

Procedimento Operacional Padrão

Assunto: Análise citotóxica por meio do teste <i>Allium Cepa</i> (cebola)		
Substitui: -		POP 12
Data de Operacionalização: 03/12/2020		Nº de Páginas: 5
Distribuição: Todos os envolvidos em análises citotóxicas.		
Elaborado por: _____ Maria Luiza Samia Ventura		Data: 01/12/2020
Revisado por: _____ Mirian Aparecida Boim		Data: 07/12/2020
Aprovado por: _____ Elizabeth Barbosa de Oliveira Sales		Data: 17/12/2020
Obsoleto em: ___ / ___ / ___ Motivo:		

1. Objetivo

Estabelecer critérios para realização de análise citotóxica por meio do método de germinação de raiz da cebola *Allium cepa L* e pela estimativa do índice mitótico das raízes.

2. Abrangência

Todos os envolvidos em análises citotóxicas.

3. Importância de análise citotóxica por meio do teste *Allium Cepa*

O *Allium cepa L.* é utilizado rotineiramente em todo o mundo em laboratórios que trabalham com testes de genética toxicológica, considerado uma ferramenta valiosa quanto à determinação da contaminação ambiental, havendo extenso banco de dados de substâncias químicas já testadas. Em geral, os metais induzem sintomas mais severos nas raízes do que nas folhas, uma vez que as raízes estão em contato direto com o solo e geralmente com o contaminante tóxico.

Os bioensaios em plantas levam em conta diferenças relevantes, incluindo a presença de uma parede celular rígida nas células vegetais, presenças localizadas em regiões meristemáticas características (por exemplo, a concentração de células altamente divididas no ápice radicular) e o fato de a raiz ser normalmente o órgão diretamente em contato com solo e água contaminados, devido à sua eficácia em medir a toxicidade de diferentes classes de compostos químicos e sua correlação com outros sistemas de teste, como linfócitos humanos e de camundongos. Esse protocolo foi adaptado e aprimorado segundo Fiskesjö, 1993.

Após a exposição dos bulbos de cebola à solução teste por um determinado período é possível avaliar os efeitos citotóxicos como diminuição do crescimento das raízes e índice mitótico.

Procedimento Operacional Padrão

4. Material

4.1. Vidraria e diversos

- Bisturi;
- Provetas de 100ml;
- Lâminas microscópicas de boa qualidade;
- Lamínulas;
- Régua;
- Peneira;

4.2. Reagentes

- Fixador de Carnoy (3:1 álcool etílico e ácido acético);
- Álcool 70%;
- HCl 5N;
- Ácido acético 45%;
- Corante Giemsa 20%;
- Xilol;
- Bálsamo do Canadá;

5. Equipamentos

- Estufa;
- Microscópio estereoscópico;
- Microscópio binocular primo star ZEISS;

6. Procedimento

6.1. Seleção das cebolas

- 6.1.1. A escolha das cebolas deve ser padronizada em tipo e peso;
- 6.1.2. Observar o bulbo de cada cebola para verificar se é saudável (Figura 1);

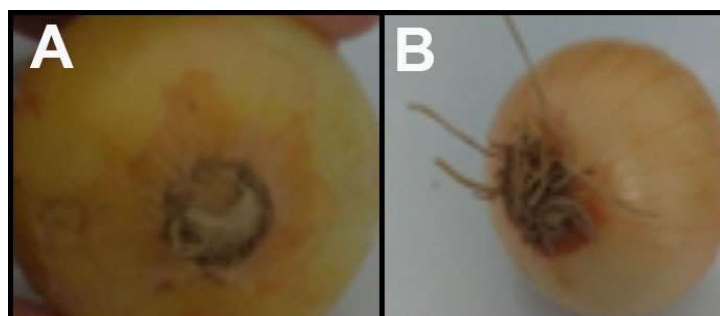


Figura 1. Cebola com deficiência para germinação (A) e cebola saudável (B)

- 6.1.3. Selecionar pelo menos três cebolas por amostra;
- 6.1.4. Cortar as raízes rente ao bulbo com auxílio de um bisturi e retirar toda a parte marrom do bulbo da Cebola;
- 6.1.5. Imergir o bulbo da cebola na amostra teste e no controle;
- 6.1.6. As raízes devem permanecer em imersão por 72h, sendo acompanhado a cada 24h o nível da água e o crescimento das raízes.

Procedimento Operacional Padrão

6.2. Análise Macroscópica da raiz

- 6.2.1. Medir o comprimento médio entre as raízes;
- 6.2.2. Avaliar o número de raízes;
- 6.2.3. Observar se há alguma pigmentação na ponta da raiz, pontas com coloração marrom são indícios tóxicos;
- 6.2.4. Observar se as raízes estão fracas e finas;
- 6.2.5. Avaliar a rigidez nas pontas; (Nos tratamentos causando alta toxicidade, as raízes vão ficar menos rígidas e morrer);
- 6.2.6. Avaliar se há formação de tumor ou inchaço na ponta da raiz (fenômeno observado de 3 a 5 dias);
- 6.2.7. Metais podem deixar as raízes curvadas e com a cor do metal em evidência.
- 6.2.8. Exemplos de análises (Figura 2).

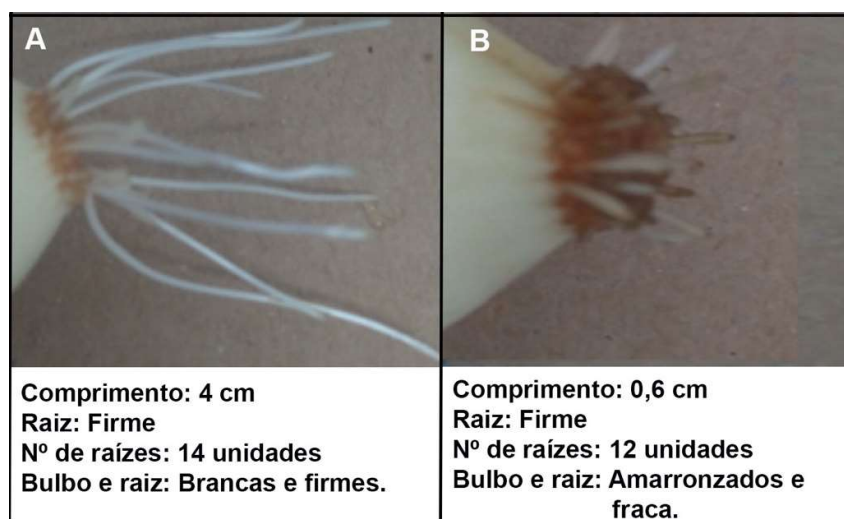


Figura 2. Análises macroscópicas das raízes das cebolas

6.4. Preparo das lâminas

- 6.4.1. Coletar pelo menos 1,5 cm e imergir no diretamente no fixador de Carnoy (3:1 álcool etílico e ácido acético) por 24h a temperatura ambiente;
- 6.4.2. Lavar com água destilada em abundância;
- 6.4.3. Estocar em frasco âmbar, com solução de álcool 70% em freezer até o preparo das lâminas;
- 6.4.4. Retirar do freezer e lavar em água destilada corrente em abundância com o auxílio de uma peneira;
- 6.4.5. Hidrolisar em HCl 5N devidamente padronizado até a concentração real por 10 min;
- 6.4.6. Lavar em água destilada corrente em abundância com auxílio de uma peneira;
- 6.4.7. Transferir para solução de ácido acético 45% e aquecer em estufa com circulação de ar e temperatura controlada à 70°C por 3 min; Sempre conferir a temperatura da estufa utilizando termômetro;
- 6.4.8. Lavar em água destilada corrente em abundância com auxílio de uma peneira;
- 6.4.9. Transferir individualmente para uma lâmina;
- 6.4.10. Com o auxílio de um microscópio estereoscópico Quimis fazer o corte com média de 2 mm da área meristemática da raiz;
- 6.4.11. Gotejar até imergir a raiz em corante Giemsa 20% por 5 min;
- 6.4.12. Retirar o excesso de corante com água destilada;
- 6.4.13. Dar 1 banhos de xilol por 1 min (para retirar o excesso de corante);
- 6.4.14. Adicionar 1 gota de bálsamo do Canadá;

Procedimento Operacional Padrão

6.4.15. Fechar com a lamínula com a técnica de esmagamento;

6.4.16. Identificar as lâminas;

6.5. Análise das mitoses ao Microscópio

6.5.1. Analisar da esquerda para direita no microscópio binocular primo star ZEISS com a objetiva de 40X para pessoas experientes, e na objetiva de 100x para iniciantes;

6.5.2. Contar as células e marcar as que estão em mitose;

6.5.3. Contar em média 100 células por lâmina num total de 400 Células por amostra;

Fórmula Índice Mitótico (IM%)

$$\text{IM\%} = \frac{\text{Número de células em mitose}}{\text{Número de células analisadas}} \times 100$$

6.5.4. Manual da mitose (Figura 3):

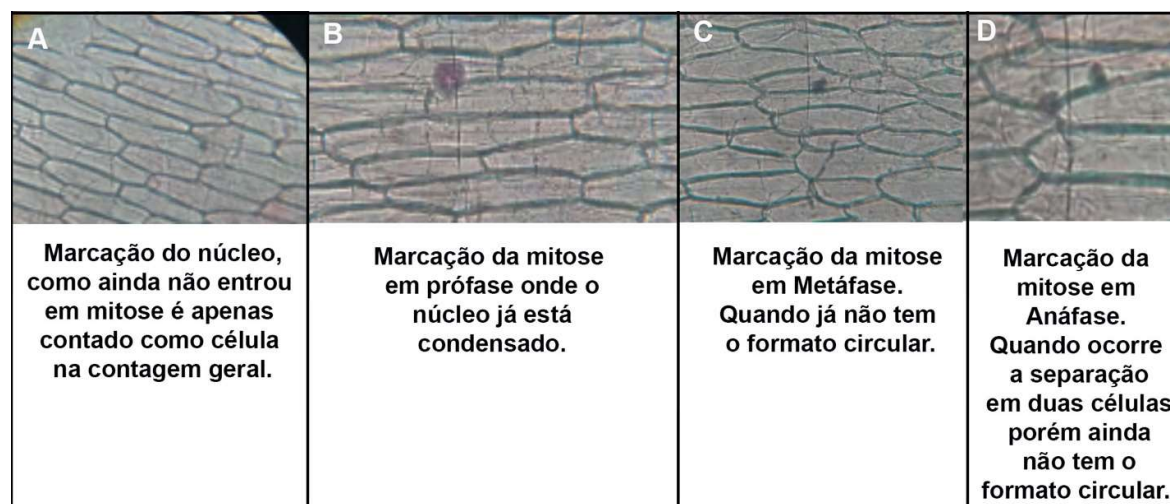


Figura 3. Manual da mitose.

7. Referências Bibliográficas

1. Fiskesjö G. Allium test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality* [internet]. Nova Iorque. v.8, n. 4, p. 461–470, 1993.
2. Santos CL, Pourrunt B, Ferreira OJM. The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. *Front genet.* 2015. p. 6-216.
3. Barbério, A., Voltolini, J. C., & Mello, M. L. S. (2011). Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, 20(4), 927–935. doi:10.1007/s10646-011-0602-8.
4. Leme DM, Marin-MMA. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. Disponível em: Acesso em: 02 abril 2019.
5. Krunger, RA. Análise da toxicidade e da genotoxicidade de Agrotóxicos Utilizado Agricultura Utilizando Bioensaios com *Allium cepa*. Centro Universitário Feevale – programa de Pós-graduação em Qualidade Ambiental – Mestrado em Qualidade Ambiental, Novo Hamburgo, 2009.

Procedimento Operacional Padrão

Controle de Revisão

Data	Versão	Revisor	Alteração