

Citogenotoxicidade e mutagenicidade do sulfato de cobre em diferentes variedades de *allium cepa* linn

Cytogenotoxicity and mutagenicity of copper sulphate in different varieties of *allium cea* linn

DOI:10.34117/bjdv7n9-131

Recebimento dos originais: 07/08/2021

Aceitação para publicação: 09/09/2021

Júlio Brando Messias

Doutor - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas, Recife – PE
E-mail: julio.messias@upe.br

Rosanne Lopes de Brito

Mestre - Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco – Recife - PE
EREM Des. Antônio da Silva Guimarães
Secretaria de Educação Pernambuco Cabo de Santo Agostinho – PE
E-mail: rosannelopes@hotmail.com

Gerusa Tomaz de Aquino Beltrão

Mestre - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas - Recife - PE
E-mail: gerusa.aquino@upe.br

Inalda Maria de Oliveira Messias

Mestre - Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina, Petrolina - PE
E-mail: inalda.messias@upe.br

Mônica Simões Florêncio

Doutora - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas - Recife - PE
E-mail: monica.simoes@upe.br

Betty Rose de Araújo Luz

Doutora - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas - Recife - PE
E-mail: betty.luz@upe.br

Sura Wanessa Nogueira Santos Rocha

Doutora - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas - Recife - PE
E-mail: sura.rocha@upe.br

João Ferreira da Silva Filho

Doutor - Universidade de Pernambuco - Campus Santo Amaro
Instituto de Ciências Biológicas - Recife - PE
E-mail: joao.filho@upe.br

RESUMO

O sistema *Allium cepa* Linn. é utilizado na avaliação dos efeitos deletérios aos cromossomos. O objetivo desse estudo foi analisar o efeito citogenotóxico e mutagênico do sulfato de cobre nas variedades de cebola, Red creole, White creole e Texas early. As sementes foram colocadas para germinar em placas de Petri em água destilada (controle) e sulfato de cobre 0,006 g/L (tratado). Após a germinação procedeu-se a coleta do meristema radicular com fixação em Carnoy. Foram contadas 5000 células por grupo. A citogenotoxicidade foi avaliada pelo cálculo do índice mitótico e a avaliação mutagênica pelas alterações cromossômicas (micronúcleos, brotos, perdas e quebras cromossômicas). Diferenças significativas foram registradas no grupo controle entre as variedades Red creole e Texas early e entre as variedades Texas early e White creole. As variedades analisadas sofreram de forma significativa a ação agressiva do sulfato de cobre, que agiu de forma diferenciada entre as variedades analisadas. Pode-se concluir que a variedade Red creole demonstrou ser a mais resistente enquanto a White creole e a Texas early as mais sensíveis. Os resultados devem ser avaliados com cautela uma vez que podem implicar, dependendo da variedade escolhida, em respostas tendenciosas para refutar ou confirmar uma ação de um suposto agente estudado.

Palavras-chave: Citologia, genética, toxicidade, cebola, sulfato cúprico.

Abstract

The *Allium cepa* Linn. system is used to evaluate deleterious effects on chromosomes. The objective of this study was to analyze the cytogenotoxic and mutagenic effect of copper sulphate in onion, Red creole, White creole and Texas early varieties. The seeds were placed to germinate in Petri dishes in distilled water (control) and copper sulphate 0.006 g / L (treated). After the germination, the root meristem was collected with Carnoy fixation. 5000 cells were counted per group. The cytotoxotoxicity was evaluated by calculating the mitotic index and the mutagenic evaluation by the chromosomal alterations (micronuclei, sprouts, losses and chromosomal breaks). Significant differences were recorded in the control group between the varieties Red creole and Texas early and between the varieties Texas early and White creole. The analyzed varieties suffered significantly the aggressive action of copper sulphate, that had different action among the varieties analyzed. It can be concluded that the variety Red creole proved to be the most resistant while White creole and Texas early the most sensitive. The results should be evaluated with caution since they may imply, depending on the variety chosen, tendentious answers to refute or confirm an action of a supposed agent studied.

Key-words: Cytology, genetics, toxicity, onion, cupric sulfate.

1 INTRODUÇÃO

Existem inúmeros estudos com *A. cepa* L. que utilizam o sulfato de cobre ou cúprico (SO_4Cu) como controle positivo para bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade (LIMA et al., 2013; MACEDO et al., 2014; MITTEREGGER-JÚNIOR et al., 2006; PRÁ et al., 2006; SOUSA et al., 2014). Isso se deve ao fato de o sulfato de cobre ser um composto químico constantemente utilizado como fungicida, representando

um importante agente de danos ambientais com potencial carcinogênico (PRÁ et al., 2006; TEISSEIRE et al., 1998).

O sulfato de cobre na forma pentaidratada ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), é de grande aplicabilidade na aquicultura para controle de parasitoses e em enfermidades bacteriana, bem como de algas macrófitas aquáticas (ARAUCO et al., 2005). Além disso, o cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância relevante (PRÁ et al., 2006; TEISSEIRE et al., 1998).

O sulfato de cobre ou cúprico (SO_4Cu) é comumente empregado como fungicida ou incorporado a fertilizantes em plantações agrícolas, também compõe a nutrição humana seja presente nos alimentos, ou na forma de suplementação ou aditivo alimentar (PRÁ et al., 2006; TEISSEIRE et al., 1998). Aguiar (2012) relata que há registros da utilização desse composto para conservação de madeiras destinadas a construção, além de ser componente de tinturarias ou integrando produtos intermediários industriais. Também está presente como mordente em banhos fotográficos, eletrólito das pilhas e produtos destinados a pirotecnia.

Quando pentahidratados ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), adquire a coloração azulada e por isso conhecido como vítreo azul, esse destinado a função de agrotóxico na aquicultura em decorrência de sua eficácia no combate de patogenias peculiares da piscicultura, desde origem bacteriana, a parasitas, moluscicida até o combate a proliferação de algas macrófitas, estas dificultam a eficiência do processo de fotossíntese reduzindo significativamente os níveis de oxigênio biodisponível na água (ARAUCO et al., 2005; SAMPAIO, 2013).

Como o cobre é comumente encontrado em diversos compartimentos dos ecossistemas, sendo um poluente de importância significativa, além de algicida, bactericida e herbicida deve-se possuir cautela na aplicação do sulfato de cobre. Pois, a dosagem equivocada pode acarretar sérios danos toxicológicos aos peixes, esses ocasionados pela formação de íons cúpricos (Cu^{+2}) ao ser dissolvido em água com níveis mínimos de alcalinidade (PRÁ et al., 2006; TEISSEIRE et al., 1998). Dentre os danos relatados ocorre a produção excessiva de muco nas brânquias dificultando a absorção de oxigênio, além de afetar significativamente o sistema imunológicos dos animais e danificar o sistema nervoso dos mesmos, podendo ocasionar a morte dos peixes (SAMPAIO, 2013).

O artigo 34, § 5º da resolução CONAMA (nº 397/2008) estabelece a concentração máxima de até 0,001 g/L de sulfato cobre para lançamentos de efluentes, além desse valor poderá agir toxicamente nos animais aquáticos (BRASIL, 2008).

A preocupação com a concentração de sulfato de cobre nos mananciais já existe a muitos anos como citado nas pesquisas de Mello e Vidal (1978), e de Arauco e Machado (2005), ao demonstrarem que se configurava necessário estabelecer análises da atuação dessa molécula em ambientes dulcícolas associado ao tempo residual em peixe cultivados; uma vez que já se tornava evidente que afetava a estrutura naturais dos ecossistemas aquáticos, desencadeando danos que inviabiliza o consumo humano e animal dessas águas (GUERRA, 2008; LEBRE, 2005).

Quanto a importância medicinal e farmacológica, alguns reagentes químicos são sintetizados a base de sulfato de cobre, tais como a solução de Feulgen e de Benedict empregada na análise química para detecção de açúcares redutores e o reagente de biureto na avaliação proteica. Também é possível constatar anemia utilizando o sulfato de cobre estabelecendo a densidade desse agente químico e comparando com a das hemoglobinas (FISKEJO, 1984; MELO; VIDAL, 1978; GUERRA, 2008; NASCIMENTO et al., 2014).

A respeito dos danos originários do uso indevido do sulfato de cobre, remete as substâncias serem classificadas como metais tais como ferro, cobre e cromo agem no ciclo redox convertendo-se em moléculas reativas de oxigênio, conseqüentemente ocorre a peroxidação de lipídios provocando danos no DNA e interferindo na homeostasia de diversos minerais essenciais a manutenção fisiológica do organismo, dificultando a correta manutenção da molécula de DNA (CHASIN; AZEVEDO, 2003; SILVA et al., 2011).

O presente trabalho tem por objetivo verificar se diferentes variedades de *Allium cepa* L. respondem de forma semelhante a ação de um mesmo agente agressor.

2 METODOLOGIA

2.1 SULFATO DE COBRE

Neste estudo foi utilizado o sulfato de cobre na concentração de 0,006g/L. Considerou-se a escolha desse agente químico, por ser um composto com potencial bioacumulativo em ecossistemas aquáticos, prejudicando a biodiversidade limnótica e podendo acarretar danos à fisiologia humana em decorrência da bioacumulação nos níveis tróficos, além de ser utilizado em vários estudos como controle positivo de bioensaios de citogenotoxicidade e mutagenicidade utilizando o sistema *Allium cepa* L.

2.2 LOCAL DE REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Técnicas Histológicas e Embriológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Pernambuco – ICB/UPE.

2.3 SEMENTES UTILIZADAS

Para realizar a comparação da ação citogenotóxica e mutagênica do sulfato de cobre foram escolhidas as variedades de sementes *Allium cepa* L. Texas Early (Lote: 502476964 52), White Creole (Lote: 4023452) e Red Creole (Lote: 4059052).

2.4 ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

As sementes do grupo 01 (controle negativo) ficaram em uma placa de petri com papel filtro embebido em água destilada; enquanto as sementes do grupo 02, foram colocadas para germinar em uma solução com sulfato de cobre (0,006 g/L), e subdividido em três grupos de acordo com a variedade de cebola. Grupo 02.a: Variedade Red Creole; Grupo 02.b: Variedade White Creole; e Grupo 02.c: Variedade Texas Early.

Todas as placas (controle e tratado) receberam 40 sementes, para cada variedade estudada.

2.5 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Após germinação procedeu-se o esmagamento dos meristemas radiculares segundo a metodologia de Guerra e Souza (2002).

Inicialmente coletou-se as raízes, fixando-as em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), por 24 horas e posteriormente armazenadas em álcool 70% sob refrigeração até a preparação a seguir: três banhos em água destilada (para remover resíduos do Carnoy e do álcool); hidrólise com ácido clorídrico (HCl) 5N, durante 20 minutos, em temperatura ambiente; lavagem em água destilada (para eliminação do HCl); maceração das células meristemáticas entre lamina e lamínula, após a adição de uma gota de ácido acético 45% (espalhamento das células); remoção da lamínula em gelo seco.

2.6 COLORAÇÃO DO MATERIAL

Após remoção da lamínula e secagem da lâmina foi realizado a coloração em uma solução de Giemsa a 2%, por 20 minutos, conforme procedimento descrito por Guerra e

Souza (2002). Após a coloração e secagem foi feita a montagem definitiva, adicionando-se uma gota de Entelan entre lâmina e lamínula para selagem do material.

Por fim, material foi observado em microscópio óptico utilizando a lente objetiva de 40x e ocular de 10x configurando uma ampliação de 400 vezes (FISKEJO, 1984; GRANT, 1982; MELLO et al., 2004).

2.7 ANÁLISES DAS IRREGULARIDADES CELULARES NOS ENSAIOS COM ALLIUM CEPA L

Foram confeccionadas 10 lâminas para cada ensaio realizado. Em cada lâmina foram analisadas, 500 células, totalizando 5000 para cada tratamento. Foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células de todas as lâminas para cada tratamento.

2.8 EFEITOS CITOGENOTÓXICOS E MUTAGÊNICOS

A análise genotóxica e mutagênica foi realizada através da presença de ponte (PT); perdas (PE); micronúcleos (MN); brotos (B) e quebras (Q).

A análise citotóxica foi feita pelo índice mitótico (IM), que consiste no número de células em mitose dividido pelo total de células meristemáticas contadas.

2.9 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Todas as análises foram realizadas através do teste t Student, com significância de 5%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados evidenciados na Tabela 1, houve diferenças estatísticas entre todos os grupos tratados em comparação com o controle, evidenciando a ação tóxica do sulfato de cobre, como era esperado, uma vez que este é um agente utilizado como controle positivo nos testes de citogenotoxicidade (CAMPOS; OLIVEIRA; SCHEVEITZE, 2017; GUECHEVA, 2002; KNAPIK; MORGANA, 2013).

Para Costa (2016) o acúmulo lento dos contaminantes nos tecidos ao longo do tempo podem desenvolver características de toxicidade subletal até alcançar níveis danosos para o organismo. Nossos resultados comprovaram o efeito citogenotóxico do Sulfato de cobre através do bioensaio utilizando-se A. cepa L. expresso, aqui, como micronúcleo, broto, quebra, ponte e perda. As incidências de pontes e quebras tem

correlação com efeitos clastogênicos, enquanto as perdas remetem a aneugênese (ALBERTINI et al., 2000).

Segundo Fenech (2000) uma das consequências da exposição a agentes genotóxicos é a indução de aberrações cromossômicas (AC), dentre as aberrações está a ocorrência de aneuploidias, que podem levar a formação de micronúcleos (MN). Para Leme e Marin-Morales (2009), os micronúcleos (MNs) têm sido considerados como o mais efetivo e simples fator para analisar efeitos mutagênicos, isso devido ao fato dos MNs resultarem de danos nas células parentais, sendo facilmente observados em células filhas.

Tabela 1. Distribuição das atividades mutagênicas e genotóxicas observadas em células meristemáticas das variedades Red creole (RC), White creole (WC) e Texas early (TE) de *Allium cepa* L., expostas a mesma concentração de sulfato de cobre*, em comparação ao controle

Ensaio	Grupo Tratado (Sulfato de Cobre)			Grupo Controle (H ₂ O)		
	Red Creole	White Creola	Texas Early	Red Creole	White Creole	Texas Early
Micronúcleos	3,6 ± 3,78 _a	13 ± 10,16 _b	4,7 ± 5,93 _c	0,4 ± 0,84 _a	0,1 ± 0,32 _b	0 _c
Broto	0,7 ± 0,67 _d	1,7 ± 1,34 _e	1,7 ± 1,95 _f	0 _{f d}	0 _e	0 _f
Quebra	0,5 ± 0,53 _g	1,3 ± 1,25 _h	0,1 ± 0,32 _i	0,1 ± 0,32 _g	0,1 ± 0,32 _h	0 _i
Ponte	2,5 ± 2,5 _j	2,0 ± 1,7 _k	2,3 ± 1,49 _l	1,1 ± 1,2 _{j, m, n}	0,1 ± 0,32 _{k, m}	0,1 ± 0,32 _{l, n}
Perda	0,9 ± 0,57 _o	0,9 ± 1,10 _p	1,2 ± 1,23 _q	0,2 ± 0,42 _o	0,1 ± 0,32 _p	0,1 ± 0,32 _q

*(0,001 g/L). Teste t Student. Letras iguais na mesma linha apresentam diferenças estatísticas, a, d, h = p < 0,001; l = p < 0,01; b, c, e, f, g, i, j, m, n, o, p, q = p < 0,05.

Conceituando, os MNs originam-se de cromossomos inteiros ou partes fragmentadas durante o processo de divisão celular anormais. Sendo evidenciado após a reconstituição da carioteca que se dar ao redor do material nuclear principal; evidenciando a falha do processo mitótico através do dano estrutural e/ou numérico pela perda da cromatina (FENECH, 1997).

Segundo Aurora et al. (1969) e Fenech (1997), tende-se a reduzir a quantidade de MNs nas regiões meristemáticas classificadas como F1 (região mais externa do ápice radicular), havendo maior incidência nos níveis de F2, afetando o ciclo de divisão já que a geração F1 é derivada da F2, essa com tais alterações não consegue dar prosseguimento ao processo mitótico ou meiótico acarretando na tendência a degenerar-se.

Corroborando Krishna e Hayashi (2000) menciona que a síntese de MN advém de quebras cromossômicas por clastogênese ou devido a disfunção da mitose por aneugênese; como no fuso que leva a aneuploidia na fase de divisão celular seguinte, em geral, a anáfase, perdendo-se cromossomos e gerando MNs, sendo facilmente visualizados no citoplasma depois da telófase (KRISHNA; HAYASHI, 2000; BONASSI et al., 2006; SAMANTA; DEY, 2012; CIMINI et al., 2002).

Quanto ao grupo tratado com sulfato de cobre, não houve diferenças significativas, demonstrando que as variedades respondem de forma semelhante ao agente agressor. Porém, comparando-se as variedades do grupo controle, percebe-se distinções estatísticas concernente a incidência de pontes nas variedades Red creole com a White creole; bem como entre a Red creole com a Texas early.

Ao analisarmos o grupo tratado com o controle fica evidente a diferença entre os grupos, para todas as alterações cromossômicas evidenciadas, isso se deve a ação citogenotóxica comprovada do sulfato de cobre (CAMPOS; OLIVEIRA; SCHEVEITZE, 2017; GUECHEVA, 2002; KNAPIK; MORGANA, 2013).

Ao compararmos as variedades do grupo controle (Tabela 2) percebe-se que houve diferenças entre as variedades Red creole e Texas early e entre as variedades White creole e Texas early, sendo a diferença mais significativa entre as duas primeiras, isso se justifica porque existe diferenças entre as variedades que são inerentes as características as quais foram destinadas porque respondem de forma diferente as especificidades das situações de cultivo como condições climáticas, edáficas, patogênicas, manejo agrônomo, entre outras.

Vários autores têm concordado que os níveis de citotoxicidade podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do índice mitótico (IM) (AKINBORO; BAKARE 2007; CHUKWUJEKWU; VAN STADEN, 2014). Todos concordam que a citotoxicidade é prejudicial à célula podendo conduzir a uma proliferação desordenada sendo essas alterações decorrentes da ação química no crescimento e desenvolvimento de organismos expostos a determinados compostos químicos. Segundo Grant (1978) concentrações elevadas desses compostos, pode interromper totalmente a divisão celular. Ainda segundo ele, esses compostos embora não necessariamente afetem o DNA diretamente, inibem a formação e função do fuso mitótico.

Em relação ao grupo tratado, não foram evidenciadas diferenças entre as variedades investigadas, contudo sabe-se que o Sulfato de cobre é um agente aneugênico e clastogênico (KRISHNA; HAYASHI, 2000; BONASSI et al., 2006; SAMANTA; DEY,

2012; CIMINI et al., 2002) e portanto, a similaridade quanto a suscetibilidade deste agente tóxico era um resultado esperado, contudo ao analisarmos os grupos tratados com o controle verifica-se como esperado que houve diferença entre os grupos, comprovando mais uma vez que o sulfato de cobre é um agente causador de danos celulares.

Tabela 2. Índice mitótico em células meristemáticas das variedades Red creole (RC), White creole (WC) e Texas early (TE) Allium cepa, expostas, a mesma concentração de sulfato de cobre*, em comparação ao controle

Variedade	Tratamento	
	Grupo Tratado (Sulfato de Cobre)	Grupo Controle (H ₂ O)
Red Creole	6,64 ± 4,9 ^a	9,18 ± 4,15 ^{a, d}
White Creole	4,18 ± 2,39 ^b	14,36 ± 8,88 ^{b, e}
Texas Early	4,98 ± 4,05 ^c	31,56 ± 14,04 ^{c, d, e}

*(0,001 g/L). Teste t Student. Letras iguais na mesma linha ou coluna apresentam diferenças estatísticas, a= p<0,05; b= p< 0,01; c= p< 0,001.

Todavia, ao comparar-se as Tabelas 1 e 2 referente à variedade Red creole identifica-se que a mesma apresenta uma maior resistência ao sulfato de cobre, uma vez que seu índice mitótico foi superior as outras duas variedades (Tabela 1) e a ocorrência de alterações citogenotóxicas foi menor (Tabela 2), possivelmente por ser a variedade Red creole menos suscetível ao sulfato de cobre, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativo.

Ainda analisando ambas tabelas, que a variedade Texas early expressa ser mais sensível a ação do sulfato de cobre, uma vez que dentre as variedades submetidas ao tratamento foi a que mais sofreu, afetando o índice mitótico com maior incidência de alterações citogenotóxicas.

Para Schneiderman et al. (1971), a redução do IM pode ser atribuída a inibição da síntese de DNA, devido ao bloqueio da fase G1 ou bloqueio em G2, evitando a entrada da célula em mitose ou ainda, segundo Mercykutty; Stephen (1980), pelo bloqueio da síntese de nucleoproteínas.

Kirsch-Volders (1984), substâncias com esses efeitos são menos documentadas do que mutágenos que interagem diretamente com o DNA o fato de que chamando a atenção para o fato de que o efeito na divisão celular é similar ao promovido pela colchicina, que promove a destruição dos microtúbulos do ciclo celular bem como, os

metais (e.g. chumbo, zinco, organomercuriais) podem inibir a síntese de microtúbulos e/ou destruir microtúbulos pré-formados, bem como agir sobre enzimas necessárias para um processo normal de divisão celular.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam que o sulfato de cobre apresenta potencial citogenotóxico atuando de forma diferenciada entre as variedades analisadas. Contudo, é imprescindível aprofundar os estudos nessa perspectiva almejando compreender melhor os níveis de suscetibilidade das variedades de *A. cepa L.*, além de averiguar se o diferencial de sensibilidade desempenhado seguirá um padrão independentemente das substâncias químicas aplicadas.

Portanto, a investigação da sensibilidade das variedades deve ser considerada a fim de estabelecer padrões de suscetibilidade no que se refere à avaliação dos efeitos tóxicos. Consequentemente, resultados positivos ou não encontrados em bioteste utilizando *Allium cepa* devem ser considerados com cautela, uma vez que dependendo da variedade escolhida, os resultados podem ser tendenciosos para refutar ou confirmar uma ação de um agente estudado. Portanto, o aprofundamento torna-se primordial almejando averiguar como essa multiplicidade pode afetar resultados de pesquisas que admitem a mesma metodologia em variedades distintas de *Allium cepa L.*

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. R. de. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulaas em *Paspalum notatum* Flügge. Dissertação. Santa Maria, RS: UFSM, 2014. 94p.
- AKINBORO, A. BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of ethnopharmacology*, v. 112. p. 470-475, 2007.
- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, v. 463, p.111–172, 2000.
- ANDRADE, V. M.; FREITAS, T. R. O.; SILVA, J. Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research*. n. 560, p. 57-67, 2004.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*. 135p. Dissertação (Mestrado em Farmácia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- ARAUCO, L. R. R.; CRUZ, C. da; MACHADO NETO, J.G. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 15, p. 55-64, 2005 jan./dez.
- BRASIL, M. M. A. Resolução CONAMA n. 397, 03 de abril de 2008. Brasília, DF: MMA, p. 68-69, 2008.
- CAMPOS, F. F. de. OLIVEIRA, L. P. de. SCHVEITZE, B. Tolerância do *Pinus teada* inoculado com fungos ectomicorrizicos (fECM), sob diferentes concentrações de cobre. *Revista brasileira de geografia física*, v.10. n. 2. p. 512-520. 2017.
- CHASIN, A. A. da M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. (Org.). *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: RiMa, p. 127-163, 2003.
- COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. In: COMBES, R.D. *Chemistry & Industry*, v. 24. p. 950-954, 1992.
- COSTA, M. H. P. da; SILVA, P. C. C.; ROCHA, C. A. M. da. Efeitos do cromo hexavalente sobre o crescimento de raízes e ciclo celular no meristema da ponta da raiz de *Allium cepa*. 2016. *Biota Amazônia*. Macapá, v. 6, n. 3. p. 40-44, 2016.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGRONÔMICA – Embrapa hostaliças. *Como plantar cebolas – cultivares*, 2019.

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

FISKEJO, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. *Hereditas*, v. 102. May, p. 99-112, 1984.

GUECHEVA, T. N. Avaliação do potencial tóxico e genotóxico do sulfato de cobre em planária: utilidade deste organismo para biomonitoramento ambiental. Tese. 2002. Porto Alegre, RS: UFRGS, 2002. 120p.

GUERRA, T. A. Cobre: deficiência e intoxicação. Seminário. 2008. Porto Alegre, RS:UFRGS, 2008, 8p, 2008.

SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. 132p.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A reporto f the U.S. environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res.*, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

KNAPIK, L. F. O.; MORGANA, A. Avaliação de toxicidade de três substâncias de referência ao microcrustáceo *Daphnia magna*, 69p. Monografia. 2013. Curitiba, PR: UTFPR, 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004. 289 p.

LEBRE, R.; RUIZ, V.; LEITÃO, S; SANTOS, R.; PORTO, A. Intoxicação aguda por sulfato de cobre. *Medicina interna*. v. 12, p. 220-224, out/dez. 2005.

LEME, D. M. MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res.*, v. 682, n. 1. p. 71-81. Jul-Ago, 2009.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C. et al. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.15, n.3, p.415-422, 2013.

MACEDO, J. F. de M.; SILVA, M. S.; BATISTA, N. J. C.; UCHOA, V. T.; ALVES, W. dos S.. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste *Allium cepa*. *Revista Saúde em Foco*, v. 1, n. 1, art. 2, p. 15-28. Jan./Jul., 2014.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, n. 3, p. 355-381. 2008.

MANZANO, B. C. Avaliação dos potenciais citotóxicos, genotóxico e mutagênico das águas do Ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, após o recebimento de efluentes urbanos. 126p. Dissertação, 2010. Rio Claro, SP: UNESP, 2010.

MAZZEO, D. E. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas testes de *Allium cepa* e cultura de células de mamíferos. 144p. Dissertação, 2009. Rio Claro: UNESP, 2009.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. de C.A. Reação de Feulgen. *Ciência e Cultura*. Campinas, SP: UNICAMP, 1978. v. 30, n. 6, p. 665-676. Jun. 1978.

MELLO, M. L. S.; JUNQUEIRA, A. C.; MARIA, C. C. J. et al. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermógenes Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso de meio ambiente Paulínia e região metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais - CD-Rom. Campinas: UNICAMP, 2004. p. 1-8.

MITTEREGGER-JÚNIOR, H.; FERRAZ-DIAS, J.; LÚCIA-YONEMA, M. et al. Avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira-calçadista, utilizando *Allium cepa*. *J Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 2, 147-151, 2006.

PEREIRA, J. C. da S. Estudo alelopático, fitoquímico e genotóxico de extratos aquosos de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. e *Combretum leprosum* Mart. em *Allium cepa*. 69p. Dissertação. 2015. Mossoró, RN: UFRSA/UFRN, 2015.

PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, S. I. R. et al. Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 1, n. 2, p. 171-175, 2006.

SAMPAIO, F. G.; BOJINK, C. de L.; RANTIN, F. T. O uso do sulfato de cobre em ecossistemas aquáticos: fatores que afetam sua toxicidade em peixes de água doce. Jaguariúna, SP: Embrapa, 2013. 101p.

SANTOS, Igor Cassimiro dos. Introdução ao mecanismo molecular do câncer, tratamento e prevenção: uma revisão da literatura. Monografia. 2015. Recife, PE: UFRPE, 2015. 82p.

SANTOS, S. C. dos; OLIVEIRA, U. A. de; TRINDADE, L. de O. R. et al. Genotypes selection for plant bioassays using *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. *Pak. J. Bot.*, v. 49, n. 6, p. 2201-2212, 2017.

SILVA, P. P.; GUERRA, W.; SILVEIRA, J. N. et al. Two new ternary complexes of copper (II) with tetracycline or doxycycline and 1, 10-Phenanthroline and their potential as antitumoral: cytotoxicity and DNA cleavage. *Inorganic Chemistry*, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

SOUSA, M. A. N. de; PINHEIRO, M. J. da C.; SILVA, R. K. da et al. Avaliação da qualidade da água dos reservatórios de Santa Cruz e Umari – RN: citotoxicidade e genotoxicidade. *Revista saúde e ciência*. v. 3, n. 3, 2014.

TEISSEIRE, H., COUDERCHET, M.; VERNET, G. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotox. Environ. Safety.*, v. 40, p. 194-200, 1998.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações*. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2008. 472 p.

ZAGATTO, P. A. et al. Avaliação de toxicidade em sistema de tratamento biológico de afluentes líquidos. *Revista SABESP*, n. 166, p. 01-06, 1992.