

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel



Tese

ELEMENTOS-TRAÇO EM *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.

MARIBEL DA SILVA MENDES

Pelotas, 2008

MARIBEL DA SILVA MENDES

ELEMENTOS-TRAÇO EM *Allium cepa* L. E *Lactuca sativa* L.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração em Produção Vegetal).

Orientador: Prof. CARLOS ROGÉRIO MAUCH, Dr.

PELOTAS, 2008

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

M538e Mendes, Maribel da Silva

Elementos –traço em *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L./
Maribel da Silva Mendes. - Pelotas, 2008.

---f. : fig. e tab.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Produção Vegetal. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.
Universidade Federal de Pelotas. - Pelotas, 2008, Carlos
Rogério Mauch, Orientador.

1. Metais pesados; 2. *Allium cepa* L.; 3. *Lactuca sativa* L.;
4. Divisão celular; 5. Índice mitótico; 6. Germinação. I. Mauch,
Carlos Rogério (orientador). II. Título.

CDD 635.25

BANCA EXAMINADORA

.....
Professor Adjunto Carlos Rogério Mauch, Dr.
Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel

.....
Pesquisadora Alice Battistin, Dr^a
Laboratório de Citogenética/FEPAGRO/RS

.....
Professora Adjunta Roberta Marins Nogueira Peil, Dr^a
Departamento de Fitotecnia/FAEM/UFPel

.....
Professor Adjunto Edison Zefa, Dr.
Departamento de Zoologia e Genética/IB/UFPel

.....
Pesquisador José Ernani Schwengber, Dr.
EMBRAPA Clima Temperado

Ao meu irmão, João Luiz,

DEDICO.

OFEREÇO

À minha avó materna, Justina Borges da Silva
(falecida dias após a apresentação deste trabalho aos 95 anos).

Aos meus avós paternos, Perpétua Goulart Mendes e João Luiz Mendes (*in
memorian*).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pela vida.

Ao meu pai, João Francisco Mendes, pelo apoio e amizade incondicionais.

Ao companheiro, de todas as horas, José Dias Vianna Filho, pelo amor, carinho e dedicação.

À Professora Doutora Judith Viégas, pelo carinho nas horas difíceis pelas quais passei durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Rogério Mauch, pela amizade e orientação.

Ao Professor Doutor João Baptista da Silva, pela paciência e ajuda nas análises estatísticas.

À Professora Doutora Alice Batisttin, pela generosa acolhida e pelas fotografias.

À Professora Doutora Roberta Marins Nogueira Peil, pela confiança.

Ao Doutor Carlos Alberto Medeiros, pelo Abstract.

Ao Doutor Clenio Nailto Pillon, pela colaboração.

À Doutora Claudinéia Rodrigues, pelo preparo das soluções.

Ao Doutor Daniel Franco e às funcionárias Rosane Gomes Machado e Luciene Sebastiana Jurê da Cunha, pela agradável convivência no Laboratório de Sementes da Embrapa Clima Temperado.

Ao Professor Doutor José Eduardo Dornelles, pelas fotos das sementes germinadas.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da UFPel Vera Lúcia Lacerda, Iára V. de Oliveira, Álvaro Miguel Martins e João Carlos Macedo, pelo carinho.

Aos acadêmicos do Curso de Agronomia Thaís Santos Lima e Heitor Lisbôa, pela ajuda na confecção das lâminas.

Ao meu padrinho Adeí Louzada de Moura, pelo incentivo e bondade.

Às Professoras Elizabeth Sopeña Silveira e Laura Palomino Machado, pela amizade e pelas palavras de incentivo nas horas de desânimo.

Ao Professor Doutor José Edgar Machado, pela compreensão e amizade.

Aos meus alunos da rede pública de ensino do Estado do Rio Grande do Sul que, apesar do descaso dos governos com a educação merecem, cada vez mais, professores qualificados.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

“Não há saber mais ou saber menos.
Há saberes diferentes”.

Paulo Freire

RESUMO

MENDES, Maribel da Silva. **Elementos-traço em *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L.** 2008. 176f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas.

A poluição ambiental com elementos-traço (ETs) é um problema cada vez maior da sociedade moderna, sendo a avaliação destes riscos ambientais de extrema importância. O uso de sementes de plantas superiores é ideal para tais ensaios porque são eficientes, rápidos e de fácil execução. Os objetivos deste trabalho foram avaliar os efeitos tóxicos na germinação e citotóxicos nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* L. e de *Lactuca sativa* L. sob diferentes concentrações dos elementos-traço cádmio (0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0mg.L⁻¹), arsênio (2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20mg.L⁻¹), chumbo (50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L⁻¹), cromo (50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L⁻¹) e mercúrio (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L⁻¹), após 168 e 48h de exposição, respectivamente. Observou-se, em alface, o número máximo e as classes de nucléolos por célula interfásica. Os resultados mostraram efeito tóxico dos elementos-traço sobre a germinação das sementes e no Índice Mitótico (IM), além da indução de aberrações cromossômicas nas células meristemáticas de *A. cepa*. O grau de toxicidade e as diferentes anomalias aumentam com o aumento da concentração do ET. Em *L. sativa* ficou evidenciado que tanto a percentagem de germinação, como o IM decresceram com o aumento da concentração dos ETs. A citotoxicidade causada por esses ETs ficou demonstrada nas diferentes anomalias cromossômicas causadas às células meristemáticas dessa espécie vegetal. A presença de cromo, mesmo nas concentrações mais baixas utilizadas neste estudo, inviabilizou a sequência dos eventos do processo de germinação das sementes de alface. Em relação ao número de nucléolos, os estudos demonstraram que, a alface possui, no máximo, seis (6) nucléolos por célula interfásica, mesmo na presença dos elementos-traço estudados.

Palavras-chave: metais pesados, *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, divisão celular, índice mitótico, germinação

ABSTRACT

MENDES, Maribel da Silva. **Trace element in *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.** 2008. 176f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Federal de Pelotas.

The environmental pollution with trace-elements (ETs) is an increasing problem in the modern society, having extreme importance the evaluation of these environmental risks. The use of seeds of superior plants is ideal for such tests since they are efficient, quick and of easy execution. The objectives of this work were evaluate the toxic effects on the germination and cytotoxics on the meristematic cells of *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. roots, under different concentrations of the trace-elements cadmium (0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 and 9,0mg. L⁻¹), arsenic (2,5; 5,0; 7,5; 10; 15; 20mg. L⁻¹), lead (50, 100, 150, 200, 250 and 300mg. L⁻¹), chromium (50, 100, 150, 200, 250 and 300mg. L⁻¹) and mercury (0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 and 2,5mg. L⁻¹), after 168 and 48h of exhibition, respectively. In lettuce, de maximum number and classes of nucleolus per interphasic cell were observed. The results showed toxic effect of the trace-elements on the germination of the seeds and Mitotic Index (IM), besides the induction of chromosomic aberrations in the meristematic cells of *A. cepa* L. The degree of toxicity and the different anomalies increased with the increase of ET concentration. In *L. sativa* it was evident that both the percentage of germination and the IM decreased with the increase of ETs concentration. The cytotoxicity caused by these ETs was demonstrated in the different chromosomic anomalies caused to the meristematic cells of this vegetable species. The presence of chrome, even in the lowest concentrations used in this study, impaired the events sequence of the germination process of lettuce seeds. Regarding the number of nucleolus, the studies demonstrated that, the lettuce has, at most, six (6) nucleolus per interphasic cell, even in the presence of the studied trace-elements.

Key words: heavy metal, *Allium cepa* L., *Lactuca sativa* L., cellular division, mitotic index, germination

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de arsênio: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L ⁻¹	48
Figura 2.2 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de cromo: 50, 100, 150, 200, 250, 300mg.L ⁻¹	48
Figura 2.3 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de chumbo: 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L ⁻¹	49
Figura 2.4 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de mercúrio: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L ⁻¹	49
Figura 2.5 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de cádmio: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0mg.L ⁻¹	50
Figura 2.6 - Semente de <i>Allium cepa</i> L. germinada em água pura, após 168h ..	51
Figura 2.7 - Semente de <i>Allium cepa</i> L. germinada em solução de 300mg.L ⁻¹ de cromo, por 168h	52
Figura 2.8 - Semente de <i>Allium cepa</i> L. germinada em solução de 9,0mg.L ⁻¹ de cádmio, por 168h	52
Figura 2.9 - Semente de <i>Allium cepa</i> L. germinada em solução de 2,5mg.L ⁻¹ de mercúrio, por 168h	53
Figura 2.10 - Células de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L. germinada em solução de 7mg.L ⁻¹ de cádmio/168h, mostrando interfases anômalas	64
Figura 2.11 - Célula anômala, em pró-metáfase, de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em mercúrio 1,0mg.L ⁻¹ /168h	65
Figura 2.12 - Prófase anormal de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em solução de 10mg.L ⁻¹ de arsênio/168h...	65
Figura 2.13 - Pró-metáfase com cromossomos aderidos de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em solução de 10mg.L ⁻¹ de arsênio/168h	66
Figura 2.14 - C-metáfase de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em solução de 15mg.L ⁻¹ de arsênio/168h	66
Figura 2.15 - Anáfase normal de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em cromo 100mg.L ⁻¹ /168h	67

Figura 2.16 - Célula de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em solução de 10mg.L ⁻¹ de arsênio/168h, mostrando fragmento de cromossomo (↓) devido à ruptura de ponte anafásica e vários fragmentos acêntricos (↓)	67
Figura 2.17 - Célula de meristema de raiz de semente de <i>Allium cepa</i> L., germinada em solução de 10mg.L ⁻¹ de arsênio/168h, mostrando anáfase tripolar com pontes (↓) e cromossomo solto	68
Figura 3.1 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. em diversas concentrações de arsênio: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L ⁻¹	83
Figura 3.2 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. em diversas concentrações de mercúrio: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L ⁻¹	84
Figura 3.3 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. em diversas concentrações de cádmio: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0mg.L ⁻¹	85
Figura 3.4 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. em diversas concentrações de cromo: 50; 100; 150; 200; 250; 300mg.L ⁻¹	85
Figura 3.5 - Percentagem de germinação de sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. em diversas concentrações de chumbo: 50; 100; 150; 200; 250; 300mg.L ⁻¹	86
Figura 3.6 - Semente de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em água, por 48h	87
Figura 3.7 - Semente de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 9mg.L ⁻¹ de cádmio, por 48h	87
Figura 3.8 - Semente de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 250mg.L ⁻¹ de cromo por 48h	88
Figura 3.9 - Semente de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 300mg.L ⁻¹ de cromo por 48h	
Figura 3.10 - Células meristemáticas de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 15mg.L ⁻¹ de arsênio/48h, mostrando os vacúolos (↓) no citoplasma e núcleo com cromatina condensada	99
Figura 3.11 - Células meristemáticas de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em água/48h, mostrando células normais, em interfase e em divisão mitótica: prófase (↓), pró-metáfase (↓) e telófase (↓)	100
Figura 3.12 - Células meristemáticas de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em água/48h, mostrando células normais, em interfase e em divisão mitótica: metáfase (↓) e anáfase final (↓)	100
Figura 3.13 - Células meristemáticas de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 15mg.L ⁻¹ de arsênio/48h, mostrando C-metáfases em célula não dividida	101
Figura 3.14 - Célula meristemática de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 15mg.L ⁻¹ de arsênio/48h, com C-metáfase	101
Figura 3.15 - Células meristemáticas de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 300mg.L ⁻¹ de chumbo/48h, mostrando cromossomos fora da placa metafásica	102

Figura 3.16 - Célula meristemática de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em solução de 15mg.L ⁻¹ de arsênio/48h, com micronúcleo	102
Figura 3.17 - Células meristemáticas de morfologia anormal, de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. germinada em 300mg.L ⁻¹ de chumbo/48h	103
Figura 4.1 - Número de células interfásicas com dois nucléolos iguais em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg. L ⁻¹	113
Figura 4.2 - Número de células interfásicas com três nucléolos iguais em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L ⁻¹	113
Figura 4.3 - Número de células interfásicas com quatro a seis nucléolos em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L ⁻¹	118
Figura 4.4 - Número de células interfásicas com um nucléolo em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L ⁻¹	119
Figura 4.5 - Número de células interfásicas com dois nucléolos, sendo um maior que o outro em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L ⁻¹	119
Figura 4.6 - Número de células interfásicas com três nucléolos iguais em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L ⁻¹	120
Figura 4.7 - Número de células interfásicas com três nucléolos, sendo que um deles é maior que os demais em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L ⁻¹	121
Figura 4.8 - Número de células interfásicas com dois nucléolos, sendo um maior que o outro em <i>Lactuca sativa</i> L. nas diferentes concentrações de mercúrio: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L ⁻¹	121
Figura 4.9 - Um nucléolo de <i>Lactuca sativa</i> L. com 1mg.L ⁻¹ de cádmio	122
Figura 4.10 - Um nucléolo em <i>L. sativa</i> L. com 10,0 mg.L ⁻¹ de arsênio	123
Figura 4.11 - Um, dois, três nucléolos de <i>L. sativa</i> com 2,0 mg.L ⁻¹ de mercúrio	123
Figura 4.12 - Fusão de nucléolos de <i>L. sativa</i> L. na testemunha	124
Figura 4.13 - Imagens de nucléolos um (↓), dois (↓), três (↓), quatro (↓), seis nucléolos, dois fusionando (↓), três fusionando (↓) com 7 mg.L ⁻¹ de cádmio	124
Figura 4.14 - Seis nucléolos, sendo que dois estão se fusionando em <i>L. sativa</i> L. na testemunha	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Efeito do chumbo em sementes de diferentes espécies de plantas, conforme Wierzbicka e Obidzinska (1998)	30
Tabela 1.2 - Bioacumulação em <i>Hibiscus esculentus</i> L. (quiabo) e <i>Vernonia amygdalina</i> Delile (folha amarga) de Hg, Pb e Cr, conforme Gbaruko e Friday (2007)	37
Tabela 2.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico, baseadas nos limites máximos admitidos pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e européia (Norma da Comissão Européia)	43
Tabela 2.2 - Células em interfase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	57
Tabela 2.3 - Células em prófase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	58
Tabela 2.4 - Células em pró-metáfase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	59
Tabela 2.5 - Células em metáfase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	60
Tabela 2.6 - Células em anáfase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	61
Tabela 2.7 - Células em telófase, de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	62
Tabela 2.8 - Índice mitótico de células de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com os elementos-traço cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	63
Tabela 2.9 - Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de ponta de raiz de <i>Allium cepa</i> L. tratada com diferentes concentrações dos elementos-traço cádmio, arsênico, chumbo, cromo e mercúrio	69
Tabela 3.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico, baseadas nos limites máximos admitidos	

pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e europeia (Norma da Comissão Europeia)	79
Tabela 3.2 - Efeito de diferentes concentrações de cromo no ciclo celular de <i>Lactuca sativa</i> L.	89
Tabela 3.3 - Células em interfase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	92
Tabela 3.4 - Células em prófase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	93
Tabela 3.5 - Células em pró-metáfase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	94
Tabela 3.6 - Células em metáfase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	95
Tabela 3.7 - Células em anáfase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	96
Tabela 3.8 - Células em telófase, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações	97
Tabela 3.9 - Índice mitótico de células, de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações	98
Tabela 3.10 - Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de ponta de raiz de <i>Lactuca sativa</i> L., tratada com os elementos-traço chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e arsênico (As) em diversas concentrações	104
Tabela 4.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico, baseadas nos limites máximos admitidos pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e europeia (Norma da Comissão Europeia).....	109
Tabela 4.2 - Teste de Duncan para as médias das diferentes classes de nucléolos nas diversas concentrações de cádmio	114
Tabela 4.3 - Análise da variação na regressão polinomial em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. em relação aos nucléolos na presença de diferentes concentrações de cádmio	115
Tabela 4.4 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações	116
Tabela 4.5 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações de arsênio	117
Tabela 4.6 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações de mercúrio	117

LISTA DE TABELAS - APÊNDICE

Tabela 1 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio	141
Tabela 2 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> L. na presença de diferentes concentrações de cromo	141
Tabela 3 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> L. na presença de diferentes concentrações de cádmio	141
Tabela 4 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> L. na presença de diferentes concentrações de arsênio	142
Tabela 5 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> L. na presença de diferentes concentrações de chumbo	142
Tabela 6 - Análise da variação na interfase em <i>Allium cepa</i> L.	142
Tabela 7 - Análise da variação na prófase em <i>Allium cepa</i> L.	143
Tabela 8 - Análise da variação na prometáfase em <i>Allium cepa</i> L.	143
Tabela 9 - Análise da variação na metáfase em <i>Allium cepa</i> L.	143
Tabela 10 - Análise da variação na anáfase em <i>Allium cepa</i> L.	144
Tabela 11 - Análise da variação na telófase em <i>Allium cepa</i> L.	144
Tabela 12 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de cromo ..	144
Tabela 13 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de arsênio ..	145
Tabela 14 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de cádmio ..	145
Tabela 15 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de chumbo .	145
Tabela 16 - Análise da variação na germinação das sementes de <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio	146
Tabela 17 - Análise da variação na interfase em <i>Lactuca sativa</i> L.	146
Tabela 18 - Análise da variação na prófase em <i>Lactuca sativa</i> L.	146
Tabela 19 - Análise da variação na prometáfase em <i>Lactuca sativa</i> L.	147
Tabela 20 - Análise da variação na metáfase em <i>Lactuca sativa</i> L.	147
Tabela 21 - Análise da variação na anáfase em <i>Lactuca sativa</i> L.	147
Tabela 22 - Análise da variação na telófase em <i>Lactuca sativa</i> L.	148
Tabela 23 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de cádmio	148

Tabela 24 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de cádmio	148
Tabela 25 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de cádmio	149
Tabela 26 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de cádmio	149
Tabela 27 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de cádmio	149
Tabela 28 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de cádmio	150
Tabela 29 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de cádmio	150
Tabela 30 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de cádmio	150
Tabela 31 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de chumbo	151
Tabela 32 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de arsênio	151
Tabela 33 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em <i>Lactuca sativa</i> L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio	151
Tabela 34 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de chumbo	152
Tabela 35 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de chumbo	152
Tabela 36 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de chumbo	152
Tabela 37 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de chumbo	153
Tabela 38 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de chumbo	153
Tabela 39 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de chumbo	153

Tabela 40 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de chumbo	154
Tabela 41 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de arsênio	154
Tabela 42 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de arsênio	154
Tabela 43 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos, um maior que o outro, na presença de diferentes concentrações de arsênio	155
Tabela 44 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de arsênio	155
Tabela 45 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de arsênio	155
Tabela 46 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de arsênio	156
Tabela 47 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de arsênio	156
Tabela 48 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de mercúrio	156
Tabela 49 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de mercúrio	157
Tabela 50 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de mercúrio	157
Tabela 51 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de mercúrio	157
Tabela 52 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de mercúrio	158
Tabela 53 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de mercúrio	158
Tabela 54 - Análise da variação em células interfásicas de <i>Lactuca sativa</i> L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de mercúrio	158

SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA	2
DEDICATÓRIA	3
AGRADECIMENTOS	4
EPÍGRAFE	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE TABELAS - APÊNDICE	14
 INTRODUÇÃO	 19
 CAPÍTULO 1 - EFEITOS DE ELEMENTOS-TRAÇO NO AMBIENTE, COM ÊNFASE NOS VEGETAIS	 22
1. Introdução	23
2. Revisão de Literatura	24
2.1. Cádmio - Cd	24
2.2. Arsênio - As	27
2.3. Chumbo - Pb	29
2.4. Mercúrio - Hg	31
2.5. Cromo - Cr	33
2.6. Elementos-traço diversos	34
 CAPÍTULO 2 - GERMINAÇÃO E CICLO CELULAR EM Allium cepa L. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS-TRAÇO: ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E MERCÚRIO	 39
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	43
2.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de cebola ..	43
2.2. Avaliação citogenética dos meristemas de raiz de cebola submetidos à ação de elementos-traço	44
3. Resultados e Discussão	47

3.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de cebola ..	47
3.2. Avaliação citogenética dos meristemas de raiz de cebola submetidos à ação de elementos-traço	54
3.2.1. Efeito dos elementos-traço no ciclo celular de células meristemáticas de raiz de cebola	54
3.2.2. Alterações citogenéticas em células meristemáticas de raiz de cebola devidas aos efeitos de elementos-traço	64

CAPÍTULO 3 - GERMINAÇÃO E CICLO CELULAR EM *Lactuca sativa* L. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS-TRAÇO ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E MERCÚRIO

74

1. Introdução	75
2. Material e Métodos	79
2.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de alface ...	79
2.2. Avaliação citogenética dos meristemas radiculares de alface submetidos à ação de elementos-traço	80
3. Resultados e Discussão	83
3.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de alface ...	83
3.2. Avaliação citogenética dos meristemas radiculares de alface submetidos à ação de elementos-traço	89

CAPÍTULO 4 - NUCLÉOLOS EM *Lactuca sativa* L. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS-TRAÇO ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E MERCÚRIO

105

1. Introdução	106
2. Material e Métodos	109
3. Resultados e Discussão	112

CONCLUSÕES

127

REFERÊNCIAS

128

APÊNDICE

140

INTRODUÇÃO

Elementos-traço (ETs) são aqueles elementos que possuem densidade maior que 5 g.cm³ e número atômico maior que 20. Estão presentes naturalmente em solos e em sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos, mesmo que não haja perturbação antrópica. Alguns elementos-traço são considerados essenciais, enquanto outros são tóxicos. No entanto, mesmo os essenciais podem, sob condições específicas, causar impactos negativos a ecossistemas terrestres e aquáticos (HARPER e OLIVEIRA, 2006).

Com a intensificação dos processos de produção agrícola e a utilização maciça de insumos industrializados e, mais recentemente, com a utilização dos resíduos e subprodutos de processos industriais na agricultura, tem-se observado o aumento de ETs no ambiente (LIMA, 2001). O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas é um aspecto de grande preocupação quanto à segurança ambiental. Esses elementos podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para a cadeia alimentar, por meio das próprias plantas, ou pela contaminação das águas de superfície e das subterrâneas (CHANG *et al.*, 1987; SOARES *et al.*, 2005).

A toxicidade por metais em plantas tem sido demonstrada somente quando os elementos são incorporados ao solo em formas solúveis ou quando resíduos orgânicos contaminados são incorporados em doses elevadas. Cerca de 1% do total dos ETs é absorvido pelas plantas (TSUTIYA *et al.*, 2001).

O acúmulo de ETs nos solos provoca importantes alterações no funcionamento dos ecossistemas e causa problemas para saúde humana. Os ETs que se encontram com maior frequência nos solos são chumbo, cobre, zinco, cádmio, cromo e níquel (HUECAS *et al.*, 2007).

As plantas desenvolveram mecanismos altamente específicos para absorver, translocar e acumular nutrientes, entretanto, alguns metais não essenciais para os vegetais são absorvidos, translocados e acumulados porque apresentam comportamento eletroquímico similar aos elementos nutritivos requeridos (LASAT, 2000). Para Kabata-Pendias e Pendias (2001), o acúmulo de ETs no interior das plantas deve ser considerado como um problema que necessita atenção. Apesar de as plantas poderem se adaptar a solos com altas concentrações de metais pesados, seus efeitos podem ser nocivos à saúde humana.

Wagner (1993) relatou que alguns ETs se acumulam em cereais, tubérculos, hortaliças e frutas. Já, Simeoni *et al.* (1984) relataram que cereais, gramíneas e hortícolas tuberosas tendem a acumular menos ETs do que plantas folhosas de crescimento rápido, como a alface.

Garbisu e Itziar (2001) relataram que os elementos-traço não podem ser destruídos biologicamente, mas podem ser transformados em outros pela oxidação ou por complexos orgânicos. Como consequência dessa transformação estes metais podem ficar menos tóxicos; ou se tornarem menos biodisponíveis; ou ainda serem volatilizados e removidos da área poluída.

Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo. O estudo dos mutagênicos em núcleos eucarióticos vem sendo observado através de métodos citológicos. A mutação pode resultar da ação de compostos químicos, ambientais e radioativos e da estabilidade intrínseca dos ácidos nucleicos. Os agentes mutagênicos podem ser detectados, citologicamente pela inibição do ciclo celular, interrupção em metáfases, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de trocas entre cromátides irmãs entre outros (VIEIRA e VICENTINI, 1997).

Tendo em vista que a alface e a cebola são hortaliças muito consumidas pelos brasileiros; levando em conta que a alface é uma planta folhosa e de crescimento rápido e que a cebola é utilizada em demonstrações didáticas de citogenética; e considerando que este trabalho avaliou algumas das

consequências citotóxicas e fisiológicas de diferentes elementos-traço em plantas; verificou-se o efeito de diferentes concentrações de arsênico, cádmio, chumbo, cromo e mercúrio sobre a germinação, o índice mitótico do meristema radicular, as alterações cromossômicas em células de cebola e alface, bem como o número de nucléolos nas células interfásicas em alface.

CAPÍTULO 1

EFEITOS DE ELEMENTOS-TRAÇO NO AMBIENTE, COM ÊNFASE NOS VEGETAIS

1. INTRODUÇÃO

Elemento-traço (ET) é aquele elemento que possui densidade maior que 5g.cm^3 e número atômico maior que 20. Os elementos-traços (ETs) estão presentes naturalmente em solos e em sistemas aquáticos superficiais e subterrâneos, mesmo que não haja perturbação antrópica. Alguns elementos-traço são considerados essenciais, enquanto outros são tóxicos. No entanto, mesmo os essenciais podem, sob condições específicas, causar impactos negativos a ecossistemas terrestres e aquáticos (HARPER e OLIVEIRA, 2006).

O acúmulo de metais pesados em solos agrícolas é um aspecto de grande preocupação quanto à segurança ambiental, sendo que as principais fontes de contaminação são os resíduos industriais, o lixo urbano, o esgoto, os fertilizantes e os agrotóxicos. Esses elementos podem expressar seu potencial poluente diretamente nos organismos do solo, pela contaminação das águas, pela disponibilidade às plantas em níveis fitotóxicos, além da possibilidade de transferência para a cadeia alimentar, por meio das próprias plantas (CHANG *et al.*, 1987; SOARES *et al.*, 2005). Neste último caso, estão bem documentadas as plantas da família Cruciferae, que têm demonstrado capacidade acumuladora de ETs, indicando sua potencial periculosidade para a saúde humana e animal (BROADLEY *et al.* 2001).

O objetivo deste capítulo é mostrar o efeito de alguns elementos-traço tais como o cádmio, o arsênio, o chumbo, o mercúrio e o cromo, no ambiente, com ênfase nos vegetais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cádmio - Cd

O cádmio (Cd) é um elemento-traço que, além de não ter função bioquímica ou nutricional, é altamente tóxico para plantas e animais, incluindo os seres humanos (ALLOWAY, 1990). Weisberg *et al.* (2003) salientaram que o cádmio é um elemento-traço tóxico, pertencente ao grupo IIIB da tabela periódica dos elementos químicos, e está presente no solo, sedimentos, ar e água.

O Cd tem mais motilidade em ambientes aquáticos do que a maioria dos outros elementos-traço, sendo bioacumulado e persistente no ambiente, possuindo uma vida média ($t^{1/2}$) de 10 a 30 anos (USPHS, 1970). Este ET é facilmente absorvido pelas plantas, havendo relação direta entre a concentração no solo e a concentração presente nos órgãos dos vegetais que se desenvolvem nos locais contaminados (CABRERA *et al.* 1994; ELINDER e JARUP, 1996).

Este ET pode combinar-se com outros, unindo-se fortemente com as partículas do solo e permanecendo, assim, por muitos anos; de acordo com Maruthi *et al.* (2005), em torno de 15 a 30 anos.

Segundo Mattiazzo-Prezzoto (1994), o óxido de cádmio (CdO_2) e o antranilato de Cd $\{\text{Cd}(\text{HOOC}-(\text{C}_6\text{H}_4)-\text{NH}_2)_2\}$ são usados como anti-helmínticos para suínos e aves, em doses de 0,03 a 1mg.Kg^{-1} , fornecidas junto com a alimentação. Já, o cloreto cádmio (CdCl_2) é utilizado em fórmulas de fungicidas (ILO, 1998).

Greger *et al.* (1991) estudaram a absorção e os efeitos fisiológicos de Cd nas concentrações 0; 0,6; 2,3; 5,0 e $20,0\mu\text{M}$ em *Beta vulgaris* L. cv. Monohill (beterraba) relacionadas à nutrição da planta. Este ET causou atraso no

crescimento da planta, além de diminuir o teor de sacarose, glicose, frutose e amido por unidade de peso seco, conforme aumentava a concentração.

Em 1994, Zhang e Yang verificaram que tanto o crescimento da raiz como o índice mitótico de *Hordeum vulgare* L. (cevada) decresceram com o aumento da concentração de Cd (0, 5 e 20ppm), assim como com o aumento da duração do tratamento. Além disso, observaram muitas irregularidades na divisão celular, tais como C-mitoses, anáfases com pontes, micronúcleos, cromossomos aderidos, retardatários e perdidos.

Em *Phaseolus vulgaris* L. (feijão), a enzima peroxidase foi usada, com sucesso, como bioindicador da fitotoxicidade causada pelo cádmio durante a germinação das sementes. Tanto nos cotilédones como nas raízes, após 72h de exposição, em todos os tratamentos (1, 2, 5 e 10 μ M.L⁻¹), houve um aumento na atividade da peroxidase (ROSSI e LIMA, 2001). Para Assche e Clijsters (1990), a indução da atividade da peroxidase pode ser um mecanismo utilizado pelos vegetais para reduzir os níveis de H₂O₂ e peróxidos orgânicos formados sob diferentes condições de estresse.

Os efeitos do acúmulo de Cd nas raízes, brotos e bulbos em *Allium sativum* L. (alho) foram investigados por Jiang *et al.* (2001). Estes pesquisadores utilizaram concentrações de 10⁻⁶ a 10⁻²M de Cd. O crescimento das raízes foi estimulado nas concentrações mais baixas de Cd (10⁻⁶ e 10⁻⁵M), durante todo o tratamento. Já, nas demais concentrações (10⁻⁴ a 10⁻²M Cd), houve redução no crescimento das mesmas. O conteúdo de Cd, nas raízes, aumentou com o aumento da concentração deste ET, nas seguintes proporções: 1.826, 114, 59, 24 e 4 vezes o controle, respectivamente para 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶M. No entanto, o transporte para os brotos e bulbos foi pequeno para todas as concentrações.

Wang *et al.* (2007) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de Cd (10⁻⁴ a 10⁻⁶M) no crescimento de duas cultivares de *Zea mays* L. (milho) Nongda nº108 e Liyu nº6 e o acúmulo deste ET nas raízes e brotos. O Cd estimulou o crescimento radicular nas concentrações 10⁻⁵ e 10⁻⁶M, nos cinco primeiros dias, na cultivar Nongda nº108. Já, na mesma cultivar, na concentração de 10⁻⁴M, após dez dias de tratamento, este ET reduziu e chegou a paralisar o

crescimento das raízes. A cultivar Liyu nº6 apresentou crescimento estimulado pelo Cd durante todo o experimento (15 dias), nas concentrações de 10^{-5} e 10^{-6} M. Porém, na concentração 10^{-4} M, após dez dias, o crescimento das raízes foi inibido. O acúmulo de Cd nas raízes e brotos, das duas cultivares, aumentou significativamente com o aumento da concentração e duração do tratamento.

O acúmulo do Cd (0, 1, 5, 10 e 20mg.Kg⁻¹) e seus efeitos sobre o rendimento de *Lactuca sativa* L. (alface), *Raphanus sativus* L. (rabanete) e *Cucumis sativus* L. (pepino) foram estudados por Moustakas *et al.* (2001). Não foram observados sintomas de toxicidade, porém houve aumento da concentração de Cd nas partes comestíveis das plantas. Em taxas superiores a 10mg.Kg⁻¹ de Cd, o rendimento da alface foi reduzido, no entanto o mesmo não aconteceu nas demais culturas. Ocorreu acúmulo de aproximadamente 5 a 43% de Cd nas partes comestíveis da alface e do pepino em relação às outras partes.

Wang e Xing (2005) estudaram os efeitos do Cd em três plantas ornamentais, *Tagetes erecta* L. (cravo-de-defunto), *Salvia splendens* L. (alegria-de-jardim) e *Abelmoschus manihot* L. (hibisco-doce). As sementes dessas plantas foram expostas a cinco concentrações de Cd (0 a 50mg.L⁻¹). Os resultados indicaram que o Cd teve pouco efeito sobre a germinação das plantas, porém resultados altamente significativos, para as três plantas estudadas, mostraram que quanto maior a concentração deste ET, menor foi o alongamento da raiz. No cravo-de-defunto e no hibisco doce, as concentrações de 0,36 e de 3,55mg.L⁻¹, respectivamente, inibiram o alongamento da raiz. A alegria-de-jardim foi extremamente sensível à toxicidade do Cd, pois a inibição do alongamento da raiz ocorreu em todas as concentrações. Aina *et al.* (2007) e Wang *et al.* (2007), também verificaram redução no crescimento e no alongamento das raízes em *Oryza sativa* L. (arroz) em concentrações de 1000µM de cádmio e em *Zea mays* L. (milho), 10^{-4} M.

Mudas de *Nicotiana tabacum* L. (fumo) foram expostas a 100uM de cádmio, como resultado houve redução da matéria seca total e do índice de clorofila, além disso, a concentração de ferro diminuiu na parte aérea e aumentou nas raízes. Provavelmente, o Cd interferiu na translocação do ferro para a parte superior da planta (YOSHIHARA *et al.* 2005).

O cádmio inibe a abertura dos estômatos em diversas espécies vegetais, tais como *Zea mays* L. (milho) e *P. vulgaris*, entre outras (BARCELÓ e POSCHENRIEDER, 1990).

Em *Medicago sativa* L. (alfafa) o cádmio, na forma de cloreto de cádmio (CdCl_2) em concentração de $100\mu\text{M}$ causou aumento do estresse oxidativo, bem como o aumento das enzimas antioxidantes (HAN *et al.*, 2008).

O efeito de $50\mu\text{M}$ de cloreto de cádmio no metabolismo do oxigênio foi estudado, em nível subcelular, em peroxissomos de folhas de *Pisum sativum* L. (ervilha). O tratamento com o cádmio produziu a proliferação de peroxissomos e aumento do teor de água oxigenada (H_2O_2) nas mesmas proporções, ocasionando mudanças na permeabilidade da membrana plasmática das células vegetais (ROMERO-PUERTAS *et al.* 1999).

2.2. Arsênio - As

O arsênio (As) existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais. Encontra-se este ET em herbicidas, inseticidas e desfoliantes (BURGUERA e BURGUERA, 1993). Existem três fontes principais de contaminação de arsênio no ambiente: fundição de metais, queima do carbono e o uso de agrotóxicos que contenham este elemento-traço (MATSCHULLAT, 2000).

O efeito tóxico das espécies de As depende, principalmente, de sua forma química. O As pode ocorrer como As III (arsenito), As V (arseniato), íon monometilarsônico (MMA) e íon dimetilarsínico (DMA), segundo Anderson *et al.* (1986). O As trivalente é 60 vezes mais tóxico que a forma pentavalente, já os compostos inorgânicos são 100 vezes mais tóxicos que as formas parcialmente metiladas, de acordo com (DAS *et al.*, 1995).

Os efeitos fitotóxicos do As são um súbito decréscimo na mobilidade da água, causando plamólise das raízes, descoloração das folhas, seguida pela necrose das mesmas (ALLOWAY, 1990).

Li e Rossman (1989) mostraram que o As III causa danos ao DNA por inibir enzimas para o reparo deste. Já, Hu *et al.* (1998) concluíram que o As III não inibe diretamente a enzima que auxilia no mecanismo de reparo, mas afeta o sinal que desencadeia a ação da enzima para o reparo do DNA.

O arsênio induz a formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas e trocas entre as cromátides irmãs, além disso, possui efeito clastogênico e aneugênico em células de camundongos. Em mamíferos, atua no mecanismo de reparo do DNA através de ação indireta, por isso, ainda não foi determinada a relação dose-resposta (GEBEL, 2001). Para Hartwig *et al.* (2002), o As III induz câncer em seres humanos e em animais, porque afeta a seqüência dos nucleotídeos e o mecanismo de reparo do DNA, mesmo em concentrações nanotóxicas.

Concentrações excessivas de arsênio III causam fitotoxicidade porque modificam a permeabilidade da membrana celular, favorecendo a reação do radical sulfidríla (-SH) com grupos de cátions, assim como proporciona reações do grupo fosfato com ADP e ATP e, ainda, faz a substituição de íons essenciais (PATRA *et al.*, 2004).

A especiação, o transporte do arsênio e os efeitos sobre o transporte do fósforo na seiva do xilema em *Pteris vittata* L. (samambaia) foi investigada por Kertulis *et al.* (2005). Nos tratamentos, foram usadas concentrações de 0, 10 e 50mg.L⁻¹ de arsênio, nas formas de As III, As V, ácido monometilarsônico (MMA) e ácido dimetilarsínico (DMA). A presença de arsênio na seiva não afetou, significativamente, a concentração de fósforo inorgânico. A forma de As que a planta mais armazenou foi As III, sendo que a forma mais transportada foi As V, talvez por ser a mais parecida com o fósforo.

Para investigar os efeitos do arsênio do solo nos pigmentos fotossintéticos e suas correlações com o crescimento e a produção de *Oriza sativa* L. (arroz), foram utilizadas concentrações de 10; 20; 30; 60 e 90mg.Kg⁻¹ deste ET. As clorofilas a e b das folhas diminuíram significativamente, com o aumento da concentração de As. Nenhuma planta de arroz sobreviveu até a maturidade nas concentrações mais altas (60 e 90mg.Kg⁻¹). A toxicidade por As afetou a

fotossíntese, resultando na redução do crescimento e do rendimento destas plantas (RAHMAN *et al.*, 2007).

2.3. Chumbo - Pb

O chumbo (Pb) é um dos metais tóxicos mais abundantes e não tem função nutricional, bioquímica ou fisiológica conhecida (GOYER, 1996). O chumbo pertence ao grupo IV B da tabela periódica de elementos e possui dois estados de oxidação, Pb II e Pb IV, que são estáveis, porém, no ambiente, esse elemento predomina na forma de íon Pb^{2+} , seus compostos e complexos. Em geral, o íon Pb^{2+} livre é mais tóxico que os complexos inorgânicos (ALLOWAY, 1990). Quando o chumbo é lançado no ambiente, possui longo tempo de residência e tende a se acumular em solos e sedimentos onde, devido à baixa solubilidade, pode permanecer acessível à cadeia alimentar e ao metabolismo humano por muito tempo (SAUVE *et al.*, 1997).

Para Wilke *et al.* (2000), o chumbo diminui a capacidade intelectual, modifica a conduta, bloqueia a hematopoiese, causa intoxicação renal, neuropatia periférica e diminui o desenvolvimento corporal. Estes sintomas são mais intensos em crianças, pois estas possuem maior capacidade de absorção por estar em desenvolvimento.

Segundo Bergmann (1992), as principais conseqüências da toxicidade de Pb nas plantas são: a interrupção no metabolismo do cálcio, a inativação enzimática e a redução na assimilação de dióxido de carbono, com inibição da respiração e transpiração. Em relação à parte citogenética, o Pb em concentrações excessivas interfere na divisão celular e inibe o crescimento do sistema radicular.

O chumbo ocorre naturalmente em plantas e resulta de processos de captação e incorporação. Existe uma relação diretamente proporcional entre as concentrações de Pb no solo e nas plantas (WHO, 1995).

Práticas de manejo do solo afetam a disponibilidade de Pb. Traina e Laperche (1999) afirmaram que a adição de adubos fosfatados a solos contaminados com Pb é uma forma de remediar problemas de toxidez, porque

este elemento forma precipitados de baixíssima solubilidade com os fosfatos. A solubilidade do Pb, também, pode ser diminuída pela calagem. Em valores altos de pH, o Pb precipita como hidróxido, fosfato ou carbonato. A calagem também pode promover a formação de complexos do Pb com a matéria orgânica (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001).

Este elemento-traço provoca mudanças na permeabilidade das membranas celulares e interfere nas reações com grupos tióis, além de apresentar afinidade para reagir com grupamentos fosfatos e grupos ativos de ADP e ATP (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001).

Wierzbicka e Obidzinska (1998) estudaram o efeito do Pb (100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000mg.dm⁻³) na absorção e na germinação das raízes de diferentes espécies de plantas. A Tabela 1.1 mostra as espécies estudadas, localização do ET (quando presente) e o tempo de embebição que a semente ficou em contato com o Pb. Foi verificado que em sementes grandes como, por exemplo, *P. vulgaris* a penetração do Pb não foi uniforme. Em *A. cepa* e *Z. mays*, o Pb foi observado nos tecidos da raiz. Nas espécies de *L. sativa*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *A. cepa* e *Z. mays*, o efeito do Pb não foi significativo na germinação das sementes.

Tabela 1.1 - Efeito do chumbo em sementes de diferentes espécies de plantas, conforme Wierzbicka e Obidzinska (1998)

Espécie	Localização do Pb		Tempo de embebição (h)
	Semente	Embrião	
<i>Lactuca sativa</i> var. Glowiastra	Presente	Ausente	9
<i>Allium cepa</i> var. Wolska	Presente	Ausente	26
<i>Zea mays</i> var. Cukrowa Goldenbaltam	Presente	Presente	48
<i>Pisum sativum</i> var. Howiecki	Presente	Presente	12
<i>Hordeum vulgare</i>	Presente	Ausente	9
<i>Triticum aestivum</i>	Presente	Ausente	10
<i>Cucumis sativus</i> var. Monastrieski	Presente	Ausente	30
<i>Brassica napus</i> var. Zerowy	Presente	Presente	12
<i>Phaseolus vulgaris</i> var. Augustinka	Presente	Presente	24

Segundo Patra *et al.* (2004), o efeito do Pb depende da concentração, do tipo de sais e das espécies de vegetais envolvidos. Embora os efeitos negativos sejam mais pronunciados em altas concentrações e em maior tempo de duração, em alguns casos, as concentrações mais baixas podem estimular os processos metabólicos. Os principais processos metabólicos afetados são: a germinação, o crescimento das plântulas, a fotossíntese e as atividades enzimáticas. Os sais inorgânicos de chumbo induzem a diminuição da atividade mitótica e a ocorrência de inúmeras C-mitoses.

Srivastava e Srivastava (2004) verificaram os efeitos citogenéticos do chumbo em *Helianthus annuus* (girassol) e constataram muitas irregularidades meióticas, tais como cromossomos aderidos e retardatários, pontes, segregação desigual e fragmentação cromossômica.

Costa *et al.* (2004) estudaram o acúmulo de Pb em *Dendranthema grandiflora*, Tzevelev (crisântemo), após cultivo em substrato contendo doses de resíduo industrial de galvanoplastia, e concluíram que não houve sintomas de toxidez por Pb, possivelmente, porque em pH alto, a solubilidade deste ET é menor.

Kiran e Sahín (2005) avaliaram o efeito do chumbo (0,125; 0,250; 0,5 e 1,0mM de Pb^{+2}) na germinação, crescimento da raiz e divisão mitótica em *Lens culinaris* Medik, (lentilha). A percentagem de germinação não foi inibida com concentrações de 0,125 e 0,25mM, entretanto com 0,50 e 1,0mM de Pb houve decréscimo na germinação das sementes. O crescimento da raiz foi menor à medida que a concentração deste ET foi aumentando. A divisão mitótica diminuiu consideravelmente e aparecem inúmeras anormalidades cromossômicas tais como C-mitoses, micronúcleos, pontes anafásicas, cromossomos perdidos e metáfases multipolares.

2.4. Mercúrio - Hg

O mercúrio (Hg) é o único metal encontrado na forma líquida em condições de temperatura e pressão normais, formando vapores incolores e inodoros. Além disso, o mercúrio ocorre no ambiente associado a outros

elementos químicos, formando compostos inorgânicos ou sais. O Hg inorgânico pode ser convertido em metil-mercúrio e dimetil-mercúrio pela ação de microrganismos (bactérias metanogênicas). Esta biotransformação representa alto risco ambiental, visto que os produtos resultantes acumulam-se na cadeia alimentar aquática. A concentração do metal aumenta à medida que o Hg avança nos níveis tróficos, este é o processo denominado de bioamplificação (BOENING, 2000).

O mercúrio é considerado um poluente de alto risco, sendo regulado pela USEPA (*United States Environmental Protection Agency*). A preocupação, a respeito da poluição pelo mercúrio, surge dos efeitos à saúde decorrentes da exposição ao mercúrio metilado, altamente tóxico, encontrado na água potável e em ambientes aquáticos (LIN e PEHKONEN, 1999).

Estudos conduzidos em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e à poliploidia. Esta ação seria resultado da forte afinidade do Hg pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso, sendo considerada como a ação mais típica, a nível genético, dos compostos de mercúrio (BUCIO *et al.* 1999).

Amorim *et al.* (2000) estudaram os danos citogenéticos causados pela contaminação de metil-mercúrio na Amazônia, tendo concluído que houve relação positiva entre a quantidade de metil-mercúrio e o dano aos linfócitos das pessoas analisadas, além das anormalidades na divisão celular observadas.

Patra e Sharma (2000) informaram que a incorporação de vapor de mercúrio pelas folhas das plantas C3 (aveia e trigo) foi cinco vezes maior que a absorção pelas folhas das plantas C4 (milho e sorgo). Os danos às sementes de cereais por compostos de mercúrio caracterizaram-se por germinação anormal e hipertrofia característica das raízes e do coleóptilo.

Flora *et al.* (1994) estudaram a genotoxicidade dos compostos de Hg em diversos organismos procariontes e eucariontes e concluíram que este ET induz mutações, clastogenia em células eucarióticas, inibe a ação do fuso mitótico, causam C-mitoses, conseqüentemente, poliploidia e aneuploidia.

2.5. Cromo - Cr

O cromo (Cr) é um elemento-traço que pode se apresentar em vários estados de valência, os mais comuns e importantes são Cr metálico (valência 0), Cr trivalente (valência III) e Cr hexavalente (valência VI). O Cr III ocorre naturalmente no ambiente. A toxicidade é causada pelos compostos do Cr VI, sendo esta forma mais disponível e instável no solo (CUNAT, 2002).

Ao comparar os efeitos do cromo trivalente (III) e hexavalente (VI) Dartsch *et al.* (1998), demonstraram que o cromo III apresenta baixa toxicidade, enquanto que o cromo VI é um oxidante forte, embora não cause danos diretos aos tecidos, é considerado um agente mutagênico, carcinogênico e teratogênico. O cromo VI é um composto de fácil penetração na membrana celular em forma de ânion cromato, o que não ocorre com o cromo III, o qual é inerte e tem sua penetração dificultada. O cromo VI no meio intracelular forma, pela ação do sistema redox-ativo, como por exemplo, a glutatona, espécies reativas ao oxigênio, provocando um desequilíbrio no estado redox celular, conhecido como estresse oxidativo, o que leva a lesões no DNA.

Dados de Matsumoto e Marin-Morales (2005) corroboram com os autores acima citados, eles relataram os efeitos tóxicos e genotóxicos dos Cr III e Cr VI. Estes estados oxidativos diferem em relação às suas atividades celulares, principalmente devido às diferentes habilidades, quanto à facilidade de transporte através das membranas biológicas. O Cr VI é transportado para o interior da célula através dos canais de transferência de ânions endógenos isoestruturais e isoeletrônicos. O Cr III normalmente é incapaz de se difundir através da membrana celular. Sua existência no interior da célula é derivada, geralmente, da redução do Cr VI, por endocitose ou via fagocitose. O Cr III age diretamente na molécula de DNA, enquanto que o Cr VI é pouco reativo a essa molécula. No ecossistema, porém, o Cr VI confere maior perigo, pois é esta forma que apresenta uma maior reatividade com as membranas biológicas, ultrapassando-as e incorporando-se facilmente à célula. Na célula, é biotransformado para Cr III, que é uma molécula potencialmente mutagênica. Dentre os danos induzidos pelo Cr, são descritas alterações na estrutura da molécula de DNA, com quebras na

cadeia principal e oxidação das bases. Essas alterações geram aberrações cromossômicas tais como: formação de micronúcleos, trocas entre cromátides irmãs e erros na síntese de DNA.

Prakash *et al.* (2004) estudaram o efeito da água de irrigação adicionada de cromo (0 a 25mg.L⁻¹) na germinação e no crescimento de rabanete. A percentagem de germinação das sementes, assim como o crescimento da planta diminuiu gradualmente conforme o aumento da concentração de cromo.

O motivo em torno das altas concentrações de Cr III nas plantas foi descoberto por Mandiwana *et al.* (2007). Eles atribuíram a alta concentração à presença de ácidos orgânicos de baixo peso molecular no solo onde as plantas estão se desenvolvendo, pois à medida que uma fração de sua massa total está biodisponível o cromo se torna móvel. O elemento mobilidade e sua disponibilidade para as plantas são diferentes para as espécies de cromo: o Cr III e o Cr VI. O cromo hexavalente está sempre presente em pequenas quantidades, quando comparado ao cromo trivalente, em qualquer tipo de solo não poluído. A solubilidade do Cr VI depende da presença de íons CO₃⁻², na solução do solo, e a concentração de Cr VI, nas plantas, depende da fração solúvel deste no solo, sendo que este ET se acumula mais nas raízes.

2.6. Elementos-traço diversos

Hooda e Alloway (1996) observaram que a elevação do pH, pela calagem, em solos de diferentes texturas, proporcionou decréscimo na concentração de cádmio, cobre, níquel, chumbo e zinco em *Daucus carota* L. (cenoura) e em *Spinacia oleracea* L. (espinafre).

Munzuroglu e Geckil (2002) avaliaram o efeito do cádmio, do mercúrio e do chumbo, em concentrações de 0,5 a 8mM, na germinação de sementes, na alongação da raiz e no crescimento do coleótilo e do hipocótilo nas culturas de *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Cucumis sativus* L. (pepino). No trigo houve decréscimo nos comprimento da raiz e do coleótilo, sendo que a partir de 1,2 mM Hg não ocorreu germinação e a partir de 1,4mM, não houve emissão de coleótilo. Com concentração de 1,0mM Hg ou maiores, as sementes de pepino

não germinaram e não ocorreu a emissão do hipocótilo. Em trigo, com concentração de Cd acima de 2,0 mM, as sementes não germinaram e nem houve a emissão do coleóptilo. No pepino o processo de germinação não ocorreu, nem houve a emissão do hipocótilo com concentrações acima de 2,5 mM de Cd. Já com Pb, ocorreu apenas decréscimo em todos os processos analisados. A relação entre a germinação e a concentração dos ETs foi inversamente proporcional em ambas as culturas estudadas.

Song *et al.* (2002) estudaram os efeitos do cobre, zinco, chumbo e cádmio na germinação das sementes e no alongamento da raiz em *Brassica pekinensis* (Lour.) Rupr. (repolho chinês), cultivada em quatro diferentes tipos de solo. Os resultados indicaram que, com concentrações iguais, a inibição do alongamento da raiz é maior que a percentagem de germinação das sementes. Sendo que, a inibição é menor em solos do que em água, indicando o importante papel que os solos exercem em relação à poluição com elementos-traço. Ocorreu efeito sinérgico quando os quatro ETs foram colocados juntos. O efeito do cádmio (10, 50 e 100 µg.L⁻¹), em solução hidropônica, foi avaliado também para *B. pekinensis* e *B. chinensis* L. (couve-da-malásia) por Liu *et al.* (2007). Verificaram que concentrações acima de 10 µg.L⁻¹ levam à diminuição significativa do alongamento das raízes e do conteúdo de clorofila da folha, sendo que, as raízes acumulam mais Cd do que os brotos, e este acúmulo ocorre, geralmente, nas paredes celulares.

Iannacone e Alvariño (2005) determinaram a ecotoxicidade do cromo VI (0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg.L⁻¹), mercúrio (0,625; 1,25; 2,5; 5,0 e 10 mg.L⁻¹) e chumbo (12,5; 25; 50; 100 e 200 mg.L⁻¹) sobre a inibição do crescimento radicular em *A. cepa*, *Beta vulgaris* L. (beterraba), *Oriza sativa* L. (arroz) e *Raphanus sativus* L. (rabanete), após 192h de exposição. Para calcular a concentração inibitória média (CI₅₀), foi utilizado um programa da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA). A ordem decrescente de ecotoxicidade para inibição do crescimento radicular das culturas testadas foi a seguinte:

- *O. sativa* > *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus*, para Cr VI;
- *B. vulgaris* > *R. sativus* ≈ *O. sativa* > *A. cepa*, para Hg;
- *B. vulgaris* > *A. cepa* > *R. sativus* > *O. sativa*, para Pb.

Para os ETs, a seqüência decrescente de ecotoxicidade foi: Hg > Cr VI > Pb; para todos os casos, quanto maior a concentração do ET, maior a freqüência de inibição do crescimento radicular.

O nível de acúmulo de chumbo e arsênio em diversas partes de *Brassica oleracea* L. (repolho) e em *R. sativus* foi estudado por Bravo *et al.* (2007). Houve maior acúmulo de As na raiz, quando comparado com as partes aéreas e comestíveis da planta de repolho, já em rabanete, o maior acúmulo ocorreu na parte aérea, fenômeno observado, também, quando a planta foi exposta ao chumbo.

Srivastava e Srivastava (2004) verificaram os efeitos citogenéticos de alguns metais pesados, como chumbo, cobre, mercúrio e zinco em girassol e constataram muitas irregularidades meióticas: cromossomos aderidos e retardatários, pontes, segregação desigual e fragmentação cromossômica. O mercúrio mostrou-se o mais tóxico e originou a maior porcentagem de células mãe de pólen anormais; já o chumbo induziu tetraploidia.

Patra *et al.* (2004) compararam os efeitos genotóxicos do mercúrio, chumbo e arsênio em plantas. Observaram que todos os ETs citados induzem alterações na estrutura cromossômica, distúrbios no fuso, indução de C-mitoses, entre outras anomalias. O efeito do chumbo depende da concentração, do tempo de exposição, das propriedades do solo e da espécie vegetal. Em geral, os efeitos são mais pronunciados em concentrações mais elevadas e com maior tempo de exposição. Em alguns casos, concentrações menores estimulam os processos metabólicos. Os principais processos fisiológicos afetados são: a germinação das sementes, o crescimento das plântulas, a fotossíntese e as atividades enzimáticas, pois o chumbo reduz a absorção e o transporte de nutrientes e diminui o tamanho dos estômatos. Já, os sintomas visíveis são manchas cloróticas, necroses e lesões foliares, senescência das folhas e raquitismo das plantas. A fitotoxicidade do arsênio é afetada por sua forma química, pelo tipo de solo e pela dosagem utilizada. Via de regra, este ET inibe a atividade de algumas enzimas, por reagir com o grupo sulfidríla das proteínas e concorre com o fósforo, causando a deficiência deste elemento. Os sintomas, devidos ao As, observados são a cor vermelho escuro nas folhas e, nas plantas, menor perfilhamento, menor

altura, menor número de folhas e área foliar, menor número de vagens e produção de matéria seca das culturas agrícolas e hortícolas. O mercúrio afeta a fotossíntese, inibe o crescimento das raízes, perturba a integridade das membranas, aumentando a permeabilidade das mesmas.

Os danos causados ao DNA de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi e de *Solanum tuberosum* L. var. Korela (batata) foram analisados por Gichner *et al.* (2006), em plantas cultivadas em solo contaminado com 0,38mg.Kg⁻¹ de Cd e 41,8mg.Kg⁻¹ de Pb. A área foliar do fumo e a altura das plantas de batata foram, significativamente, reduzidas. Nas raízes de fumo e batata foram encontrados, respectivamente, 16,8 e 17,4mg.Kg⁻¹ de Cd e 1.200 e 1.570 mg.Kg⁻¹ de Pb. Os danos causados ao DNA das espécies estudadas não foram significativos, o que levou os autores a concluir que esses ETs causaram efeitos tóxicos, mas não genotóxicos. Em 2007, Gbaruko e Friday estudaram a bioacumulação de ET em algumas espécies de plantas, *Hibiscus esculentus* L. (quiabo) e *Vernonia amygdalina* Delile (espécie nativa da Nigéria, conhecida como folha amarga), ambas as espécies acumularam Hg, Pb e Cr, conforme a Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Bioacumulação em *Hibiscus esculentus* L. (quiabo) e *Vernonia amygdalina* Delile (folha amarga) de Hg, Pb e Cr, conforme Gbaruko e Friday (2007)

Espécie	Parte da planta	Hg (µg. g ⁻¹)	Pb (µg. g ⁻¹)	Cr (µg. g ⁻¹)
<i>Hibiscus esculentus</i>	Raiz	0,01	0,5	0,06
	Caule	0,05	0,41	0,06
	Folha	0,02	0,37	0,05
	Fruto	0,01	0,22	0,04
<i>Vernonia amygdalina</i>	Raiz	0,01	0,48	0,06
	Caule	0,17	0,47	0,06
	Folha	0,25	0,41	0,06

Em 1996, Zheljazkov e Nielsen salientaram que o conteúdo dos elementos-traço variou conforme o órgão da planta, normalmente acumulou-se na

seguinte ordem: raízes > folhas > caules > inflorescências > sementes. Porém, esta ordem pode variar conforme a espécie.

Segundo Baker (1987), a sobrevivência das espécies que crescem em solos contaminados é relacionada à capacidade de tolerar e não de anular a toxicidade do elemento contaminante. As concentrações dos metais pesados variam, conforme o tipo de tecido da planta e, em geral, os grãos contêm concentrações menores que as partes vegetativas (BERTON, 2000).

Diante do exposto até aqui, faz-se necessário maior estudo e atenção dos órgãos governamentais e de pesquisas para a questão da contaminação do ambiente por elementos-traço, já que a contaminação dos alimentos é uma questão de saúde pública e, a segurança alimentar da população uma prerrogativa de cidadania.

CAPÍTULO 2

**GERMINAÇÃO E CICLO CELULAR EM *Allium cepa* L. SOB DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS-TRAÇO: ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO,
CROMO E MERCÚRIO**

1. INTRODUÇÃO

Os elementos-traço (ETs) ocorrem, naturalmente, no solo, em baixas concentrações e em formas não prontamente disponíveis para os organismos vivos (RESENDE *et al.*, 1997). Entretanto, com a intensificação dos processos de produção agrícola e a utilização maciça de insumos industrializados e, mais recentemente, com a utilização dos resíduos e subprodutos de processos industriais na agricultura, tem-se observado o enriquecimento de ETs nos solos (LIMA, 2001). Os impactos exercidos pelo homem ao ambiente são de dois tipos: o consumo de recursos naturais em ritmo mais acelerado do que os mesmos podem ser renovados e a geração de produtos residuais, tais como materiais tóxicos ao sistema ecológico (IAP-GTZ, 1995). Wagner, em 1993, relatou que alguns ETs acumulam-se em cereais, tubérculos, hortaliças e frutas e que, aproximadamente, 70% da contaminação em seres humanos, é oriunda da alimentação.

Os teores de metais pesados solúveis no solo são geralmente baixos. Entretanto, o emprego de fungicidas, fertilizantes minerais e esterco de animais na agricultura, podem elevar a concentração de metais pesados no solo a níveis capazes de causar danos à biota (FERNANDES, 1999).

Os ensaios ecotoxicológicos são importantes para avaliar o nível de prejuízo ambiental dos ETs, sendo que os ensaios de fitotoxicidade com germinação de sementes são simples e versáteis (RODRIGUES, 2003). Células meristemáticas de raízes de plantas são indicadores apropriados para a detecção de efeitos clastogênicos causados por poluentes do meio ambiente, especialmente para o monitoramento de contaminantes da água e do solo. O sistema de teste de *Allium cepa* L. (cebola) pode ser utilizado para o monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de

muitos compostos químicos (MA *et al.*, 1995). Fernandes *et al.* (2002) e Rigonato e Jordão (2002) corroboraram que *A. cepa* é uma das espécies vegetais mais utilizadas em testes de toxicidade e genotoxicidade, principalmente em questões de monitoramento de efluentes industriais e acúmulo de metais pesados, atualmente denominados de elementos-traço (ETs). El-Shahaby *et al.* (2003) consideraram o sistema teste de *A. cepa* como o mais adequado para detecção de toxicidade e/ou genotoxicidade na avaliação de níveis de poluição ambiental, que venham a representar riscos diretos ou indiretos para a população humana.

A cebola, uma das mais antigas hortaliças cultivadas, pertence à família Alliaceae e é uma planta originária da Ásia, de hábitat cosmopolita e não conhecida em estado silvestre (MULLIN, 1994; GRAYUM, 2003). No Brasil, a cebola destaca-se como uma das hortaliças economicamente mais importante, tanto pelo volume produzido, como pela contribuição sócio-econômica, tendo em vista que ela viabiliza as pequenas propriedades, exigindo grande quantidade de mão-de-obra, normalmente, a familiar (LEITE *et al.*, 2002).

A germinação da semente é do tipo epígea e, na primeira fase deste processo, a semente embebe água, aumenta de peso e, simultaneamente, ativa o seu metabolismo (BEWLEY e BLACK, 1994). A raiz primária emerge e transporta os nutrientes, retirados do meio ao qual a planta está inserida (BREWSTER, 1994), transportando, também, quaisquer elementos contaminantes do solo. Para Barceló e Poschenrieder (1992), nem todos os órgãos das plantas possuem a mesma sensibilidade quanto à acumulação de elementos-traço. Normalmente, a raiz é o órgão prioritário de absorção e acúmulo desses elementos.

Já há muito tempo, os meristemas radiculares vêm sendo utilizados como avaliadores para contaminantes e/ou drogas. Segundo Grant (1982), ensaios com *A. cepa* são importantes porque existe uma grande correlação com as células do sistema mamário dos mamíferos, o que pode ajudar na descoberta do mecanismo de ação e cura de algumas doenças. Há mais de vinte anos, Feskesjö (1985) considerou os meristemas radiculares de *A. cepa* como os melhores modelos biológicos para o estudo do efeito dos contaminantes ambientais. Uma série de trabalhos tem mostrado que os elementos-traço apresentam efeitos danosos sobre a divisão celular e à célula como um todo, influenciando no crescimento celular

e, conseqüentemente, na germinação das sementes (ZAYED *et al.*, 1998; MARCANO *et al.*, 1999, 2001; DOVGALIUK *et al.*, 2001, JIANG *et al.*, 2001, LIU E KOTTKE, 2003, 2004; LIU *et al.*, 2004, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2005; MITTEREGGER-JÚNIOR *et al.*, 2006; UNYAYAR *et al.*, 2006).

Este trabalho avaliou as conseqüências citotóxicas e os efeitos na germinação da cebola de diferentes concentrações de cinco elementos-traço. Estes ETs fazem parte da composição química de agrotóxicos ou são provenientes de resíduos ou subprodutos utilizados na produção agropecuária. Esta hortaliça é excelente como espécie teste e, muito consumida pela população brasileira.

Foram avaliados os efeitos das diferentes concentrações dos elementos-traço cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio

- na germinação de sementes de cebola;
- no ciclo celular de raízes de sementes de cebola germinadas;
- no índice mitótico das células meristemáticas de raízes de sementes de cebola.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de cebola

As concentrações dos elementos-traço – cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio – foram constituídas a partir de uma solução padrão, de cada elemento, diluída em água ultra-pura. A testemunha foi composta, somente, por água ultra-pura. As concentrações dos elementos-traço usadas para a germinação das sementes de alface são as constantes na Tabela 2.1.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, sendo utilizadas sementes de cebola da cultivar ‘Baia Periforme’, de mesmo lote, obtidas em empresas comerciais locais.

Tabela 2.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio, baseadas nos limites máximos admitidos pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e européia (Norma da Comissão Européia)

Elementos-traço (ETs)	Concentrações (mg.L ⁻¹)						Limites máximos admitidos (mg.Kg ⁻¹)	
							IN 27*	NCE**
Cromo (Cr)	50	100	150	200	250	300	500	100
Chumbo (Pb)	50	100	150	200	250	300	300	100
Mercúrio (Hg)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	2,5	1
Cádmio (Cd)	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0	8	1
Arsênio (As)	2,5	5,0	7,5	10	15	20	20	10

*Instrução Normativa nº 27, de 05/06/2006, do MAPA**Norma da Comissão Européia

Cada gerbox com papel germiteste, embebido com as soluções descritas na Tabela 2.1, conteve 100 sementes e constituiu uma unidade experimental. Após a semeadura, os gerbox foram colocados em germinador, à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, sem a presença da luz.

A avaliação a percentagem de sementes germinadas foi realizada aos 7 dias, em todos os tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizados, com um total de 31 tratamentos (5 ETs com 6 concentrações diferentes mais a testemunha) e 4 repetições por tratamento. A análise estatística constou da análise da variação e da regressão polinomial. Antes da análise de variação a variável estudada foi transformada segundo arco seno.

2.2. Avaliação citogenética dos meristemas de raiz de cebola submetidos à ação de elementos-traço

O estudo citogenético foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Foram coletadas todas as raízes germinadas provenientes do experimento que avaliou a percentagem de germinação das sementes de cebola submetidas à ação dos ETs, por um período de sete dias, para a avaliação do ciclo celular e índice mitótico e para verificação das alterações cromossômicas.

As raízes foram fixadas em Carnoy I (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético) por, no máximo, 24 horas à temperatura ambiente. Após, foram transferidas para álcool 70% e estocadas em geladeira até sua utilização.

O preparo das lâminas para análise citogenética do meristema radicular foi realizado conforme seqüência abaixo:

- Lavaram-se as raízes, três vezes, em água destilada, depois de terem sido retiradas do álcool 70%;
- Enxugaram-se as raízes, rapidamente, em papel de filtro;
- Hidrolisaram-se as raízes em HCl 5N, à temperatura ambiente, por 8 a 10 minutos;

- Lavaram-se as raízes, três vezes, em água destilada;
- Enxugaram-se as raízes, rapidamente, com papel de filtro, colocando-as sobre uma lâmina limpa;
- Seccionou-se a porção apical de cada raiz, eliminando o restante do material;
- Colocou-se uma gota de ácido acético 45% sobre o meristema radicular;
- Cobriu-se com uma lamínula e, com o auxílio de uma agulha de ponta rombuda, bateu-se levemente sobre a lamínula;
- Levou-se o conjunto lâmina/lamínula à chama de uma lamparina, tendo o cuidado de não aquecer em demasia;
- Pressionou-se a lamínula contra a lâmina, dentro de uma folha dobrada de papel filtro;
- Colocou-se o conjunto lâmina/lamínula sob resfriamento rápido, em nitrogênio líquido;
- Retirou-se a lamínula e colocou-se a lâmina para secar em temperatura ambiente;
- Corou-se a lâmina com solução de Giemsa a 1%, por 15 minutos;
- Colocou-se uma nova lamínula com uma gota de Entellan;
- Observou-se o material sob microscópio ótico com aumento de 1.000X, em imersão.

Foram contadas 1.000 células por repetição, num total de 3.000 células por tratamento. Esta contagem foi feita pelo sistema de varredura, anotando-se as células encontradas nas diversas fases da divisão celular (prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase e telófase) e as que estavam em interfase, até completar o total estipulado.

Foram, também, anotadas as anomalias cromossômicas encontradas tais como pontes, C-mitoses, cromossomos retardatários ou aderidos e fora da placa equatorial, assim como células com micronúcleos.

A análise estatística constou das análises de variação e das comparações de médias pelo teste de Duncan a 5%.

Para calcular o Índice Mitótico (IM) foi utilizada a seguinte fórmula, com os dados da cada repetição:

$$\text{IM} = \text{Número de células em divisão} / \text{Número total de células contadas}$$

A análise estatística constou das análises de variação e de comparação de médias pelo teste de Duncan a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de cebola

As Figuras 2.1, 2.2, 2.3 e 2.4 mostram os resultados obtidos com a germinação das sementes de cebola nas diferentes concentrações de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo, respectivamente. Para estes ETs, verificou-se que os diagramas de dispersão do número de sementes germinadas de *Allium cepa*, após 168h de incubação, em função das diferentes concentrações, apresentaram curvas de regressão cúbica, altamente significativas. De acordo com os gráficos, pode-se observar os excelentes valores de R^2 apresentados nas referidas curvas de regressão do cromo, arsênio, mercúrio e chumbo: 0,97; 0,91; 0,83 e 0,80, respectivamente. Excetuaram-se as diferentes concentrações de cádmio, onde a frequência da germinação das sementes de cebola ficou evidenciada por uma regressão linear descendente, altamente significativa, com R^2 igual a 0,74, conforme Figura 2.5.

Para o cádmio, ficou evidente que quanto maior sua concentração, menor a frequência de germinação das sementes de cebola, ressaltando assim a grande toxicidade deste ET. A alta toxicidade do cádmio em baixas concentrações pode ser explicada pela grande penetração deste ET nas plantas (GEETA *et al.* 1990).

Para Arkhipchuk e Garanko (2002) a comparação dos resultados é difícil para as diferentes espécies de plantas vasculares, tendo em vista diferentes sensibilidades e diversos tempos de exposição aos ETs. A idade da semente também é um fator que deve ser levado em consideração (ARKHIPCHUK *et al.*, 2000).

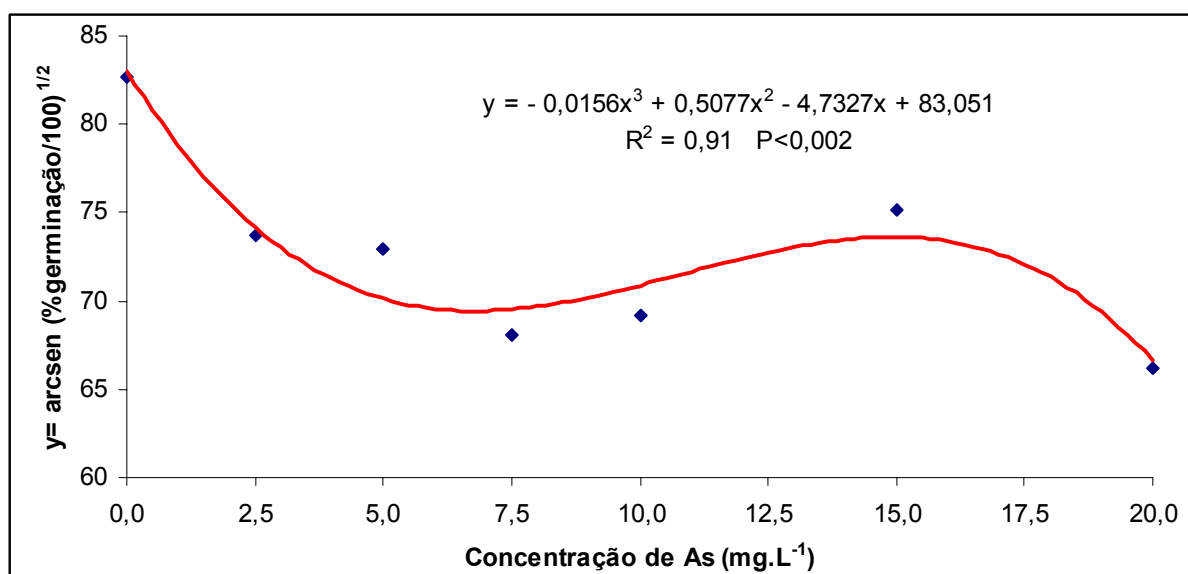


Figura 2.1 - Percentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de arsênio: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L⁻¹

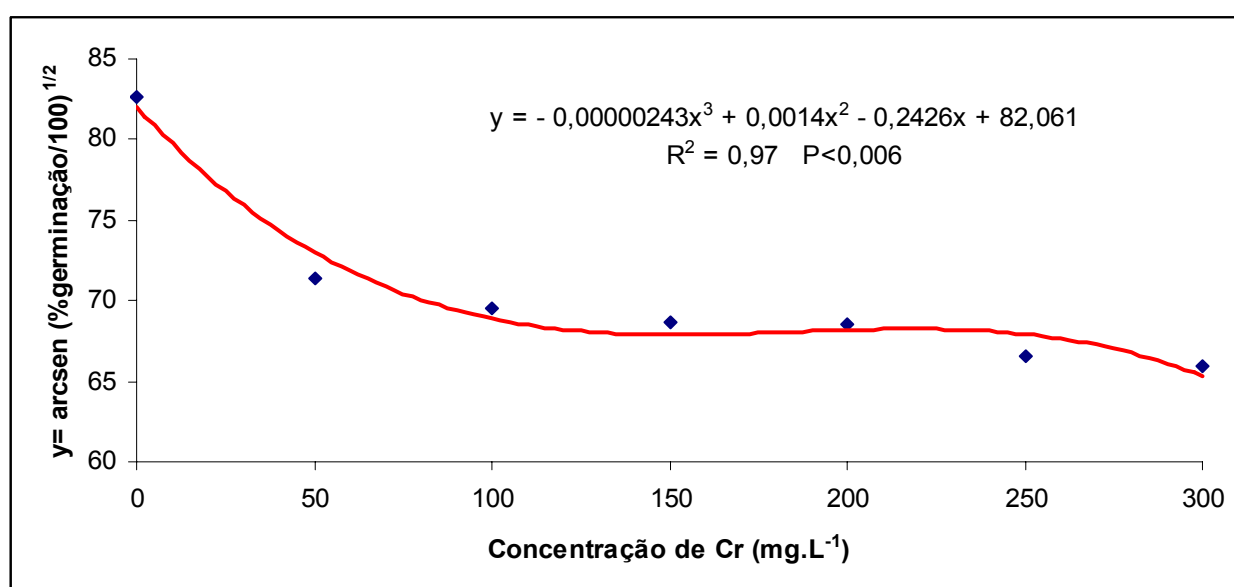


Figura 2.2 - Percentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de cromo: 50, 100, 150, 200, 250, 300mg.L⁻¹

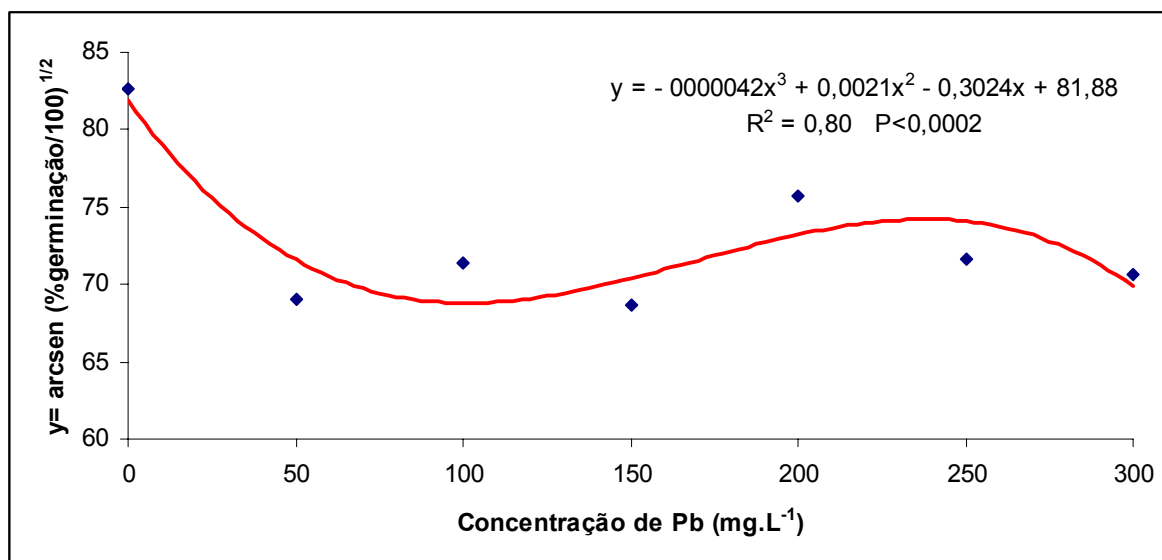


Figura 2.3 - Percentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de chumbo: 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L⁻¹

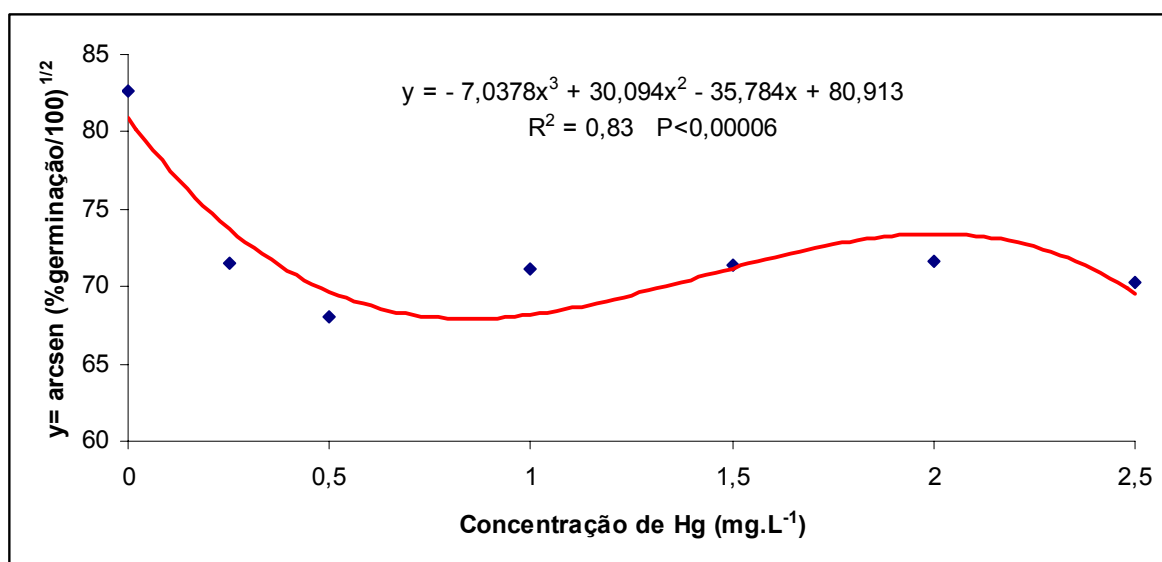


Figura 2.4 - Percentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de mercúrio: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L⁻¹

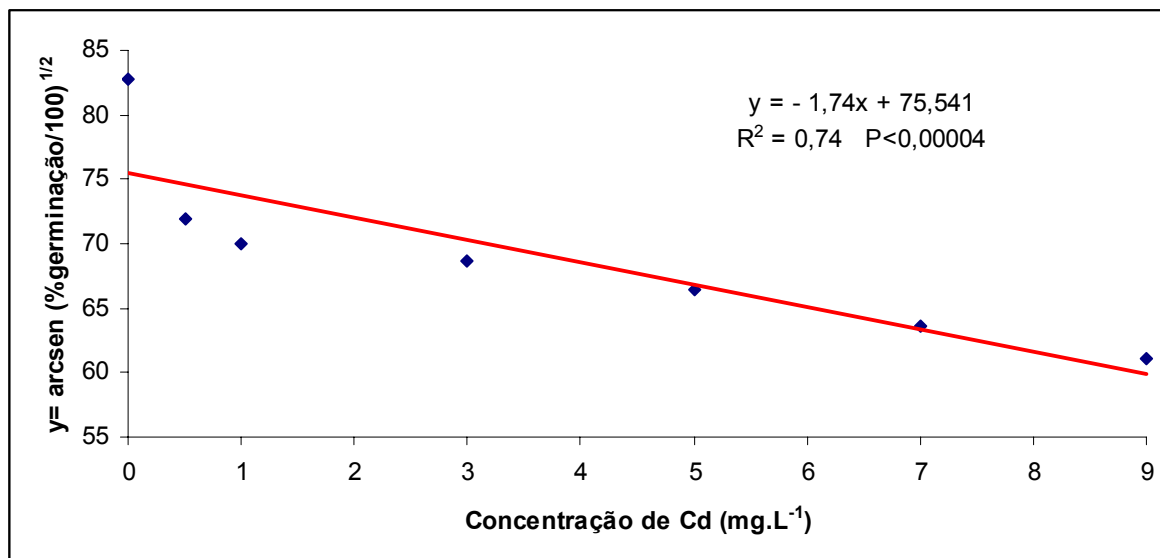


Figura 2.5 - Percentagem de germinação de sementes de *Allium cepa* L., após 168h de incubação, em diversas concentrações de cádmio: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0mg.L⁻¹

Utilizando as equações obtidas nas análises de regressão polinomial, para cada metal pesado, obtiveram-se os pontos de concentrações máximas e mínimas para a germinação de sementes de cebola, conforme detalhado a seguir.

A instrução normativa Nº 27 (IN 27), de 05 de junho de 2006, no seu anexo IV, dispõe sobre as concentrações máximas admitidas por metais pesados tóxicos em substratos para plantas e condicionadores de solo (Tabela 2.1). O resultado deste trabalho para arsênio, cujos pontos de mínima e máxima são 6,78 e 14,91mg.L⁻¹, respectivamente, está dentro do admitido pela N 27, cujo valor máximo é 20mg.Kg⁻¹, entretanto fora do limite máximo permitido pela Norma da Comissão Européia (NCE) que é de 10mg.Kg⁻¹ (Tabela 2.1).

Para cromo e mercúrio, ocorreu a mesma situação do arsênio. As concentrações de cromo calculadas, onde as sementes terão a máxima e a mínima germinação, são de 19,04 e 179,72mg.L⁻¹. Estas concentrações estão dentro do limite máximo permitido pela IN 27, que é de 300mg.Kg⁻¹, mas excedem bastante o limite máximo estabelecido pela NCE, que é de 100mg.Kg⁻¹ de Cr (Tabela 2.1). Os valores mínimos e máximos encontrados para mercúrio são de 0,79 e 2,14mg.L⁻¹, estão dentro do limite máximo permitido pela N 27, que é de

2,5mg.Kg⁻¹, mas excedem, em muito, o limite máximo estabelecido pela NCE, que é de 1,0mg.Kg⁻¹ Hg (Tabela 2.1).

Tanto o limite de mínima, cujo valor foi 100,74mg.L⁻¹, como o de máxima 237,79mg.L⁻¹ encontrados para o chumbo, extrapolaram o valor máximo admitido pela NCE, que é de 100mg.Kg⁻¹. Em relação à IN 27 o limite máximo encontrado para este ET ficou dentro do permitido pela referida norma, que é de 300mg.Kg⁻¹ Pb (Tabela 2.1).

Pode-se verificar na Figura 2.6, o comprimento da raiz de cebola quando germinada em água. Na Figura 2.7, a semente de *A. cepa* foi germinada em solução de 300mg.L⁻¹ de cromo. Constata-se que a ponta da raiz encontra-se escurecida e pouco desenvolvida, quando comparada com a da semente incubada em água (Figura 2.6). Isto indica que o processo de germinação iniciou, porém, provavelmente, não continuará devido à toxicidade do cromo.

A Figura 2.8 mostra a germinação de semente de cebola tratada com 9mg.L⁻¹ de cádmio. Verifica-se que a ponta da raiz está escurecida. Possivelmente, esta semente torne-se inviável, pois o processo de necrose foi iniciado. Na Figura 2.9, observa-se o bom desenvolvimento do processo germinativo da semente de cebola incubada com 2,5mg.L⁻¹ de mercúrio.

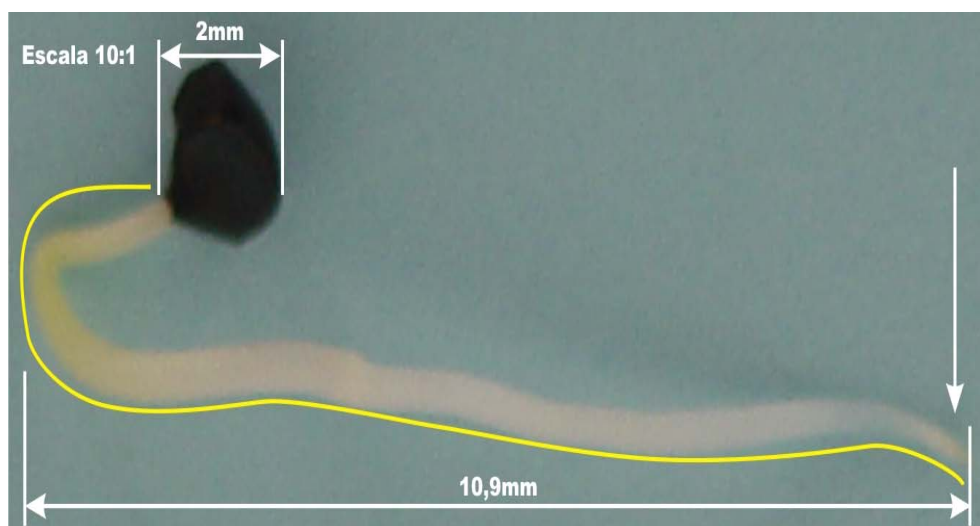


Figura 2.6 - Semente de *Allium cepa* L. germinada em água pura, após 168h.

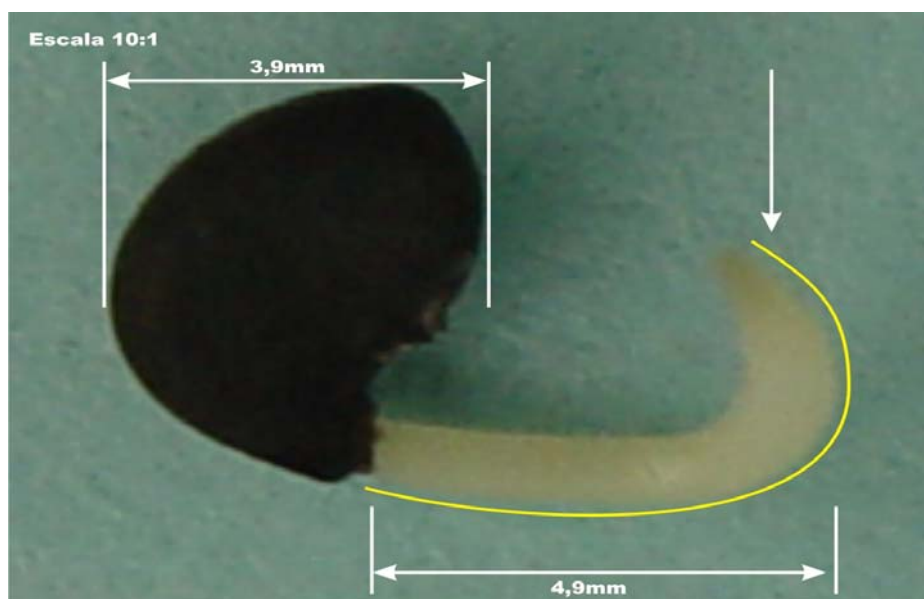


Figura 2.7 - Semente de *Allium cepa* L. germinada em solução com 300mg.L⁻¹ de cromo, por 168h.

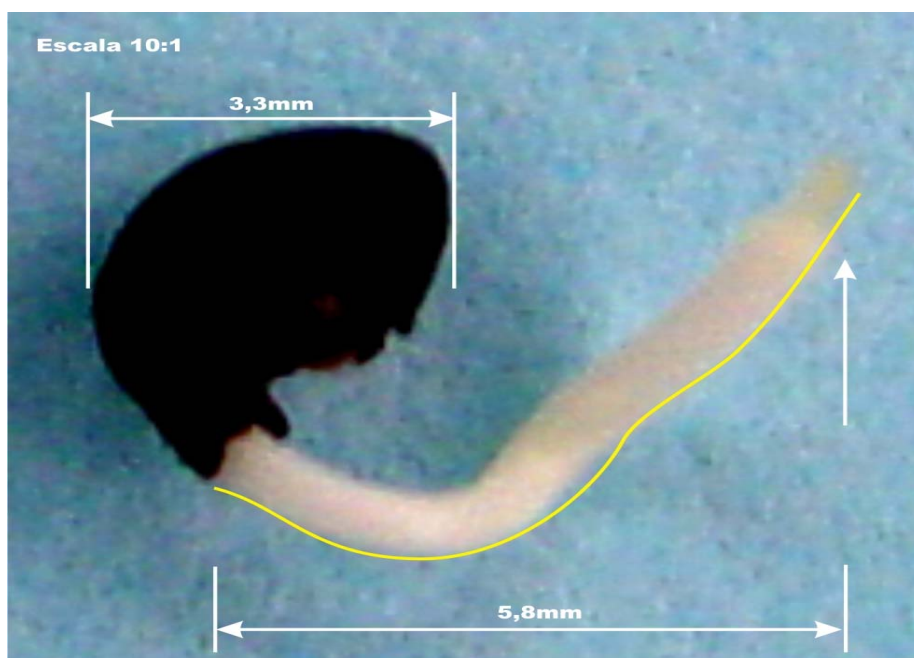


Figura 2.8 - Semente de *Allium cepa* L. germinada em solução com 9,0mg.L⁻¹ de cádmio, por 168h.

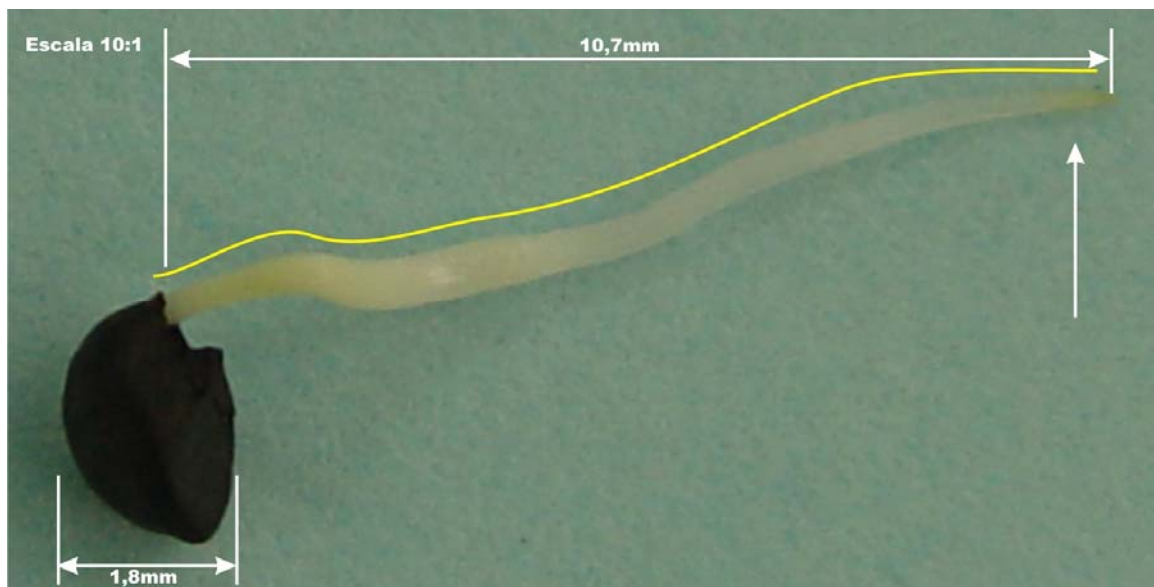


Figura 2.9 - Semente de *Allium cepa* L. germinada em solução de $2,5\text{mg.L}^{-1}$ de mercúrio, por 168h.

A Figura 2.8 mostra a germinação de semente de cebola tratada com 9mg.L^{-1} de cádmio. Verifica-se que a ponta da raiz está escurecida. Possivelmente, esta semente torne-se inviável, pois o processo de necrose foi iniciado. Na Figura 2.9, observa-se o bom desenvolvimento do processo germinativo da semente de cebola incubada com $2,5\text{mg.L}^{-1}$ de mercúrio.

Os resultados obtidos sobre o efeito dos ETs na germinação das sementes de cebola concordam com os da bibliografia científica revisada. Kiran e Sahín (2005) estudaram o efeito do chumbo ($0,125$; $0,250$; $0,5$ e $1,0\text{mM}$ de Pb^{+2}) na germinação, crescimento da raiz e divisão mitótica em *Lens culinaris* Medik (lentilha). A germinação não foi inibida com concentrações de $0,125$ e $0,25\text{mM}$, entretanto, com $0,50$ e $1,0\text{mM}$ de Pb houve decréscimo na germinação das sementes. O crescimento da raiz foi menor à medida que a concentração deste ET foi aumentando.

Os efeitos do Cd (6 e 10mg.L^{-1}), Cu (60 e 150mg.L^{-1}), Pb (100 e 500mg.L^{-1}) e Zn (400 e 800mg.L^{-1}) na germinação e no crescimento radicular em *Alyssum sp.* L. (alissum), *Cuminum cyminum* L. (cominho) e *Salvia officinalis* L. (sálvia) foram estudados por Jeliaskova e Craker (2003). Na presença de 10mg.L^{-1} de Cd o cominho apresentou a menor taxa de germinação ($88,6\%$) e alissum, o menor crescimento de raiz ($6,49\text{mm}$). A sálvia apresentou as menores taxas de

germinação e de crescimento da raiz em 150mg.L^{-1} de Cu (46,8% e 1,0mm, respectivamente). Na presença de 500mg.L^{-1} de Pb, o cominho germinou menos (34,3%) e a sálvia teve o menor crescimento de raiz (4mm). Em 800mg.L^{-1} de Zn, o cominho teve a percentagem de germinação mais baixa (29,9%) e a sálvia, o menor crescimento da raiz (3,8mm). As autoras concluíram que o cominho poderia ser utilizado como indicador de toxicidade em solos contaminados, principalmente para Cd e Pb se a concentração de ETs no solo não exceder 6mg.L^{-1} e 100mg.L^{-1} , respectivamente.

Prakash *et al.* (2004) avaliaram o efeito da água de irrigação adicionada de cromo (0 a 25mg.L^{-1}) na germinação e no crescimento de *R. sativus*. A percentagem de germinação das sementes, assim como o crescimento da planta diminuiu gradualmente conforme o aumento da concentração de cromo.

Os efeitos do acúmulo de Cd (10^{-6} a 10^{-2}M) nas raízes, brotos e bulbos em *A. sativum* foram investigados por Jiang *et al.* (2001). O crescimento das raízes foi estimulado nas concentrações mais baixas (10^{-6} e 10^{-5}M), durante todo o tratamento. Já nas demais concentrações (10^{-4} a 10^{-2}M), houve redução no crescimento das mesmas. O conteúdo de Cd, nas raízes, aumentou com o aumento da concentração deste ET, nas seguintes proporções: 1.826, 114, 59, 24 e 4 vezes o controle, respectivamente para 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}M . No entanto, o transporte para os brotos e bulbos foi pequeno para todas as concentrações.

3.2. Avaliação citogenética dos meristemas de raiz de cebola submetidos à ação de elementos-traço

3.2.1. Efeito dos elementos-traço no ciclo celular de células meristemáticas de raiz de cebola

Ao observar a Tabela 2.2, constata-se que a testemunha apresentou a menor frequência de células em interfase, diferindo significativamente ($\alpha=0,05$) de todos os ETs. Conseqüentemente, a testemunha deverá apresentar a maior

freqüência de células em divisão, o que, biologicamente é o esperado, pois as sementes não sofreram nenhuma ação tóxica, nem genotóxica.

Na Tabela 2.2, verifica-se, também, a toxicidade do cromo, que nas quatro maiores concentrações (150; 200; 250 e 300mg.L⁻¹) diferiram significativamente ($\alpha=0,05$) dos demais elementos-traço, por apresentar maior freqüência de células interfásicas (98,80; 99,30; 99,43 e 99,80%, respectivamente). Isto corresponderá respectivamente a 1,20; 0,70; 0,57 e 0,20% de células em mitose, o que equivale a baixíssimas freqüências de divisão celular, comparadas com a da Testemunha que deverá ser de 12.84%, ou seja, aproximadamente 11 a 64 vezes maior.

A Testemunha apresentou a maior freqüência de células em prófase (3,64%), diferindo significativamente ($\alpha=0,05$) de todos os ETs (Tabela 2.3), seguida por Hg 0,25 e Hg 0,5mg.L⁻¹ com 2,47 e 2,40%, respectivamente, ambas diferiram da Testemunha, mas não diferiram entre si. O cromo, nas duas concentrações mais altas (250 e 300mg.L⁻¹), apresentou a menor freqüência de células em prófase (0,10% para ambas as concentrações).

Nas células em pró-metáfase (Tabela 2.4), observa-se que ocorreu o mesmo que nas células em prófase (Tabela 2.3), onde a testemunha diferiu dos tratamentos contendo os ETs. O Hg 0,25 e o Hg 0,5mg.L⁻¹ (2,20 e 2,00%, respectivamente), não diferiram entre si, sendo que o Cr 300mg.L⁻¹ apresentou a pior freqüência (0,03%), diferindo estatisticamente ($\alpha=0,05$) dos demais, não diferindo, porém do Cr 250mg.L⁻¹, o qual também apresentou baixíssima freqüência de células em pró-metáfase (0,10%).

A Testemunha apresentou 2,26% de células em metáfase, não diferindo apenas de Hg 0,5 e Hg 0,25mg.L⁻¹, ambos com 1,90% de células metafásicas (Tabela 2.5). Já, o Cr 300 e o Cr 250mg.L⁻¹ apresentaram as menores freqüências médias (0,03 e 0,10%).

As células em anáfase, apresentadas na Tabela 2.6, mostram que a testemunha diferiu significativamente dos ETs (2,12%), exceto Hg 1,0mg.L⁻¹ (1,80%). Cr 300mg.L⁻¹ também diferiu significativamente dos demais, pois não apresentou células anafásicas, enquanto que Cr 100 e Cr 200mg.L⁻¹ tiveram apenas 0,10% de células em anáfase.

Também, para as células em telófase (Tabela 2.7), a Testemunha apresentou a melhor frequência (2,06%) e o Cr 300mg.L⁻¹ a pior (0,03%), ambas as duas estatisticamente diferentes das demais analisadas.

No índice mitótico de células de ponta de raiz de cebola (Tabela 2.8), a testemunha (IM=0,128) diferiu, significativamente, dos ETs ($\alpha=0,05$), isto quer dizer que ocorreram mais divisões quando as sementes foram tratadas apenas com água, corroborando o que já havia sido observado nas diversas fases da divisão celular (Tabelas 2.3 a 2.7). Já que o índice mitótico é considerado um parâmetro que reflete a frequência da divisão celular e, conseqüentemente, a velocidade do crescimento dos meristemas, também, conforme esperado, na presença de concentrações altas de cromo, ocorreu o contrário, o IM foi extremamente baixo: Cr 300mg.L⁻¹ (IM=0,002) diferiu estatisticamente de todos os demais ETs e, inclusive, de Cr 250 e de Cr 200mg.L⁻¹ (IM=0,006 e 0,007, respectivamente), que não diferem entre si, mas diferem significativamente dos demais.

Tabela 2.2 - Células em interfase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em interfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Cr	300	99,80	A
2	Cr	250	99,43	Ab
3	Cr	200	99,30	Ab
4	Cr	150	98,80	Abc
5	Cd	9,0	98,50	Bc
6	Cr	100	98,07	C
7	As	20,0	98,00	C
8	Pb	300	96,83	D
9	As	7,5	96,83	D
10	Pb	200	96,80	D
11	As	15,0	96,80	D
12	Cd	5,0	96,70	D
13	Cd	7,0	96,50	De
14	Pb	250	96,17	Def
15	As	10,0	96,10	Def
16	Pb	150	95,77	Defg
17	Pb	100	95,57	Efgh
18	As	5,0	95,47	Efgh
19	As	2,5	95,27	Fghi
20	Cd	3,0	95,27	Fghi
21	Hg	2,0	94,97	Ghi
22	Cd	0,5	94,63	Hij
23	Hg	2,5	94,23	Ij
24	Pb	50	94,20	Ij
25	Cd	1,0	93,83	J
26	Hg	1,5	92,50	K
27	Cr	50	91,63	Kl
28	Hg	1,0	91,40	Lm
29	Hg	0,5	90,80	Lm
30	Hg	0,25	90,57	M
31	Testem	0,0	87,16	N

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao, nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.3 - Células em prófase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em prófase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	3,64	A
2	Hg	0,25	2,47	B
3	Hg	0,5	2,40	Bc
4	Hg	1,0	2,07	Cd
5	Cr	50	2,03	D
6	Hg	1,5	2,00	D
7	Hg	2,0	1,60	E
8	Hg	2,5	1,57	E
9	Cd	1,0	1,23	F
10	As	5,0	1,13	Fg
11	Pb	150	1,12	Fg
12	Pb	100	1,10	Fg
13	Cd	0,5	1,10	Fg
14	Cr	100	1,03	Fgh
15	Pb	50	1,00	Fghi
16	As	2,5	0,90	Ghij
17	Pb	250	0,83	Hij
18	Pb	200	0,79	Hij
19	Cd	5,0	0,77	Ijk
20	As	7,5	0,77	Ijk
21	Pb	300	0,67	Jk
22	As	15,0	0,57	Kl
23	As	10,0	0,57	Kl
24	Cd	3,0	0,56	Kl
25	As	20,0	0,47	Lm
26	Cd	7,0	0,38	Mn
27	Cr	150	0,27	No
28	Cr	200	0,16	Op
29	Cd	9,0	0,16	Op
30	Cr	300	0,10	P
31	Cr	250	0,10	P

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.4 - Células em pró-metáfase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em pró-metáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,69	A
2	Hg	0,25	2,20	B
3	Hg	0,5	2,00	Bc
4	Cr	50	1,80	Cd
5	Hg	1,0	1,73	Cd
6	Hg	1,5	1,57	D
7	Hg	2,5	1,26	E
8	Pb	100	1,03	Ef
9	Pb	50	1,03	Ef
10	Hg	2,0	1,03	Ef
11	Cd	1,0	0,90	Fg
12	Pb	150	0,89	Fg
13	Cd	0,5	0,86	Fg
14	As	5,0	0,80	Fg
15	Pb	250	0,77	Gh
16	As	2,5	0,76	Gh
17	Pb	200	0,72	Ghi
18	Pb	300	0,70	Ghij
19	Cd	5,0	50,7	Hijk
20	Cd	3,0	0,53	Ijk
21	As	10,0	0,53	Ijk
22	As	20,0	0,50	Jk
23	Cr	100	0,50	Jk
24	As	7,5	0,50	Jk
25	As	15,0	0,43	K
26	Cd	7,0	0,41	K
27	Cr	150	0,27	L
28	Cd	9,0	0,20	Lm
29	Cr	200	0,16	Lm
30	Cr	250	0,10	Mn
31	Cr	300	0,03	N

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.5 - Células em metáfase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em metáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,26	A
2	Hg	0,5	1,90	Ab
3	Hg	0,25	1,90	Ab
4	Hg	1,0	1,70	Bc
5	Hg	1,5	1,63	Bcd
6	Cd	1,0	1,56	Bcd
7	Cr	50	1,53	Cde
8	Pb	50	1,38	Cdef
9	Cd	0,5	1,33	Def
10	Cd	3,0	1,23	Efg
11	As	10,0	1,16	Fgh
12	As	2,5	1,13	Fghi
13	Hg	2,5	1,03	Ghij
14	As	5,0	0,97	Ghijk
15	As	7,5	0,93	Hijkl
16	Hg	2,0	0,93	Hijkl
17	Pb	150	0,87	Ijkl
18	As	15,0	0,87	Ijkl
19	Pb	100	0,87	Ijkl
20	Pb	250	0,83	Jklm
21	Cd	7,0	0,73	Klmn
22	Pb	300	0,70	Lmn
23	Cd	5,0	0,69	Lmn
24	Pb	200	0,60	Mno
25	Cd	9,0	0,56	No
26	As	20,0	0,43	O
27	Cr	150	0,23	P
28	Cr	100	0,16	P
29	Cr	200	0,16	P
30	Cr	250	0,10	Pq
31	Cr	300	0,03	Q

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.6 - Células em anáfase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em anáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,12	A
2	Hg	1,0	1,80	Ab
3	Hg	0,25	1,65	Bc
4	Hg	0,5	1,60	Bc
5	Cd	1,0	1,60	Bc
6	Cr	50	1,50	Bcd
7	Pb	50	1,43	Cde
8	Hg	1,5	1,33	Cdef
9	Cd	3,0	1,32	Cdef
10	Cd	0,5	1,20	Defg
11	Hg	2,5	1,17	Efg
12	As	2,5	1,06	Fgh
13	As	10,0	1,00	Ghi
14	Cd	7,0	0,96	Ghij
15	As	5,0	0,86	Hijk
16	Hg	2,0	0,85	Hijk
17	As	15,0	0,80	Hijkl
18	Pb	100	0,77	Ijkl
19	Pb	150	0,73	Jklm
20	Pb	250	0,73	Jklm
21	Cd	5,0	0,63	Klm
22	Pb	200	0,60	Lmn
23	Pb	300	0,57	Lmn
24	As	7,5	0,53	Mn
25	Cd	9,0	0,40	No
26	As	20,0	0,30	O
27	Cr	150	0,25	Op
28	Cr	250	0,13	Pq
29	Cr	100	0,10	Q
30	Cr	200	0,10	Q
31	Cr	300	0,00	R

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.7 - Células em telófase, de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de cebola em telófase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,06	A
2	Cr	50	1,50	B
3	Hg	1,0	1,30	B
4	Hg	0,5	1,20	Bc
5	Hg	0,25	1,19	Bc
6	Cd	3,0	1,19	Bc
7	Hg	1,5	0,96	Cd
8	Pb	50	0,93	Cde
9	As	2,5	0,87	Def
10	Cd	0,5	0,86	Def
11	Cd	1,0	0,86	Defg
12	As	5,0	0,76	Defgh
13	Hg	2,5	0,73	Defgh
14	Pb	100	0,66	Efghi
15	Pb	250	0,65	Efghij
16	Cd	5,0	0,63	Fghij
17	As	10,0	0,62	Fghij
18	Hg	2,0	0,59	Ghij
19	Pb	150	0,59	Ghij
20	Cd	7,0	0,53	Hij
21	Pb	300	0,53	Hij
22	Pb	200	0,46	Ijk
23	As	15,0	0,43	Ijkl
24	As	7,5	0,42	Jkl
25	Cd	9,0	0,30	Klm
26	As	20,0	0,25	Lmn
27	Cr	150	0,16	Mno
28	Cr	250	0,13	Nop
29	Cr	100	0,13	Nop
30	Cr	200	0,10	Op
31	Cr	300	0,03	P

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

Tabela 2.8 - Índice mitótico de células de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com os elementos-traço cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Índice mitótico	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	0,128	A
2	Hg	0,25	0,094	B
3	Hg	0,5	0,092	B
4	Hg	1,0	0,086	Bc
5	Cr	50	0,084	Bc
6	Hg	1,5	0,075	C
7	Cd	1,0	0,062	D
8	Pb	50	0,058	De
9	Hg	2,5	0,058	De
10	Cd	0,5	0,054	Def
11	Hg	2,0	0,050	Ef
12	Cd	3,0	0,048	Ef
13	As	2,5	0,047	Fg
14	As	5,0	0,045	Fgh
15	Pb	100	0,044	Fgh
16	Pb	150	0,044	Fgh
17	As	10,0	0,039	Ghi
18	PB	250	0,038	Hij
19	Cd	5,0	0,033	Ij
20	Pb	200	0,032	Ij
21	Pb	300	0,032	Ij
22	As	7,5	0,032	Ij
23	As	15,0	0,031	Ij
24	Cd	7,0	0,030	J
25	As	20,0	0,020	K
26	Cr	100	0,019	K
27	Cd	9,0	0,016	Kl
28	Cr	150	0,012	L
29	Cr	200	0,007	M
30	Cr	250	0,006	M
31	Cr	300	0,002	N

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si, ao nível de 5%, pelo teste de Duncan

3.2.2. Alterações citogenéticas em células meristemáticas de raiz de cebola devidas aos efeitos de elementos-traço

Nas figuras seguintes, visualizam-se diversas anomalias cromossômicas em células meristemáticas de raiz de cebola devidas aos efeitos de diversos ETs nas diferentes concentrações utilizadas (Tabela 2.1). As alterações acontecem já, na interfase, onde, observam-se núcleos aparentemente compartimentalizados, formando interfases anômalas (Figura 2.10).

Na figura 2.11, observa-se prófase anormal na presença de $1,0\text{mg.L}^{-1}$ de mercúrio. Igualmente, visualiza-se na Figura 2.12, na presença de 10mg.L^{-1} de arsênio, prófase anormal. O efeito danoso dos elementos-traço é observado na Figura 2.14, na presença de 15mg.L^{-1} de arsênio, uma C-metáfase. Na Figura 2.15 anáfase normal com semente germinada em 100mg.L^{-1} cromo. Já na Figura 2.16 observam-se fragmentos de cromossomos, e na Figura 2.17 vê-se uma anáfase com três pontes e um cromossomo isolado em 10 mg.L^{-1} de arsênio.

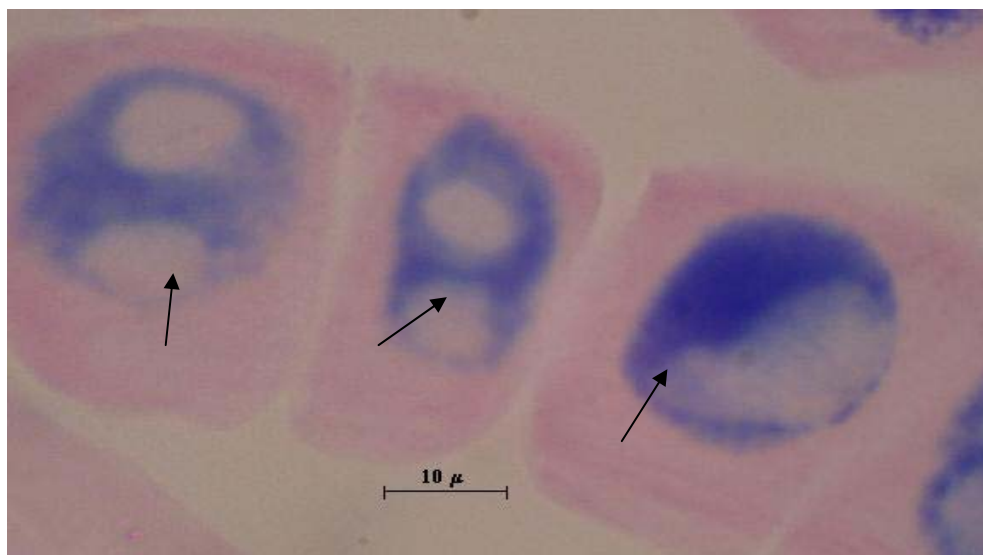


Figura 2.10 - Células de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L. germinada em solução de 7mg.L^{-1} de cádmio por 168h, mostrando interfases anômalas.

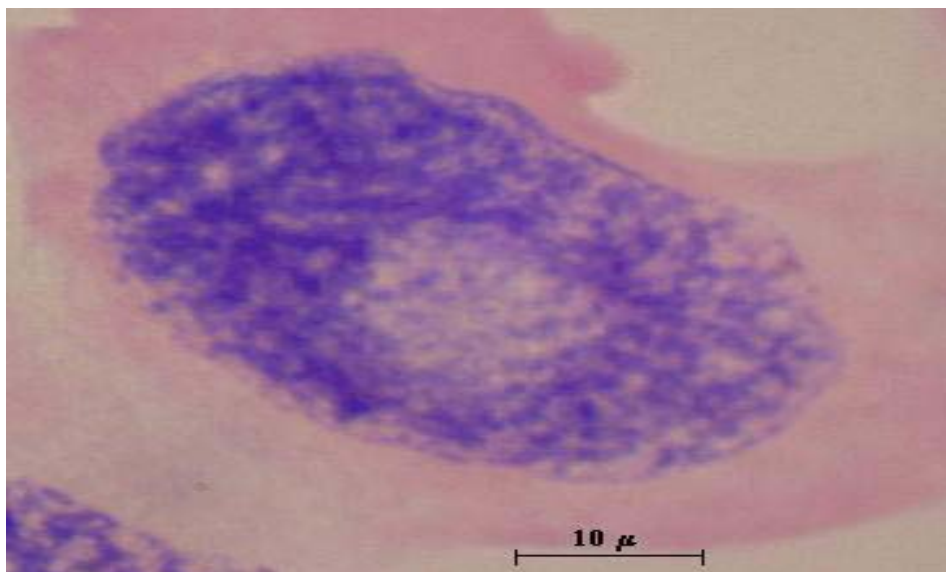


Figura 2.11 - Célula anômala, em prófase, de células de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em mercúrio $1,0\text{mg.L}^{-1}$ por 168h.

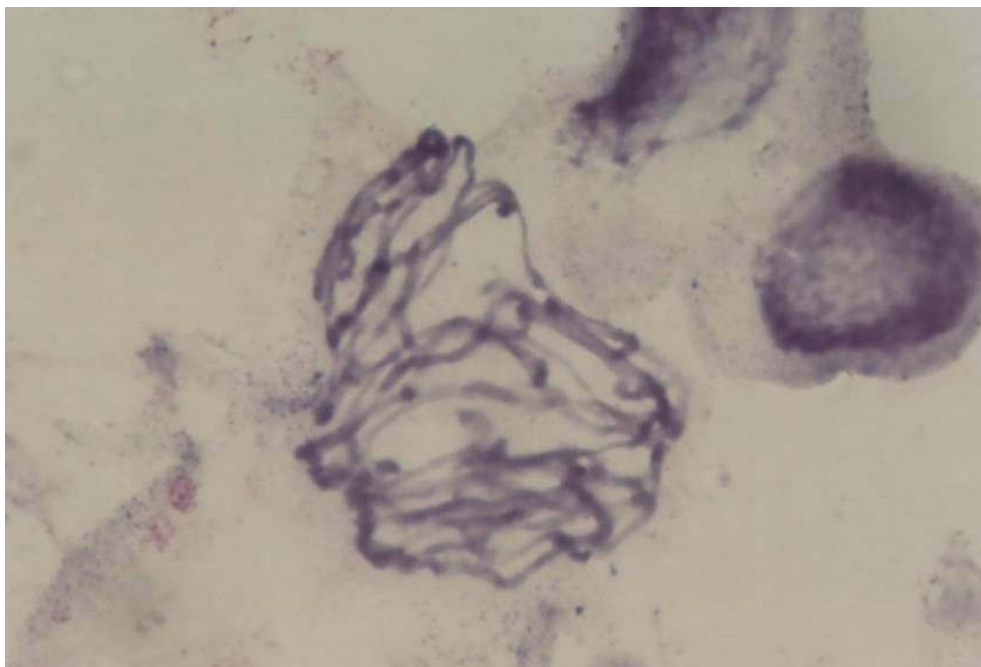


Figura 2.12 - Prófase anormal de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em solução com 10mg.L^{-1} de arsênio por 168h.

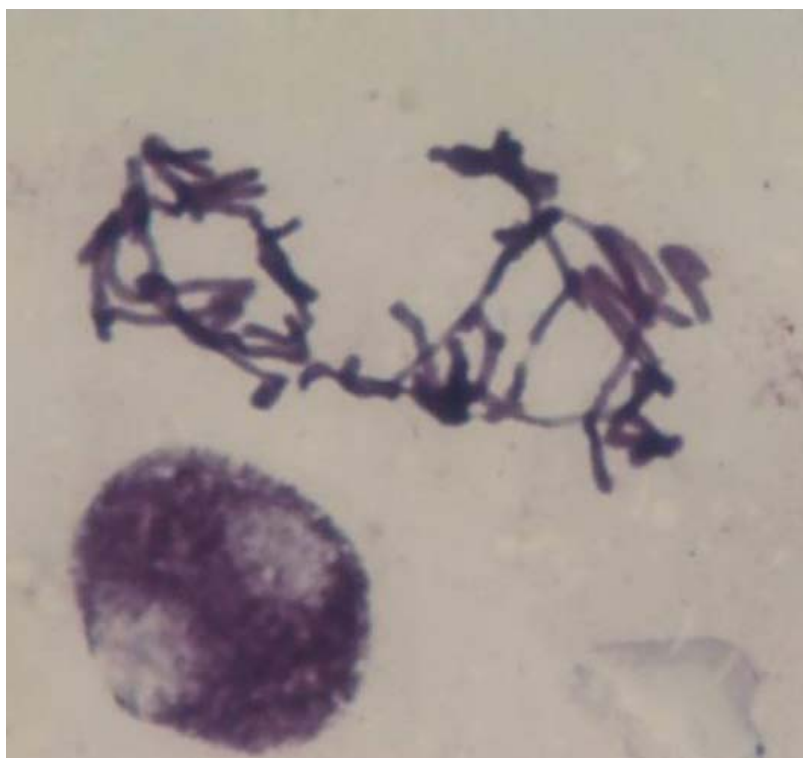


Figura 2.13 - Prófase com distribuição de cromossomos anormal em célula de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em solução com 10mg.L^{-1} de arsênio por 168h

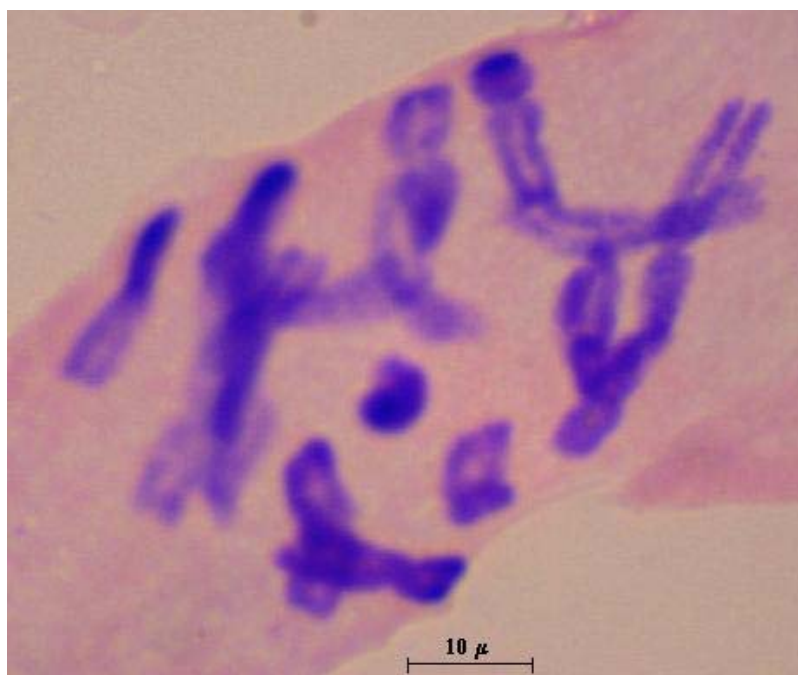


Figura 2.14 - C-metáfase de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em solução de 15mg.L^{-1} de arsênio por 168h.



Figura 2.15 - Célula em anáfase normal de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em cromo 100mg.L^{-1} por 168h.

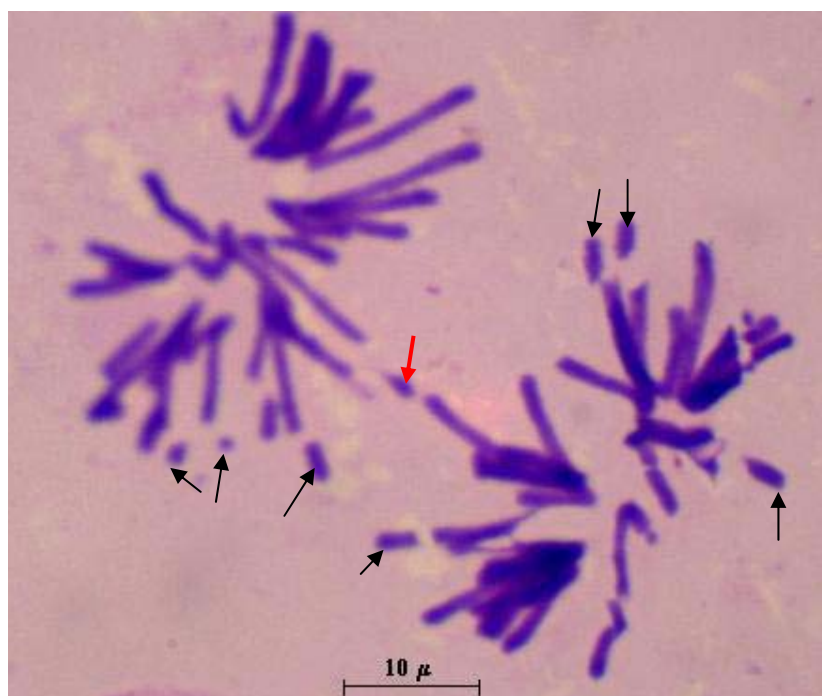


Figura 2.16 - Célula de raiz de semente de *Allium cepa* L., em anáfase germinada em solução com 10mg.L^{-1} de arsênio por 168h, mostrando fragmento de cromossomo (↓) devido à ruptura de ponte anafásica e vários fragmentos acêntricos (↓).



Figura 2.17 - Célula de meristema de raiz de semente de *Allium cepa* L., germinada em solução com 10mg.L^{-1} de arsênio por 168h, mostrando anáfase tripolar com pontes (↓) e cromossomo isolado (↓).

A Tabela 2.9 mostra a frequência de alterações cromossômicas observada em células meristemáticas de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com diferentes concentrações dos elementos-traço estudados.

Flora *et al.* (1994) analisaram a genotoxicidade dos compostos de Hg em diversos organismos procariontes e eucariontes e concluíram que este ET induz mutações, clastogenia em células eucarióticas, inibe a ação do fuso mitótico, causa C-mitoses e, conseqüentemente, poliploidia e aneuploidia.

Marcano *et al.* (1999) avaliaram o índice mitótico em raiz de cebola exposta a cádmio (7, 10, 15 e 20ppm), tendo verificado que a partir de Cd 7ppm houve diminuição altamente significativa do IM. Ao analisar o tempo de exposição, em horas, juntamente com a concentração de Cd, os resultados demonstraram que o maior efeito tóxico ocorre em concentrações menores com maior tempo de exposição. Demonstraram, também, uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre o comprimento da raiz, a concentração de cádmio e o tempo de exposição. O efeito do tempo de exposição do Cd foi 1,58 vezes maior que o efeito de sua concentração.

Tabela 2.9 - Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de ponta de raiz de *Allium cepa* L. tratada com diferentes concentrações dos elementos-traço cádmio, arsênio, chumbo, cromo e mercúrio

Elementos-traço (mg.L ⁻¹)	Alterações Cromossômicas (%)			
	Pontes	C-mitoses	Cromossomos aderidos	Micronúcleos
Testemunha	-	-	0,03	-
Cd 0,5	0,10	-	0,10	-
Cd 1,0	0,23	0,26	0,23	-
Cd 3,0	0,16	0,26	0,23	0,03
Cd 5,0	0,03	0,07	0,23	-
Cd 7,0	0,23	0,13	0,20	0,07
Cd 9,0	0,23	0,40	0,33	-
As 2,5	-	0,16	0,03	-
As 5,0	0,07	0,23	0,26	-
As 7,5	0,23	0,40	0,30	0,07
As 10,0	0,13	0,33	0,10	0,03
As 15,0	-	0,30	0,30	-
As 20,0	0,07	0,96	0,30	-
Pb 50	0,07	0,33	-	-
Pb 100	-	0,13	-	-
Pb 150	0,10	0,20	0,03	-
Pb 200	0,10	0,10	0,03	-
Pb 250	0,30	0,07	0,20	-
Pb 300	0,10	0,10	0,03	-
Cr 50	0,26	0,07	0,03	0,07
Cr 100	-	0,10	0,03	-
Cr 150	-	0,40	-	-
Cr 200	-	0,13	0,03	-
Cr 250	-	0,03	-	-
Cr 300	-	0,03	0,07	-
Hg 0,25	-	0,07	0,03	-
Hg 0,5	0,07	0,07	-	0,07
Hg 1,0	0,13	0,16	0,07	-
Hg 1,5	0,16	0,03	0,03	-
Hg 2,0	0,03	0,03	0,07	-
Hg 2,5	0,16	-	0,23	-

(-) não existência

Este mesmo grupo de pesquisadores (Marcano *et al.*, 2001) estudou as alterações citológicas induzidas por cádmio (3,4; 7,4 e 9,9x10⁻⁵M) nas células meristemáticas das raízes de cebola, por 4, 8, 12 e 24h. Com a concentração mais baixa, não ocorreram mudanças morfológicas em nenhum dos tempos. Em

concentração de $7,4 \times 10^{-5} \text{M}$, com 12h de exposição, foram observadas células de formas variadas (quadradas e ovóides, entre outras), inclusive com depressões na sua superfície. Com o aumento do tempo de exposição, as depressões na superfície da célula se acentuaram parecendo perfurações na superfície. Com concentração de $9,9 \times 10^{-5} \text{M}$ e 24h de exposição, estas depressões e perfurações ficaram parecendo vacúolos. O núcleo apresentou-se pseudolobulado com a cromatina condensada, na presença de $7,4 \times 10^{-5} \text{M}$ de cádmio e 12h de tempo de exposição.

A cultivar 'Baia Periforme' apresenta uma boa constância de divisão celular, pois esta mesma cultivar de cebola foi utilizada por Molina *et al.* (2006) para um experimento de avaliação de técnicas de crioconservação de sementes e a testemunha apresentou frequências de interfase (86,19%) e IM (12,8%) semelhantes às obtidas para a testemunha do presente trabalho.

Kiran e Sahín (2005) estudaram o efeito do chumbo (0,125; 0,250; 0,5 e 1,0mM de Pb^{+2}) na germinação, crescimento da raiz e divisão mitótica em *L. culinaris*. A divisão mitótica diminuiu consideravelmente e aparecem inúmeras anormalidades cromossômicas tais como C-mitoses, micronúcleos, pontes anafásicas, cromossomos perdidos e metáfases multipolares.

O efeito do crescimento de plantas de ervilha na presença de cloreto de cádmio com concentrações que variaram de 0 a 50 μM foi estudado por Sandalio *et al.* (2001). O cádmio inibiu o crescimento das raízes e das folhas, diminuiu a taxa da fotossíntese e da transpiração. As plantas tratadas com 50 μM de cloreto de cádmio apresentaram folhas com distúrbio caracterizado pelo aumento do tamanho das células do mesófilo, bem como a redução dos espaços intercelulares.

Lerda (1992) encontrou que o chumbo reduz o crescimento radicular, a frequência de células em mitose e o aumento da ocorrência de anormalidades cromossômicas em *A. cepa*. A intensidade do efeito está diretamente relacionada com a concentração do chumbo.

O arsênico (As), aplicado em ápices vegetativos de *A. cepa*, levou à necrose da zona meristemática e à redução da zona de alongamento. Ocasionalmente, também, a redução do índice mitótico e alterações citológicas, tais como o

aparecimento de células multinucleadas, binucleadas e formação de micronúcleos, o que sugere segregação incorreta dos cromossomos e, em alguns casos, inibição da divisão celular, o que se correlaciona com a redução da taxa de crescimento radicular (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Marcano *et al.* (2001) estudaram as alterações citológicas induzidas por diferentes concentrações de cádmio (6,23; 13,56 e 18,15mg.L⁻¹) em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Concluíram que o cádmio (Cd) produziu efeito citotóxico nos meristemas, apresentando perigo para a saúde humana. As alterações celulares foram morfológicas e estruturais, dentre as quais foram observadas vacuolização do citoplasma, dilatação das membranas celulares, pseudolobulação do núcleo, condensação da cromatina e nucléolos colapsados. As três últimas alterações citadas caracterizam a necrose celular, sendo que esse efeito aumentou com o acréscimo tanto da concentração de Cd, quanto do tempo de exposição a este elemento-traço (ET).

Zayed *et al.* (1998) determinaram o acúmulo de cromo (Cr) em diferentes hortaliças, dentre as quais a alface (*Lactuca sativa* L.) e a cebola *A. cepa* L. As concentrações utilizadas foram 1 e 2mg.L⁻¹ de Cr e os resultados indicaram que o Cr VI é convertido em Cr III na raiz de todas as plantas testadas. Pelo fato da translocação deste ET, da raiz para a parte aérea das plantas, ser pequena, o acúmulo do mesmo foi 100 vezes maior nas raízes do que nos brotos das plantas. As hortaliças da família Brassicaceae foram as que apresentaram maior acúmulo de Cr.

Liu e Kottke (2003) estudaram, em cebola, a localização de cromo mais níquel, ambas nas concentrações 10 e 100µM.L⁻¹. Foram observadas, na maior concentração estudada, algumas mudanças na estrutura das células. Houve maior deposição dos elementos-traço (ETs) nas paredes celulares, maior desintegração das organelas celulares e surgimento de grande número de vacúolos.

Células de raiz de *A. cepa* foram expostas a 1 e 10mM de Cd por 48 e 72h. Os resultados indicaram que o Cd induziu várias mudanças na estrutura celular: aumento do número de vacúolos, redução das cristas mitocondriais, adensamento da matriz citoplasmática, grande condensação da cromatina

nuclear, acentuada plasmólise e altos níveis de Cd nos nucléolos. Entretanto, nas raízes, o Cd não foi encontrado nas paredes celulares e nem nas células do cilindro vascular (LIU e KOTTKE, 2004).

Os efeitos de diferentes concentrações de cádmio foram investigados por Liu *et al.* (2004) em *Allium sativum* L. (alho), tendo sido observado que o índice mitótico decresceu progressivamente com o aumento da concentração e duração do tratamento, exceto na concentração de 10^{-7} M. A frequência de células com C-mitoses aumentou com o incremento da concentração e do tempo de exposição. Na interfase, foram observadas células com micronúcleos, após 48 horas de tratamento, em concentração de 10^{-7} M. Conforme aumentou o tempo de exposição ocorreu maior desintegração do núcleo, ocasionando, inclusive, a morte celular.

A genotoxicidade, citotoxicidade e peroxidação lipídica causadas pelo Cd (1, 10, 100 e 200 μ M) em *A. sativum* e *Vicia faba* L. (fava) foram estudadas por Unyayar *et al.* (2006), os quais verificaram que houve diminuição do índice mitótico e atraso nas fases da mitose em ambos os vegetais. Sendo que, na fava, ocorreu aumento da peroxidação lipídica, fato que contribuiu para aumentar a citotoxicidade do Cd.

A análise comparativa da influência dos sais de cádmio, chumbo, níquel, alumínio, cobre e zinco, nas concentrações de 10^{-6} e 10^{-3} M, em *A. cepa*, foi feita por Dovgaliuk *et al.* (2001). Os efeitos clastogênicos e aneugênicos constatados posicionaram-se em ordem decrescente: $\text{ZnSO}_4 > \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 > \text{Al}(\text{NO}_3)_3 = \text{NiSO}_4 > \text{CdCl}_2 > \text{CuSO}_4$. As anomalias visualizadas foram anáfases multipolares, cromossomos fora da placa ou retardatários e C-mitoses. Os autores sugeriram que o citoesqueleto foi afetado pelo NiSO_4 (sulfato de níquel), devido à sua capacidade 69,6 vezes maior de inibir o fuso do que o controle.

Os efeitos do acúmulo de Cd (10^{-6} a 10^{-2} M) nas raízes, brotos e bulbos em *A. sativum* foram investigados por Jiang *et al.* (2001). O Cd estimulou o crescimento das raízes nas concentrações mais baixas (10^{-6} e 10^{-5} M), durante todo o tratamento. Já, nas concentrações mais altas (10^{-4} a 10^{-2} M) houve redução no crescimento das raízes. Nas raízes, o conteúdo de Cd aumentou 1.826, 114, 59, 24 e 4 vezes o valor do controle, relativo ao aumento da concentração deste

elemento, na seguinte proporção 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} M, respectivamente. No entanto, o transporte para os brotos e bulbos foi pequeno.

Chugh e Sawhney (1996) estudaram o efeito de 0,25mM de Cd em *Pisum sativum* L. (ervilha) e constataram que a germinação e a elongação da radícula foram afetadas. Esse elemento-traço causou, também, a supressão da respiração das sementes.

Munzuroglu e Geckil (2002) avaliaram o efeito do cádmio, do mercúrio e do chumbo, em concentrações de 0,5 a 8mM, na germinação de sementes, na elongação da raiz e no crescimento do coleóptilo e do hipocótilo nas culturas de *Triticum aestivum* L. (trigo) e *Cucumis sativus* L. (pepino). De modo geral houve decréscimo nos comprimentos da raiz e do coleóptilo do trigo; a partir de 1,2mM de Hg não ocorreu germinação e a partir de 1,4mM não houve emissão de coleóptilo. Com concentração igual ou maior que 1,0mM de Hg, as sementes de pepino não germinaram e não ocorreu a emissão do hipocótilo. Em trigo, com concentração de Cd acima de 2,0mM, as sementes não germinaram e nem houve a emissão do coleóptilo. Para pepino, nas concentrações acima de 2,5mM de Cd, o processo de germinação não ocorreu, nem a emissão do hipocótilo. Já com Pb, ocorreu decréscimo em todos os processos analisados. A relação entre a germinação e a concentração do chumbo foi inversamente proporcional em ambas as culturas estudadas.

Frente aos evidentes problemas causados pela contaminação com os elementos-traço, torna-se necessário uma legislação nacional que regule e órgãos de fiscalização eficientes que controlem a produção e o uso de agrotóxicos, além das outras fontes poluidoras no Brasil.

CAPÍTULO 3

**GERMINAÇÃO E CICLO CELULAR EM *Lactuca sativa* L. SOB DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS-TRAÇO ARSÊNIO, CÁDMIO,
CHUMBO, CROMO E MERCÚRIO.**

1. INTRODUÇÃO

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea, anual, pertencente à família Asteraceae, sendo considerada a hortaliça folhosa mais importante na alimentação dos brasileiros, o que assegura a essa cultura, expressiva importância econômica (YURI *et al.* 2002).

Os ensaios ecotoxicológicos são importantes para avaliar o nível de prejuízo ambiental dos elementos-traço (ETs), sendo que os ensaios de fitotoxicidade com germinação de sementes são simples e versáteis. A alface é a planta mais comum como espécie alvo, devido tanto ao pequeno período requerido para sua germinação (24 a 48 horas), quanto para as etapas de seu crescimento; seja para o enraizamento, cerca de 7 dias, seja para o transplante da muda, em torno de 15 dias (RODRIGUES, 2003).

Para Barceló e Poschenrieder (1992), nem todos os órgãos das plantas possuem a mesma sensibilidade quanto ao acúmulo de elementos-traço, normalmente, a raiz é o órgão prioritário de absorção e acúmulo desses metais pesados.

Santos *et al.* (1999) analisaram os teores de metais pesados (Pb, Mn, Cu e Zn), de K e de Na, no substrato, em função de doses de composto orgânico de lixo urbano após a colheita de quatro cultivares de alface (Brasil 48, Regina 71, Vitória Verde Clara e Grand Rapids). As doses de lixo urbano usadas foram: 0; 17,5; 35; 52,5t.ha⁻¹. Os resultados obtidos mostraram que quanto maior a dose de composto de lixo urbano, maior o teor de Cu, Mn, Pb, Zn, K, Na, maior a condutividade elétrica e o pH do substrato após o cultivo.

Mantovani *et al.* (2003) estudaram o efeito da adição de um vermicomposto oriundo de lixo urbano e da calagem na matéria seca e na concentração de metais pesados na parte aérea de plantas de alface, cultivar

Mesa 659. Em um dos ensaios, foi utilizado um latossolo vermelho distroférico e, em outro, um argissolo vermelho-amarelo eutrófico. O vermicomposto de lixo urbano apresentou os seguintes teores de metais pesados, em mg.Kg^{-1} , base seca: $\text{Cd} < 1$; $\text{Ni} = 18$; $\text{Pb} = 122$; $\text{Cu} = 197$; $\text{Fe} = 32000$; $\text{Mn} = 272$ e $\text{Zn} = 455$. As doses de corretivos da acidez foram estimadas para obter índices de saturação por bases (V%) iguais a 40, 50, 60, 70 e 80, a relação Ca:Mg empregada foi igual a 4:1 para o solo argiloso e 2:1 para o arenoso. As doses de vermicomposto adicionadas foram correspondentes a 0, 25, 50, 75 e 100 t.ha^{-1} , com base no peso seco. O vermicomposto e a calagem afetaram significativamente a produção de matéria seca de alface em ambos os solos. Os teores de Cd, Ni, Cu e Zn na parte aérea da alface aumentaram significativamente com o aumento das doses do vermicomposto de lixo urbano no latossolo vermelho distroférico. No solo arenoso, o vermicomposto aumentou significativamente a concentração, apenas de Cd e Cu na parte aérea da alface.

Mendes *et al.* (2006) observaram a germinação de sementes de alface sob diferentes concentrações de elementos-traço Cr (50 a 500 mg.L^{-1}), Pb (50 a 300 mg.L^{-1}) e As (5 a 20 mg.L^{-1}). À medida que a concentração de Cr e As aumentava ocorria um decréscimo significativo na percentagem de germinação. Em relação ao Pb, ocorreu diminuição pouco significativa da germinação das sementes de alface.

Acumulação de Cd (0, 1, 5, 10 e 20 mg.Kg^{-1}) e seus efeitos sobre o rendimento de *L. sativa*, *Raphanus sativus* L. (rabanete) e *Cucumis sativus* L. (pepino) foram estudados por Moustakas *et al.* (2001). Não foram verificados sintomas de toxicidade, porém houve aumento da concentração de Cd nas partes comestíveis das plantas. O rendimento da alface foi reduzido sob o efeito de taxas superiores a 10 mg.Kg^{-1} de Cd, o mesmo não aconteceu nas demais culturas. Em torno de 5 a 43% de Cd fica acumulado nas partes comestíveis da alface e do pepino, respectivamente.

Patra *et al.* (2004) compararam os efeitos genotóxicos do mercúrio, chumbo e arsênio em plantas. Observaram que todos os ETs citados induzem alterações na estrutura cromossômica, distúrbios no fuso, indução de C-mitoses, entre outras anomalias. O efeito do chumbo depende da concentração, do tempo

de exposição, das propriedades do solo e da espécie vegetal. Em geral, os efeitos são mais pronunciados em concentrações mais elevadas e com maior tempo de exposição. Em alguns casos, concentrações menores estimulam os processos metabólicos. Os principais processos fisiológicos afetados são: a germinação das sementes, o crescimento das plântulas, a fotossíntese e as atividades enzimáticas, pois o chumbo reduz a absorção e o transporte de nutrientes e diminui o tamanho dos estômatos. Já, os sintomas visíveis são manchas cloróticas, necroses e lesões foliares, senescência das folhas e raquitismo das plantas. A fitotoxicidade do arsênio é afetada por sua forma química, pelo tipo de solo e pela dosagem utilizada. Via de regra, este ET inibe a atividade de algumas enzimas, por reagir com o grupo sulfidril das proteínas e concorre com o fósforo, causando a deficiência deste elemento. Os sintomas, devidos ao arsênio, são cor vermelho escuro nas folhas e, nas plantas, menor perfilhamento, menor altura, menor número de folhas e área foliar, menor número de vagens e produção de matéria seca das culturas agrícolas e hortícolas. O mercúrio afeta a fotossíntese, inibe o crescimento das raízes, perturba a integridade das membranas, aumentando a permeabilidade das mesmas.

O chumbo provoca mudanças na permeabilidade das membranas celulares e interfere nas reações com grupos tióis, além de apresentar afinidade para reagir com grupamentos fosfatos e grupos ativos de ADP e ATP (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001).

O arsênio induz a formação de micronúcleos, aberrações cromossômicas e trocas entre as cromátides irmãs, além disso, possui efeito clastogênico e aneugênico em células de camundongos. Em mamíferos atua no mecanismo de reparo do DNA através de ação indireta, por isso, ainda não foi determinada a relação dose-resposta (GEBEL, 2001). Burguera e Burguera (1993) asseguram que o arsênio existe na natureza numa variedade de formas químicas, incluindo espécies orgânicas e inorgânicas, como resultado de sua participação em complexos biológicos, processos químicos e algumas aplicações industriais. Encontra-se este ET em herbicidas, inseticidas e desfoliantes.

O trabalho permitiu avaliar as consequências citotóxicas e os efeitos na germinação com diferentes concentrações de elementos-traço. Estes ETs fazem

parte da composição química dos agrotóxicos ou são provenientes de resíduos ou subprodutos utilizados na produção agropecuária, além disso, por ser a alface uma hortaliça muito consumida pela população brasileira.

Foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações dos elementos-traço cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio

- na germinação de sementes de alface;
- no ciclo celular de raízes de sementes de alface;
- no índice mitótico das células meristemáticas de raízes de sementes de alface.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de alface

As sementes de alface, utilizadas nos experimentos, foram da cultivar 'Regina', pertencentes ao lote 310201 da marca Tecnoseed Sementes, obtidas em empresa comercial local.

As concentrações dos elementos-traço (ETs) – cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio – foram constituídas a partir de uma solução padrão de cada elemento, diluída em água ultra pura. A testemunha foi constituída, somente, por água ultra-pura. As concentrações dos elementos-traço usadas para a germinação das sementes de alface são as constantes na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio, baseadas nos limites máximos admitidos pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e europeia (Norma da Comissão Europeia)

Elementos-traço (ETs)	Concentrações (mg.L ⁻¹)						Limites máximos admitidos (mg.Kg ⁻¹)	
							IN 27*	NCE**
Cromo (Cr)	50	100	150	200	250	300	500	100
Chumbo (Pb)	50	100	150	200	250	300	300	100
Mercúrio (Hg)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	2,5	1
Cádmio (Cd)	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0	8	1
Arsênio (As)	2,5	5,0	7,5	10	15	20	20	10

*Instrução Normativa nº 27, de 05/06/2006, do MAPA**Norma da Comissão Europeia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Cada gerbox com papel germiteste, embebido com as soluções descritas na Tabela 3.1, conteve 100 sementes e constituiu uma unidade experimental. Após a semeadura, os gerbox foram colocados em germinador, à temperatura de 20 ± 1 °C, sem exposição à luz.

A avaliação do número de sementes germinadas foi realizada aos 2 dias, em todos os tratamentos. O delineamento experimental utilizado foi de blocos casualizado, com um total de 31 tratamentos e 5 repetições por tratamento. A avaliação estatística constou das análises de variação e regressão polinomial. Antes da análise de variação a variável estudada foi transformada segundo arco seno.

2.2. Avaliação citogenética dos meristemas radiculares de alface submetidos à ação de elementos-traço

O estudo citogenético foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

As raízes obtidas no experimento sobre “Efeito dos elementos-traço na germinação das sementes de alface”, descrito anteriormente, foram coletadas, para avaliação dos efeitos dos ETs no ciclo celular, no índice mitótico, sobre o número de nucléolos em células interfásicas e na indução de alterações cromossômicas.

Após dois dias de germinação, as raízes foram fixadas em Carnoy I (3 partes de álcool etílico e 1 parte de ácido acético). Depois de, no máximo, 24 horas à temperatura ambiente, foram transferidas para álcool 70% e estocadas em geladeira até sua utilização.

O preparo das lâminas para análise de índice mitótico de meristema radicular foi realizado conforme seqüência abaixo:

- Lavaram-se as raízes, três vezes, em água destilada, depois de terem sido retiradas do álcool 70%;

- Enxugaram-se as raízes, rapidamente, em papel de filtro, colocando-as em HCl 5N à temperatura ambiente por, mais ou menos, 10 segundos;
- Lavaram-se as raízes, três vezes, em água destilada;
- Enxugaram-se as raízes, rapidamente, em papel de filtro, colocando-as sobre uma lâmina limpa;
- Seccionou-se a porção apical de cada raiz, eliminando o restante do material;
- Colocou-se uma gota de ácido acético a 45% sobre o meristema radicular;
- Cobriu-se com uma lamínula e, com o auxílio de uma agulha de ponta rombuda, bateu-se levemente;
- Levou-se o conjunto lâmina/lamínula à chama de uma lamparina com o cuidado de não aquecer em demasia;
- Pressionou-se a lamínula contra a lâmina, dentro de uma folha dobrada de papel filtro;
- Colocou-se o conjunto lâmina-lamínula sob resfriamento rápido, em nitrogênio líquido;
- Retirou-se a lamínula e colocou-se a lâmina para secar em temperatura ambiente;
- Corou-se a lâmina com solução de Giemsa à 1%, por 5 a 7 minutos;
- Colocou-se uma nova lamínula com uma gota de Entellan;
- Observou-se o material sob microscópio ótico com aumento de 100 vezes, em imersão.

Eventualmente, eram feitas lâminas semi-permanentes coradas com orceína acética 2%.

O material foi observado ao microscópio ótico, tendo sido contado um total de 3.000 células por tratamento. Esta contagem foi feita a partir do campo superior esquerdo da lamínula, percorrendo-a em zigue-zague, até o canto inferior direito, anotando-se as células encontradas nas diversas fases da divisão celular (prófase, pro-metáfase, metáfase, anáfase e telófase) e as que estavam em interfase, até completar o total estipulado.

Foram, também, anotadas as anomalias cromossômicas encontradas tais como pontes, C-mitoses, cromossomos retardatários ou aderidos e fora da placa equatorial.

Para calcular o Índice Mitótico (IM) foi utilizada a seguinte fórmula, com os dados da cada repetição:

$$\text{IM} = \text{Número de células em divisão} / \text{Número total de células contadas}$$

A análise estatística constou das análises de variação e de comparação de médias pelo teste de Duncan a 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Efeito dos elementos-traço na germinação de sementes de alface

A Figura 3.1 mostra os resultados obtidos com a germinação das sementes de alface nas soluções de arsênio. Verifica-se que o diagrama de dispersão do número de sementes germinadas, após 48h de incubação, em função das diferentes concentrações de arsênio utilizadas, segue uma regressão linear descendente, altamente significativa, mostrando a efetiva diminuição da germinação conforme o aumento da concentração deste ET: de 0,0 para 20,0 mg.L⁻¹.

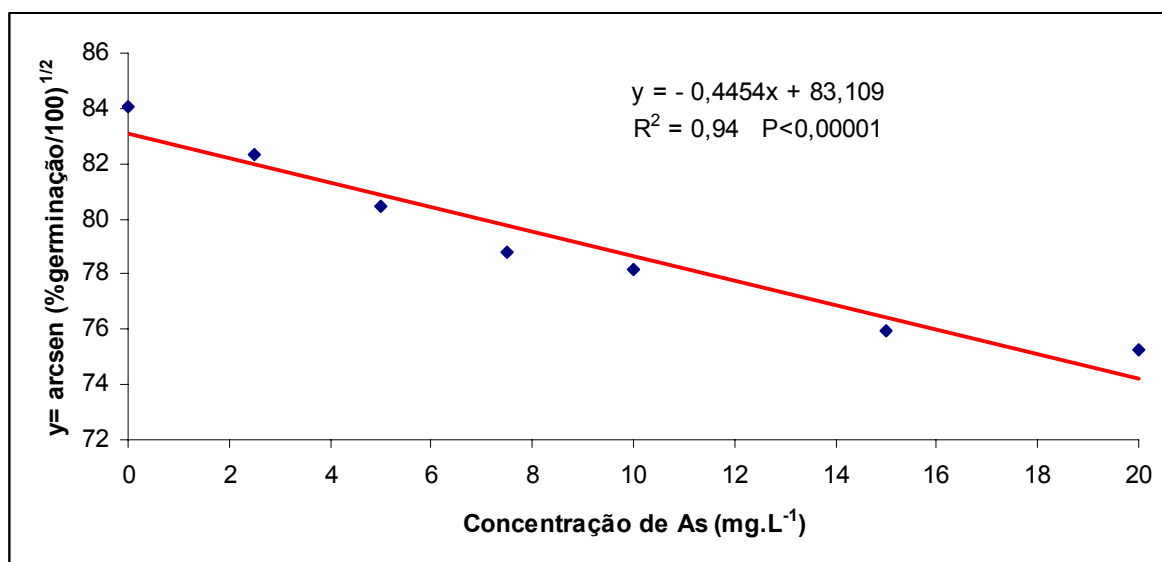


Figura 3.1 - Percentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. em diversas concentrações de arsênio: 0 ; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0 mg.L⁻¹

A Figura 3.2 mostra os resultados obtidos na germinação das sementes de alface na presença de mercúrio. Verifica-se que o diagrama de dispersão do número de sementes germinadas, após 48h de incubação, em função das diferentes concentrações de mercúrio utilizadas, segue uma regressão linear descendente altamente significativa, com $R^2 = 0,91$. Analisando a figura observa-se a diminuição da germinação conforme o aumento da concentração do ET: de 0,0 para 2,5mg.L⁻¹.

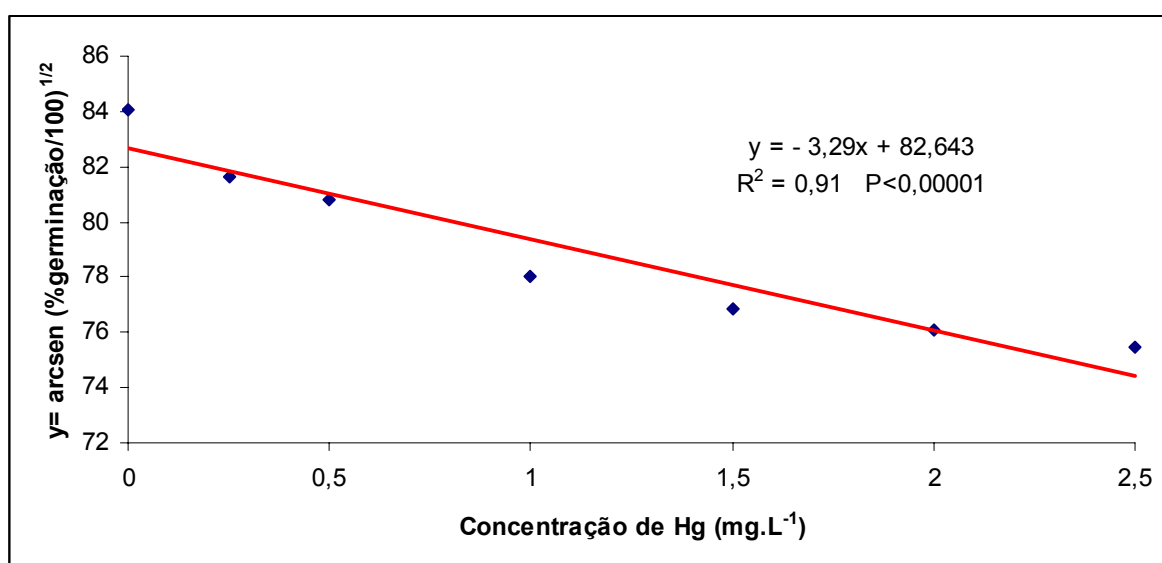


Figura 3.2 - Percentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. em diversas concentrações de mercúrio: 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.L⁻¹

Na Figura 3.3, que mostra os resultados obtidos na germinação de sementes de alface na presença de cádmio, pode-se verificar que o diagrama de dispersão também segue uma regressão linear descendente altamente significativa, com $R^2 = 0,91$. A regressão indica que conforme a concentração deste ET aumenta, de 0,0 para 9,0mg.L⁻¹, diminui a percentagem de germinação.

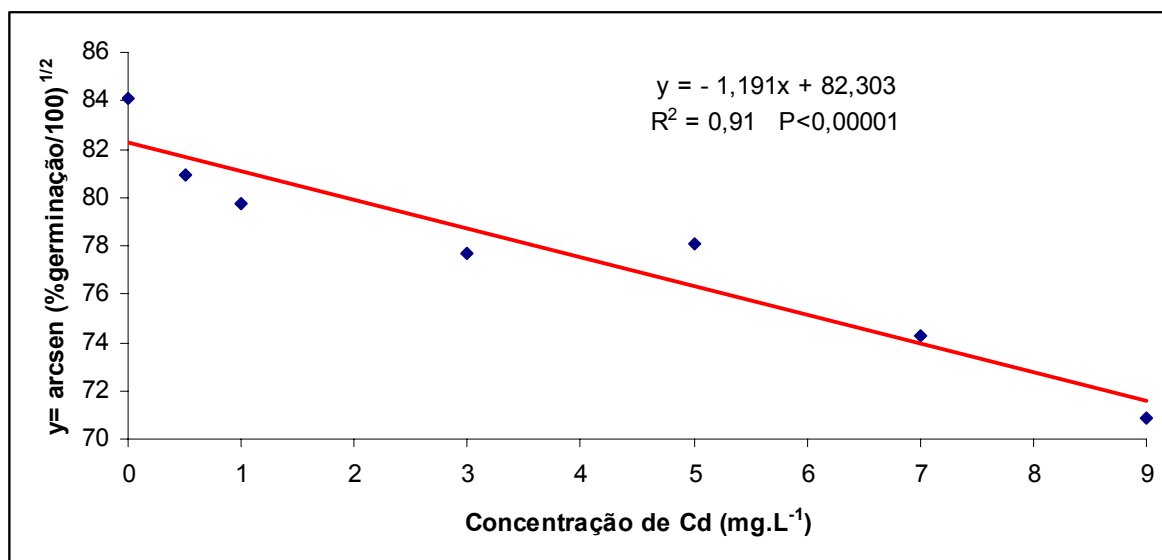


Figura 3.3 - Percentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. em diversas concentrações de cádmio: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 mg.L⁻¹

Ao analisar a germinação das sementes de alface na presença de diferentes concentrações de cromo, conforme Figura 3.4, verifica-se uma regressão linear descendente altamente significativa, mostrando a acelerada diminuição da germinação conforme o aumento da concentração deste ET: de 0,0 para 300 mg.L⁻¹.

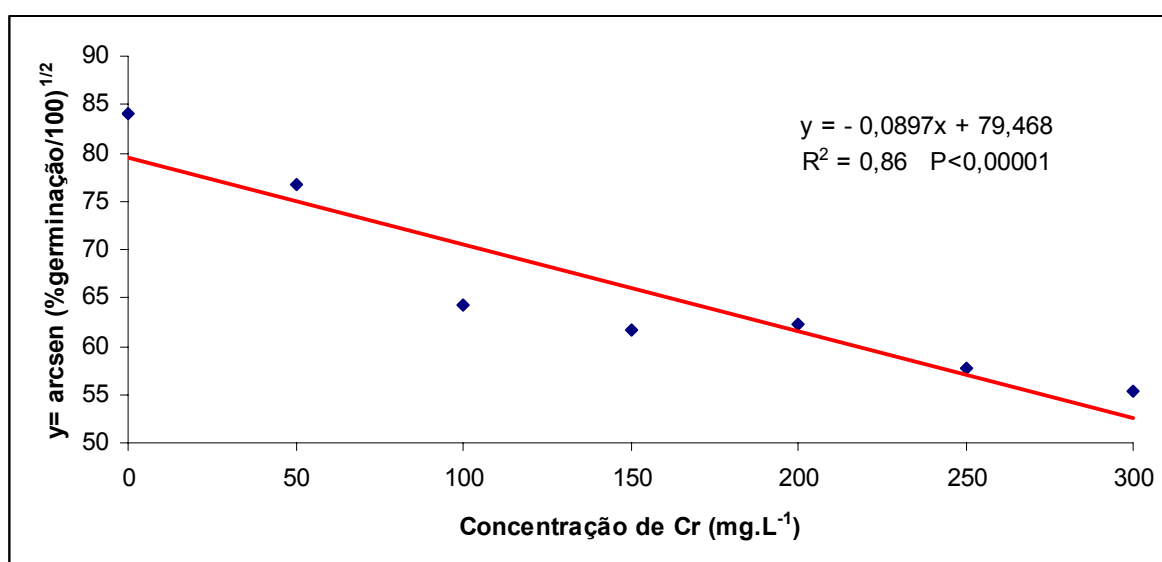


Figura 3.4 - Percentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. em diversas concentrações de cromo: 50; 100; 150; 200; 250; 300 mg.L⁻¹

A Figura 3.5 mostra os resultados obtidos na germinação das sementes de alface na presença de chumbo. Diferente dos demais ETs analisados no presente experimento, para o Pb, verifica-se que o diagrama de dispersão do número de sementes germinadas, após 48h de incubação, em função das diferentes concentrações de chumbo utilizadas, segue uma curva de regressão quadrática altamente significativa ($R^2 = 0,91$), cujo ponto de mínima ocorre na concentração de $216,58\text{mg.L}^{-1}$.

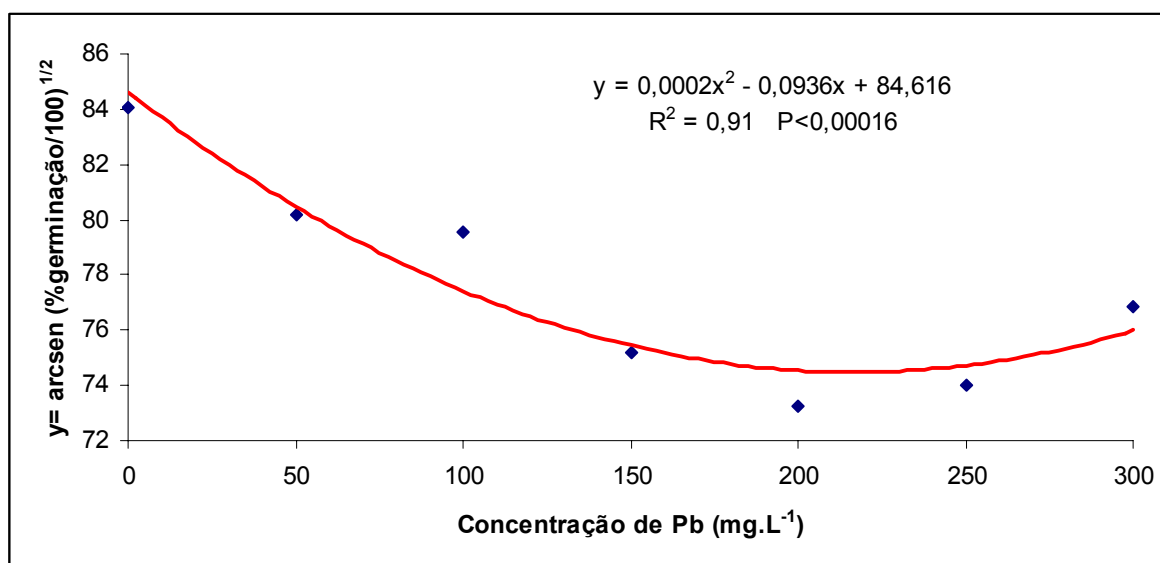


Figura 3.5 - Percentagem de germinação de sementes de *Lactuca sativa* L. em diversas concentrações de chumbo: 50; 100; 150; 200; 250; 300mg.L⁻¹

As figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 mostram que arsênio, mercúrio, cádmio e cromo têm um efeito semelhante sobre a germinação das sementes de alface. No entanto, o efeito do cromo é bastante mais drástico que dos outros três metais pesados, conforme verificado nas Figuras 3.6, 3.7 e 3.8 e 3.9 que mostram sementes de alface germinadas em água, em cádmio e em solução de cromo de 250mg.L^{-1} , respectivamente. Salientam-se as pontas de raiz necrosadas e o mínimo crescimento das raízes das sementes germinadas em cromo (Figuras 3.8 e 3.9), após 48h de tratamento.

Em plântulas de *Fagus sylvatica* L. (árvore da família das fagáceas), concentrações de 44mg.Kg^{-1} de Pb provocaram o espessamento das pontas das

raízes e concentrações acima de 55mg.Kg^{-1} reduziram a massa das mesmas (BALIGAR *et al.* 1998).

Chugh e Sawhney (1996) constataram que a germinação e a elongação da radícula de *Pisum sativum* L. (ervilha) foram afetadas por $0,25\text{mM}$ de Cd. Esse elemento-traço causou, também, a supressão da respiração das sementes.

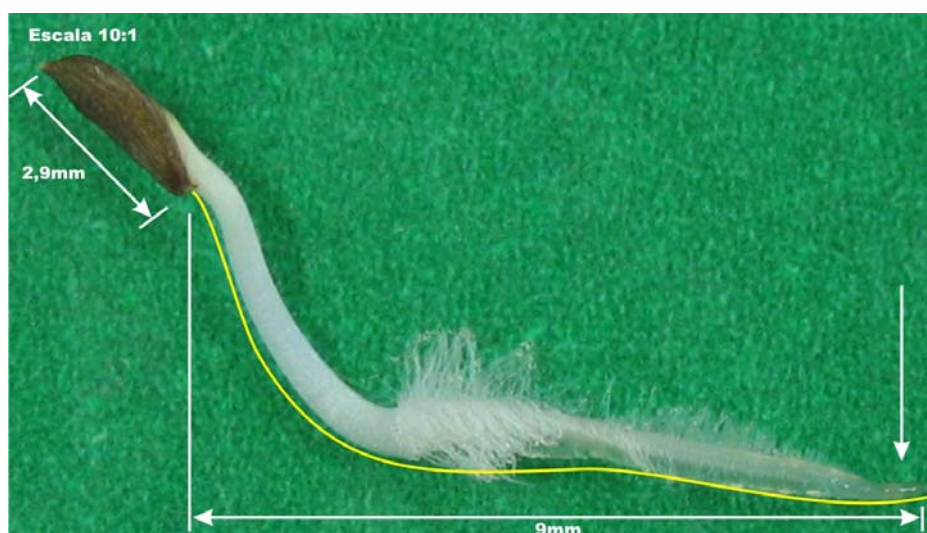


Figura 3.6 - Semente de *Lactuca sativa* L. germinada em água, por 48h.



Figura 3.7 - Semente de *Lactuca sativa* L. germinada em solução de 9mg.L^{-1} de cádmio, por 48h.



Figura 3.8 - Semente de *Lactuca sativa* L. germinada em solução de 250mg.L⁻¹ de cromo por 48h.

Wierzbicka e Obidzinska (1998) estudaram o efeito do Pb (100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000mg.dm⁻³) na absorção e na germinação das raízes de diferentes espécies de plantas. Em sementes grandes, como por exemplo, *P. vulgaris* a penetração do Pb não foi uniforme. Em *A. cepa* e *Z. mays* o Pb foi observado nos tecidos da raiz. Nas espécies de *L. sativa*, *C. sativus*, *T. aestivum*, *A. cepa* e *Z. mays* o efeito do Pb não foi significativo na germinação das sementes.

Liu *et al.* (2000) estudaram a absorção e acúmulo de Pb (10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵M) nas raízes, hipocótilos e na germinação de *Brassica juncea* L. (mostarda marrom). O crescimento da raiz diminuiu, consideravelmente, variando de cerca de 12cm no controle para aproximadamente 6cm na maior concentração. No controle, as plântulas apresentaram 3 ou 4 folhas com aparência normal e na concentração de 10⁻³M de Pb elas possuíam, geralmente, 2 folhas com coloração amarelada (clorose). A mostarda marrom acumulou chumbo em todas as concentrações utilizadas na seguinte ordem decrescente: raízes> hipocótilos>plântulas.

Prakash *et al.* (2004) estudaram o efeito da água de irrigação adicionada de cromo as concentrações de 0 a 25 mg.L⁻¹ na germinação e no crescimento de *Raphanus sativus* L. (rabanete). A percentagem de germinação das sementes,

assim como do crescimento da planta diminuiu gradualmente conforme o aumento da concentração de cromo.

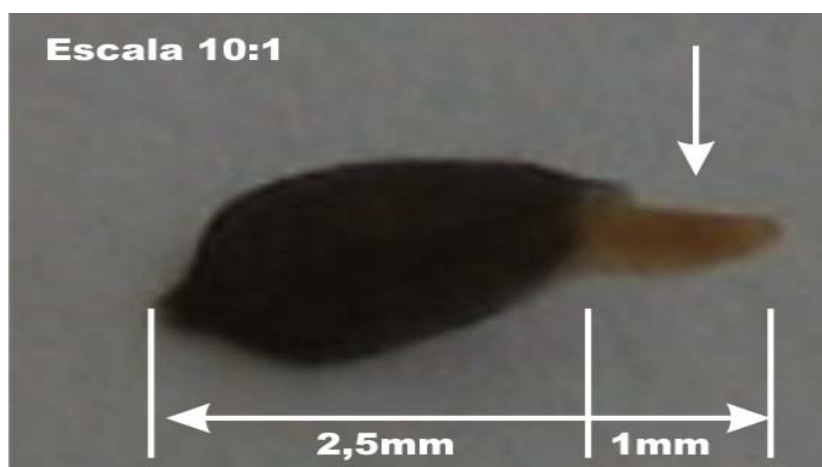


Figura 3.9 - Semente de *Lactuca sativa* L. germinada em solução de 300mg.L⁻¹ de cromo por 48h

3.2. Avaliação citogenética dos meristemas radiculares de alface submetidos à ação de elementos-traço

A análise do ciclo celular das células meristemáticas tratadas com cromo não foi incluída nas análises estatísticas devido ao grande número de células sem divisão celular, conforme Tabela 3.2. Estes dados justificam a falta de crescimento ocorrida nas pontas das raízes necrosadas verificadas no material tratado com este ET (Figuras 3.8 e 3.9).

Tabela 3.2 - Efeito de diferentes concentrações de cromo no ciclo celular de *Lactuca sativa* L.

Elementos-traço (mg.L ⁻¹)	Ciclo celular de alface (%)					
	Interfase	Prófase	Pró-metáfase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Cr 50	98,40	0,30	0,23	0,67	0,13	0,20
Cr 100	99,87	0,03	0,03	0,03	SCD	0,03
Cr 150	99,90	0,03	SCD	0,03	0,03	SCD
Cr 200	100	SCD	SCD	SCD	SCD	SCD
Cr 250	100	SCD	SCD	SCD	SCD	SCD
Cr 300	100	SCD	SCD	SCD	SCD	SCD

SCD = sem células em divisão.

A análise estatística do ciclo celular das células de ponta de raiz de alface tratadas com elementos-traço foi feita, então, somente para chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico. Os resultados obtidos mostraram que as percentagens médias de células em fase de interfase dos onze primeiros números de ordem da Tabela 3.3 foram, significativamente, mais danosos a divisão celular (nível de 5%) do que os cinco últimos. Como esperado, entre os primeiros encontram-se as concentrações mais altas dos quatro ETs estudados (Pb: 300; Hg: 2,5; Cd: 9,0; As: 20 mg.L⁻¹) e entre os últimos, encontram-se os mesmos ETs em suas menores concentrações (Pb: 50; Hg: 0,25; Cd: 0,5; As: 2,5 mg.L⁻¹) e a testemunha. Os dados obtidos para as células interfásicas da testemunha, inclusive, diferiram significativamente dos obtidos para todos os resultados de células interfásicas de tratamentos com os metais pesados, em qualquer concentração.

Em todas as fases da divisão celular, a testemunha se diferenciou dos demais, significativamente, ao nível de 5%, sempre apresentando uma frequência muito maior de células em divisão do que o material tratado com os metais pesados: prófase (Tabela 3.4), pró-metáfase (Tabela 3.5), metáfase (Tabela 3.6), anáfase (Tabela 3.7) e telófase (Tabela 3.8).

Os ETs que mais afetaram a prófase, pró-metáfase e a telófase foram o arsênio com concentração de 20mg.L⁻¹ e cádmio com 9,0mg.L⁻¹. Na metáfase, as concentrações de As (10,0mg.L⁻¹ e 20,0mg.L⁻¹) diferiram, significativamente, ao nível de 5% das demais. O cádmio, nas duas maiores concentrações, afetou a anáfase, significativamente a 5%. De maneira geral, como esperado, a divisão celular foi menos afetada pelas menores concentrações dos ETs utilizados no experimento.

Em qualquer tecido, com exceção de tecidos de embriogênese inicial, a fase do ciclo celular de mais longa duração é a interfase, por ser uma fase metabolicamente ativa, durante a qual ocorrem etapas importantíssimas da vida celular, tais como: o crescimento celular, a produção dos diversos tipos de proteínas e o metabolismo celular próprio e o seu envolvimento como parte de um organismo; a replicação cromossômica e o preparo para a divisão celular (Alberts

et al., 2008). Se esta fase for prejudicada, isto se refletirá em todo o ciclo celular e, conseqüentemente, no crescimento do organismo e em sua reposição celular.

Lerda (1992) estudou o efeito do chumbo em *A. cepa* L. com concentrações de 0,1; 1,0; 10; 50; 100 e 200 ppm, nesse estudo foram avaliados o crescimento da raiz, freqüência de mitoses e de anomalias nas células da zona meristemática. Quanto maior a concentração do ET e o tempo de exposição menor foi o crescimento da raiz, sendo que, em concentrações acima de 50 ppm por mais de 24h as raízes morreram. Aberrações citogenéticas foram observadas, como por exemplo: pontes, quebras cromossômicas, cromossomos aderidos, distúrbios metafásicos e anafásicos, além de células binucleadas.

Mitteregger-Júnior *et al.* (2006) fizeram uma avaliação das atividades tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha (RS), região coureiro-calçadista, utilizando *A. cepa*. Foram coletadas amostras de água e do sedimento durante as estações do verão e inverno em três diferentes pontos, identificados como: Nascente, localizado na nascente do arroio, B. Rosas, próximo ao centro da cidade, e Final, localizado no final do arroio. A mutação cromossômica, determinada pela presença de micronúcleos não revelou resultados significativos, à nível de 5%, nas amostras de água e sedimento coletadas nas duas estações analisadas, entretanto, pode-se perceber aumento do número de micronúcleos na amostra coletada no B. Rosas durante o inverno e no Final do arroio no verão.

Em 2007, Liu *et al.* avaliaram a localização do Cd em células de raízes de *A. cepa* através da análise de RX por energia dispersiva. As raízes foram expostas a concentrações de 0,1 e 1,0mM de Cd por 6, 24 e 48 horas. Na concentração 1,0mM, após 48h de tratamento, o Cd foi detectado na parede e no citoplasma das células da epiderme, do córtex e dos tecidos vasculares das raízes.

Pode-se constatar na Tabela 3.9 que a testemunha e as concentrações mais baixas dos elementos-traço utilizados tiveram o maior IM. Esse resultado é o esperado tendo em vista que os ETs afetam a divisão celular. As concentrações mais altas de cromo, confirmando o resultado obtido com a germinação das sementes, foram os que apresentaram o menor IM, pois, como foi mostrado, as raízes após 48h de incubação apresentavam a ponta necrosada (Figuras 3.8 e 3.9).

Tabela 3.3 - Células em interfase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em interfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	As	20,0	99,50	A
2	Cd	9,0	99,43	Ab
3	As	10,0	99,37	Abc
4	As	15,0	99,33	Abc
5	Cd	7,0	99,27	Abcd
6	Pb	300	99,03	Abcd
7	Hg	2,5	98,93	abcde
8	Hg	1,0	98,93	abcde
9	Hg	0,5	98,80	abcdef
10	Cd	5,0	98,77	abcdef
11	Hg	1,5	98,77	abcdef
12	Pb	250	98,73	bcdef
13	Pb	150	98,70	bcdef
14	As	7,5	98,66	Cdefg
15	Hg	2,0	98,63	Cdefg
16	Cd	3,0	98,57	Defg
17	Pb	200	98,27	Efg
18	Cd	1,0	98,20	Efgh
19	As	5,0	98,17	Fgh
20	Pb	100	97,97	Gh
21	Pb	50	97,57	Hi
22	Cd	0,5	97,27	I
23	Hg	0,25	96,93	Ij
24	As	2,5	96,33	J
25	Testem	0,0	86,50	K

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.4 - Células em prófase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em prófase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	3,33	A
2	As	2,5	0,73	B
3	Pb	50	0,60	Bc
4	Cd	0,5	0,56	Bc
5	Hg	0,25	0,53	Cd
6	Pb	200	0,49	Cd
7	Cd	1,0	4,66	Cde
8	As	5,0	0,46	Cde
9	Pb	100	0,43	Cdef
10	Pb	150	0,37	Defg
11	Hg	2,0	0,37	Defg
12	As	7,5	0,37	Defg
13	Cd	3,0	0,30	Efgh
14	Hg	0,5	0,30	Efgh
15	Pb	250	0,30	Efgh
16	Pb	300	0,29	Fgh
17	Hg	2,5	0,27	Gh
18	Hg	1,5	0,25	Ghi
19	Cd	5,0	0,23	Ghi
20	Cd	7,0	0,20	Hij
21	Hg	1,0	0,19	Hij
22	As	15,0	0,16	Hij
23	As	10,0	0,16	Hij
24	As	20,0	0,13	Ij
25	Cd	9,0	0,10	J

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.5 - Células em pró-metáfase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em pró-metáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,97	A
2	As	2,5	0,70	B
3	Hg	0,25	0,69	B
4	Cd	0,5	0,57	Bc
5	Pb	50	0,53	Bcd
6	As	5,0	0,43	Cde
7	Pb	200	0,40	Cdef
8	Cd	1,0	0,40	Cdef
9	Pb	100	0,40	Cdef
10	Cd	3,0	0,37	Cdefg
11	Pb	150	0,33	Defgh
12	Hg	2,0	0,32	Defgh
13	Hg	0,5	0,30	Efgh
14	As	7,5	0,30	Efgh
15	Pb	250	0,30	Efgh
16	Hg	1,5	0,27	Efgh
17	Pb	300	0,23	Fghi
18	Hg	2,5	0,23	Fghi
19	Cd	5,0	0,23	Fghi
20	Cd	7,0	0,19	Ghi
21	Hg	1,8	0,16	Hi
22	As	15,0	0,16	Hi
23	As	10,0	0,16	Hi
24	As	20,0	0,10	I
25	Cd	9,0	0,10	I

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.6 - Células em metáfase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em metáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,56	A
2	As	2,5	0,79	B
3	Hg	0,25	0,73	Bc
4	Cd	0,5	0,63	Bcd
5	Pb	100	0,50	Cde
6	Pb	50	0,46	Def
7	Pb	200	0,37	Efg
8	Hg	2,0	0,36	Efg
9	Hg	1,5	0,33	Efg
10	Cd	1,0	0,33	Efg
11	As	5,0	0,33	Efg
12	Cd	3,0	0,33	Efg
13	Pb	150	0,33	Efg
14	Hg	1,0	0,27	Fgh
15	Pb	250	0,26	Fgh
16	Cd	9,0	0,23	Gh
17	Cd	5,0	0,23	Gh
18	Hg	0,5	0,23	Gh
19	Pb	300	0,23	Gh
20	As	7,5	0,23	Gh
21	Hg	2,5	0,20	Gh
22	Cd	7,0	0,13	H
23	As	15,0	0,10	H
24	As	20,0	0,10	H
25	As	10,0	0,10	H

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.7 - Células em anáfase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em anáfase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,56	A
2	As	2,5	0,67	B
3	Hg	0,25	0,57	Bc
4	Cd	0,5	0,50	Bc
5	Pb	50	0,40	Cd
6	Pb	100	0,37	Cde
7	Cd	1,0	0,30	Def
8	Pb	200	0,27	Def
9	Cd	3,0	0,23	Defg
10	As	7,5	0,23	Defg
11	As	5,0	0,23	Defg
12	Cd	5,0	0,22	Defg
13	Pb	15,0	0,20	Efg
14	Hg	2,0	0,20	Efg
15	Hg	2,5	0,20	Efg
16	Pb	250	0,20	Efg
17	Hg	1,0	0,19	Efg
18	Hg	1,5	0,17	Fg
19	Hg	0,5	0,16	Fg
20	Pb	300	0,13	Fgh
21	As	10,0	0,10	Gh
22	As	15,0	0,10	Gh
23	As	20,0	0,10	Gh
24	Cd	7,0	0,10	Gh
25	Cd	9,0	0,03	H

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.8 - Células em telófase, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Células de alface em telófase (%)	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	2,06	A
2	As	2,5	0,56	B
3	Hg	0,25	0,53	Bc
4	Cd	0,5	0,46	Bcd
5	Pb	50	0,43	Bcde
6	Pb	100	0,33	Cdef
7	Cd	1,0	0,28	Defg
8	As	5,0	0,25	Efgh
9	Cd	3,0	0,20	Fghi
10	Pb	250	0,20	Fghi
11	Pb	200	0,19	Fghi
12	As	7,5	0,19	Fghi
13	Hg	0,5	0,18	Fghi
14	Hg	2,5	0,16	Fghi
15	Hg	1,0	0,16	Fghi
16	Cd	7,0	0,13	Ghi
17	Cd	5,0	0,13	Ghi
18	Pb	300	0,13	Ghi
19	Pb	150	0,13	Ghi
20	As	15,0	0,10	Hi
21	As	10,0	0,10	Hi
22	Hg	1,5	0,09	Hi
23	Hg	2,0	0,09	Hi
24	As	20,0	0,06	I
25	Cd	9,0	0,06	I

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

Tabela 3.9 - Índice mitótico de células, de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L. tratada com os elementos-traço chumbo, mercúrio, cádmio, cromo e arsênico em diversas concentrações

Elementos-traço			Índice mitótico IM	
nº ordem	ET	(mg.L ⁻¹)		
1	Testem	0,0	0,1350	A
2	As	2,5	0,0346	B
3	Hg	0,25	0,0305	B
4	Cd	0,5	0,0273	Bc
5	PB	50	0,0243	Bcd
6	PB	100	0,0203	Cde
7	Cd	1,0	0,0178	Def
8	As	5,0	0,0173	Defg
9	PB	200	0,0172	Defg
10	Cr	50	0,0146	Efg
11	Cd	3,0	0,0143	Efg
12	Hg	2,0	0,0136	Efgh
13	PB	150	0,0136	Efgh
14	As	7,5	0,0130	Efghi
15	PB	250	0,0125	Efghij
16	Hg	0,50	0,0118	Fghij
17	Hg	1,5	0,0108	Fghijk
18	Hg	2,5	0,0106	Fghijkl
19	Hg	1,0	0,0106	Fghijkl
20	Cd	5,0	0,0103	Fghijkl
21	PB	300	0,0099	Ghijkl
22	Cd	7,0	0,0073	Hijkl
23	As	15,0	0,0066	Ijkl
24	As	10,0	0,0063	Jkl
25	Cd	9,0	0,0051	Kl
26	As	20,0	0,0050	L
27	Cr	100	0,0008	M
28	Cr	150	0,0003	M
29	Cr	250	0,0000	M
30	Cr	300	0,0000	M
31	Cr	200	0,0000	M

Médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si ao nível de 5%, pelo teste de Duncan.

IM = nº de células em divisão/ nº total de células

Em 1994, Zhang e Yang verificaram que tanto o crescimento da raiz como o índice mitótico de *Hordeum vulgare* L. (cevada) decresceram com o aumento da concentração de Cd (0,5 e 20ppm), assim como com o aumento da duração do tratamento. Além disso, observaram muitas irregularidades na divisão celular, tais como C-mitoses, anáfases com pontes, micronúcleos, cromossomos aderidos, retardadários e perdidos.

Observa-se na Figura 3.10, células meristemáticas de alface germinada em concentração de 15mg.L^{-1} de arsênio, onde se verifica a presença de vacúolos, como os citados por Marcano *et al.* (2001), que estudaram as alterações citológicas induzidas por cádmio ($3,4$; $7,4$ e $9,9 \times 10^{-5}\text{M}$) nas células meristemáticas das raízes de cebola, por 4, 8, 12 e 24h. Com a concentração mais baixa não verificaram mudanças morfológicas em nenhum dos tempos. Em concentração de $7,4 \times 10^{-5}\text{M}$, com 12h de exposição, foram observadas células de formas variadas (quadradas e ovóides, entre outras), inclusive com depressões na sua superfície. Com o aumento do tempo de exposição, as depressões na superfície da célula se acentuaram parecendo perfurações na superfície. Com concentração de $9,9 \times 10^{-5}\text{M}$ e 24h de exposição, estas depressões e perfurações ficaram parecendo vacúolos. O núcleo apresentou-se pseudolobulado com a cromatina condensada, na presença de $7,4 \times 10^{-5}\text{M}$ de cádmio e 12h de tempo de exposição.

As Figuras 3.11 e 3.12 mostram-nos a divisão celular normal com raízes germinadas em água.



Figura 3.10 - Células meristemáticas de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em solução com 15mg.L^{-1} de arsênio por 48h, mostrando os vacúolos (↓) no citoplasma e núcleo com cromatina condensada (↓).



Figura 3.11 - Células meristemáticas de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em água por 48h, mostrando células normais, em interfase e em divisão mitótica: prófase (↓), pró-metáfase (↓) e telófase (↓).



Figura 3.12 - Células meristemáticas de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em água por 48h, mostrando células normais, em interfase e em divisão mitótica: metáfase (↓) e anáfase final (↓).

Na Figura 3.13, observam-se duas células fusionadas, apresentando duas C-metáfases em célula meristemática de raiz de alface em arsênio, por 48h, com concentração de 15mg.L^{-1} . A Figura 3.14, também, apresenta uma C-metáfase típica, inclusive com as cromátides irmãs bem separadas.

O chumbo, principalmente nas concentrações mais altas, como por exemplo 300mg.L^{-1} , mostrou-se citotóxico causando cromossomos fora da placa metafásica na Figura 3.15 e na Figura 3.17 células com morfologia anômala. Entretanto, o arsênio, também citotóxico, causou micronúcleo que pode ser observado na Figura 3.16.



Figura 3.13 - Células meristemáticas de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em solução com 15mg.L^{-1} de arsênio por 48h, mostrando C-metáfases em célula não dividida.



Figura 3.14 - Célula meristemática de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em solução com 15mg.L^{-1} de arsênio por 48h, com C-metáfase.



Figura 3.15 - Células meristemáticas de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em solução com 300mg.L^{-1} de chumbo por 48h, mostrando cromossomos fora da placa metafásica.

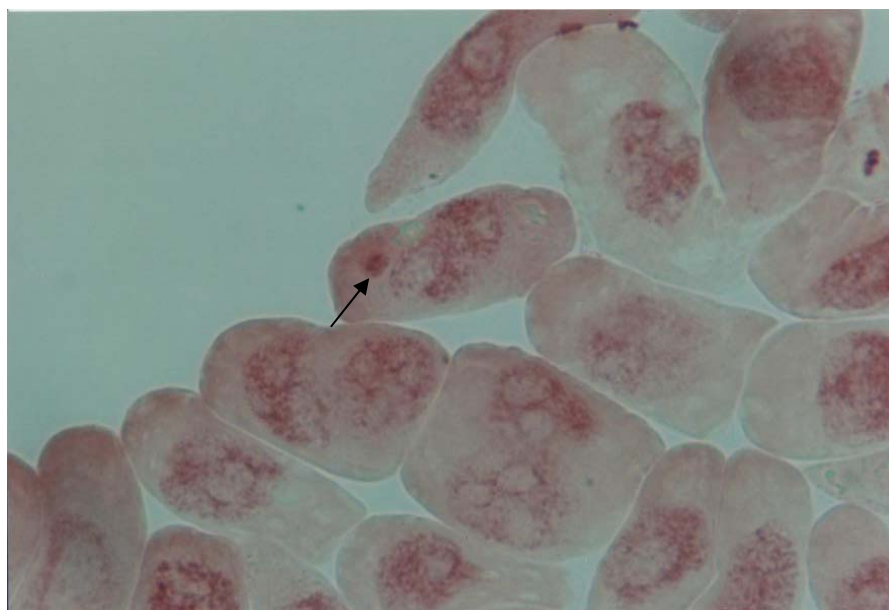


Figura 3.16 - Célula meristemática de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em solução com 15mg.L^{-1} de arsênio por 48h, com micronúcleo.

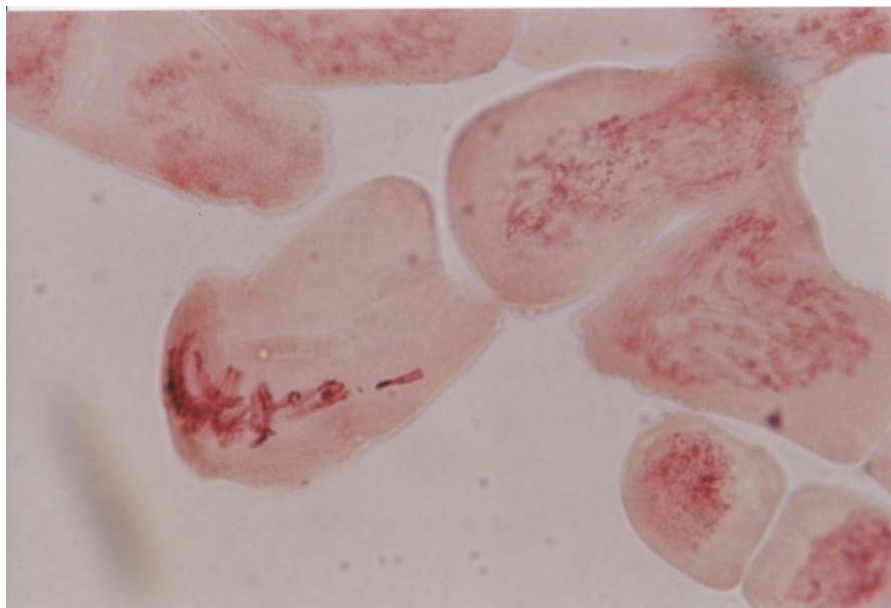


Figura 3.17 - Células meristemáticas de morfologia anormal, de raiz de *Lactuca sativa* L. germinada em 300mg.L^{-1} de chumbo por 48h.

Em concordância com os diversos autores, já citados, observaram-se, nas células meristemáticas de alface, com as diferentes concentrações dos ETs que foram utilizadas neste estudo, as anomalias cromossômicas evidenciadas na Tabela 3.10. Verificou-se que a Testemunha não apresentou alterações cromossômicas. As pontes e os micronúcleos ocorreram com menor frequência nas diferentes concentrações dos ETs estudados. A presença de cromossomos aderidos ocorreu, em maior frequência, em arsênio 15mg.L^{-1} . Já, as C-mitoses apresentaram a maior ocorrência em mercúrio $1,5\text{mg.L}^{-1}$.

Estudos conduzidos em plantas e animais de laboratório mostraram que o mercúrio tem a capacidade de inibir a formação do fuso mitótico, levando a uma distribuição anormal dos cromossomos e à poliploidia. Esta ação seria resultado da forte afinidade do Hg pelos grupos sulfidrilas encontrados nas proteínas do fuso, sendo considerada como a ação mais típica, a nível genético, dos compostos de mercúrio (BUCIO *et al.*, 1999).

Srivastava e Srivastava (2004) verificaram os efeitos citogenéticos de alguns metais pesados, como chumbo, cobre, mercúrio e zinco em girassol e constataram muitas irregularidades meióticas: cromossomos aderidos e retardatários, pontes, separação desigual e fragmentação cromossômica. O

mercúrio mostrou-se o mais tóxico e originou a maior porcentagem de células mãe de pólen anormais, já o chumbo induziu tetraploidia.

Tabela 3.10 - Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de ponta de raiz de *Lactuca sativa* L., tratada com os elementos-traço chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e arsênico (As) em diversas concentrações

Elementos-traço (mg.L ⁻¹)	Alterações Cromossômicas (%)			
	Pontes	C-mitoses	Cromossomos aderidos	Micronúcleos
Testemunha	-	-	-	-
Cd 0,5	0,03	0,13	0,10	0,03
Cd 1,0	0,07	0,07	0,10	-
Cd 3,0	0,03	0,10	0,03	-
Cd 5,0	-	0,03	0,07	-
Cd 7,0	-	0,03	0,16	-
Cd 9,0	0,10	0,07	0,07	-
As 2,5	0,03	0,10	0,07	-
As 5,0	0,03	0,16	0,16	0,07
As 7,5	-	0,16	0,16	-
As 10,0	0,03	0,16	0,16	0,03
As 15,0	-	0,20	0,20	0,03
As 20,0	0,03	0,10	0,10	-
Pb 50	-	0,03	0,03	-
Pb 100	0,07	0,07	0,03	-
Pb 150	-	0,10	0,07	0,03
Pb 200	0,03	0,10	0,10	-
Pb 250	-	0,10	0,07	-
Pb 300	-	0,13	0,03	-
Hg 0,25	0,07	0,10	0,03	0,03
Hg 0,5	0,07	0,03	0,13	-
Hg 1,0	-	0,10	0,07	-
Hg 1,5	-	0,23	-	-
Hg 2,0	-	0,10	-	-
Hg 2,5	-	0,07	0,03	-

(-) não existência

Com os resultados obtidos no presente trabalho, ratificado pela extensa bibliografia consultada, faz-se necessário maior investimento em pesquisa com contaminantes ambientais, como por exemplo, os elementos-traço, tendo em vista o grande prejuízo que eles causam ao ambiente e a todos os seres vivos.

CAPÍTULO 4

NUCLÉOLOS EM *Lactuca sativa* L. SOB DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS-TRAÇO ARSÊNIO, CÁDMIO, CHUMBO, CROMO E MERCÚRIO

1. INTRODUÇÃO

O nucléolo é uma estrutura sub-nuclear presente nas células eucarióticas, foi descrito no início do século XIX, mas só na década de 60 descobriu-se que era o local da síntese dos ribossomos. As principais funções do nucléolo são a transcrição do rRNA (RNA ribossômico) e a montagem dos ribossomos (PEDERSON, 1998). Mais especificamente, os rRNAs são sintetizados, processados e montados com as proteínas ribossomais no nucléolo (SIRRI, 2008; ALBERTS, 2008).

O nucléolo é constituído por três regiões morfológicamente distintas: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG), onde as subunidades ribossomais ficam amadurecendo (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000).

A organização e a distribuição das regiões do nucléolo (CF, CFD, CG) dependem do tipo de célula e da função que ela desempenha. A média de ribossomos formados, bem como a estrutura dos nucléolos é altamente influenciada pela função que a célula exerce e por fatores tais como as proteínas nucleares, que regulam o ciclo celular (MEDINA *et al.*, 2001; MELLO, 2001).

Entre as funções do nucléolo está o seu envolvimento no controle e na proliferação das células (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000). Atua, também, em infecções virais, na exportação de material do núcleo, no seqüestro de moléculas reguladoras, na modificação de pequenos RNAs e no controle do envelhecimento (OLSON *et al.*, 2002).

Estudos recentes mostraram que o nucléolo também participa da regulação do ciclo celular, da formação de partículas recombinantes, da resposta ao estresse, da senescência celular, da infecção viral em plantas e animais e de

algumas doenças humanas, tais como a doença de Alzheimer, câncer, disqueratose congênita, entre outras (BOISVERT *et al.*, 2007).

A RNA polimerase I sintetiza os rRNAs e esta atividade regula o ciclo celular. O nucléolo revela a organização funcional do núcleo e as etapas da síntese de ribossomos. Após a mitose é necessário um tempo para a reorganização dos nucléolos, além disso, por gerar um volume grande no núcleo e, aparentemente, nenhuma atividade, o nucléolo cria um domínio de retenção que capta moléculas, normalmente ativas, fora dele (SIRRI *et al.*, 2008).

O nucléolo está envolvido nas respostas da célula aos estresses, podendo ser considerado um sensor de estresse devido à redistribuição das proteínas ribossomais no nucleoplasma. Sua atuação na regulação do crescimento celular pode ser verificada através do conjunto de proteínas e da sua estrutura, as quais estão constantemente mudando em resposta às condições metabólicas. Os vírus, ao penetrarem no núcleo, interagem imediatamente com o nucléolo para recrutar proteínas que facilitem sua replicação (HISCOX, 2007; SIRRI *et al.*, 2008).

O nucléolo e os corpos de Cajal estão envolvidos numa série de eventos celulares, tais como o da infecção viral. Certos vírus, como por exemplo, os vírus da roseta do amendoim dependem, estritamente, da interação da proteína ORF3 (*Open Reading Frame*) destes dois domínios para atravessar longas distâncias através do floema. A proteína ORF3 localiza e reorganiza os corpos de Cajal em múltiplas estruturas e, em seguida, realiza a fusão de ambos, vírus e Cajal, no nucléolo. A localização nucleolar da proteína ORF3 é essencial para a posterior formação da ribonucleoproteína viral, pois desta maneira os vírus poderão percorrer longas distâncias realizando uma infecção sistêmica (SANG *et al.*, 2007).

A interferência de íons metálicos tóxicos no processo de reparação do DNA e no controle do ciclo celular foi investigada por Hartwig *et al.* (2002). Ficou evidente que os sistemas de reparo do DNA, NER (reparo por excisão de nucleotídeos) e BER (reparo por excisão de bases) são inibidos mesmo em concentrações baixas e não citotóxicas dos íons níquel (II), cobalto (II), cádmio (II) e arsênio (III). O Cd interfere nos primeiros passos do NER. O arsenito impede a

incisão em baixas concentrações e em altas concentrações impede que a ligação de reparo do DNA seja eficiente durante o BER. Em geral, pontos de checagem durante ciclo celular controlam a habilidade da célula para reparar danos ao DNA, controlando a ativação dos passos para o reparo e monitorando as proteínas de reparo. Na fase G₁, ocorre uma parada preventiva aos danos de replicação, na fase S, a parada repara os ocorridos na replicação e, em G₂, há a proteção contra possíveis erros mitóticos.

Liu *et al.* (2004), utilizando a técnica de coloração com nitrato de prata (AgNO₃), constataram que as células de meristema radicular de cebola apresentaram poucas partículas nucleolares após 24 h de tratamento com cádmio com concentração de 10⁻⁵ M e com concentrações de 10⁻⁶ M e 10⁻⁷ M Cd após 72h de tratamento. Com presença de 10⁻⁴ a 10⁻² M de Cd, após 72h mais partículas foram se acumulando na periferia do nucléolo, tornando-o frágil.

O objetivo deste trabalho foi contar o número máximo de nucléolos presentes nas células interfásicas de alface, bem como avaliar se ocorreu ou não interferência neste número quando na presença das diferentes concentrações dos elementos-traço em relação à testemunha, que foi feita na presença de água ultra-pura.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As concentrações dos elementos-traço (ETs) – chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio – foram constituídas a partir de uma solução padrão de cada elemento, diluída em água ultra pura. A testemunha foi constituída, somente, por água ultra-pura. As concentrações dos elementos-traço usadas para a germinação das sementes de alface são as constantes na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Concentrações dos elementos-traço (ETs) cromo, chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio, baseadas nos limites máximos admitidos pelas normas brasileira (Instrução Normativa nº 27 do MAPA) e européia (Norma da Comissão Européia)

Elementos-traço (ETs)	Concentrações (mg.L ⁻¹)						Limites máximos admitidos (mg.Kg ⁻¹)	
							IN 27*	NCE**
Chumbo (Pb)	50	100	150	200	250	300	300	100
Mercúrio (Hg)	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	2,5	1
Cádmio (Cd)	0,5	1,0	3,0	5,0	7,0	9,0	8	1
Arsênio (As)	2,5	5,0	7,5	10	15	20	20	10

*Instrução Normativa nº 27, de 05/06/2006, do MAPA**Norma da Comissão Européia

O experimento foi conduzido no Laboratório de Sementes da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, tendo sido utilizadas sementes de alface cv. 'Regina' de mesmo lote, obtidas de empresas comerciais.

Cada gerbox com papel germiteste, embebido com as soluções descritas na Tabela 4.1 conteve 100 sementes e constituiu uma unidade experimental. Após a semeadura, os gerbox foram colocados em germinador, à temperatura de 20 ± 1 °C em ausência de luz.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, com um total de 31 tratamentos e 3 repetições por tratamento.

O estudo citogenético foi realizado no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

Foram coletadas todas as raízes das sementes de alface submetidas por dois dias aos tratamentos com os elementos-traço conforme Tabela 4.1. As raízes foram fixadas em Carnoy I, (3 partes de álcool etílico : 1 parte de ácido acético) por, no máximo, 24 horas, à temperatura ambiente. Após, foram transferidas para álcool 70% e estocadas em geladeira até sua utilização.

O preparo das lâminas para verificação do número de nucléolos em meristemas radiculares de células interfásicas de alface seguiu as etapas abaixo relacionadas:

- Retiraram-se as raízes do fixador, mergulhando-as três vezes em água destilada;
- Fragmentou-se o ápice radicular em uma gota de ácido acético 45%;
- Colocou-se a lamínula e o meristema foi esmagado sob pressão;
- Separou-se a lâmina da lamínula, após resfriamento rápido (nitrogênio líquido);
- Secou-se a lâmina à temperatura ambiente;
- Corou-se com uma gota de gelatina 1% e duas gotas de nitrato de prata 1%, segundo HOWELL e BLACK (1980);
- Cobriu-se o preparado com lamínula e colocou-se em estufa a 60°C, em câmara úmida, até obtenção de coloração marrom-amarelada (tonalidade fraca);
- Lavou-se a lâmina em água corrente e, após, em água destilada;
- Deixou-se secar à temperatura ambiente;
- Colocou-se uma lamínula nova com uma gota de Entellan;
- Observou-se com aumento de 400 vezes sob microscópio ótico.

Para obtenção do número e das classes de nucléolos, foram contadas 100 células, em interfase, de cada tratamento, nas três repetições. A análise estatística do número de células em interfase constou da análise de variação, da comparação de médias pelo teste de Duncan a 5% e da regressão polinomial. Antes da análise da variação a variável foi transformada segundo raiz quadrada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar o manuseio e o entendimento dos dados e expressar os resultados de forma mais objetiva, adotou-se a seguinte classificação quanto ao número de nucléolos das células interfásicas:

classe 1: um nucléolo;

classe 2: com dois nucléolos de igual tamanho;

classe 3: com dois nucléolos, um maior que o outro;

classe 4: com três nucléolos de tamanho igual;

classe 5: três nucléolos, sendo que um deles é maior que os restantes;

classe 6: três nucléolos, sendo dois deles maiores que o restante;

classe 7: quatro a seis nucléolos.

O estudo dos nucléolos em *Lactuca sativa* L. é raro, sendo que não foi encontrado praticamente nada, portanto, os dados obtidos neste trabalho são incipientes.

O número máximo de nucléolos encontrado em *L. sativa* L. (Figuras 4.1 e 4.2) na testemunha e sob as diferentes concentrações de elementos-traço utilizados para cada núcleo interfásico foi de seis (6). Podemos dizer que o núcleo interfásico das células de alface possui seis regiões com genes ribossomais ativos.

Battistin *et al.* (1999) verificaram, entre outros estudos, o número máximo de nucléolos por núcleo interfásico de três espécies de *Lathyrus* L. nativas e uma cultivada no sul do Brasil. Constataram que todas as espécies possuíam número máximo de quatro nucléolos em cada núcleo interfásico, indicando quatro regiões com genes ribossomais ativos em cada espécie.

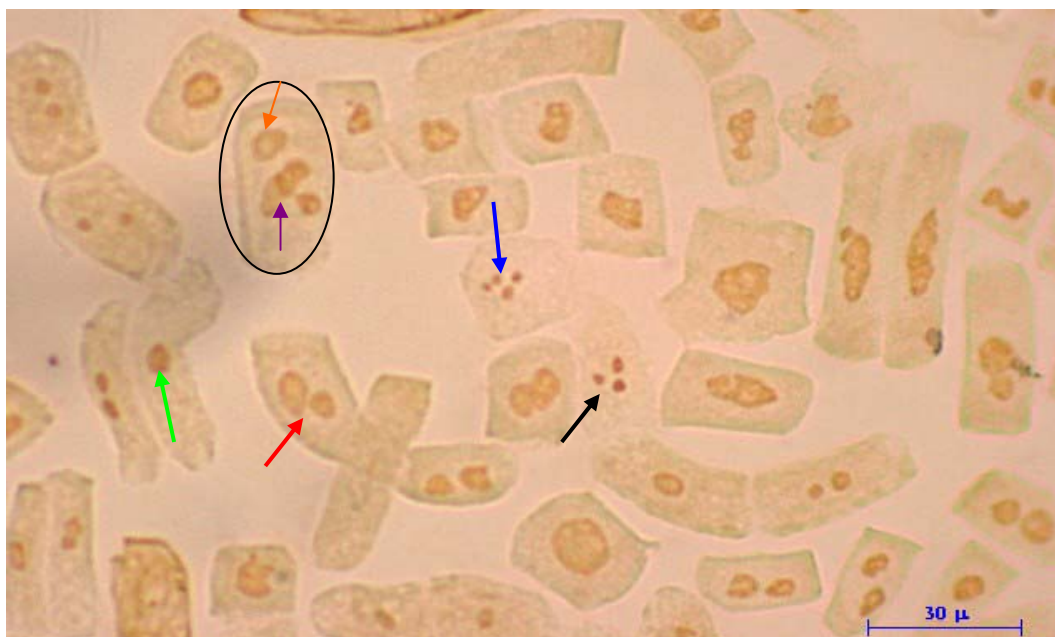


Figura 4.1 - Nucléolos um (↓), dois (↓), três (↓), quatro (↓), seis nucléolos, dois fusionando (↓), três fusionando (↓) com 7 mg.L^{-1} de cádmio.

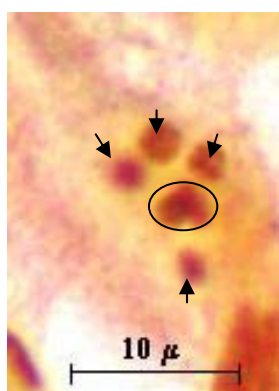


Figura 4.2 - Seis nucléolos, sendo que dois estão se fusionando (circulados) em *L. sativa* L. na testemunha

O cádmio, em alface, não apresentou relação significativa na interação das diferentes concentrações e as células interfásicas com as diferentes classes de nucléolos Tabela 23 do Apêndice. Entretanto, Liu e Kottke (2004) ao estudarem os efeitos do cádmio nas células de raiz de *A. cepa* constataram um aumento do número de nucléolos e de vacúolos, além da condensação do citoplasma, da redução das cristas mitocondriais, da plasmólise acentuada da célula e da desorganização da estrutura dos cloroplastos.

Para Prasad (1995); Grant *et al.* (1998) existe uma grande variação dos efeitos e da tolerância ao cádmio entre as diferentes espécies de plantas e, até mesmo, dentro dos genótipos das espécies. Segundo esses autores essa variação ainda não está bem compreendida.

Daud *et al.* (2008) estudaram os efeitos do cádmio (0; 10; 100; 1000 μ M), em raízes, de duas cultivares transgênicas (BR001 e GK 30) e em uma selvagem (Coker 312) de *Gossypium* spp. L. (algodão). Após 6 dias de tratamento com 10 μ M de Cd ocorreu aumento do número de nucléolos e vacúolos em ambas as cultivares transgênicas, sendo que na cultivar selvagem também houve aumento porém, este aumento foi menor que o ocorrido nas demais. Em concentração de 100 μ M o dano foi maior, houve aumento do número de nucléolos e de vacúolos, encolhimento do citoplasma, irregularidades na estrutura do núcleo. Na presença de 1000 μ M de cádmio as células foram severamente danificadas, em todas as cultivares estudadas.

Na Tabela 4.2 observa-se através do teste de Duncan as médias dos nucléolos na presença de diferentes concentrações de cádmio. As classes 1 e 2 se diferenciaram das demais, mas não entre si, com as maiores médias originais para células em interfase com um nucléolo e com dois nucléolos de tamanho iguais. Sendo que a classe 7 apresentou a menor média original de todas elas, classe esta que representa células com quatro a seis nucléolos.

Tabela 4.2 - Teste de Duncan para as médias das diferentes classes de nucléolos nas diversas concentrações de cádmio

Nucléolos		Células com nucléolos (%)
Classe	Descrição	
1	um nucléolo	24,33 a
2	dois nucléolos de igual tamanho	23,22 a
3	dois nucléolos, um maior que o outro	14,89 b
4	três nucléolos de igual tamanho	12,30 b
5	três nucléolos, um maior que os demais	8,60 c
6	três nucléolos, dois maiores que os demais	8,11 c
7	quatro a seis nucléolos	6,70 d

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5%.

Verifica-se através da Tabela 4.3 que nenhuma das regressões nas diferentes concentrações de cádmio foi significativa para a avaliação do número de células em interfase com as diferentes classes dos nucléolos. Confirma-se este resultado observando as Tabelas 24 a 30 do Apêndice, onde as regressões linear, quadrática e cúbica não se apresentaram significativas.

Tabela 4.3 - Análise da variação na regressão polinomial em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. em relação aos nucléolos na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor F	Prob. >F
Regressão Linear	1	0,1085254	0,1085254	0,45129	0,51044
Regressão Quadrática	1	0,0000376	0,0000376	0,00016	0,98683
Regressão Cubica	1	0,0740529	0,0740529	0,30794	0,58707
Desvios de Regr.	3	0,1034174	0,00344725	0,14335	0,93302
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Para as diferentes concentrações de chumbo, arsênio e mercúrio houve interação significativa a 1% entre a concentração dos referidos ETs e o número de células em interfase com as diversas classes de nucléolos conforme Tabelas 31, 32 e 33, respectivamente, do Apêndice.

A comparação de médias pelo teste de Duncan do número e das classes de nucléolos nas diferentes concentrações de chumbo está evidenciada na Tabela 4.4. Na testemunha as células interfásicas das classes 1, 2 e 3 não diferiram entre si ao nível de significância de 5%, entretanto, diferiram das demais classes, sendo que estas não diferiram entre si no mesmo nível de significância. Com 50mg.L⁻¹ de chumbo a classe de maior média foi a classe 3, sendo que esta não diferiu ao nível de 5% da classe 2, porém a classe com menor média foi a classe 5. As classes 1 e 2 apresentaram maior média de células interfásicas com um e dois nucléolos iguais. Na presença de 150mg.L⁻¹ de chumbo células com um nucléolo apresentaram maior frequência, diferindo das demais ao nível de 5%. O mesmo aconteceu com as duas maiores concentrações de chumbo. Podemos verificar que a classe 7, de maneira geral, foi a que apresentou menor média.

Tabela 4.4 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações de chumbo

Classes de nucléolos	Concentração de chumbo (mg.L ⁻¹)						
	0	50	100	150	200	250	300
1	24,1a	13,9 cd	20,0 a	32,2 a	25,2 a	26,0 b	30,6 a
2	23,3a	20,6 ab	19,0 a	24,0 b	22,3 ab	37,0 a	20,1 b
3	19,1a	25,0 a	17,6 ab	16,3 c	20,3 b	16,0 c	17,2 b
4	11,0 b	17,5 bc	14,6 b	10,3 d	12,0 c	5,0 d	7,9 d
5	7,8 b	3,0 f	9,2 c	5,3 e	9,3 c	5,3 d	11,0 c
6	6,7 b	8,0 e	8,0 c	2,3 f	9,3 c	5,3 d	7,0 de
7	7,0 b	11,6 d	11,0 c	6,0 e	1,31 d	5,3 d	5,0 e

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

O efeito das diferentes concentrações de arsênio sobre as células em interfase em relação a média do número e das classes de nucléolos pode ser observado na Tabela 4.5. Através do teste de Duncan podemos observar que a testemunha mostrou o mesmo comportamento na presença de todos os ETs avaliados. Células interfásicas das classes 1 e 2 as que apresentaram melhor média em relação as outras classes em quase todas as concentrações, exceto em 5,0mg.L⁻¹ de As. Já a classe 7 apresentou uma variação em relação a sua ocorrência, na concentração de 10mg.L⁻¹ apresentou a menor frequência.

Na Tabela 4.6 verifica-se o efeito das diferentes concentrações de mercúrio sobre o número e as classes de nucléolos das células interfásicas. Via de regra, as classes 1 e 2 apresentam as melhores médias, e a classe 7 as piores. Na concentração de 0,5 mg.L⁻¹ as classes 1, 2 e 4 diferiram das demais, mas não entre si ao nível de 5%. A classe 2 na presença de 2,0 mg.L⁻¹ de Hg apresentou a melhor média, diferindo das demais a 5%.

Tabela 4.5 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações de arsênio

Classes de nucléolos	Concentração de arsênio (mg.L ⁻¹)						
	0	2,5	5,0	7,5	10	15	20
1	24,1a	22,6 a	10,3 b	16,0 ab	19,0 a	23,5 a	21,2 a
2	23,3a	25,6 a	28,9 a	20,5 a	24,6 a	20,3 a	19,6 ab
3	19,1a	18,9 a	13,2 b	15,6 ab	19,6 a	21,9 a	14,5 bc
4	11,0 b	6,3 c	12,6 b	8,0 c	11,0 b	19,3 a	13,5 c
5	7,8 b	6,1 c	8,6 b	10,9 bc	10,6 b	8,3 b	13,4 c
6	6,7 b	10,0 bc	12,6 b	13,1 b	12,6 b	10,6 b	10,6 c
7	7,0 b	12,8 b	13,0 b	11,6 bc	2,6 c	7,9 b	5,0 d

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Tabela 4.6 - Teste de Duncan para a média de células em interfase com as diferentes classes de nucléolos na presença das diversas concentrações de mercúrio

Classes de nucléolos	Concentração de mercúrio (mg.L ⁻¹)						
	0	0,25	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5
1	24,1a	20,0 b	21,3 a	24,2 a	25,0 a	14,7 c	22,5 a
2	23,3a	33,6 a	20,0 a	26,6 a	26,3 a	30,8 a	22,5 a
3	19,1a	22,3 b	13,3 b	16,2 b	23,3 a	23,3 b	18,6 a
4	11,0 b	10,0 c	21,3 a	12,0 b	9,5 b	14,0 c	13,0 b
5	7,8 b	6,7 c	4,7 d	6,6 c	6,8 b	4,7 d	8,9 b
6	6,7 b	3,3 d	8,9 c	6,3 c	6,0 b	5,3 d	9,9 b
7	7,0 b	3,0 d	7,5 cd	7,1 c	2,6 c	6,6 d	4,0 c

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

Morgan (1999) declarou que o número de nucléolos em uma célula pode variar de um a tantos quantos forem o número de Regiões Organizadoras de Nucléolos (NORs) codificadas em um genoma. O número de nucléolos pode, também, depender do tipo de célula.

Observa-se na, Figura 4.3, uma regressão polinomial cúbica para as células interfásicas com dois nucléolos de mesmo tamanho na presença de diferentes concentrações de chumbo. Ficou evidenciado que a menor ocorrência de nucléolos na classe 2 aconteceu na concentração de $64,7\text{mg.L}^{-1}$ de Pb e a maior na concentração de $217,65\text{mg.L}^{-1}$. Sendo que o coeficiente de determinação da equação é de 68%.

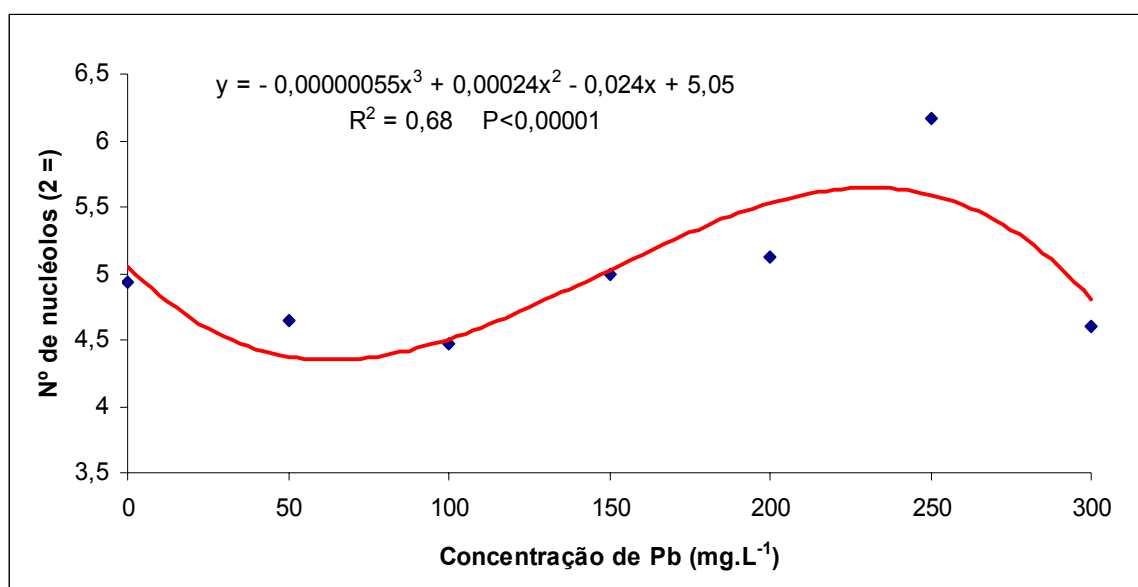


Figura 4.3 - Número de células interfásicas com dois nucléolos iguais em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg. L⁻¹.

Observa-se uma regressão polinomial cúbica com um coeficiente de determinação de 79%, sendo que o ponto de máximo com células interfásicas da classe 4 ocorre na concentração de $72,72$ e o de mínimo na concentração $272,72\text{mg.L}^{-1}$ de chumbo (Figura 4.4).

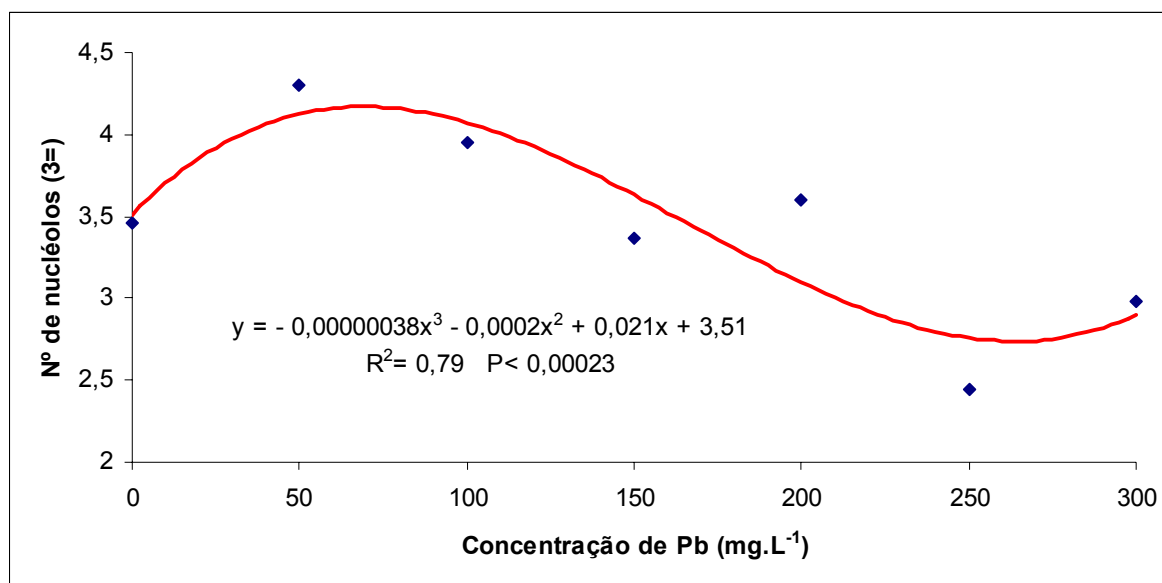


Figura 4.4 - Número de células interfásicas com três núcleos iguais em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L⁻¹.

A Figura 4.5 está evidenciando, nas diferentes concentrações de chumbo uma regressão cúbica, sendo que o maior número de células interfásicas na classe 7 ocorre com concentração de 58,82mg.L⁻¹ e o menor com 235,29mg.L⁻¹. O R^2 é de 0,74 com $P < 0,00001$.

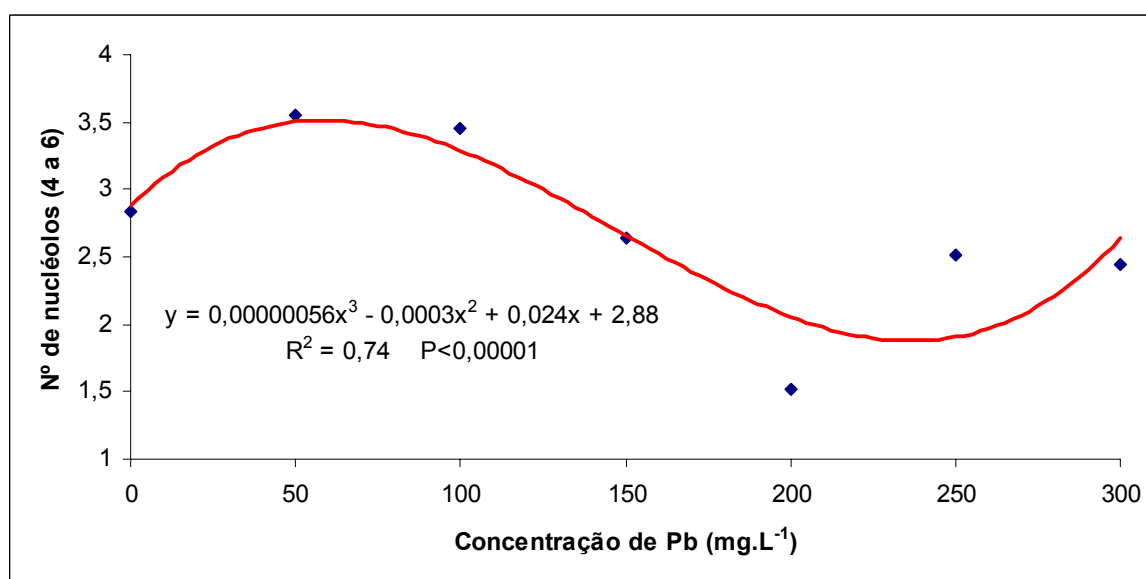


Figura 4.5 - Número de células interfásicas com quatro a seis núcleos em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de chumbo: 0, 50, 100, 150, 200, 250 e 300mg.L⁻¹.

Ao observar a Figura 4.6 constata-se que nas diferentes concentrações de arsênio a ocorrência de células interfásicas com um nucléolo é evidenciada por uma regressão polinomial cúbica, cujo ponto de máximo se localiza na concentração de $15,7\text{mg.L}^{-1}$ e o de menor ocorrência na concentração de $6,3\text{mg.L}^{-1}$ de arsênio. O R^2 encontrado é 0,64 a um nível de significância de 0,0007.

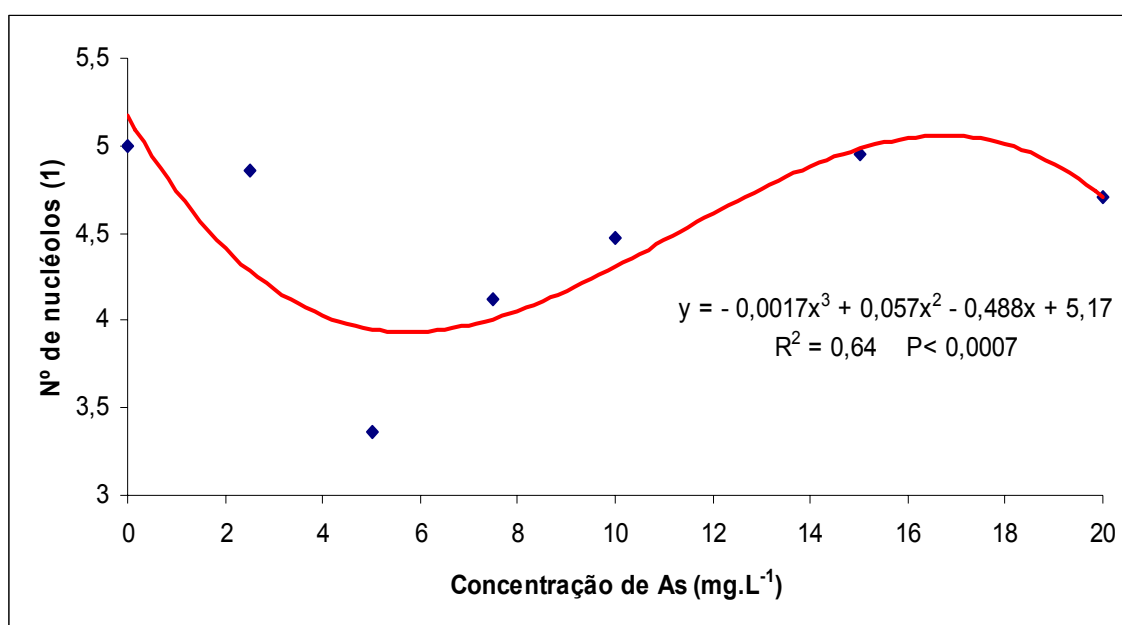


Figura 4.6 - Número de células interfásicas com um nucléolo em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e $20,0\text{mg.L}^{-1}$.

Observa-se na Figura 4.7 que a ocorrência de dois nucléolos, sendo que, um é maior do que o outro em diferentes concentrações de arsênio foi representada por uma regressão polinomial cúbica cujos pontos de mínimo e de máximo ocorreram nas concentrações de $4,66$ e $14,0\text{mg.L}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de determinação é de 73%.

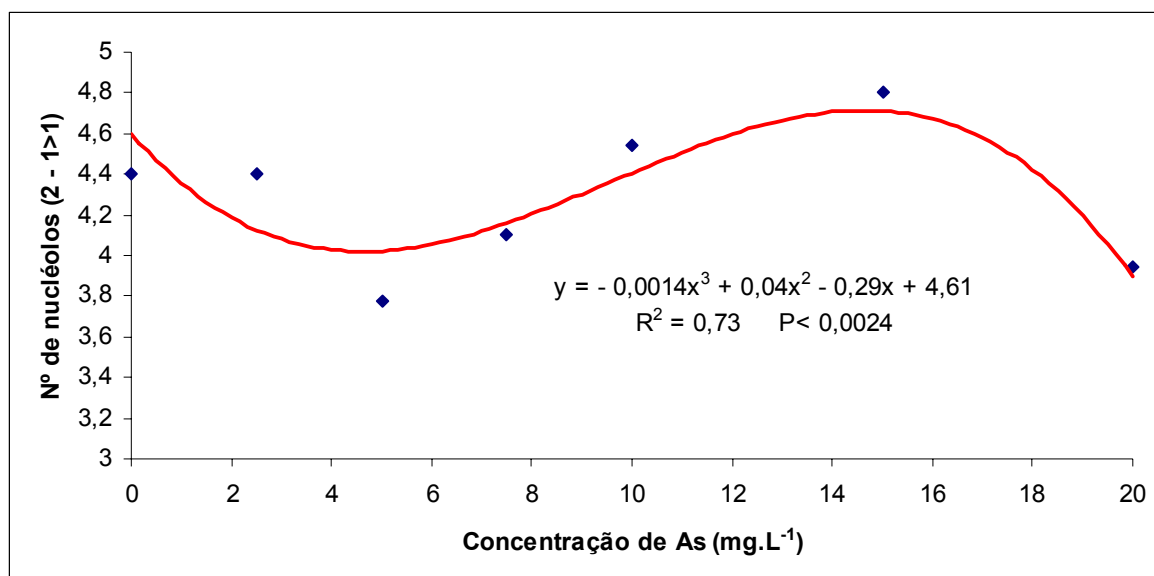


Figura 4.7 - Número de células interfásicas com dois nucléolos, sendo um maior que o outro em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L⁻¹.

Na Figura 4.8 observa-se o número de células interfásicas com três nucléolos de mesmo tamanho nas diferentes concentrações de arsênio. O ponto máximo ocorreu na concentração 16,3 e o de mínimo na concentração de 3,69mg.L⁻¹. O R^2 é de 0,65.

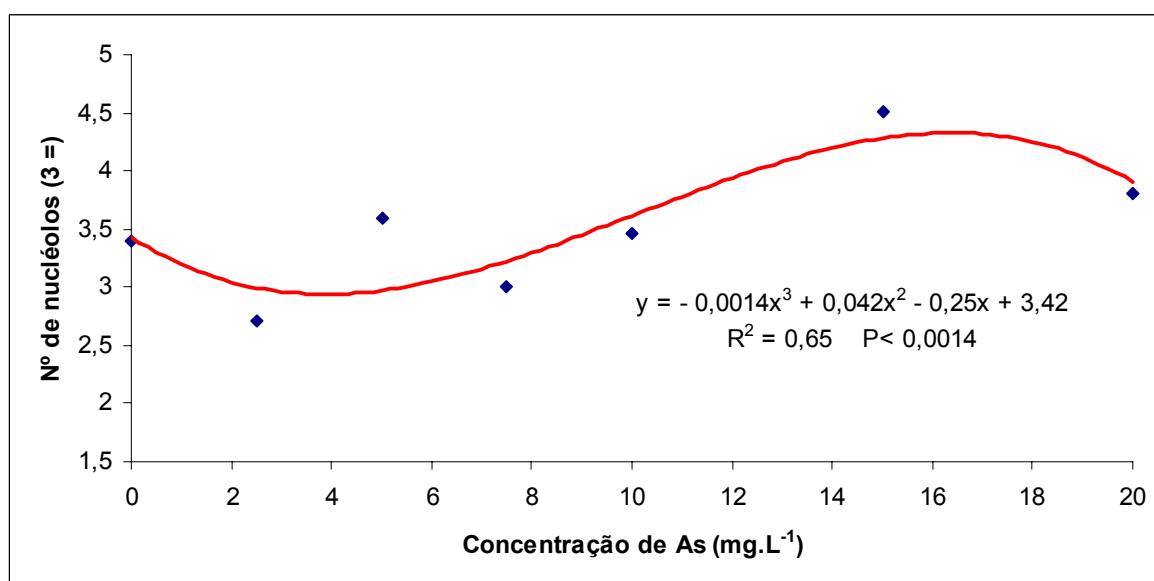


Figura 4.8 - Número de células interfásicas com três nucléolos iguais em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L⁻¹.

Na Figura 4.9 observa-se uma regressão linear ascendente, quanto maior a concentração de arsênio maior é o número de células interfásicas com três nucléolos, sendo que um deles é maior que os restantes. O coeficiente de determinação da equação é de 54%.

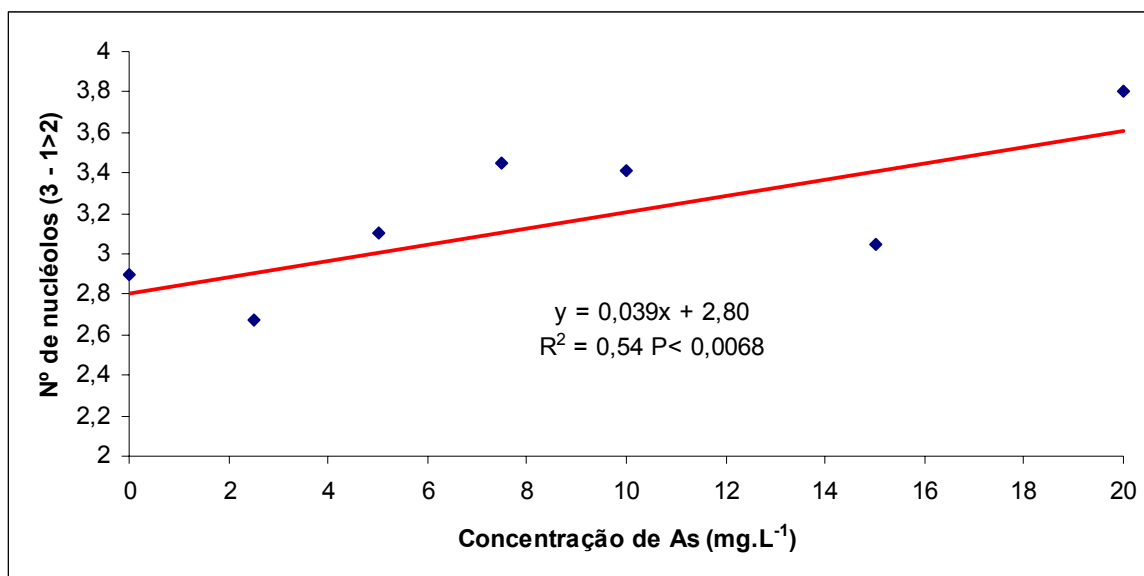


Figura 4.9 - Número de células interfásicas com três nucléolos, sendo que um deles é maior que os demais em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de arsênio: 0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0 e 20,0mg.L⁻¹.

Pode ser observado na Figura 4.10 uma regressão polinomial cúbica, cujo R^2 é de 55%, o número de células interfásicas na classe 3 apresenta o ponto de máximo com 1,96mg.L⁻¹ de mercúrio e ponto de mínima ocorrência dos nucléolos, nesta classe, ocorre com concentração de 0,58mg.L⁻¹ do ET estudado.

Liu *et al.* (1994) estudaram o efeito do sulfato de cobre pentaidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) sobre os nucléolos de cebola, as concentrações utilizadas foram de 10^{-7} até 10^{-1}M . Normalmente, o núcleo diplóide de *A. cepa* contém dois nucléolos, sendo que os efeitos do ET estudado variaram conforme a concentração. Com 10^{-7}M de Cu, após 48h apareceram partículas de nitrato de prata (AgNO_3) no núcleo. À medida que houve o aumento da concentração aumentaram as partículas do nitrato de prata no núcleo, chegando a preenchê-lo completamente (10^{-4}M Cu, 48h e 96h).

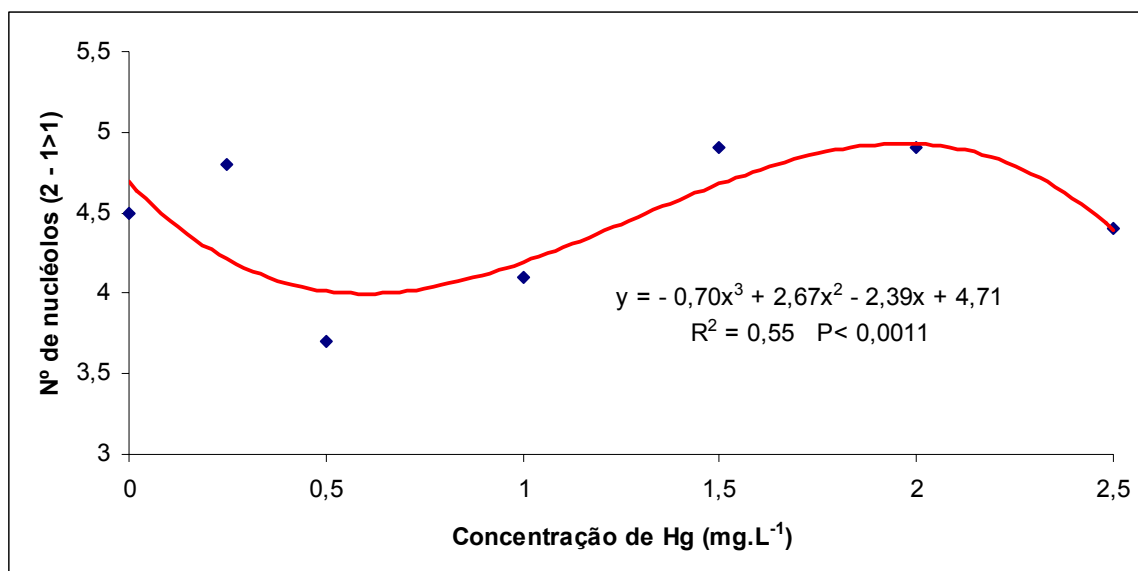


Figura 4.10 - Número de células interfásicas com dois nucléolos, sendo um maior que o outro em *Lactuca sativa* L. nas diferentes concentrações de mercúrio: 0; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5mg.L⁻¹.

Com concentração de 10⁻¹ e 10⁻²M de Cu (48h) a reação com a prata na periferia do nucléolo se tornou mais fraca. Já com concentração de 10⁻³M e 48h de tratamento com o cobre o material do núcleo vazou para o citoplasma, como o núcleo tivesse estourado. Após 96h com 10⁻¹M de Cu o citoplasma ficou com grande quantidade de partículas de prata e o núcleo ficou pequeno e com coloração mais fraca.

Nas figuras 4.11, 4.12, 4.13 e 4.14 observam-se nucléolos de alface sob o efeito de diferentes elementos-traço e na testemunha.

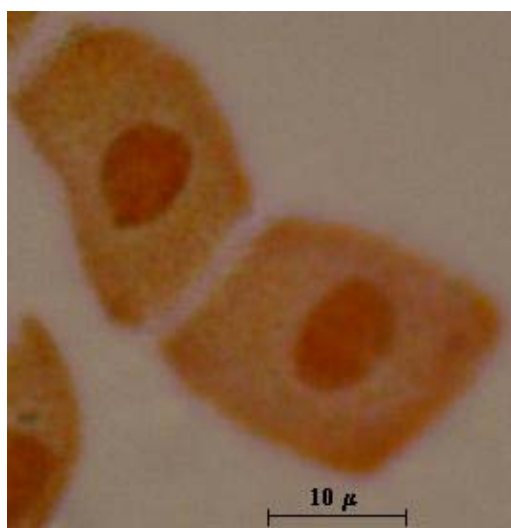


Figura 4.11 - Um nucléolo (↓) de *Lactuca sativa* L. com 1mg.L⁻¹ de cádmio.

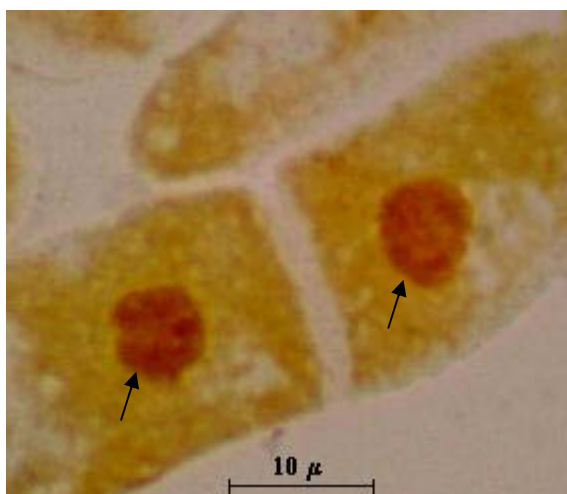


Figura 4.12 - Um nucléolo (↓) em *L. sativa* L. com 10,0 mg.L⁻¹ de arsênio.

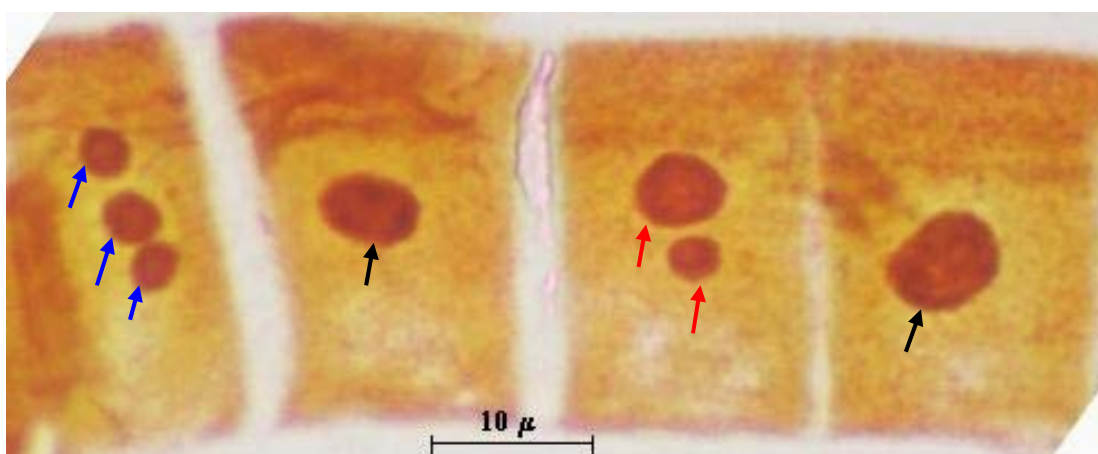


Figura 4.13 - Um (↓), dois (↓↓) e três nucléolos (↓↓↓) de *L. sativa* com 2,0 mg.L⁻¹ de mercúrio.



Figura 4.14 - Fusão de nucléolos (↓) de *L. sativa* L. na testemunha.

Marcano *et al.* (2001) avaliaram as alterações citológicas induzidas pelo cádmio em células meristemáticas de raízes de cebolas. Em células expostas a cádmio na concentração de $7,4 \times 10^{-5}$ M por 12 horas foram observados nucléolos 'colapsados'.

Os efeitos de diversas concentrações de chumbo (0; 5; 10; 15; 20 e 50 mg.L⁻¹) foram estudados por Hu *et al.* (2007) sobre a estrutura das células das folhas de *Potamogeton crispus* (planta aquática de origem européia, mas de grande ocorrência nos Estados Unidos e no Canadá) . Em comparação com o controle ocorreram pequenas transformações no núcleo das plantas, quando as mesmas foram tratadas com 5mg.L⁻¹ de Pb²⁺ por 3 dias. Entretanto, quando a concentração foi de 10 mg.L⁻¹ o núcleo se deformou, a cromatina se condensou e os nucléolos de dispersaram. Com a presença de 20 e 50 mg.L⁻¹ de Pb²⁺ os nucléolos desapareceram. A estimativa de concentração letal para *P. crispus* variou de 10 a 15 mg.L⁻¹ de Pb²⁺.

Liu e Jiang (1991) estudaram o efeito do alumínio (Al⁺³) nos nucléolos de células meristemáticas de raízes de cebola. Com concentração de 10⁻²M de alumínio e 24h de tratamento, o material do núcleo vazou para o citoplasma, diversas partículas ficaram irregularmente distribuídas nele. Este fenômeno também foi observado com concentrações de 10⁻³ e 10⁻⁴M de Al, após 48h de tratamento.

O efeito do Cd foi estudado nos nucléolos das células meristemáticas de cebola por Marcano *et al.* (2002), para este estudo, foram utilizados 10 ppm de CdCl₂ (cloreto de cádmio). Foram observadas alterações nos nucléolos de acordo com o tempo de exposição, após 4h de tratamento a segregação dos nucléolos foi observada, na interfase, provavelmente por causa do efeito do cádmio sobre a síntese de RNAs ribossômicos precursores. A diminuição das fibras do componente granular ocorreu após 8h de exposição ao ET. Foram observadas mudanças na fase G₁, a cromatina ficou muito condensada, permanecendo pré-nucléolos dispersos no interior do núcleo. Por fim, sugeriram que o Cd exerce sua toxicidade alterando a biossíntese do precursor do RNA pré-ribossomal.

Brown *et al.* (2005), mostraram que existem algumas diferenças significativas entre os nucléolos de humanos e de plantas. Observações feitas

com microscopia eletrônica de transmissão revelaram que, em plantas, o componente fibrilar denso é menos denso e ocupa aproximadamente 70% do nucléolo. Na região central do nucléolo foi visualizada uma cavidade, denominada “cavidade do nucléolo”, cuja função ainda é desconhecida.

Conforme a bibliografia consultada e os resultados obtidos no presente trabalho, tornam-se necessários maiores estudos sobre os nucléolos de alface, em função da importância de seu papel biológico nas células desta espécie, como nas células das diferentes espécies viventes. Faz-se necessário, também, maior conhecimento dos efeitos tóxicos dos elementos-traço em plantas, tendo em vista que os mesmos podem contribuir para a compreensão do mecanismo de toxicidade e de tolerância nos demais seres vivos.

CONCLUSÕES

- Os resultados mostram que, tanto *Allium cepa* L. como *Lactuca sativa* L. possuem grande sensibilidade à contaminação pelos elementos-traço estudados, causando diferentes anomalias cromossômicas.

- O aumento da concentração dos ETs afetam, negativamente, a germinação das sementes de *A. cepa* e *L. sativa*.

- O grau de toxicidade e as diferentes anomalias aumentam com o aumento da concentração dos elementos-traço.

- O índice mitótico diminui com o aumento das concentrações dos elementos-traço.

- A presença de cromo inviabiliza a seqüência dos eventos do processo de germinação das sementes de *Lactuca sativa* L.

- A alface possui o número máximo de 6 nucléolos por célula interfásica, mesmo na presença dos elementos-traço arsênio, mercúrio, chumbo e cádmio.

REFERÊNCIAS

AINA, R.; LABRA, M.; FUMAGALLI, P.; VANINI, C.; MARSONI, M.; BRACALE, M.; SGORBATI, S.; HERIO, S. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oriza sativa* L. roots. **Environmental and Experimental Botany** v. 59, p. 381 – 392, 2007.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**. 5. ed. New York: Garland Science, 2008, 1268 p.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. John Wiley and Sons, Inc. New York, 1990, 338 p.

ALMEIDA, C.; COSTA, S. M.; FERNANDES, J.F.; GONÇALVES, P. B.; PINHO, N.M.; SANTOS, C.G.; SILVA, S.G. Estudos de toxicologia de metais pesados em ápices vegetativos de *Allium cepa* L.. **Young Report Environment**, v. 17, p. 18 - 23, 2005.

AMORIM, M. I.; MERGLER, D.; BAHIA, H. D.; MIRANDA, D.; LEBEL, J.; BURBANO, R.; LUCOTTE, M. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 72, n. 4, p. 497 – 507, 2000.

ANDERSON, R. K.; THOMPSON, M.; CULBARD, E.; Selective reduction of As species by continuous hybride generation. **Analyst**, v. 111, p. 1143 – 1152, 1986.

ARKHIPCHUK, V. V.; MALINOVSKAYA, M. V.; GARANKO, N. N. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa* and *Hydra attenuate* cells. **Environmental Toxicology**, v. 15, p. 338 – 344, 2000.

ARKHIPCHUK, V. V.; GARANKO, N. N. A novel nucleolar biomarker in plant and animal cells for assessment of substance cytotoxicity. **Environmental Toxicology**, v. 17, p. 187 – 194, 2002.

ASSCHE, VAN F.; CLIJSTERS, H. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 3, p. 195 – 206, 1990.

BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **New Phytologist**, v.106, p.93 -111, 1987.

BALIGAR, V. C.; FAGERIA, N. K.; ELRASHIDI, M. A. Toxicology and nutrient constraints on root growth. **Hortscience**, Alexandria, v. 33, n. 6, p. 960 -965, 1998.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations on affected by heavy metals stress: a review. **Journal Plant Nutrition**, v.13, p. 1 -37, 1990.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, v. 2, n.2, p. 345 - 361, 1992.

BATTISTIN, A.; BIONDO, E.; COELHO, L. G. M. Chromosomal Characterization of Three Native and One Cultivated Species of *Lathyrus* L. in Southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 4, p. 557 – 563, 1999.

BERGMANN, W. **Nutrition disorders of plants: development, visual and analytical diagnosys**. 2. ed. New York: Gustav Fischer, 1992, 741 p.

BERTON, R.S. Riscos de contaminação do agrossistema com metais pesados. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 259 – 268, 2000.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 445p.

BOENING, D. W. Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. **Chemosphere**, v. 40, p. 1335 – 1351, 2000.

BOISVERT, F. M.; VAN KONINGSBRUGGEN, S.; NAVASCUÉS, J.; LAMOND, A. I. The multifunctional nucleolus. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 574 – 585, 2007.

BRAVO, de HARO, M. I.; CELESTINO del RIO, M.; BAILÓN, de HARO, A. Acumulación y distribución de arsênico y plomo em plantas de bróculi y rábano cultivadas em suelos contaminadas. **Acta de Horticultura da Sociedade Española de Ciências Hortícolas**, v. 48, p. 596 – 599, 2007.

BREWSTER, J. L. **Onions and other vegetables alliums**. Wallingford: CAB International, 1994, 236 p.

BROADLEY, M.; WILLEY, M. J.; WILKINS, J. C.; BAKER, A. J. M.; MEAD, A.; WHITE, P. J. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. **New Phytopatology**, v. 152, p. 9 - 27, 2001.

BROWN, J.W.S.; SHAW, P.J.; SHAW,P.; MARSHALL, D. *Arabidopsis* nucleolar protein database (AtNoPDB). **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 633 - 636, 2005.

BUCIO, L.; GARCIA, C.; SOUZA, V.; HERNANDEZ, E.; GONZALES, C.; BETANCOURT, M.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M. C. Uptake, cellular distribution and DNA damage. Produced by mercuric chloride in a fetal hepatic cell line. **Mutation Research**, v. 423, p. 65 – 72, 1999.

BURGUERA, M.; BURGUERA, J. L. Flow injection-electrothermal atomic absorption spectrometry for arsenic speciation using the Fleitmann reaction. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 8, p. 229 - 233, 1993.

CABRERA, C.; ORTEGA, E.; GALLEG0, C.; LOPEZ, M. C.; LORENZO, M. L.; ASENSIO, C. Cadmium concentration in farmlands in southern Spain: possible sources of contamination. **The Science of the Total Environment**, v. 153, p. 261 – 265, 1994.

CARMO-FONSECA, M.; MENDES-SOARES, L.; CAMPOS I. To be or not to be in the nucleolus. **Nature Cell Biology**, v. 2 p. 107 – 112, 2000.

CHANG, A.C.; PAGE, A.L.; WARNEKE, J.E.; GRGUREVIC, E. Sequential extraction on soil heavy metals following a sludge application. **Journal of Environmental Quality**, v.13, p.33 - 38, 1987.

CHUGH, L. K., SAWHNEY, S. K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 1 – 5, 1996.

COSTA, A. C. S.; LOPES, L. F.; D'OLIVEIRA, P. S.; SILVA, M. A. G.; GIL, L.G.; ROCHA, R. A. A. Acúmulo de Zn, Fe e Pb em plantas de crisântemo após cultivo em substrato contendo doses de resíduo industrial de galvanoplastia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 26, n. 4, p. 407 - 411, 2004.

CUNAT, P. J. Chromium in stainless steel welding kimes, n. 9, 2002. On line in: [http:// www.chromium-asoc.com/publications/crfile9apr02.htm](http://www.chromium-asoc.com/publications/crfile9apr02.htm). captado em 15 de fevereiro de 2008 às 18h30min.

DARTSCH, P. C.; KIMMEL, R.; SCHMAL, F. W. Nephrotoxic and hepatotoxic effect of a chromium (VI) compound in comparasion to a basic chromium (III) tanning agent. **Word Leather**, Liverpool, v. 3, p. 66 – 70, 1998.

DAS, D.; CHATTERJEE, A.; MANDAL, B.K.; CHOWDHURY, T.R.; SAMANTA, G. CHAKRABORTI, D. Arsenic in groundwater in 6 districts of West-Bengal, India - The biggest arsenic calamity in the world .1. arsenic species in drinking-water and urine of the affected people. **Analyst**, v. 120, p. 643 - 650, 1995.

DAUD, M. K.; SUN, Y.; DAWOOD, M.; HAYAT, Y.; VARIATH, M. T.; WU, Y.; RAZIUDDIN; MISHKAT, U.; SALAHUDDIN; NAJEEB, U.; ZHU, S. Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars. **Journal of Hazardous Materials**, p. 1 -11, 2008.

DOVGALIUK, Al.; KALINIAK, T. B.; BLIUM, Ia B. Cytogenetic effects of toxic metal salts on apical meristem cells of *Allium cepa* L. seeds roots. **Tsitologiya i Genetika**, v.35, n. 2, p. 3 - 10, 2001.

ELINDER, C. G.; JARUP, L. Cadmium exposure and health risks: recent findings. **Ambio**, v. 25, n. 5, p. 370 – 373, 1996.

EL-SHAHABY, A.O.; ABDEL MIGID, H.M.; SOLIMAN, M.I.; MASHALY, I.A. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. **Pakistan Journal of Biology and Science**, v. 6, p. 23 - 28, 2003.

FERNANDES, F. (coord.) **Programa de Pesquisa em Saneamento Básico. Manual Prático para a compostagem de Bio sólidos**. Rio de Janeiro; ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1999, 84p.

FERNANDES, T. C. C.; VENTURA, B. C.; MARIN-MORALES, M. A. O uso do teste de micronúcleo na detecção de genotoxicidade do herbicida Trifluralina, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa* L. In: 48º Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Anais do 48º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP: CNG, CD Rom, 2002.

FESKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99 – 112, 1985.

FLORA, S. de; BENNICELLI, C.; BAGNASCO, M. Genotoxicity of mercury compounds: A review. **Mutation Research**, v. 317, n. 1, p. 57 – 79, 1994.

GARBISU, C.; ITZIAR, A.; Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 229 – 236, 2001.

GBARUKO, B. C.; FRIDAY, O. U. Bioaccumulation of heavy metals in some fauna and flora. **International Journal of Environment Science and Tecnology**, v. 4, n. 2, p. 197 – 202, 2007.

GEBEL, T. W. Genotoxicity of arsenical compounds. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, p. 249 - 262, 2001.

GEETA, C. H.; JASWANT, S.; VISWANA, T. Effect of pH and temperatura on the uptake of cadmium by *Lemna minor*. **Environmental Contamination Toxicology**, v.47, p. 84 – 90, 1990.

GICHNER, T.; MENKE, M.; STAVREVA, D. A.; SCHUBERT, I. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans. **Mutagenesis**, v. 15, n. 5, p. 385 – 389, 2000.

GICHNER, T.; PATKOVÁ, Z.; SZAKOVÁ, J.; DEMMEROVÁ, K. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, n. 3, p. 420 – 426, 2006.

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273 – 291, 1982.

GRANT, C. A.; BUCKLEY, W. T.; BAILEY, I.D.; SELLES, F. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, p. 1 -17, 1998.

GRAYUM, M. H. Alliaceae. In: HAMMEL, B. E.; GRAYUM, M. H.; HERRERA, C.; ZAMORA, C. Manual de plantas da Costa Rica. St. Louis: Missouri Botanical Garden, v. 2, p. 43 – 45, 2003.

GREGER, M.; BRAMMER, E.; LINDBERG, S.; LARSSON, G.; IDESTAM-ALMQUIST, J. Uptake and Physiological Effects of Cadmium in Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Related to Mineral provision. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, n. 6, p. 729 – 737, 1991.

GOYER, R. A. Toxicity effects of metals. In Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klassen, CD Ed. McGraw-Hill Health Professions Division, 1996.

HAN, Y.; ZHANG, J.; CHEN, X.; GAO, Z.; XUAN, W.; XU, S.; DING, X.; SHEN, W. Carbon monoxide alleviates cadmium-induced oxidative damage by modulating glutathione metabolism in the roots of *Medicago sativa* L. **New Phytologist** v. 177, p. 155 -166, 2008.

HARPER, K.; OLIVEIRA, A. P.; Determinação de Elementos-traço em solos e lodos de esgoto por ICP-OES. **Revista Analytica**, n. 23, p. 52 - 60, 2006.

HARTWIG, A.; ASMUSS, M.; EHLEBEN, I.; HERZER, U.; KOSTELAC, D.; PELZER, A.; SCHWERDTLE, T.; BÜRKLE, A. Interference by Toxic Metal Ions with DNA Repair Processes and Cell Cycle Control: Molecular Mechanisms. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 5, p. 797 – 799, 2002.

HERICKOFF, L., STACK, S. AND ROBERTSON, J. Staining plant cells with silver III. **Biotechnenology and Histochemistry**, v. 67, p.171 – 182, 1992.

HISCOX, J. A. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 119 – 127, 2007.

HOODA, P. S.; ALLOWAY, B. J. The effect of liming on heavy metal concentration in wheat, carrots and spinach grown on previously sludge-applied soils. **Journal of Agricultural Science**, v. 127, p. 289 – 294, 1996.

HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. **Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: a one-step method.** Experientia, n. 36, p. 1014 - 1015, 1980.

HU, Y.; SU, L.; SNOW, E. T. Arsenic toxicity is enzyme specific and its affects on ligation are not caused by the direct inhibition of DNA repair enzymes. **Mutation Research**, v. 408, n. 3, p. 203 – 218, 1998.

HU, J. Z.; SHI, G. X.; XU, Q. S.; WANG, X.; YUAN, Q. H.; DU, K. H. Effectsof Pb²⁺ on the Active Oxygen-Scavenging Enzyme Activities and Ultrastructure in *Potamogeton crispus* Leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 54, n. 3, p. 414 – 419, 2007.

HUECAS, G. C.; QUINTANA, N. J. R.; SANTIAGO, M. A.; LÓPEZ, L. A. Retención de metales pesados em suelos: riesgos para la salud. **Schironia**, n. 6, p. 12 – 13, 2007.

IANNACONE, J. O.; ALVARIÑO, L. F. Efecto ecotoxicológico de três metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas vasculares. **Agricultura Técnica**, v. 65, n. 2, p. 198 – 203, 2005.

IAP – GTZ, **Coletânea de textos traduzidos: índices hidro-ambientais – análise e avaliação do seu uso na estimação dos impactos ambientais e projetos hídricos**. Curitiba – PR, cap. 2, 52 p., 1995.

INTERNATIONAL LABOUR OFFICE – ILO **Encyclopedia of occupational health and safety**, Genova, 1998. CD-ROM.

JELIAZKOVA, E. A.; CRAKER, L. E. Heavy metals and seed germination in some medicinal and aromatic plants. **Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants**, v. 10, n. 2, p. 105 – 112, 2003.

JIANG, W.; LUI, D.; HOU, W. Hyperaccumulation of cadmium by roots, bulbs and shoots of garlic (*Allium sativum* L.). **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 9 – 13, 2001.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2001, 413 p.

KERTULIS, G. M.; MA, L. Q.; MacDONALD, G. E.; CHEN, R.; WINEFORDNER, J. D.; CAI, Y, Arsenic speciation and transport in *Pteris vittata* L. and the effects on phosphorus in the xylem sap. **Environmental and Experimental Botany**, v. 54, p. 239 – 247, 2005.

KIRAN, Y.; SAHIN, A. The effects of the lead on the seed germination, root growth, and root tip cell mitotic division of *Lens culinaris* Medik. **Journal of Science**, v. 18, n. 1, p. 17 – 25, 2005.

LASAT, M. M. The use of plants for the removal of toxic metals from contaminated soil. **American Association for the Advancement of Science, Environmental Science and Engineering Fellow**, 2000, 33 p.

LEITE, D. L.; PEREIRA, A. S.; AUGUSTIN, E.; CHOER, E. Programa de melhoramento genético de cebola na Embrapa Clima Temperado. In: JORNADA CIENTÍFICA DE CEBOLA DO MERCOSUL, 5, 2002, Pelotas. Resumos... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 72 – 73, 2002 (Embrapa Clima Temperado. Documento, 85)

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v. 281, p. 89 – 92, 1992.

LI, JIH-HENG; ROSSMAM, T. G. Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: A possible mechanism of its comutagenesis. **Molecular Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1 - 9, 1989.

LIMA, G.J.E.O. **Biodisponibilidade de cádmio, zinco e chumbo presentes em calcário comercial para feijoeiro cultivado em três solos do Noroeste de Minas Gerais**. 2001, 148p. Dissertação Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LIN, C. J.; PEHKONEN, S. O. The chemistry of atmospheric mercury: a review. **Atmospheric Environmental**, v. 33, p. 2067 – 2079, 1999.

LIU, D.; JIANG, W. Effects of Al^{+3} on the nucleolus in root tip cells of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 115, p. 213 – 219, 1991.

LIU, D.; JIANG, W.; CHENG, LU; ZHAO, F.; HAO, Y.; GUO, L. Effects of copper sulfate on the nucleolus of *Allium cepa* root-tip cells. **Hereditas**, v. 120, p. 87 – 90, 1994.

LIU, D.; JIANG, W.; LIU, C.; XIN, C.; HOU, W. Uptake and accumulation of lead by roots, hypocotyls and shoots of Indian mustard [*Brassica juncea* (L.)]. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 3, p. 273 – 277, 2000.

LIU, D.; JIANG, W.; GAO, X. Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. **Biologia Plantarum**, v. 47, n. 1, p. 79 – 83, 2004.

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, n.5, p. 299 – 311, 2003.

LIU, D.; KOTTKE, I. Subcellular localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by electron energy loss spectroscopy and cytochemistry. **Journal Bioscience**, v. 29, n. 3, p. 329 – 335, 2004.

LIU, C.P., SHEN, Z.G., LI, X.D. Accumulation and detoxification of cadmium in *Brassica pekinensis* and *B. chinensis*. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 116-120, 2007.

LIU, D.; KOTTKE, I.; ADAM, D. Localization of cadmium in the root cells of *Allium cepa* by energy dispersive x-ray analysis. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 2, p. 363 – 366, 2007.

MA, T. H.; XU, Z.; XU C.; MCCONNELL H.; RABAGO E. V.; ARREOLA G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, p. 185 - 195, 1995.

MANDIWANA, K. L.; PANICHEV, N.; KATAEVA, M.; SIEBERT, S. The solubility of Cr (III) and Cr (VI) compounds in soil and their availability to plants. **Journal of Hazardous Materials**, v. 147, n. 1 -2, p. 540 – 545, 2007.

MANTOVANI, J. R.; FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C.; CHIBA, M. K.; BRAZ, L. T. Calagem e adubação com vermicomposto de lixo urbano na produção e nos teores de metais pesados em alface. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 498 – 504, 2003.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X.; BRACHO, M.; SOTO, L. M. Valoración del efecto tóxico del cádmio em células meristemáticas de cebolla *Allium cepa* L. **Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia**, v. 16, p. 476 – 487, 1999.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; MONTIEL, X. Alteraciones citológicas inducidas por el cádmio em células meristemáticas de raíces de cebolla (*Allium cepa* L.). **Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia**, v. 18, p. 247 – 257, 2001.

MARCANO, L.; CARRUYO, A. I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L.: Ultrastructural study. **Environmental Research**, v. 88, p. 30 -35, 2002.

MARCANO, L.; CARRUYO, A. I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221 – 226, 2004.

MARUTHI, B. B. S.; DILE, S. V., HAN, F.; MONTS, D. L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental Experimental Botany**, v. 54, p. 131 - 141, 2005.

MATSCHULLAT, J. Arsenic in the geosphere – a review. **The Science of The Total Environment**, v. 249, n. 1 – 3, p. 297 – 312, 2000.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 18, p. 77 - 85, 2005.

MATTIAZZO-PREZZOTO, M. E. **Comportamento do cobre, cádmio, cromo, níquel e zinco adicionados a solos de clima tropical em diferentes valores de pH**. Tese de livre docência – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, 1994, 197 p.

MEDINA, F. J.; CERDIDO, A.; de CÁRCER, G. The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. **European Journal of Histochemistry**, v. 45, n. 1, p. 5 - 6, 2001.

MELLO, M. L. S. Nucléolo. In: CARVALHO, H.F.; PIMENTEL, S.M.R. **A célula 2001**. São Paulo: Manole, 2001.

MENDES, M. S.; VIÉGAS, J.; PEIL, R. M.; PILLON, C. N.; MAUCH, C. R. Germinação de sementes de alface sob diferentes concentrações de elementos-traço: dados preliminares. In: Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação

da Embrapa Clima Temperado, 2006, Pelotas, RS. **Anais: Idéias, Inovação e Tecnologia**, Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2006. p. 65 – 68.

MITTEREGGER-JÚNIOR, H.; FERRAZ-DIAS, J.; LÚCIA-YONEMA, M.; AREZON, A.; SILVA, J.; PEGAS-HENRIQUES, J. A. Avaliação das Atividades Tóxicas e Mutagênicas da Água e do Sedimento do Arroio Estância Velha, Região Coureira-calçadista, Utilizando *Allium cepa* L. **Jornal Brasileiro da Sociedade de Ecotoxicologia**, v. 1, n. 2, p. 147 - 151, 2006.

MOLINA, T. F.; TILLMANN, M. A. A.; DODE, L. B.; VIÉGAS, J. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 28, nº 3, p.72 - 81, 2006.

MORGAN, D. O. Regulation of the APC and the exit from mitosis. **Nature Cell Biology**, v. 1, p. 47 – 53, 1999.

MOUSTAKAS, N. K.; AKOUMIANAKIS, K. A.; PASSAM, H. C. Cadmium accumulation and its effect on yield of lettuce, radish and cucumber. **Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, n. 11 e 12, p. 1793 – 1802, 2001.

MULLIN, J. M. Allium In: DAVIDSE, E.; SOUZA, S. M.; CHARTER, A. O. **Flora Mesoamericana**. México: Universidade Nacional Autónoma do México, v. 6, p. 31-32, 1994.

MUNZUROGLU, O.; GECKIL, H. Effects of metals on Seed Germination, Root Elongation, and Coleoptile and Hypocotyl Growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 43, p. 203-213, 2002.

OLSON, M. O.; HINGORANI, K.; SZE BENI, A. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. **International Review of Cytology**, v. 219, p. 199-266, 2002.

PATRA, M.; SHARMA, A. Mercury Toxicity in Plants. **The Botanical Review**, v. 66, p. 379-422, 2000.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.52, p. 199-223, 2004.

PEDERSON, T. The plurifunctional nucleolus. **Nucleic Acids Research**, v. 26, n. 17, p. 3871-3876, 1998.

PRAKASH, S.M.; YOGEEETHA, M.S.; PARMA, V.R. Effects irrigation water with chromium germination and growth of radish (*Rhaphanus sativus* L.). **Nature, Environment Poluttion and Technology**, v. 3, 121-124, 2004.

PRASAD, M. N. V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plant. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, p. 525-544, 1995.

RAHMAN, A. M.; HASEGAWA, M.; RAHMAN, M.; ISLAM, M. N.; MIAH, M. M.; TASMEN, A. Effect of arsenic on photosynthesis, growth and yield of five widely cultivated rice (*Oriza sativa* L.) varieties in Bangladesh. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1072 – 1079, 2007.

RESENDE, M.; CURI, N.; RESENDE, S.B.; CÔRREA, G.F. **Pedologia: base para distinção de ambientes**, 2 ed., Viçosa: Neput, 1997, 367p.

RIGONATO, J.; JORDÃO, B.Q. Uso do teste de Allium na avaliação de amostras ambientais. In: 48º Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia, SP. **Anais do 48º Congresso Nacional de Genética**, Águas de Lindóia, SP: CNG, CD Rom, 2002.

RODRIGUES, M.T.T. Empleo de los ensayos com plantas em el control de contaminantes tóxicos ambientales. **Revista Cubana Higiene Epidemiologia**, v. 41, p. 2 - 3, 2003.

ROMERO-PUERTAS, M.; MCCARTHY, I.; SANDALIO, L. M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F.J.; GÓMES, M.; RÍO, L. A. del Cadmium toxixity and oxidative metabolismo of pea leaf peroxisomes. **Journal of the Society for Free Radical Research**, v. 31, p. 25 – 31, 1999.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P. Cádmio e a atividade de peroxidase durante a germinação de sementes de feijoeiro. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 197 – 199, 2001.

SANDALIO, L. M.; DALURZO, H. C.; GÓMES, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; RÍO, L. A. del, Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolismo of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 364, p. 2115 – 2126, 2001.

SANG, H. K.; RYABOV, E.; KALININA, N.; RAKITINA, D. V.; GILLESPIE, T.; MACFARLANE, S.; HAUPT, S.; JOHN, W. S.; TALIANSKY, M. B. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 26, p. 2169 – 2179, 2007.

SANTOS, I. C.; CASALI, V. W.; MIRANDA, G. V. Teores de metais pesados, K e Na, no substrato, em função de doses de composto orgânico de lixo urbano e de cultivares de alface. **Ciência Rural**, v. 29, n. 3, p. 123 – 134, 1999.

SAUVE, S.; McBRIDE, M. B.; HENDERSHOT, W. H. Speciation of lead in contaminated soils. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 2, p. 149 – 155, 1997.

SIMEONI, L. A.; BRABARICK, K. A.; SABEY, B. R. Effect of a small-scale composting of sewage sludge on heavy metal availability to plants. **Journal Environmental Quality**, v. 13, p. 264 – 268, 1984.

SIRRI, V.; URCUQUI-INCHIMA, S.; ROUSSEL, P.; HERNANDEZ-VERDUM, D. Nucleolus: the fascinating nuclear body. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 129, p. 13 – 31, 2008.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G. de; MOREIRA, F.M.S. Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, v.29, p.175 - 183, 2005.

SONG, Y.; XU, H.; REN, L.; GONG, P.; ZHOU, Q. Eco-toxicological effects of heavy metals on the inhibition of seed germination and root elongation of Chinese cabbages in soils. **Huan Jing Ke Xue**, v. 23, n. 1, p. 103 – 107, 2002.

SRIVASTAVA, R. and SRIVASTAVA, G. K. Meiotic Abnormalities and Tetraploidy (by Lead Nitrate) Induced by Heavy Metals (Pb, Cu, Hg, Zn) on *Helianthus annuus* L. **Cytologia**, v. 69, p. 119 - 124, 2004.

TRAINA, S. J.; LAPERCHÉ, V. Contaminant bioavailability in soils, sediments, and aquatic environments. **Proceeding National Academic Science of the State of America**, Washington, v. 96, p. 3365 – 3371, 1999.

TSUTIYA, T. M.; COMPARINI, J. B.; SOBRINHO, P. A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P. C. T.; MELFI, A. J.; MELO, W. J.; MARQUES, M. O., **Biossólidos na Agricultura**, SP, 2001.

ÜNYAYAR, S.; ÇELİK, A.; CEKİÇ, F. O.; GÖZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v.21, n. 1, p. 77 – 81, 2006.

USPHS (United States Public Health Service). Toxicological profile for cadmium on CD – ROM, Agency for Toxic Substances and Diseases, 1997.

VIEIRA, D.; VICENTINI V. E. P. Estudo do efeito mutagênico do floxacina em *Allium cepa*. *Genet Mol Biol Supplement*. 42º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brazil, 1997.

WAGNER, G. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advance Agronomy**, v. 51, p. 173 – 212, 1993.

WANG, X.; XING, Q. Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 16 – 21, 2005.

WANG, M.; ZOU, J.; DUAN, X.; JIANG, W.; LIU, D. Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 82 – 88, 2007.

WEISBERG, M.; JOSEPH, P.; HALE, B. ; BEYERSMANN, D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, v. 32, p. 95 – 110, 2003.

WIERZBICKA, M.; OBIDZINSKA, J. The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. **Plant Science**, v. 137, p. 155 – 171, 1998.

WILKE, N.; DEMARCHI, M. V.; LERDA, D.; SOLÍS, V. M. Determinación electroquímica de plumbemia em niños residentes em la Ciudad de Córdoba,

Argentina. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v. 24, n. 4, p. 471 – 479, 2000.

WHO (World Health Organization), IPCS Environmental Health Criteria 85 – inorganic. Geneva, 1995, 300p. Publish under the joint sponsorship of the **United Nations Environment Program, the International Labour Organization, and the World Health Organization**.

YOSHIHARA, T.; HODOSHIMA, H.; MIYANO, Y.; SHOJI, K.; SHIMADA, H.; GOTO, F. Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. **Plant Cell Reports**, v. 9, p. 1 – 9, 2005.

YURI, J. E.; MOTA, J. H.; SOUZA, R. J.; RESENDE, G. M.; FREITAS, S. A. C.; RODRIGUES JÚNIOR, J. C. **Alface Americana: Cultivo Comercial**. Lavras: UFLA, 2002, 49p. Texto Acadêmico.

ZAYED, A.; LYTLE, C. M.; QIAN, J-H; TERRY, N. Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. **Planta**, v. 206, p. 293 – 299, 1998.

ZHANG, Y.; YANG, X. The effects of cadmium on cell division and chromosomal morphology of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, p. 121 – 126, 1994.

ZHELJAZKOV, V. D.; NIELSEN, N. E. Effects of Heavy Metals on Peppermint and Cornmint. **Plant Soil**, v. 178, p. 12 – 20, 1996.

APÊNDICE

Tabela 1 - Análise da variação na germinação das sementes de *Allium cepa* L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	3	66,2457372			
Tratam	6	532,8534997	88,8089166	15,1605	0,00003
Resíduo	18	105,4422239	5,8579013		
Total	27	704,5414609			

Média Geral = 72,383659

Coeficiente de Variação = 3,344%

Tabela 2 - Análise da variação na germinação das sementes de *Allium cepa* L. na presença de diferentes concentrações de cromo

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	3	152,7639474			
Tratam	6	779,1947706	129,8657951	15,7610	0,00002
Resíduo	18	148,3143469	8,2396859		
Total	27	1080,2730650			

Média Geral = 70,467857

Coeficiente de Variação = 4,073%

Tabela 3 - Análise da variação na germinação das sementes de *Allium cepa* L. na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	3	8,4687671			
Tratam.	6	1185,3785419	197,5630903	8,8144	0,00028
Residuo	18	403,4444190	22,4135788		
Total	27	1597,2917281			

Média Geral = 69,202255

Coeficiente de Variação = 6,841%

Tabela 4 - Análise da variação na germinação das sementes de *Allium cepa* L. na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	3	52,0456277			
Tratam	6	730,5979407	121,7663235	11,7026	0,00008
Resíduo	18	187,2916671	10,4050926		
Total	27	969,9352355			

Média Geral = 72,574997

Coeficiente de Variação = 4,445%

Tabela 5 - Análise da variação na germinação das sementes de *Allium cepa* L. na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	3	8,6733235			
Tratam	6	582,4759504	97,0793251	10,4981	0,00013
Resíduo	18	166,4523835	9,2473546		
Total	27	757,6016574			

Média Geral = 72,830376

Coeficiente de Variação = 4,175%

Tabela 6 - Análise da variação na interfase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,0656097			
Tratam	30	20,2962113	0,6765404	71,2172	0,00001
Resíduo	60	0,5699804	0,0094997		
Total	92	20,9318014			

Média Geral = 30,901869

Coeficiente de Variação = 0,315%

Tabela 7 - Análise da variação na prófase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,2115623			
Tratam	30	118,8753558	3,9625119	86,4177	0,00001
Resíduo	60	2,7511792	0,0458530		
Total	92	121,8380974			

Média Geral = 3,246440

Coeficiente de Variação = 6,596%

Tabela 8 - Análise da variação na prometáfase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,317583			
Tratam	30	89,5413196	2,9847107	68,9455	0,00001
Resíduo	60	2,5974507	0,0432908		
Total	92	92,4563186			

Média Geral = 2,983005

Coeficiente de Variação = 6,975%

Tabela 9 - Análise da variação na metáfase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,3686080			
Tratam	30	80,7316936	2,6910565	51,2196	0,00001
Resíduo	60	3,1523723	0,0525395		
Total	92	84,2526739			

Média Geral = 3,151629

Coeficiente de Variação = 7,273%

Tabela 10 - Análise da variação na anáfase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,2514506			
Tratam	30	82,4346748	2,7478225	51,6814	0,00001
Resíduo	60	3,1901120	0,0531685		
Total	92	85,8762373			

Média Geral = 3,028758

Coeficiente de Variação = 7,613%

Tabela 11 - Análise da variação na telófase em *Allium cepa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	1,3061056			
Tratam	30	59,4721777	1,9824059	32,5293	0,00001
Resíduo	60	3,6565281	0,0609421		
Total	92	64,4348113			

Média Geral = 2,709135

Coeficiente de Variação = 9,112%

Tabela 12 - Análise da variação na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de cromo

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	4	4,1664808			
Tratam.	6	3281,603923	546,9339873	68,0858	0,00001
Resíduo	24	192,7923679	8,0330153		
Total	34	3478,562772			

Média Geral = 66,005180

Coeficiente de Variação = 4,294%

Tabela 13 - Análise da variação na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	4	27,3216255			
Tratam.	6	314,4541034	52,409005	14,6889	0,00001
Resíduo	24	85,6303591	3,5679316		
Total	34	427,4060195			

Média Geral = 79,291275

Coeficiente de Variação = 2,382 %

Tabela 14 - Análise da variação na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	4	3,1140888			
Tratam.	6	564,1080939	94,0180157	15,0537	0,00001
Resíduo	24	149,8918237	6,2454927		
Total	34	717,1140065			

Média Geral = 77,964439

Coeficiente de Variação = 3,205%

Tabela 15 - Análise da variação na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	4	4,5828734			
Tratam.	6	4,2579808	75,3763301	6,1975	0,00071
Resíduo	24	1,8986549	12,1624440		
Total	34	8,7395091			

Média Geral = 77,600410

Coeficiente de Variação = 4,494%

Tabela 16 - Análise da variação na germinação das sementes de *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB.>F
Blocos	4	25,5012666			
Tratam.	6	311,4797244	51,913287 ₄	11,8192	0,00003
Resíduo	24	105,4151393	4,3922975		
Total	34	442,3961303			

Média Geral = 79,000084

Coeficiente de Variação = 2,653%

Tabela 17 - Análise da variação na interfase em *Lactuca sativa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,0015345			
Tratam	24	12,3151380	0,5131307	140,2828	0,00001
Resíduo	48	0,1755758	0,0036578		
Total	74	12,4922483			

Média Geral = 31,323584

Coeficiente de Variação = 0,193%

Tabela 18 - Análise da variação na prófase em *Lactuca sativa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,0235894			
Tratam	24	51,3707910	2,1404496	50,8562	0,00001
Resíduo	48	2,0202375	0,0420883		
Total	74	53,4146179			

Média Geral = 2,225864

Coeficiente de Variação = 9,217%

Tabela 19 - Análise da variação na prometáfase em *Lactuca sativa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,0505486			
Tratam	24	45,8889105	1,9120379	31,1580	0,00001
Resíduo	48	2,9455642	0,0613659		
Total	74	48,8850324			

Média Geral = 2,172909

Coeficiente de Variação = 11,400%

Tabela 20 - Análise da variação na metáfase em *Lactuca sativa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,5934110			
Tratam	24	40,8960895	1,7040037	24,4658	0,00001
Resíduo	48	3,3431220	0,0696484		
Total	74	44,8326225			

Média Geral = 2,145281

Coeficiente de Variação = 12,302%

Tabela 21 - Análise da variação na anáfase em *Lactuca sativa* L.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,0452094			
Tratam	24	42,6627263	1,7776136	29,8520	0,00001
Resíduo	48	2,8582852	0,0595476		
Total	74	45,5662209			

Média Geral = 1,947421

Coeficiente de Variação = 12,531%

Tabela 22 - Análise da variação na telófase em *Lactuca sativa* L.

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,1715128			
Tratam	24	34,5089444	1,4378727	20,3939	0,00001
Resíduo	48	3,3842469	0,0705051		
Total	74	38,0647041			

Média Geral = 1,854491

Coeficiente de Variação = 14,318%

Tabela 23 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,4475015			
Nucléolos	6	104,672040	17,4453401	72,5447	0,00001
Concentração	6	0,2860333	0,0476722	0,1982	0,97522
Nucl. X Conc.	36	10,1107471	0,2808541	1,1679	0,27144
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		
Total	146	138,6021265			

Média Geral = 3,80

Coeficiente de Variação = 12,90%

Tabela 24 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0969578	0,0969578	0,40319	0,53410
Regressão Quadrática	1	0,6428782	0,6428782	2,67334	0,10135
Regressão Cubica	1	0,0531330	0,0531330	0,22095	0,64458
Desvios de Regr.	3	0,1910817	0,0636939	0,26486	0,85172
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 25 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,3283115	0,3283115	1,36525	0,24392
Regressão Quadrática	1	0,1580172	0,1580172	0,65710	0,57493
Regressão Cubica	1	0,0189692	0,0189692	0,07888	0,77621
Desvios de Regr.	3	0,0255362	0,0085121	0,03540	0,99047
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 26 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,7417045	0,7417045	3,08430	0,07850
Regressão Quadrática	1	0,0126873	0,0126873	0,05276	0,81370
Regressão Cubica	1	1,4029110	1,4029110	5,83386	0,01670
Desvios de Regr.	3	0,0175832	0,0058611	0,02437	0,99435
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 27 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	1,0783591	1,0783591	4,48425	0,03456
Regressão Quadrática	1	0,7316012	0,7316012	3,04229	0,08055
Regressão Cubica	1	0,0688460	0,0688460	0,28629	0,60044
Desvios de Regr.	3	1,5900836	0,5300279	2,20407	0,09124
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 28 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,5210493	0,5210493	2,16673	0,14045
Regressão Quadrática	1	0,0424336	0,0424336	0,17646	0,67882
Regressão Cubica	1	0,0392952	0,0392952	0,16340	0,68972
Desvios de Regr.	3	0,6211911	0,2070637	0,86105	0,53331
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 29 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,8288949	0,8288949	3,44688	0,06303
Regressão Quadrática	1	0,0113763	0,0113763	0,04731	0,82286
Regressão Cubica	1	0,0029772	0,0029772	0,01238	0,90782
Desvios de Regr.	3	0,9287187	0,3095729	1,28733	0,28241
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 30 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de cádmio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0028657	0,0028657	0,01192	0,90959
Regressão Quadrática	1	0,1163188	0,1163188	0,48370	0,50449
Regressão Cubica	1	0,0462036	0,0462036	0,19213	0,66628
Desvios de Regr.	3	0,0767952	0,0255984	0,10645	0,95528
Resíduo	96	23,0858040	0,2404771		

Tabela 31 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,2831913			
Nucléolos	6	138,0067809	23,0011302	262,9985	0,00001
Concentração	6	0,9150004	0,1525001	1,7437	0,11848
Nucl. X Conc.	36	38,3261953	1,0646165	12,1730	0,00001
Resíduo	96	8,3958969	0,08745773		
Total	146	185,9270648			

Média Geral = 3,73

Coeficiente de Variação = 7,92%

Tabela 32 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. F
Blocos	2	0,4909941			
Nucléolos	6	65,79212	10,9653	61,7304	0,00001
Concentração	6	1,077	0,1795	1,0107	0,43370
Nucl. X Conc.	36	29,2351	0,8120	4,5717	0,00001
Resíduo	96	17,05275	0,1776		
Total	146	113,6481			

Média Geral = 3,84

Coeficiente de Variação = 10,97%

Tabela 33 - Análise da variação do número de nucléolos nas células interfásicas em *Lactuca sativa* L. na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Blocos	2	0,02005			
Nucléolos	6	152,7186	25,45311	192,3507	0,00001
Concentração	6	0,38721	0,064536	0,4877	0,81729
Nucl. X Conc.	36	21,8600	0,607222	4,5888	0,00001
Resíduo	96	12,70335	0,1323266		
Total	146	187,6893488			

Média Geral = 3,73

Coeficiente de Variação = 9,745%

Tabela 34 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	2,4577344	2,4577344	28,10212	0,00002
Regressão Quadrática	1	0,1229466	0,1229466	1,40579	0,23686
Regressão Cubica	1	0,4707621	0,4707621	5,38277	0,02116
Desvios de Regr.	3	4,5383726	1,5127909	17,29749	0,00001
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 35 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,7820366	0,7820366	8,94193	0,00385
Regressão Quadrática	1	0,0451051	0,0451051	0,51574	0,51863
Regressão Cubica	1	3,10199993	3,1019993	35,46875	0,00001
Desvios de Regr.	3	1,8730135	0,6243378	7,13878	0,00042
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 36 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,5638933	0,5638933	6,44764	0,01223
Regressão Quadrática	1	0,0045762	0,0045762	0,05232	0,81440
Regressão Cubica	1	0,1080736	0,1080736	1,23573	0,26829
Desvios de Regr.	3	1,3887947	0,4629316	5,29323	0,00239
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 37 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	3,2608458	0,5638933	37,28502	0,00001
Regressão Quadrática	1	0,5499571	0,0045762	6,28830	0,01324
Regressão Cubica	1	1,4896071	0,1080736	17,0340	0,00023
Desvios de Regr.	3	1,4377264	0,4629316	5,47973	0,00197
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 38 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,7064920	0,7064920	8,07814	0,00563
Regressão Quadrática	1	0,2932211	0,2932211	3,35274	0,06669
Regressão Cubica	1	0,0006618	0,0006618	0,00757	0,92834
Desvios de Regr.	3	3,8279465	1,2759822	1,2759822	0,00001
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 39 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0291015	0,0291015	0,33275	0,57240
Regressão Quadrática	1	0,1627404	0,1627404	1,86080	0,17232
Regressão Cubica	1	0,0579689	0,0579689	0,66283	0,57702
Desvios de Regr.	3	3,5368191	1,1789397	13,48018	0,00001
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 40 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de chumbo

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	2,8574546	2,8574546	32,67258	0,00001
Regressão Quadrática	1	0,0265517	0,0265517	0,30360	0,58971
Regressão Cubica	1	3,3522454	3,3522454	38,33010	0,00001
Desvios de Regr.	3	2,1945483	0,7315161	8,36427	0,00016
Resíduo	96	8,3958969	0,0874573		

Tabela 41 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,1052460	0,1052460	0,59249	0,55038
Regressão Quadrática	1	1,5393383	1,5393383	8,66584	0,00434
Regressão Cubica	1	2,3569500	2,3569500	13,26866	0,00074
Desvios de Regr.	3	2,2508046	0,7502682	4,22370	0,00771
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 42 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,8498786	0,8498786	4,78447	0,02925
Regressão Quadrática	1	0,0920689	0,0920689	0,51831	0,51975
Regressão Cubica	1	0,2180437	0,2180437	1,22750	0,26993
Desvios de Regr.	3	0,9174759	0,3058253	1,72167	0,16626
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 43 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos, um maior que o outro, na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0116406	0,0116406	0,06553	0,79425
Regressão Quadrática	1	0,0214428	0,0214428	0,12071	0,72909
Regressão Cubica	1	1,7863892	1,7863892	10,05664	0,00242
Desvios de Regr.	3	0,6690805	0,2230268	1,25555	0,29343
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 44 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	2,2673772	2,2673772	12,76440	0,00087
Regressão Quadrática	1	0,0024034	0,0024034	0,01353	0,90358
Regressão Cubica	1	1,6817137	1,6817137	9,46736	0,00308
Desvios de Regr.	3	2,1721874	0,7240625	4,07617	0,00915
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 45 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	1,3608642	1,3608642	7,66111	0,00682
Regressão Quadrática	1	0,0002717	0,0002717	0,00153	0,96775
Regressão Cubica	1	0,1832413	0,1832413	1,03157	0,31327
Desvios de Regr.	3	0,9798960	0,3266320	1,83880	0,14385
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 46 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,2362450	0,2362450	1,32996	0,25028
Regressão Quadrática	1	1,3636625	1,3636625	7,67686	0,00677
Regressão Cubica	1	0,4819314	0,4819314	2,71308	0,09884
Desvios de Regr.	3	0,0065719	0,0021906	0,01233	0,99775
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 47 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de arsênio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	2,0122063	2,0122063	11,32789	0,00147
Regressão Quadrática	1	0,0931412	0,0931412	0,52435	0,52234
Regressão Cubica	1	1,2735560	1,2735560	7,16960	0,00859
Desvios de Regr.	3	5,3786979	1,7928993	10,09328	0,00005
Resíduo	96	17,0527568	0,1776329		

Tabela 48 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com um nucléolo na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,1890716	0,1890716	1,42883	0,23296
Regressão Quadrática	1	0,0034581	0,0034581	0,02613	0,86634
Regressão Cubica	1	0,1750978	0,1750978	1,32322	0,25151
Desvios de Regr.	3	2,3730119	0,7910040	5,97766	0,00120
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 49 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0000395	0,0000395	0,00030	0,98366
Regressão Quadrática	1	0,1611013	0,1611013	1,21745	0,27196
Regressão Cubica	1	0,4327281	0,4327281	3,27015	0,07010
Desvios de Regr.	3	3,1655851	1,0551950	7,97417	0,00021
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 50 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com dois nucléolos, um maior que o outro na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,2539449	0,2539449	1,91908	0,16565
Regressão Quadrática	1	0,0028769	0,0028769	0,02174	0,87783
Regressão Cubica	1	1,5734372	1,5734372	11,89056	0,00119
Desvios de Regr.	3	1,5251811	0,5083937	3,84196	0,01206
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 51 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos de tamanhos iguais na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0000797	0,0000797	0,00060	0,97860
Regressão Quadrática	1	0,0106960	0,0106960	0,08083	0,77373
Regressão Cubica	1	0,8674244	0,8674244	6,55518	0,01159
Desvios de Regr.	3	3,6466059	1,2155353	9,18587	0,00009
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 52 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo um deles maior que os restantes na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,0260773	0,0260773	0,19707	0,66245
Regressão Quadrática	1	0,4564511	0,4564511	3,44943	0,06293
Regressão Cubica	1	0,0106574	0,0106574	0,08054	0,77410
Desvios de Regr.	3	0,9433229	0,3144410	2,37625	0,07353
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 53 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com três nucléolos, sendo dois deles maior que um na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,3885347	0,3885347	2,93618	0,08600
Regressão Quadrática	1	0,1965394	0,1965394	1,48526	0,22373
Regressão Cubica	1	0,4715921	0,4715921	3,56385	0,05879
Desvios de Regr.	3	1,8748630	0,6249543	4,72282	0,00440
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		

Tabela 54 - Análise da variação em células interfásicas de *Lactuca sativa* L. com quatro a seis nucléolos na presença de diferentes concentrações de mercúrio

Causas da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	VALOR F	PROB. >F
Regressão Linear	1	0,2017316	0,2017316	1,52450	0,21757
Regressão Quadrática	1	0,0050123	0,0050123	0,03788	0,84037
Regressão Cubica	1	0,0009304	0,0009304	0,00703	0,93099
Desvios de Regr.	3	3,2911909	1,0970636	8,29057	0,00017
Resíduo	96	12,7033546	0,1323266		