aparecida Santana¹, Alexandre de Queiroz¹, Raquel Bagattini¹ e Fábio Mesquita do Nascimento^{1*}

Recebido: 11 de julho de 2018 Recebido após revisão: 18 de novembro de 2018 Aceito: 7 de dezembro de 2018
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/4122>

RESUMO: (Efeito citogenotóxico do conteúdo de atratores luminosos em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa* L.). O uso de atratores quimioluminescentes na pesca comercial com espinhel tem levado ao acúmulo destes dispositivos em praias da região da Costa dos Coqueiros, no estado da Bahia, e o conteúdo desses dispositivos tem sido usado na pele por moradores locais para fins supostamente cosméticos e medicamentosos. Com o objetivo de avaliar o efeito tóxico do líquido existente no interior desses dispositivos, bulbos de *Allium cepa* foram expostos a soluções aquosas de concentrações 0,007%, 0,010% e 0,013% desse conteúdo. Após 72 horas de exposição, as extremidades das raízes crescidas nessas soluções foram coletadas, fixadas e, sob microscopia, células meristemáticas radiculares desses bulbos foram avaliadas quanto a parâmetros citotóxicos e genotóxicos. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste exato de Fisher. Observou-se uma redução significativa do índice mitótico nas células radiculares nas diferentes concentrações da mistura testada ($p < 0,001$). Além disso, registrou-se um aumento significativo na frequência de anomalias nucleares interfásicas ($p < 0,001$). Núcleos fragmentados, vacuolados, alongados, entalhados assim como brotos nucleares, células binucleadas e micronúcleos foram algumas das anomalias nucleares mais frequentes. Esses resultados são compatíveis com a existência de efeitos citotóxicos e genotóxicos da mistura química testada em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*.

Palavras-chave: cebola, *light stick*, índice mitótico, anomalias nucleares interfásicas.

ABSTRACT: (Cytogenotoxic effect of glow stick content on meristematic root cells of *Allium cepa* L.). The use of chemiluminescent glow sticks in commercial longline fishing has led to an accumulation of these devices on beaches at the Costa dos Coqueiros region, Bahia state, northeastern Brazil, and local residents thereat have been using the content of the sticks on their skin, allegedly with cosmetic and medicinal purposes. Aiming to evaluate the toxic effects of the stick liquid content, we exposed *Allium cepa* bulbs to aqueous solutions of such content at concentrations 0.007%, 0.010% and 0.013%. After a 72-h exposure, root tips grown in these solutions were collected and fixed, and we then analyzed meristematic root cells under microscopy to assess cytotoxic and genotoxic parameters. Data was analyzed by Fisher's exact test. The mitotic index of root cells decreased significantly at the tested concentrations ($p < 0.001$), while the frequency of interphase nuclear abnormalities increased significantly ($p < 0.001$). The most frequent nuclear abnormalities included fragmented nuclei, vacuolated nuclei, elongated nuclei, notched nuclei, nuclear buds, binucleated cells and micronuclei. Our results suggest that the glow stick chemical content has cytotoxic and genotoxic effects on meristematic root cells of *Allium cepa*.

Keywords: onion, glow sticks, mitotic index, interphase nuclear abnormalities.

INTRODUÇÃO

Na pesca comercial, diferentes estratégias são adotadas no sentido de aumentar a quantidade de peixes capturados. A técnica de pesca com espinhel, por exemplo, é particularmente útil na pesca do espadarte (*Xiphias gladius*) e do atum (*Thunnus albacares* e *T. atlanticus*) (Araújo *et al.* 2015). A pesca dessas espécies geralmente é realizada à noite, de modo que o uso de atratores químicos luminescentes, conhecidos como *lightsticks* (LS), são presos à longa linha de pescaria com o objetivo de atrair os peixes. Entretanto, essa prática tem levado ao acúmulo de LS em águas oceânicas e praias (Bechara *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2014, Araújo *et al.* 2015).

Cada LS corresponde a um tubo plástico transparente e flexível preenchido por líquido, no qual encontra-se imersa uma ampola de vidro também repleta de fluido. O líquido onde se encontra a ampola corresponde a uma solução que contém peróxido de hidrogênio e um salici-

lato dissolvido em ftalato dimetílico. Por sua vez, o fluido existente no interior da ampola contém um éster oxálico, geralmente o CPPO (oxalato de bis(2-carbopentiloxi-3,5,6-triclorofenil)) ou o TCPO (oxalato de bis(2,4,6-triclorofenil)), dissolvido em ftalato de dibutila. Além do éster oxálico, esse fluido também contém um hidrocarboneto policíclico aromático (HAP) (Bechara *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2014, Araújo *et al.* 2015).

Quando o tubo plástico do LS é dobrado com força, a ampola de vidro contida em seu interior é quebrada e libera seu conteúdo, cuja interação química com o fluido externo, conhecida como sistema ou reação peroxioxalato, resulta em quimioluminescência (Oliveira *et al.* 2014, Araújo *et al.* 2015). Oliveira *et al.* (2014) afirmam que a exposição prolongada ao sol dessa mistura química contida em LS utilizados e descartados favorece a ocorrência de reações secundárias que liberam eletrófilos potencialmente genotóxicos, uma vez que são capazes de agir sobre o DNA e formar adutos.

1. Universidade Paulista (UNIP), Instituto de Ciências da Saúde, curso de Ciências Biológicas, campus Vergueiro. Rua Apeninos, 267, Aclimação, CEP 01533-000, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: fmnbio@yahoo.com.br

No Brasil, especialmente na região nordeste, uma grande quantidade de atratores quimioluminescentes é encontrada flutuando nas águas marinhas, provenientes da pesca com espinhel (Bechara *et al.* 2009, Ivar do Sul *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2014). Um monitoramento realizado pela organização não-governamental (ONG) Global Garbage registrou mais de 7.000 desses dispositivos coletados por voluntários em praias ao norte do estado da Bahia (Bechara *et al.* 2009).

Esse tipo de poluição oceânica representa um risco em potencial para a biota marinha, considerando a possibilidade de extravasamento do fluido dos LS para o ambiente aquático. Alguns estudos já registraram os efeitos tóxicos de componentes desse fluido em crustáceos marinhos e em embriões de ouriços-do-mar (Pinho *et al.* 2009, César-Ribeiro & Palanch-Hans 2010).

Na região de Costa dos Coqueiros, no litoral norte da Bahia, residentes de vilas locais têm usado o conteúdo dos LS encontrados nas praias como bronzeador, óleo de massagem, repelente e no tratamento de dores musculares e vitiligo (Ivar do Sul, 2005). Esse tipo de prática causa preocupação, pois, em contato com a pele, o conteúdo dos LS pode induzir a ocorrência de reações inflamatórias (Bechara *et al.* 2009, Ivar do Sul *et al.* 2009), além de ser potencialmente genotóxico (Oliveira *et al.* 2014).

O conhecimento a respeito dos efeitos toxicológicos da exposição ao conteúdo químico dos LS ainda é escasso. Não há relatos consistentes na literatura sobre respostas citológicas induzidas por esse conteúdo. Muitos estudos sobre citotoxicidade e genotoxicidade induzidas por contaminantes químicos usam plantas como modelos experimentais para avaliar os efeitos de tais contaminantes em células individuais ou tecidos específicos (Fiskesjö 1985). *Allium cepa* é uma das plantas mais utilizadas, devido à sua elevada sensibilidade a diversos poluentes químicos. O sistema-teste de *Allium cepa* é eficiente para avaliar a ocorrência de danos cromossômicos e distúrbios no ciclo mitótico resultantes da ação de tais contaminantes (Leme & Marin-Morales 2009). Além disso, a estrutura cromossômica de *A. cepa* é similar à de humanos e outros animais (Evandri *et al.* 2000).

Sendo assim, o presente estudo se propôs a identificar possíveis alterações citotóxicas e genotóxicas resultantes da exposição a substâncias provenientes dos LS por meio do sistema-teste de *A. cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções de light sticks (LS)

Os atratores quimioluminescentes [*light sticks* (LS)] a partir dos quais se obtiveram os conteúdos químicos usados nos bioensaios foram coletados pela ONG Global Garbage em praias da região da Costa dos Coqueiros (15°54'S, 38°20'O a 11°34'S, 37°47'O), ao norte do estado da Bahia. O conteúdo químico desses atratores foi gentilmente cedido pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

A obtenção das soluções aquosas dos conteúdos químicos dos LS foi adaptada a partir da descrição feita por Pinho *et al.* (2009). Em resumo, a mistura química dos LS foi vigorosamente misturada com água de torneira de modo a se obter as concentrações almeçadas. Tomando por base as concentrações utilizadas por Oliveira *et al.* (2014) em seus bioensaios, foram obtidas soluções aquosas dos conteúdos de LS nas concentrações de 0,007, 0,010 e 0,013%.

Organismo modelo

Para a realização dos bioensaios, bulbos frescos e saudáveis de *Allium cepa* foram obtidos de um mesmo fornecedor comercial de produtos vegetais na cidade de São Paulo. Os bulbos eram semelhantes em tamanho, variando de 2,5 a 3,0 cm em diâmetro. As raízes secas presentes nesses bulbos foram raspadas para facilitar o crescimento de novas raízes durante o tempo de exposição às soluções testadas.

Delineamento experimental

Os bulbos de *Allium cepa* foram colocados por 72h para crescer raízes em contato com as soluções testadas, suspensos por palitos de madeira de modo a tocar a base, onde se situa o meristema radicular, nas soluções dispostas em copos de polietileno. Além de soluções aquosas dos conteúdos de LS, os tratamentos também incluíram água de torneira como controle negativo (Nielsen & Rank 1994) e solução aquosa de paracetamol a 0,08% como controle positivo (Sturbelle *et al.* 2010). Dois bulbos foram expostos para cada tratamento e, após o período de exposição, as extremidades de duas raízes (cerca de 3 mm de comprimento) foram removidas de cada bulbo.

As extremidades radiculares coletadas foram fixadas em solução de Carnoy (etanol e ácido acético; 3:1 v/v), por 24h. Posteriormente, a hidrólise dos meristemas radiculares, normalmente efetuada em tubo de ensaio com solução ácida a 60 °C por 10 minutos (Roa *et al.* 2012), foi adaptada de modo que o aquecimento das extremidades radiculares realizou-se pela passagem repetida (dez vezes) de um vidro de relógio, contendo o material coletado em solução aquosa a 1 N de HCl, sobre a chama de um bico de Bunsen. Após essa etapa, as extremidades radiculares foram transferidas para lâminas e submetidas à técnica de esmagamento (*squash*) em solução aquosa a 1,5% de azul de toluidina e, então, analisadas em microscópio óptico (nos aumentos totais de 400X e 1000X).

Ao microscópio, determinou-se as porcentagens de células em cada fase mitótica e as porcentagens de micronúcleos (MN) e anomalias nucleares interfásicas (ANI) em um total de 1000 células analisadas por lâmina. Em virtude de dificuldades técnicas, o total de células analisadas em algumas lâminas foi ligeiramente inferior a 1000. Nesses casos, isso foi levado em consideração na estimativa das frequências. Anomalias cromossômicas específicas não foram analisadas. O número de células

em mitose foi usado no cálculo do índice mitótico (IM), correspondente à porcentagem de células em divisão em cada um dos tratamentos. Os dados foram analisados estatisticamente pelo teste exato de Fisher, considerando o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os efeitos das diferentes concentrações dos conteúdos de LS nas frequências de cada fase mitótica e no índice mitótico podem ser observados na Tabela 1. Quando comparadas com o controle negativo, as porcentagens de células em prófase mostraram-se significativamente menores ($p < 0,001$), independente da concentração de LS considerada. Além disso, houve um decréscimo dessa porcentagem em função do aumento da concentração do contaminante. A proporção de células em metáfase só foi inferior na concentração de 0,013% de LS ($p < 0,05$). A proporção de células em anáfase, em qualquer uma das três concentrações analisadas, também foi inferior ($p < 0,001$), embora, ao contrário do observado para as prófases, houve um aumento dessa proporção em função do aumento da concentração do contaminante. Já as porcentagens de células em telófase só foram significativamente inferiores nas concentrações de 0,010% ($p < 0,05$) e 0,013% ($p < 0,001$) de LS.

Os valores de IM também foram inferiores àqueles do controle negativo ($p < 0,001$), e a redução nesses valores foi proporcional ao aumento na concentração do LS. O valor médio do IM para as células expostas à menor concentração do contaminante correspondeu a 54% daquele registrado para o controle negativo, enquanto que nas células expostas à maior concentração do contaminante o IM foi equivalente a apenas 37,5% do registrado para o controle negativo, compatível com o índice registrado para o controle positivo.

Células com aparência necrótica (Fig. 1B, 1C e 1D) e apoptótica (Fig. 1E), bem como células fantasmas (Fig. 1F) foram identificadas nas raízes expostas às diferentes concentrações de LS e também no controle positivo. A ocorrência de deformações nucleares foi alta ($p < 0,001$) nas células expostas às três concentrações de LS analisadas (Fig. 2), sendo mais evidente nas células expostas à concentração de 0,010% de LS. Núcleos extrudados (Fig. 1G), vacuolados (Fig. 1H), brotos

nucleares (Figs. 1I e 1J), células binucleadas (Fig. 1K), núcleos entalhados (Fig. 1L) e curvados ou lobados (Figs. 1M, 1N e 1O) foram observados. Micronúcleos (Fig. 1P), apesar de detectados, apresentaram frequência significativa ($p < 0,05$) apenas na solução de menor concentração do contaminante e no controle positivo (Fig. 2).

DISCUSSÃO

Produtos quimioluminescentes, tais como aqueles presentes em atratores luminosos, já foram considerados inofensivos em estudos anteriores (Hoffman *et al.* 2002). Entretanto, diversos outros estudos revelaram que o conteúdo dos LS é potencialmente danoso às pessoas e ao ecossistema (Ivar do Sul 2005, Bechara *et al.* 2009, Ivar do Sul *et al.* 2009, Pinho *et al.* 2009, César-Ribeiro & Palanch-Hans 2010, Oliveira *et al.* 2014, Araújo *et al.* 2015). O presente estudo corrobora com essa última observação ao adicionar novos conhecimentos a respeito dos efeitos celulares do conteúdo químico dos LS.

As variações significativas nas frequências de células nas diferentes fases da mitose revelam uma das ações do contaminante, embora os resultados não apontem uma mesma tendência de aumento ou diminuição para todas as fases. Enquanto a proporção de prófases reduziu em função do aumento da concentração do contaminante, a de anáfases aumentou. Não foi possível estabelecer uma explicação satisfatória para essa dicotomia de resultados observada. Diversos estudos que contabilizam as frequências de células nas diferentes fases da mitose não costumam incluir análises mais pormenorizadas das variações encontradas especificamente em cada fase (Fachinetto *et al.* 2007, Türkoğlu 2007, Oliveira *et al.* 2011, Bezerra *et al.* 2016). Sendo assim, novos estudos se fazem necessários para se estabelecerem maiores esclarecimentos a respeito dessa variação aqui registrada.

Um dos efeitos mais notáveis foi a redução significativa do índice mitótico. Vários estudos atribuem a ocorrência de baixos valores de IM aos efeitos citotóxicos provocados por contaminantes químicos (Türkoğlu 2007, Leme & Marin-Morales 2008, Çelik & Aslantürk 2010, Wang *et al.* 2014, Kumar & Pandey 2015). Os dados obtidos no presente estudo revelaram que esse efeito citotóxico foi significativo, mesmo nas células expostas

Tabela 1. Frequências percentuais médias (\pm desvios-padrão) de cada estágio mitótico e valores do índice mitótico (IM) de células radiculares de *A. cepa* expostas a soluções de diferentes concentrações de light stick (LS).

| Tratamento | Total de células analisadas | Prófase | Metáfase | Anáfase | Telófase | IM |
|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Controle negativo ¹ | 3992 | 2,08 \pm 0,85 | 0,80 \pm 0,44 | 1,20 \pm 0,65 | 0,93 \pm 0,71 | 5,01 \pm 2,38 |
| LS: 0,007% | 3999 | 0,98 \pm 0,40*** | 0,63 \pm 0,30 | 0,38 \pm 0,34*** | 0,73 \pm 0,34 | 2,70 \pm 1,02*** |
| LS: 0,010% | 3999 | 0,80 \pm 0,35*** | 0,83 \pm 0,56 | 0,45 \pm 0,31*** | 0,55 \pm 0,38* | 2,63 \pm 1,50*** |
| LS: 0,013% | 4000 | 0,75 \pm 0,53*** | 0,40 \pm 0,43* | 0,53 \pm 0,46*** | 0,20 \pm 0,18*** | 1,88 \pm 1,47*** |
| Controle positivo ² | 4000 | 0,33 \pm 0,39*** | 0,23 \pm 0,26*** | 0,15 \pm 0,19*** | 0,35 \pm 0,44*** | 1,08 \pm 1,18*** |

1. Água de torneira. 2. Solução aquosa de paracetamol a 0,08%.

Níveis de significância no teste exato de Fisher: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (comparados ao controle negativo).

à menor concentração de LS testada. Esses dados são compatíveis com aqueles registrados por Oliveira *et al.* (2014) ao submeterem células humanas, mantidas em meio de cultura, a diferentes concentrações de LS.

Muitas das alterações celulares aqui registradas são indicativas de processos de morte celular, tanto necrose quanto apoptose, e são comumente descritas em estudos similares. Por exemplo, alterações como células

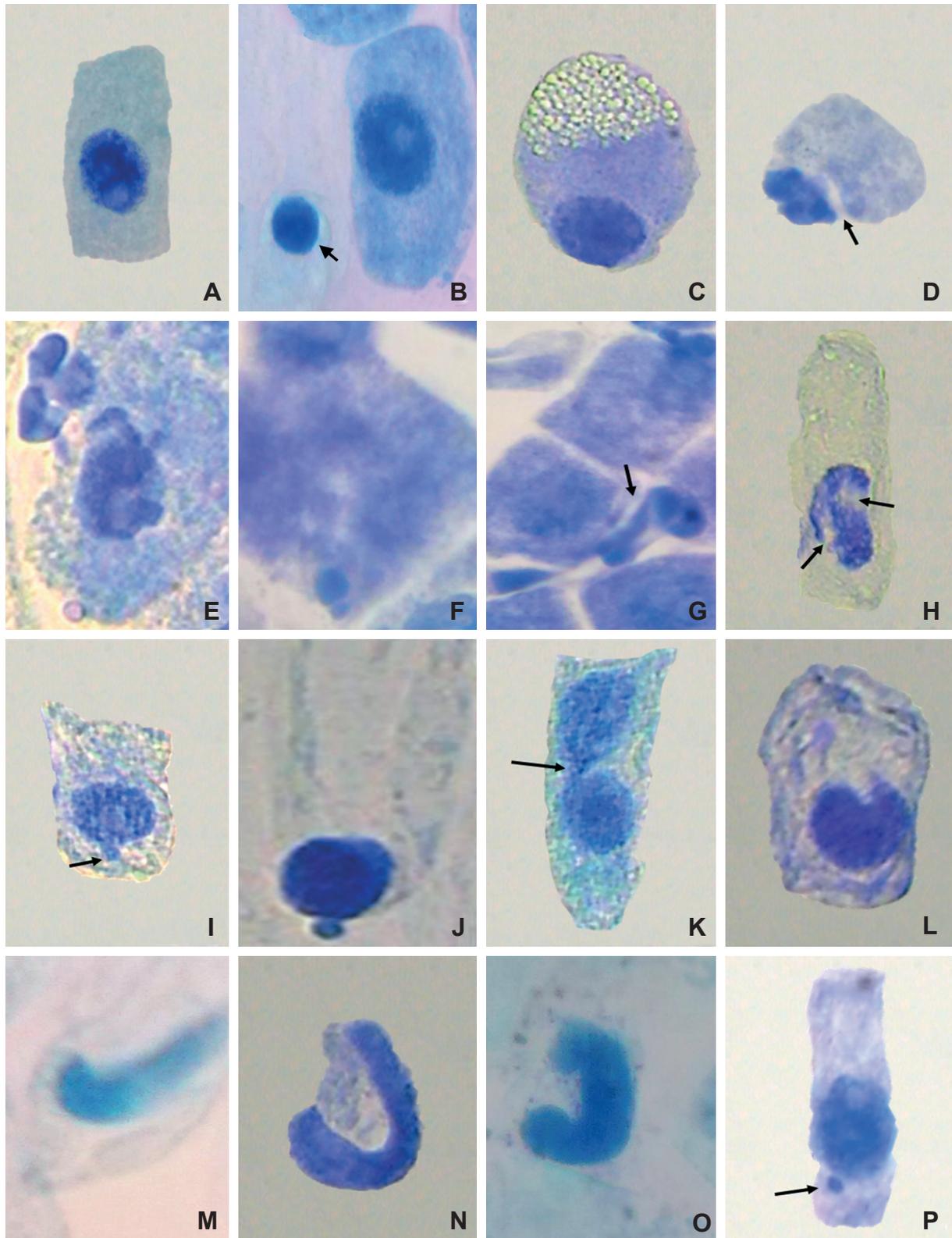


Figura 1. Aspectos celulares observados em células radiculares de *A. cepa* expostas a soluções de diferentes concentrações de light stick (LS). A. Normal. B. Picnose. C. Necrose. D. Rompimento celular. E. Apoptose. F. Célula fantasma. G. Dissolução nuclear. H. Núcleo vacuolado. I-J. Brotos nucleares. K. Ponte nucleoplasmática. L. Núcleo entalhado. M-N. Núcleos com formato alongado. O. Núcleo lobado. P. Micronúcleo.

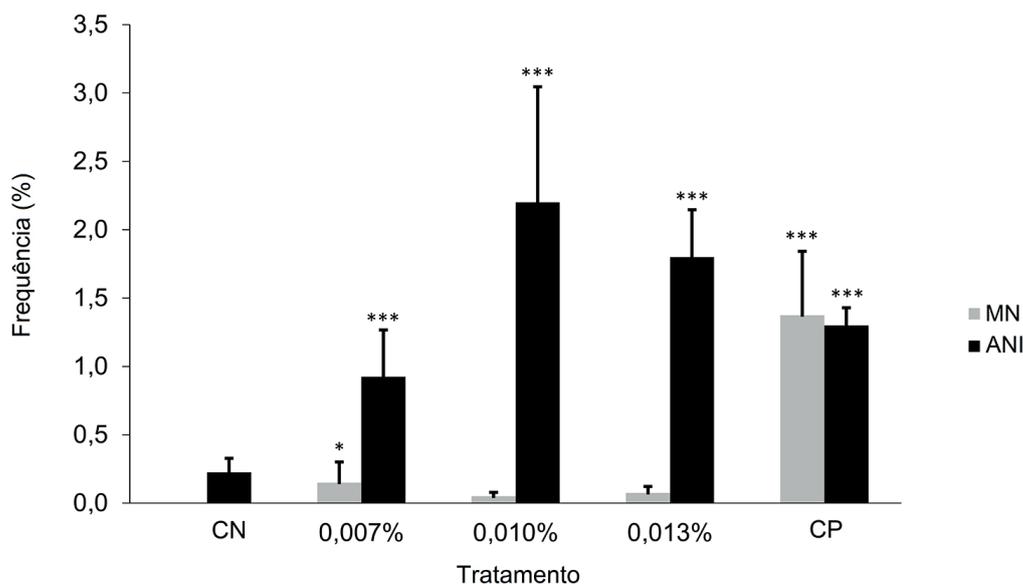


Figura 2. Frequências médias de micronúcleos (MN) e de anomalias nucleares interfásicas (ANI) em células radiculares de *A. cepa* expostas a soluções de diferentes concentrações de light stick (LS). Barra vertical: erro-padrão. Tratamentos: soluções de LS nas concentrações 0,007%, 0,010% e 0,013%, controle negativo (CN) e controle positivo (CP). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (comparado ao controle negativo).

fantasmas, que mantêm os contornos celulares mesmo sofrendo cariólise, são associadas à morte celular provocada por contaminantes ambientais (Çelik & Aslantürk 2010, Nefic *et al.* 2013). Ruptura celular com remoção de núcleo periférico (Fig. 1D) também leva à formação de células fantasmas.

Extrusão de material nuclear também é evidência de morte celular. O material extrudado observado nas células analisadas no presente estudo (Fig. 1G) apresenta a mesma coloração do núcleo celular, e, portanto, provavelmente corresponde a cromatina. Campos & Vicini (2003) também observaram a extrusão de cromatina em células de *A. cepa* contaminadas com alumínio, um fenômeno denominado dissolução nuclear. A presença de núcleos vacuolados (Fig. 1H) parece estar associada a um fenômeno similar, chamado extrusão nucleolar. Esse fenômeno foi igualmente observado em células de *A. cepa* e de *A. sativum* expostas à contaminação por alumínio e cobre (Fiskesjö 1983, Liu *et al.* 2009) e também em outros sistemas-teste vegetais (Zhang *et al.* 2009, Zhang *et al.* 2014). Tanto a dissolução nuclear quanto a nucleolar estão relacionadas à morte celular (Campos & Vicini 2003), e têm sido associadas a um efeito inibitório da síntese de DNA durante a fase S da intérfase (Şutan *et al.* 2014).

A morte de células expostas a contaminantes químicos também pode ser decorrente de estresse oxidativo, um fenômeno que resulta da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Matringe *et al.* 1992). Já se sabe, por exemplo, que em células radiculares de *A. cepa*, alguns pesticidas induzem a produção de EROs que provocam peroxidação de biomoléculas tais como proteínas e lipídios de membrana, provocando, com isso, a

ruptura seguida de morte celular (Bianchi *et al.* 2016). Um fenômeno similar foi relatado por Oliveira *et al.* (2014) em células humanas da linhagem HepG2 expostas a soluções de LS.

A presença de ftalatos no conteúdo dos LS é outro fator que pode provocar morte celular. A citotoxicidade do di-n-butilftalato, por exemplo, foi observada em células humanas mantidas em meio de cultura (Mankidy *et al.* 2013). Esse mesmo composto parece promover uma interrupção do ciclo celular no período G1 e inibir a expressão de genes que controlam vias apoptóticas (Craig *et al.* 2013).

A redução no índice mitótico é também associada com a inibição da síntese de DNA, o que impediria a célula de entrar em mitose (Çelik & Aslantürk 2010, Kumar & Pandey 2015). Essa inibição pode resultar da ação direta do contaminante na síntese do DNA (Campos & Vicini 2003), ou indiretamente pela redução da síntese de ATP (Kumar & Pandey 2015, Obute *et al.* 2016). Considerando que o conteúdo dos LS interfere na cadeia respiratória (Oliveira *et al.* 2014), é possível que essa inibição indireta da síntese de DNA também seja um dos efeitos celulares do conteúdo químico presente nos LS.

A frequência elevada de micronúcleos e de alterações nucleares interfásicas registradas no presente estudo sugerem efeito genotóxico da mistura química presente nos LS. Oliveira *et al.* (2014) já haviam sugerido a ocorrência desse tipo de efeito em células humanas mantidas em meio de cultura, possivelmente resultante da presença no conteúdo dos LS, de substâncias como 2,4,6-triclorofenol, formado pela reação entre TCPO e peróxido de hidrogênio. A essa mesma substância já foi também atribuída a formação de aberrações cromos-

sômicas e micronúcleos em outros estudos (Jansson & Jansson 1992, Liu *et al.* 2013), e uma das possíveis causas dessas alterações é a formação de adutos de DNA (Fenech *et al.* 2011).

É importante frisar que a frequência de MN contabilizada nos resultados do presente estudo teve significância estatística apenas na solução de menor concentração de LS. O mesmo tipo de resultado foi obtido por outros autores em células de *Allium cepa* expostas a diferentes contaminantes (Roa *et al.* 2012, Bianchi *et al.* 2016). Esse fenômeno pode ocorrer em algumas condições de estresse oxidativo, quando elevadas concentrações do contaminante induz as células a produzirem grandes quantidade de enzimas antioxidantes, as quais seriam responsáveis por reduzir a ocorrência de danos genotóxicos responsáveis pela formação de MN (Bianchi *et al.* 2016). Outra possível explicação para esse fenômeno talvez seja a ocorrência de um efeito citotóxico mais intenso nessas células, o que reduziria a frequência de mitoses nas raízes. A formação de MN depende da ocorrência de divisão celular nas células parentais expostas ao contaminante, uma vez que, após a divisão celular, fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não tenham se ligado aos fusos durante a segregação mitótica são empacotados em micronúcleos nas células-filhas (Leme & Marin-Morales 2009).

A elevada porcentagem de alterações nucleares interfásicas (ANI) nas células expostas às diversas concentrações de LS excederam inclusive os valores registrados para o controle positivo. Assim como no caso dos MN, a ocorrência de certas anomalias em núcleos interfásicos resulta da exposição a agentes genotóxicos (Çavaş & Ergene-Gözükara 2005). Essa porcentagem elevada de ANI é também compatível com efeitos induzidos por estresse oxidativo. Ohshima (2008) observou que fibroblastos humanos expostos a peróxido de hidrogênio apresentam redução no ritmo de divisões celulares e aumento na quantidade de aberrações morfológicas do núcleo interfásico, algumas delas associadas à poliploidia. Vale destacar que o peróxido de hidrogênio é uma das substâncias encontradas na mistura química presente no interior dos LS.

A poliploidia é uma condição que pode originar brotos nucleares (Figs. 1I e 1J), uma vez que, nessa situação, o material genético excessivo eventualmente resultante da ação do agente contaminante no ciclo celular tende a ser eliminado do núcleo (Leme & Marin-Morales 2008). Outras deformações nucleares, tais como núcleos entalhados (Fig. 1L), têm sido associadas à ocorrência de aneuploidias (Carrasco *et al.* 1990). A ocorrência de núcleos lobados (Fig. 1O), por sua vez, sugere morte celular (Leme & Marin-Morales 2008). A presença de células binucleadas, de outro modo, pode indicar supressão da origem do fragmoplasto durante a telófase de células vegetais, o que levaria à ausência de formação da placa celular (Oyedare *et al.* 2009).

A presença de pontes nucleoplasmáticas nas células analisadas (Fig. 1K) é uma consequência de pontes

cromossômicas formadas durante a anáfase, quando os centrômeros de um cromossomo dicêntrico são puxados para polos opostos durante a mitose (Fenech *et al.* 2011), como parte de um fenômeno chamado ciclo de quebra-fusão-ponte (QFP). Quando as pontes são quebradas, uma das células-filhas recebe um cromossomo com uma cópia extra de certos genes que estarão ausentes na outra célula-filha. Os cromossomos quebrados não apresentam telômero em uma de suas extremidades, o que levará à fusão das cromátides-irmãs nessa extremidade após a síntese de DNA, originando, assim, um novo ciclo QFP. A perpetuação desse ciclo por várias gerações de células-filhas resultará, em longo prazo, na amplificação de genes localizados próximos ao ponto de fusão cromossômica. Por meio de mecanismos de recombinação, esses genes amplificados seriam eliminados do núcleo celular, o que seria uma das explicações para a origem de brotos nucleares e MN (Fenech *et al.* 2011).

Nas células analisadas verificou-se a presença de várias delas contendo núcleos alongados, muitos deles com formato curvo (Figs. 1M e 1N). Esse tipo de anomalia também foi registrado por outros autores em células radiculares de *A. cepa* expostas a extratos de taboa (Gallardo-Williams *et al.* 2002) ou tratadas com cafeína e hidroxireia (Zabka *et al.* 2010). Nesse último caso, os autores afirmam que o tratamento induz a formação de células multinucleadas alongadas, uma vez que a cafeína inibiria a formação da placa celular e a hidroxireia interromperia a replicação do DNA e aumentaria o comprimento celular.

Micronúcleos e deformações morfológicas nucleares sugerem instabilidade cromossômica, responsável pela alteração na dosagem de certos genes, o que resultaria em sérias consequências negativas para as células (Fenech *et al.* 2011). Nesse sentido, os resultados do presente estudo reforçam a existência de riscos associados à manipulação incorreta de LS. Embora os bioensaios relatados no presente estudo tenham empregado um sistema-teste vegetal, os registros aqui descritos são condizentes com conclusões prévias, apresentadas por Oliveira *et al.* (2014) em estudo realizado com células humanas em meio de cultura, de que o conteúdo dos LS tem potencial citotóxico e genotóxico. Obviamente, os achados do presente trabalho requerem análises futuras mais aprofundadas, mas, somados aos achados anteriores, apontam para a necessidade de atenção, por parte de autoridades sanitárias, aos potenciais efeitos lesivos resultantes da aplicação de tais substâncias sobre a pele por parte de pessoas desinformadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Ana Paula de Melo Loureiro, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por ter gentilmente cedido as misturas químicas usadas nos bioensaios do presente estudo.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, M.M.S., FILHO, A.M., NASCIMENTO, I.A. & PEREIRA, P.A.P. 2015. Lightsticks content toxicity: Effects of the water soluble fraction on the oyster embryonic development. *Chemosphere*, 139: 73-80. <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.05.058>>
- BECHARA, E.J.H., LOUREIRO, A.P.M., SILVA, A.L.M., BAGATTINI, R., STEVANI, C.V., CAMPOS, I. P. A., BARRETO, F.P. 2009. Atratores luminosos: poluição na costa brasileira. *Ciência Hoje*, 43(257): 42-48.
- BEZERRA, C.M., DINELLY, C.M.N. & OLIVEIRA, M.A.S. 2016. Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de malva-santa *Plectranthus barbatus* (Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Journal of Pharmacy*, 13(3): 220-228.
- BIANCHI, J., FERNANDES, T.C.C. & MARIN-MORALES, M.A. 2016. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. *Chemosphere*, 144: 475-483. <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.021>>
- CAMPOS, J.M.S. & VICCINI, L.F. 2003. Cytotoxicity of aluminum on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. *Caryologia*, 56(1): 65-73. <<https://doi.org/10.1080/00087114.2003.10589309>>
- CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L. & MYERS, M.S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 47(11): 2123-2136. <<https://doi.org/10.1139/f90-237>>
- ÇAVALAS, T. & ERGENE-GÖZÜKARA, S. 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology*, 74(3): 264-271. <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>>
- ÇELİK, T.A. & ASLANTÜRK, O.S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 189252. <<https://doi.org/10.1155/2010/189252>>
- CÉSAR-RIBEIRO, C. & PALANCH-HANS, M.F. 2010. Chronic toxicity test with sea urchin *Echinometra lucunter* and *Lytechinus variegatus* (Echinodermata: Echinoidea), exposed to light-stick-flag paternoster used for longline surface fishing. *Braz. J. Oceanog.*, 58(3): 71-75. <<https://doi.org/10.1590/S1679-87592010000700009>>
- CRAIG, Z.R., HANNON, P.R., WANG, W., ZIV-GAL, A. & FLAWS, J.A. 2013. Di-n-butyl phthalate disrupts the expression of genes involved in cell cycle and apoptotic pathways in mouse ovarian antral follicles. *Biology of Reproduction*, 88(1): 1-10. <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105122>>
- EVANDRI, M.G., TUCCI, P. & BOLLE, P. 2000. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. *Food Additives and Contaminants*, 17(12): 1037-1045. <<https://doi.org/10.1080/02652030010014411>>
- FACHINETTO, J.M., BAGATTINI, D., DURIGON, J., DA SILVA, A.C.F. & TEDESCO, S.B. 2007. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1): 49-54.
- FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A.T., SURRALLS, J., CROTT, J.W., PARRY, J., NORPPA, H., EASTMOND, D.A., TUCKER, J.D. & THOMAS, P. 2011. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1): 125-132. <<https://doi.org/10.1093/mutage/geq052>>
- FISKESJÖ, G. 1983. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of *Allium*. *Physiologia Plantarum*, 59: 508-511. <<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb04238.x>>
- FISKESJÖ, G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102(1), 99-112. <<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471>>
- GALLARDO-WILLIAMS, M.T., BARTON, R.L., DOORIS, P.M. & MARTIN, D.F. 2002. Inhibition of onion germination and root growth by cattail extracts involves reduced cell proliferation and disruption of cell wall integrity. *J. Aquat. Plant Manage.*, 40: 105-109.
- HOFFMAN, R.J., NELSON, L.S. & HOFFMAN, R.S. 2002. Pediatric and young adult exposure to chemiluminescent glow sticks. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 156(9): 901-904. <<https://doi.org/10.1001/archpedi.156.9.901>>
- IVAR DO SUL, J. A. 2005. *Lixo marinho na área de desova de tartarugas marinhas do litoral norte da Bahia: consequências para o meio ambiente e moradores locais*. 53 f. Monografia (Graduação em Oceanologia) – Departamento de Oceanografia. Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, 2005.
- IVAR DO SUL, J.A., RODRIGUES, O., SANTOS, I.R., FILLMANN, G. & MATTHIENSEN, A. 2009. Skin irritation and histopathologic alterations in rats exposed to lightstick contents, UV radiation and seawater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(7): 2020-2024. <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.05.006>>
- JANSSON, K. & JANSSON, V. 1992. Genotoxicity of 2,4,6-trichlorophenol in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 280(3): 175-179. <[https://doi.org/10.1016/0165-1218\(92\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0165-1218(92)90046-3)>
- KUMAR, G. & PANDEY, A. 2015. Genotoxic and mito-depressive effects of food preservatives on root meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Chromosome Botany*, 10(2): 51-60. <<https://doi.org/10.3199/iscb.10.51>>
- LEME, D.M. & MARIN-MORALES, M.A. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. *Mutation Research*, 650(1): 80-86. <<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>>
- LEME, D.M. & MARIN-MORALES, M.A. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, 682(1): 71-81. <<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002>>
- LIU, D., JIANG, W., MENG, Q., ZOU, J., GU, J. & ZENG, M. 2009. Cytogenetical and ultrastructural effects of copper on root meristem cells of *Allium sativum* L. *Biocell*, 33(1): 25-32.
- LIU, N.N., MA, M., XU, Y., ZHA, J., RAO, K. & WANG, Z. 2013. Susceptibility of male and female Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to 2,4,6-trichlorophenol-induced micronuclei in peripheral erythrocytes. *Front. Environ. Sci. Eng.*, 7: 77-84. <<https://doi.org/10.1007/s11783-012-0466-z>>
- MANKIDY, R., WISEMAN, S., MA, H. & GIESY, J. P. 2013. Biological impact of phthalates. *Toxicology Letters*, 217(1): 50-58. <<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.11.025>>
- MATRINCE, M., MORNET, R. & SCALLA, R. 1992. Characterization of (3H) acifluorfen binding to purified pea etioplasts, and evidence that protoporphyrinogen oxidase specifically binds acifluorfen. *European Journal of Biochemistry*, 209(3): 861-868. <<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17358.x>>
- NEFIC, H., MUSANOVIC, J., METOVIC, A. & KURTESHI, K. 2013. Chromosomal and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* L. induced by alprazolam. *Medical Archives*, 67(6): 388-392. <<https://doi.org/10.5455/medarh.2013.67.388-392>>
- NIELSEN, M.H. & RANK, J. 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, 121(3): 249-254. <<https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1994.00249.x>>
- OBUTE, G.C., EKEKE, C. & IZUKA, D.C. 2016. Genotoxicity assessment of refined petroleum products and popular local soft drink (Zobo) in daily use in Nigeria. *Research Journal of Mutagenesis*, 6(1): 22-30. <<https://doi.org/10.3923/rjmutag.2016.22.30>>
- OLIVEIRA, L.M., VOLTOLINI, J.C. & BARBÉRIO, A. 2011. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. *Ambi-Agua*, 6(1): 90-103. <<http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.176>>
- OLIVEIRA, T.F., SILVA, A.L.M., MOURA, R.A., BAGATTINI, R., OLIVEIRA, A.A.F. & MEDEIROS, M.H. G. 2014. Luminescent threat: toxicity of light stick attractors used in pelagic fishery. *Scientific Reports*, 4: 5359. <<https://doi.org/10.1038/srep05359>>

- OSHIMA, S. 2008. Abnormal mitosis in hypertetraploid cells causes aberrant nuclear morphology in association with H₂O₂-induced premature senescence. *Cytometry A*, 73(9): 808-815. <<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20604>>
- OYEDARE, B.M., BAKARE, A.A. & AKINBORO, A. 2009. Genotoxicity assessment of water extracts of *Ocimum gratissimum*, *Morinda lucida* and *Citrus medica* using the *Allium cepa* assay. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.*, 8(2): 97-103.
- PINHO, G.L.L., IHARA, P.M. & FILLMANN, G. 2009. Does lightstick content pose any threat to marine organisms? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 27: 155-157. <<https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.08.001>>
- ROA, O., YEBER, M.C. & VENEGAS, W. 2012. Genotoxicity and toxicity evaluations of ECF cellulose bleaching effluents using the *Allium cepa* L. test. *Brazilian Journal of Biology*, 72(3): 471-477. <<https://doi.org/10.1590/S1519-69842012000300009>>
- STURBELLE, R.T., PINHO, D.S., RESTANI, R.G., OLIVEIRA, G.R., GARCIA, G.L., MARTINO-ROTH, M.G. 2010. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica de *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, 20(3): 409-415.
- ŞUTAN, N.A., POPESCU, A., MIHAESCU, C., SOARE, L.C. & MARINESCU, M.V. 2014. Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide Ridomil in *Allium cepa* L. *An. Stiint. Univ. Al. I. Cuza Iasi Sect. II a. Biol. veget.*, 60(1): 5-12.
- TÜRKOĞLU, Ş. 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 626(1-2): 4-14. <<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.07.006>>
- WANG, Q.L., ZHANG, L.T., ZOU, J.H., LIU, D.H. & YUE, J.Y. 2014. Effects of cadmium on root growth, cell division and micronuclei formation in root tip cells of *Allium cepa* var. *agrogarum* L. *Phyton*, 83(2): 291-298.
- ZABKA, A., POLIT, J.T. & MASZEWSKI, J. 2010. Inter- and intra-chromosomal asynchrony of cell division cycle events in root meristem cells of *Allium cepa*: possible connection with gradient of cyclin B-like proteins. *Plant Cell Reports*, 29(8): 845-856. <<https://doi.org/10.1007/s00299-010-0869-x>>
- ZHANG, H., JIANG, Z., QIN, R., ZHANG, H., ZOU, J., JIANG, W. & LIU, D. 2014. Accumulation and cellular toxicity of aluminum in seedling of *Pinus massoniana*. *BMC Plant Biology*, 14: 264. <<https://doi.org/10.1186/s12870-014-0264-9>>
- ZHANG, H.M., ZHANG, S.S., MENG, Q.M., ZOU, J., JIANG, W.S. & LIU, D.H. 2009. Effects of aluminum on nucleoli in root tip cells, root growth and the antioxidant defense system in *Vicia faba* L. *Acta Biol. Cracov. Ser. Bot.*, 51(2): 99-106.