



INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA

**FITOTESTES PARA AVALIAÇÃO ECO-GENO-
TOXICOLÓGICA DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS:
IMPLICAÇÕES PARA VALORES DE PREVENÇÃO**

**LAVRAS-MG
2019**

INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA

FITOTESTES PARA AVALIAÇÃO ECO-GENO-TOXICOLÓGICA DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS: IMPLICAÇÕES PARA VALORES DE PREVENÇÃO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

Larissa Fonseca Andrade-Vieira, Ph.D.
Orientadora

Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Ph.D.
Coorientador

**LAVRAS-MG
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alvarenga, Ingrid Fernanda Santana.

Fitotestes para avaliação eco-geno-toxicológica de arsênio em solos tropicais : implicações para valores de prevenção / Ingrid Fernanda Santana Alvarenga. - 2019.

126 p. : il.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade-Vieira.

Coorientador(a): Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Genotoxicidade. 2. Avaliação de Risco Ambiental. 3. Valores Orientadores para solo. I. Andrade-Vieira, Larissa Fonseca. II. Guilherme, Luiz Roberto Guimarães. III. Título.

INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA

FITOTESTES PARA AVALIAÇÃO ECO-GENO-TOXICOLÓGICA DE ARSÊNIO EM SOLOS TROPICAIS: IMPLICAÇÕES PARA VALORES DE PREVENÇÃO

PHYTOTESTS FOR ARSENIC ECOGENOTOXICOLOGICAL EVALUATION IN TROPICAL SOILS: AN APPROACH FOR ASSESSING SOIL SCREENING VALUES

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 20 de dezembro de 2019.

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme - UFLA

Dra. Laiane Corsini Rocha - UFLA

Dra. Cynthia de Oliveira - UFLA

Dra. Elisa Monteze Bicalho - UFLA

Dr. Raphael Baston de Souza - UNICAMP



Dra. Larissa Fonseca Andrade Vieira, Ph.D.
Orientadora

Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Ph.D.
Coorientador

**LAVRAS-MG
2019**

*À dona do meu maior amor,
minha irmã, Ismênia
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, mentor da minha vida, por todas as oportunidades concedidas e por colocar em meus caminhos pessoas tão especiais que me auxiliaram nessa etapa.

Aos meus pais Reinaldo e Elaine, pelo exemplo de caráter, por serem fontes inesgotáveis de amor e meus melhores amigos. Por acreditarem nos meus sonhos, me incentivando e mostrando o caminho correto para realizá-los. Vocês ensinaram à minha irmã e a mim o verdadeiro significado de família e esse é o maior tesouro que poderíamos ter!

À minha irmã Ismênia, a quem eu amo mais que a mim mesma e esse amor me motiva a tentar ser uma pessoa melhor todos os dias.

À professora Larissa Fonseca Andrade-Vieira pela orientação e por toda dedicação e contribuição para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme, que em todos os momentos me incentivou e apoiou, por ser fonte inesgotável de conhecimento e pelo exemplo de profissionalismo.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de avaliar e contribuir com este trabalho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela estrutura concedida para realização deste trabalho. Aos professores, secretária e colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, por todos os ensinamentos e contribuições.

Aos órgãos de fomento à pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Enfim, à todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O arsênio (As) é um metaloide tóxico e solos com altos níveis de As podem representar uma ameaça para todos organismos do ecossistema, por isso a importância de valores orientadores para As em solos. No entanto, as metodologias atuais que utilizam plantas superiores não incluem parâmetros para prospecção genotóxica. Por isso, objetivou-se avaliar a toxicidade de solos tropicais com As através de uma nova metodologia para avaliação de risco que engloba aspectos macroscópicos e efeitos mutagênicos. E, além disso, fornecer dados para a triagem ecotoxicológica para As. Para tanto, sementes de *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Pennisetum glaucum* e *Phaseolus vulgaris* foram expostas em placas de Petri a solos tropicais típicos (Latosolo e Cambissolo) e a um solo artificial tropical (ATS) contendo doses de As (0; 8; 14,5; 26; 46,5; 84; 150 e 270 mg kg⁻¹) e acondicionadas em estufa tipo B.O.D. a 24°C, sem fotoperíodo, por 120 horas. Após isso, foram realizadas análises macroscópicas (germinação e crescimento) e microscópicas (aberrações cromossômicas e alterações nucleares). Para as análises macroscópicas, a germinação não foi tão sensível para avaliar a fitotoxicidade de As nos solos e o desenvolvimento inicial foi mais afetado no ATS, seguido do Latossolo e Cambissolo. Em relação as variáveis microscópicas, a exposição ao As aumentou a frequência de anormalidades cromossômicas e micronúcleos, bem como diminuiu a frequência do índice mitótico nas células das pontas das raízes de *A. cepa*. Houve predomínio dos efeitos clastogênicos do As nas células. Os valores aceitos de EC₅₀ (concentração que resulta em inibição de 50% dos parâmetros) permitiram plotar a curva de distribuição de sensibilidade das espécies e obter a concentração perigosa para 5% das espécies testadas (HC₅) de 11,87 mg As kg⁻¹, o valor obtido assemelha-se ao Valor de Prevenção (VP) para As de MG. Tais resultados, indicam que a nova metodologia em microplacas é válida e que as variáveis relacionadas ao ciclo celular e fragmentação de DNA são importantes e que devem ser utilizadas em uma avaliação ecotoxicológica. Desta forma, acredita-se que tal metodologia possa ser uma alternativa aos testes realizados em casa de vegetação. Finalmente, este estudo forneceu dados importantes para a triagem ecotoxicológica de As em solos tropicais.

Palavras-chave: Genotoxicidade; Micronúcleo; Avaliação de Risco Ambiental; Valores Orientadores para solo; Mutagênese.

ABSTRACT

High levels of arsenic (As), a toxic metalloid, in the soil can pose threats to all organisms in the ecosystem. Thus, besides the soil screening guidance for this element, it is also important to focus on efforts to monitor its values in soils. Current methodologies using superior plants do not include parameters for genotoxicity studies. Therefore, this study aimed to assess the As toxicity in tropical soils using a new methodology for risk assessment that includes macroscopic aspects and mutagenic effects. In addition, we aim to provide data for As ecotoxicological screening. Seeds of *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Pennisetum glaucum* and *Phaseolus vulgaris* were exposed in Petri dishes to typical tropical soils (Oxisol and Inceptisol) and to a tropical artificial soil (TAS) containing different doses of As (0; 8; 14.5; 26; 46.5; 84; 150 and 270 mg kg⁻¹) and stored in a B.O.D-type chamber at 24 °C, without photoperiod, for 120 hours. After that, macroscopic (germination and growth) and microscopic (chromosomal aberrations and nuclear alterations) analyzes were performed. For the macroscopic parameters, germination was not as sensitive to evaluate the phytotoxicity of As in the tested soils and the initial development of the species was more affected in ATS, followed by Oxisol and Inceptisol. Regarding the microscopic variables, the exposure to As increased the frequency of chromosomal abnormalities and micronuclei, with a decreased frequency of the mitotic index in the cells of the root tips of *A. cepa*. There was a predominance of the clastogenic effects of As in the cells. The accepted values of EC₅₀ (concentration that results in 50% inhibition of the parameters) allowed to plot the sensitivity distribution curve of the species and to obtain the threatening concentration for 5% of the tested plant species (HC₅), which corresponded to a value of 11.87 mg As kg⁻¹. This value is similar to the Prevention Value (PV) set for As in the state of Minas Gerais, Brazil. The results indicate that the new microplate methodology is valid and that the variables related to the cell cycle and DNA fragmentation are important and ought to be used in ecotoxicological tests. Therefore, it is believed that such a methodology could be an alternative to tests carried out under greenhouse conditions. This study provided important data for ecotoxicological screening of As in tropical soils.

Keywords: Genotoxicity; Micronucleus; Environmental Risk Assessment; Soil Screening Guidance; Mutagenesis.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	10
1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Arsênio	13
2.1.1 As no solo	13
2.1.2 As em Plantas	14
2.2. Ensaio Ecotoxicológico	17
2.2.1. Testes Macroscópicos	18
2.2.1. Testes Microscópicos.....	20
2.3. Valores Orientadores.....	22
2.3.1. Curva de distribuição de sensibilidade de espécies	24
Referências.....	25
SEGUNDA PARTE	30
METODOLOGIA PROPOSTA - Ensaio vegetal em microplacas para avaliação de risco eco-geno-toxicológicas em solo: germinação, desenvolvimento inicial e efeitos sobre o DNA.	30
ARTIGO 1 – Avaliação da ecotoxicidade de arsênio em solos tropicais: uma abordagem utilizando uma nova metodologia	45
ARTIGO 2 - Investigating arsenic toxicity in tropical soils: a cell cycle and DNA fragmentation approach.....	65
ARTIGO 3 – Avaliação de risco eco-geno-toxicológica do arsênio em solos tropicais através de ensaios vegetais em microplacas	100

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O arsênio (As) é um elemento químico conhecido pelo seu alto potencial de toxicidade. Em geral, ocorre de forma natural nos solos e tem suas concentrações elevadas devido às ações antropogênicas, sendo o 20º elemento mais onipresente do meio ambiente (DREWNIAK; SKLODOWSKA, 2013). Devido à sua toxicidade, o As ocupa o primeiro lugar na lista de substâncias prioritárias para controle pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (EUA) desde 1997 (ATSDR, 2017). Além disso, foi classificado como cancerígeno de classe 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2019). Por essas razões, há uma grande preocupação na área de toxicologia ambiental para se conseguir realizar o efetivo monitoramento das áreas para evitar que as concentrações cheguem a níveis deletérios aos organismos (SUSAN et al., 2019).

Embora tenha sido estudado sobre a exposição de seres humanos ao As pela ingestão de água (água superficial ou subterrânea) e alimentos contaminados (CIMINELLI et al., 2017), pouca atenção tem sido dada aos solos contaminados. É importante gerenciar as concentrações de arsênio no solo e os efeitos nas plantas, porque as mesmas podem absorver e acumular arsênio em partes comestíveis, o que representa um caminho para a exposição a esse elemento (ISLAM et al., 2015).

Uma das formas de gerenciar e conhecer as concentrações do elemento que podem causar prejuízos é através de estudos ecotoxicológicos para derivação de valores orientadores para o solo. Esses estudos visam assegurar as condições naturais – ou com mínima interferência – dos ecossistemas prevenindo a perda das funções ambientais do meio. Por isso, tais estudos, constituem-se em importantes ferramentas para o monitoramento ambiental, avaliação de danos e identificação das causas, bem como subsídios para a tomada de decisão.

Uma das metodologias padronizadas e aceitas para determinar valores orientadores para os solos é através de ensaios com vegetais superiores (OECD, 2006). Tais ensaios são padronizados pelas normativas OECD-208 e ISO-

11.269-2 que estabelecem avaliações de parâmetros macroscópicos envolvendo germinação e crescimento das plantas modelo, os quais são realizados com vasos em casa de vegetação (FREITAS et al., 2016; KADER et al., 2016).

No entanto, os protocolos estabelecidos para avaliação de risco ecotoxicológica para solos, não preveem bioensaios com análises microscópicas, que incluem as avaliações genotóxicas. Tais ensaios baseiam-se em avaliações citogenéticas, que envolvem avaliação das etapas do ciclo celular, incluindo a divisão mitótica, onde alterações encontradas em cada fase (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase), as quais são anotadas para o cálculo da frequência de cada tipo de alteração e do índice mitótico (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Neste contexto, o agente testado é caracterizado como citotóxico quando altera o índice mitótico normal do modelo vegetal e/ou genotóxico se as alterações estão relacionadas com quebras no DNA e formação de micronúcleos (CAMPOS et al., 2008). A classificação do tipo de alteração também pode ser feita como: aneugênica, quando a alteração se relaciona a má formação ou funcionamento do fuso mitótico ou, clastogênica quando associada à quebras e rearranjos no DNA (LEME; MARIN-MORALES, 2008; ANDRADE-VIEIRA et al., 2012).

Os ensaios para prospecção da genotoxicidade em modelos vegetais se destacam, pois apresentam baixo custo, são simples e fáceis de serem conduzidos (GRANT, 1994). Além disso, as respostas apresentadas pelas plantas apresentam sensibilidade equivalente ou superior à de outros organismos para detectar o efeito genotóxico de poluentes ambientais (U.S. EPA, 1980), sendo os efeitos compatíveis àqueles observados em células humanas (REIS et al., 2017). Por fim, esses ensaios não necessitam de aprovação em comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) e estão de acordo com as diretrizes toxicológicas para o século XXI, na qual a substituição e diminuição de testes com modelos animais é sugerida (HARTUNG, 2009).

Por fim, devido à toxicidade do As, os resultados dos bioensaios realizados com plantas superiores que incluem avaliações do ciclo celular e fragmentação do DNA, além dos parâmetros já comumente avaliados, são importantes para compreender os efeitos genotóxicos em organismos vivos e, com isso, auxiliar a estabelecer limites seguros para as concentrações de As nos solos. Nesse sentido, os bioensaios vegetais são de especial importância, pois

lidam com organismos diretamente expostos aos poluentes do solo em áreas contaminadas.

Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivos: i) avaliar a toxidez de solos tropicais contaminados com As através de metodologia que utiliza microplacas; e, ii) comparar os resultados obtidos com aqueles reportados em ensaios realizados em casa de vegetação. Além disso, dentro desta abordagem comparativa, espera-se validar uma nova metodologia para avaliação de risco de elementos potencialmente tóxicos presentes em solos, a qual tem caráter mais sustentável, econômico e de mais baixo custo, que pode ser executada em menor tempo em relação às atualmente aplicadas para tal fim. Espera-se, com isso, fornecer dados que possam ser usados na triagem ecotoxicológica para As em solos tropicais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Arsênio

O arsênio (em latim *arsenium*, significado potente), elemento químico de símbolo As, é um metaloide ou semimetal que possui número atômico 33 e de peso atômico $74,92 \text{ g mol}^{-1}$, na tabela periódica faz parte do grupo 15 (V) (ADRIANO, 2001). O As ocorre na natureza em diferentes estados de oxidação, como arsenato, arsenito, arsina e metal. Os complexos de arsenato e arsenito são as espécies mais solúveis e as mais abundantes no solo, sendo os compostos de As^{+3} mais tóxicos que os de As^{+5} (SAKUMA et al., 2002).

O As ocorre no ambiente de forma natural e é frequentemente associado a outros elementos (Au, Ag, Cu e Sn em particular) e, sendo que a mineração e o processamento desses minérios levaram a uma poluição por arsênio nas regiões de mineração em todo o mundo (NRIAGU, 1994). Mas, os níveis de tal elemento vêm aumentando consideravelmente devido a ações antropogênicas tais como a queima de combustível fóssil, carvão vegetal, resíduos de agroquímicos, produção de vidro, indústria eletrônica, tratamento de metais (cobre, chumbo e bronze) e produtos farmacêuticos (FAROOQ et al., 2016; PACYNA, 1987; SELVARAJ et al., 2013).

Tal elemento é amplamente estudado devido ao seu potencial de toxicidade. O As ocupa o primeiro lugar na lista de substâncias prioritárias pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (EUA) desde 1997 (ATSDR, 2017). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2019) classifica o arsênio e compostos de arsênio inorgânico como cancerígenos para o ser humano (Grupo 1). Por isso são necessários constantes estudos e levantamentos toxicológicos do As em solos, sedimentos, água.

2.1.1 As no solo

A disponibilidade e a toxicidade do As no solo e na solução do solo são determinadas pelas espécies predominantes do elemento químico no meio, que são influenciadas pelas condições químicas e microbiológicas do solo. Normalmente, no solo há um predomínio das formas inorgânicas As^{+3} e As^{+5} e a

ordem de toxicidade é arsenito (AsO_3^{-3}) > arsenato (AsO_4^{-3}) > organoarsênicos (ADRIANO, 2001; KADER et al., 2016).

Além disso, a espécie química do As presente na solução do solo depende do pH e o potencial redox do meio (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002). Desta forma, é essencial saber qual a espécie química predominante no meio para então, fazer a avaliação do destino do As e poder realizar a prospecção da toxicidade da área de estudo.

A espécie química do As (III) predomina em pH acima de 8 e potencial de oxirredução abaixo de zero ($E_h < \text{mV}$). O As (V) é a espécie predominante em solos com pH abaixo de 7 e potencial de oxirredução acima de zero (SMEDLEY; KINNIBURGH, 2002). Nos solos com boas condições para a atividade microbiana (temperatura e umidade adequadas e matéria orgânica), a sequência de reação ocorre no sentido da metilação e da volatilização. Arsenito é oxidado a arsenato e os óxidos de manganês são apontados como os receptores de elétrons nesta reação de oxidação (MCLEAN; BLEDSOE, 1992).

O comportamento do arsenato no solo é semelhante ao do fosfato, devido à semelhança química entre eles, por isso, pode formar precipitados insolúveis com o Fe, Al e Ca (FAROOQ et al., 2016; FINNEGAN; CHEN, 2012; KUMAR et al., 2015; WU et al., 2016). Por essa razão, a presença de ferro no solo é uma das maneiras de controlar a mobilidade do arsenato. A adsorção do arsenato por caulinita e outros alcança os níveis máximos em um pH de 3 a 4 e com o aumento gradual do pH vai reduzindo a adsorção (MCLEAN; BLEDSOE, 1992). Já a adsorção do arsenito, também é fortemente dependente do pH, sendo maior no pH na faixa de 3 a 9, com o máximo de adsorção por óxido de ferro a um pH 7 (MCLEAN; BLEDSOE, 1992).

As diferentes espécies químicas do As e suas concentrações presentes no solo causam efeitos fitotóxicos distintos, por isso, há a necessidade de estudar diferentes espécies de plantas e os efeitos macroscópicos e microscópicos causado por este elemento.

2.1.2 As em Plantas

O As é um elemento não essencial para as plantas e por isso o efeito tóxico desse elemento também é observado em vegetais e a sua fitotoxicidade

depende do metabolismo da planta, da forma química do As no solo, sua concentração e da presença de outros elementos no solo (FINNEGAN; CHEN, 2012; SINGH et al., 2015; WU et al., 2016). O As é absorvido pelas raízes das plantas através dos transportadores de fosfato, em sua maioria, na forma de arsenato (FINNEGAN; CHEN, 2012). Essa absorção do As só é possível devido à grande similaridade existente entre o As e o fosfato, o que faz com que o As^{+5} seja absorvido como um análogo químico (não funcional) do fosfato, sendo um forte competidor (FINNEGAN; CHEN, 2012; WU et al., 2016). No geral, maiores teores de fosfato no ambiente promovem menores taxas de absorção de arsenato (MEHARG; HARTLEY-WHITAKER, 2002). Existe uma outra forma de absorção pelas raízes menos usual, que é quando o arsenito é absorvido pelas mesmas via transportadores de silício (FAROOQ et al., 2016; WANG et al., 2015; WU et al., 2016).

A similaridade do As com o fosfato, além da competição pela absorção, causa a substituição do elemento essencial em vias metabólicas. Durante a síntese de ATP, o As se liga à molécula de ADP no lugar do fosfato inorgânico (Pi), formando o ADP-As que, ao contrário do ATP, possui ligação química com pouca energia (GARG; SINGLA, 2011; PANDA et al., 2010). Isso torna o As um desacoplador da síntese de ATP nos processos de transporte de elétrons da respiração celular e da fotossíntese (FINNEGAN; CHEN, 2012; GARG; SINGLA, 2011; YADAV; SRINIVAS, 2002).

Além do ATP, o arsenato presente no citosol também é um desacoplador da glicólise, pois pode substituir o Pi, que em condições normais produz 1,3-bisfosfoglicerato e passa a produzir o 1-arseno-3-fosfoglicerato, a molécula gerada a partir do As é instável e facilmente hidrolisável, no entanto, forma o próximo intermediário do processo, o 3-fosfoglicerato. Desta forma, não interrompe o processo, a glicólise ocorre, mas não há a formação da molécula de ATP que seria gerada a partir do 1,3-bisfosfoglicerato (BYERS et al. 1979).

Nos tecidos das plantas, o As^{+5} é convertido à As^{+3} pela ação da enzima As redutase (FAROOQ et al., 2016; SOUZA et al., 2015) e, em tal conversão, ocorre a formação e liberação no vegetal de EROs (espécies reativas de oxigênio) (FAROOQ et al., 2016; PANDA et al., 2010). Se o aumento de tais oxigênios singletos excede a capacidade de defesa antioxidante e de reparo da planta, há mutações prejudiciais e paralisação metabólicas essenciais à

sobrevivência por toxicidade, podendo levar à morte celular (DUQUESNOY et al., 2010; FAROOQ et al., 2016).

Em geral, as raízes são mais afetadas pelo As do que a parte aérea, uma vez que são a porta de exposição principal ao contaminante no solo (SHRI et al., 2009). Nas raízes os efeitos negativos do As já relatados são sobre o desenvolvimento e anatomia radicular, inibindo a proliferação e, o alongamento, bem como causando alterações mitóticas (ALVARENGA et al., 2019; FINNEGAN; CHEN, 2012; FREITAS et al., 2016; YADAV et al., 2014; YOON et al., 2015). Segundo Kaur et al. (2012), a redução causada no crescimento das radículas também é devido à menor disponibilidade de sacarose em decorrência do aumento da atividade da invertase ácida. Conseqüentemente, a redução do desenvolvimento da raiz levam a uma menor absorção de nutrientes (SHRI et al., 2009), o que também influencia nos demais efeitos prejudiciais às plantas.

Os efeitos negativos do As nas folhas incluem os danos ao cloroplasto e a redução nas taxas fotossintéticas, que podem estar relacionadas a efeitos sobre o ciclo de Calvin e limitações estomáticas (CAPORALE et al., 2013; PANDA et al., 2010). Alguns autores, associam ainda, o menor crescimento das plantas expostas a concentrações crescentes de arsenito à redução do conteúdo da molécula de clorofila, pois essa está associada à biossíntese de carboidratos durante a fotossíntese (YADAV et al., 2014). Além dos já descritos, prejuízos ao metabolismo do fósforo e do carbono, há também ações sobre o metabolismo do nitrogênio devido à interferência no suprimento de nitrogênio inorgânico e sobre a sua via de assimilação (FINNEGAN; CHEN, 2012). Ademais, a inibição do crescimento radicular já citada, influencia diretamente no crescimento da parte aérea (FINNEGAN; CHEN, 2012; LIU et al., 2005).

A destoxificação do As é fundamental para a manutenção da homeostase celular nas células vegetais e envolve a participação de glutathionas e fitoquelatinas (FINNEGAN; CHEN, 2012; PITA-BARBOSA, 2009; YADAV et al., 2014). Esse processo baseia-se na conversão do arsenato em arsenito, efetivada pela enzima arsenato redutase (AR), com a posterior captura do arsenito por moléculas de glutathiona e fitoquelatina, seguida pelo armazenamento do composto formado, no vacúolo. O As que não é complexado e armazenado nos vacúolos das células radiculares pode ser translocado para a parte aérea, mas em geral a taxa de translocação é baixa (ZHAO et al., 2010).

Mesmo assim, sintomas de toxicidez podem ser notados na parte aérea de plantas expostas ao As, como murcha (PITA-BARBOSA, 2009) e aumento na atividade de enzimas antioxidantes (ZHAO et al., 2010).

Uma questão ainda muito controversa é o potencial genotóxico do As. Vários efeitos deletérios ao DNA já foram observados em células radiculares de plantas expostas a este elemento em solução, tais como aberrações em cromátides, trocas de cromátides irmãs, redução do índice mitótico, aumento das taxas de micronúcleos (GRANT, 1994; PITA-BARBOSA, 2009; WU et al., 2010; YI et al., 2007).

2.2. Ensaios Ecotoxicológicos

A ecotoxicologia é o ramo da toxicologia que se dedica ao estudo dos efeitos tóxicos que são causados pelos agentes químicos (naturais ou sintéticos) sobre todos os constituintes dos ecossistemas (sejam eles animal, vegetal ou microbianos) (MOREIRA et al., 2019). De forma prática, a ecotoxicologia envolve a realização de testes ecotoxicológicos para avaliar o potencial nocivo de uma substância no ambiente.

Os estudos ecotoxicológicos visam assegurar as condições naturais – ou com mínima interferência - dos ecossistemas prevenindo a perda das funções ambientais do meio. Por isso, tais estudos, constituem-se em importantes ferramentas para o monitoramento ambiental, avaliação de danos e identificação das causas, bem como subsídios para a tomada de decisão.

A utilização de testes ecotoxicológicos para avaliação de contaminação de solos é reconhecida internacionalmente como uma ferramenta complementar à análise química (CROUJAU; MOÏA, 2006). Tais testes objetivam conhecer a consequência da liberação de substâncias químicas no ambiente e nos organismos neles existentes e como seus efeitos se manifestam.

Os testes com organismos, ou bioensaios, são realizados sob condições controladas, nas quais os organismos-modelos são expostos a um crescente de concentrações do elemento, com possível efeito tóxico. O teste é feito através de comparação experimental do efeito da substância testada com efeitos de um tratamento controle, em uma cultura de células vivas ou em um organismo-teste (ARAGÃO et al., 2019; WHITE; CLAXTON, 2004).

Os bioensaios podem ser subdivididos em relação ao tempo de exposição do organismo-modelo em agudos e crônicos. Testes de toxicidade aguda são ensaios experimentais com uma única exposição do organismo-modelo à substância testada e por um curto período de tempo (em média 14 dias), para se observarem os possíveis efeitos. Já nos testes de toxicidade crônica, o organismo-modelo é avaliado durante um ciclo de vida completo enquanto é exposto à substância teste.

Tanto os testes agudos quanto os crônicos, são realizados com vários organismos (pertencentes a diferentes níveis tróficos), para se aumentar o nível de confiabilidade, devido aos diferentes mecanismos de resistência. Atuando com diferentes organismos, é possível avaliar a toxicidade relativa de diversos agentes químicos para uma ou diversas espécies, embora exista a necessidade de aumentar a representatividade e confiança com cada organismos-modelo testado.

2.2.1. Testes Macroscópicos

Para plantas, o protocolo 208 da Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD (2006) prevê a realização de testes de germinação, com espécies consideradas sensíveis à contaminação por elementos-traço, conforme a Tabela 1. O teste tem duração de 14 a 21 dias, após germinação de 50% do controle, com pelo menos duas espécies diferentes e no mínimo cinco concentrações do contaminante para que seja possível análise de regressão.

São avaliados a emergência e o crescimento inicial, sintomas de fitotoxicidade e biomassa no final do teste. Os resultados de emergência são expressos em LC_{50} (dose que causa 50% de redução a uma variável resposta, em comparação ao controle) e o efeito no crescimento das plântulas expresso em EC_{50} (dose que causa 50% de morte em relação ao controle). Este protocolo abrange a ISO 11.269 e demais referências internacionais reconhecidas, em especial a U.S. EPA Test Guidelines e American Standard for Testing Material (ASTM).

Outra metodologia é a norma europeia ISO 22.030, de 2005, editada pela ISO 22.030, de 2011, que descreve um método para determinar a inibição do crescimento e da capacidade reprodutiva de plantas superiores por solos sob

condições controladas. A duração do teste deve ser suficiente para induzir fitotoxicidade crônica que demonstra a capacidade reprodutiva das plantas avaliadas. O teste é aplicável para avaliar a qualidade do solo, especialmente a função do solo como um *habitat* para plantas e permite ensaios do ciclo de vida do vegetal. Por fim, destaca-se que, na literatura nacional, existem diversos estudos ecotoxicológicos, porém sem padronização que sirva como modelo para determinação de valores de prevenção para os solos de Minas Gerais.

Tabela 1: Espécies de plantas superiores consideradas sensíveis à contaminação por elementos-traço

Espécie	Referência
Eudicotiledôneas	
<i>Beta vulgaris</i>	OECD (2006) ^{***}
<i>Brassica napus</i>	ISO (2013)* e OECD (2006) ^{**}
<i>Brassica oleracea var.</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Brassica rapa</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Brassica rapa pekinensis</i>	ISO (2013)
<i>Cucumis sativus</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Daucus carota</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Glycine max</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Helianthus annuus</i>	OECD (2006)
<i>Lactuca sativa</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Lepidium sativum</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Phaseolus aureus</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Pisum sativum</i>	OECD (2006)
<i>Raphanus sativus</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Sinapis alba</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Vicia sativa</i>	OECD (2006)
Monocotiledôneas	
<i>Allium cepa</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Avena sativa</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Hordeum vulgare</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Lolium perene</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Oryza sativa</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Secale cereal</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Sorghum bicolor</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Triticum aestivum</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Zea mays</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)

* International Standard Organization

** United States Environmental Protection Agency

*** Organisation for Economic Co-operation and Development

2.2.1. Testes Microscópicos

Os bioensaios utilizando modelos vegetais são bem estabelecidos e comumente empregados para avaliar a atividade mutagênica de um determinado poluente (ARAGÃO et al., 2019; WHITE; CLAXTON, 2004). Esses bioensaios não necessitam de aprovação de comissões de ética e resultados podem ser correlacionados com testes em animais, incluindo mamíferos (PALMIERI et al., 2016; VIEIRA; SILVEIRA, 2018). Segundo Hartung (2009), os bioensaios vegetais estão de acordo com as Diretrizes de Toxicologia para o século XXI, que reivindicam testes que possam substituir aqueles que usam animais como modelos. No entanto, tais estudos ainda não estão normatizados para avaliação de risco ecotoxicológico em solos.

Em relação ao As, existem vários estudos na América Latina sobre a exposição de seres humanos pela ingestão de água (água superficial ou subterrânea) e alimentos contaminados (CIMINELLI et al., 2017), contudo pouca atenção tem sido dada à genotoxicidade em plantas cultivadas em solos contaminados com As, particularmente em condições tropicais. Uma vez que as plantas podem absorver e acumular As em órgãos como mecanismo de defesa, os quais muitas vezes são comestíveis, é importante gerenciar as concentrações de As no solo e os seus efeitos nas plantas, pois esse também pode ser um caminho para a exposição humana (ISLAM et al., 2016).

As raízes são geralmente o primeiro tecido vegetal a ser exposto a elementos tóxicos nos solos, sendo que a exposição ao As inibe a sua extensão e proliferação. Esse metaloide também inibe o crescimento da planta como um todo, alterando os processos metabólicos e comprometendo a sua capacidade reprodutiva (ALVARENGA et al., 2019; FARNESE et al., 2014; FINNEGAN; CHEN, 2012).

Estudos relacionados aos potenciais efeitos genotóxicos do As podem ser interessantes para uma melhor compreensão dos efeitos desse elemento em seres vivos e também podem ajudar a estabelecer limites seguros para as concentrações de As nos solos. Nesse sentido, os bioensaios vegetais são de especial importância, pois lidam com organismos diretamente afetados pelos poluentes do solo em áreas contaminadas.

Allium cepa L. é um dos sistemas de testes citogenéticos amplamente aceitos em estudos toxicológicos (BANDYOPADHYAY, 2016) e utilizado como indicador de exposição ao As (Yi et al., 2007). Os experimentos realizados até o momento, para avaliar os efeitos do As em *Allium* utilizavam sais de arsênio diluídos diretamente em solução, ou seja, o As estava prontamente disponível para as raízes (BANDYOPADHYAY, 2016; WU et al., 2010; YI et al., 2007). Contudo, White e Claxton (2004) demonstraram que o contato direto do solo contaminado com a raiz é mais eficiente e confiável para avaliações toxicológicas utilizando espécies vegetais.

Em estudos como o de Pepper et al. (1988) solução com As^{+5} inibiu o crescimento radicular e a proliferação celular meristemática em bulbos de cebola. Estudando a frequência de cada estágio do ciclo celular (G1, S, G2-M), esses autores propuseram que os efeitos do As^{+5} estavam relacionados à uma inibição na síntese de fosfoproteínas necessária para o progresso do ciclo celular. Ainda, esses autores observaram um aumento nas células G1 e G2, o que foi associado a um bloqueio nesses estágios em concentrações mais baixas de As^{+5} e por um período de curta exposição. Já em tratamento contínuo de até 72 h, esse bloqueio não foi observado, indicando que o sistema radicular de *Allium* possui um mecanismo desintoxicante contra o As^{+5} , principalmente na zona meristemática, pois as regiões de alongamento e diferenciação celular apresentaram maior sensibilidade à exposição ao As^{+5} .

Autores como Yi et al. (2007) relataram uma redução no índice mitótico (IM) e no número de células em prófase como consequência de uma lenta progressão da fase S em raízes de *A. cepa* expostas por 12 horas às soluções de 0 a 100 mg L⁻¹ As. Esses autores também observaram a ocorrência de picnose (núcleos condensados) em células de raízes expostas às maiores concentrações de As.

Além disso, Wu et al. (2010) observaram que a exposição por 12 h em soluções de 1 a 30 mg L⁻¹ As^{+3} diminuiu o IM das raízes de *V. faba* L. e de *A. cepa*, apresentando uma redução de 85% e 70% do IM, respectivamente, em relação ao tratamento controle após exposição à dose máxima (30 mg L⁻¹ As^{+3}).

Alguns autores apontam que a progressão mais lenta do ciclo celular é resultado da falta de energia, uma vez que o As é um desacoplador da síntese de ATP nos processos de transporte de elétrons da respiração celular e da

fotossíntese (FINNEGAN; CHEN, 2012; GARG; SINGLA, 2011; YADAV; SRINIVAS, 2002).

Em relação às alterações que podem ser encontradas durante a avaliação do ciclo celular, Wu et al. (2010) relataram que o As^{+3} induziu a formação de micronúcleos (MN) de maneira dose-dependente, embora a frequência de MN tenha diminuído nas raízes de *V. faba* após 12 h de exposição a 30 mg L^{-1} de As, aumentou nas células de *A. cepa*. Yi et al. (2007) observaram um aumento significativo na ocorrência de MN após uma exposição de curta duração (1 h) a 10 mg L^{-1} As e, apontaram que o ensaio de MN em raízes de *Allium* é um método simples, eficiente e reprodutível para estudar a toxicidade do As. Esses autores também sugeriram que a indução de MN pela exposição ao As indica que as células da raiz de *Allium* podem entrar na fase M com danos no DNA, prosseguir através de um ciclo celular e formar MN, o que demonstra a disfunção do ponto de verificação mitótico e da regulação do ciclo celular após a exposição a esse elemento.

Vários experimentos foram feitos para entender a biodisponibilidade de As para plantas, usando solução hidropônica ou exposição ao solo (i. e., plantas que crescem diretamente no solo, areia lavada ou matrizes artificiais) (FINNEGAN; CHEN, 2012). No entanto, prever a toxicidade do As em diferentes solos tropicais contaminados, expondo as raízes das plantas diretamente a essas amostras e analisar o potencial citogenotóxico, ainda é uma técnica pouco explorada.

2.3. Valores Orientadores

A legislação brasileira, através da Resolução 420/2009 (CONAMA, 2009), estabeleceu três valores orientadores da qualidade do solo distintos que são classificados com base nos riscos de exposição aos contaminantes: Valores Orientadores de Referência de Qualidade (VRQs), de Prevenção (VP) e de Investigação (VI) (CONAMA, 2009). Estes valores são baseados na análise dos solos sob condição natural (sem nenhuma ou mínima interferência antrópica) e em análise de risco, sendo conceituados da seguinte forma:

Valor Orientador de Referência de Qualidade (VRQ) é também conhecido como *background* geoquímico, o qual é baseado na avaliação dos teores

naturais presentes nos solos, sem ação antrópica. Para sua definição, a distribuição dos dados de uma população de amostras é normalizada, existindo inúmeros processos indicados para a sua obtenção (MATSCHULLAT et al., 2000). A resolução (CONAMA, 2009), estabeleceu que os VRQs devem ser estabelecidos pelos órgãos ambientais estaduais dos estados brasileiros. Segundo a Deliberação Normativa COPAM (2011), o atual VRQ de As para Minas Gerais é de 8 mg kg^{-1} de peso seco. O Estado de São Paulo também já determinou o VRQ para As ($3,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco) e os demais possuem pesquisas em andamento para contribuir com tal valor.

Quando não está determinado o VRQ para As ou outro elemento potencialmente tóxico, as agências de proteção ambiental brasileiras, podem utilizar valores genéricos internacionais. No entanto, tais valores foram gerados em solos distintos aos tropicais e o uso desses valores podem levar à medidas e análise de risco não confiáveis (CONAMA, 2009).

O Valor de Prevenção (VP) é o intermediário entre o VRQ e o Valor de Investigação (VI), sendo o valor limite do elemento no solo, que não interfere em sua capacidade de comprometer suas funções, ou seja, para um elemento é a menor concentração que causa fitotoxicidade (CONAMA, 2009). No caso deste valor ser alcançado, será necessário o monitoramento e a avaliação da causa deste alto teor, tornando-se determinante para extinção de possíveis fontes de contaminação na área ou verificação da existência de teores naturais atípicos (CONAMA, 2009). O VP de As, atualmente, para o Estado de Minas Gerais é de 15 mg As kg^{-1} .

Já o Valor de Investigação (VI) é o valor acima do qual haverá risco à saúde humana e ao desenvolvimento dos demais organismos vivos (CONAMA, 2009). Sua determinação é baseada em análise de risco, considerando a dose máxima aceitável que pode ser absorvida pelo organismo receptor (CONAMA, 2009). O VI é determinado com base em estudos desenvolvidos por diversos órgãos (e.g., Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos/EPA) e é baseado na toxicologia da substância e o nível de exposição dos indivíduos, mediante a aplicação de sistemas de modelagens. Uma vez atingido o VI, serão necessárias ações específicas para o gerenciamento da contaminação de forma a remediar a área e reduzir o risco de poluição (CONAMA, 2009).

2.3.1. Curva de distribuição de sensibilidade de espécies

Uma das metodologias amplamente utilizadas e aceitas para avaliação de risco ambiental em solos é através da elaboração de curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (Species sensitivity distributions - SSD), fundamentado que essas variam de sensibilidade a depender da substância testada (NEWMAN et al., 2000; SUTER, 2001).

Este método leva em consideração a diversidade de espécies representando de forma mais abrangente o comportamento de determinada substância no ambiente, pois se utiliza de dados de sensibilidade de diferentes organismos e assim, determina qual a fração afetada de espécies para cada composto estudado (VAN DEN BRINK et al., 2006). Desse modo é calculada uma concentração conhecida como o HC₅ (concentração perigosa para 5% das espécies, ou que proporciona um nível de proteção para 95% das espécies). Tal método é importante por levar em consideração a diversidade de parâmetros testados, tornando o teste mais representativo.

Referências

ALVARENGA, I. F. S. et al. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Sci. Total Environ**, 698, 134272, 2019.

ADRIANO D. C. Trace elements in terrestrial environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2nd. ed. New York: **Springer-Verlag** New York, 867, 2001.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE CONTROL (ATSDR). The Priority List of Hazardous Substances **201**, 2017.

ARAGÃO, F.B. et al. Cyto(geno)toxicity of Commercial Fungicides Based on the Active Compounds Tebuconazole, Difenoconazole, Procymidone, and Iprodione in *Lactuca sativa* L. Meristematic Cells. **Water. Air. Soil Pollut.** 230, 2019.

BANDYOPADHYAY, A., 2016. Role of oxidative stress in arsenic (III) induced genotoxicity in cells of meristematic tissue of *Allium cepa*: An in vivo study. **Mater. Today Proc.** 3, 3194–3199, 2016.

CAMPOS, J. M. S. et al. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic, in: **Plant Bioassays**. pp. 1–344, 2008.

CAPORALE, A.G. et al. Influence of compost on the mobility of arsenic in soil and its uptake by bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) irrigated with arsenite-contaminated water. **J. Environ. Manage.** 128, 837–843, 2013.

CIMINELLI, V.S.T. et al. Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. **Chemosphere** 168, 996–1003, 2017.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL. COPAM. **Deliberação Normativa COPAM nº 166**, de 29 de junho de 2011. Altera o anexo I da deliberação normativa conjunta COPAM CERH nº 2 de 6 de setembro de 2010, estabelecendo os valores de referência de qualidade dos solos. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=18414>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. CONAMA. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

CROUAU, Y.; MOÏA, C. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: An indicator of soil toxicity. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 64, 115–121, 2006.

DREWNIAK, L.; SKŁODOWSKA, A. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. **Environmental Science and Pollution Research** 20, 7728–7739, 2013.

DUQUESNOY, I. et al. Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. **Comptes Rendus - Biol.** 333, 814–824, 2010.

FARNESE, F.S. et al. Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. **Idesia (Arica)** 32, 99–106, 2014.

FAROOQ, M. A. et al. Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. **Environ. Exp. Bot.** 132, 42–52, 2016.

FINNEGAN, P.M.; CHEN, W. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. **Front. Physiol.** 3 jun, 1–18, 2012.

FREITAS, A.S.; FONTES CUNHA, I.M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V.H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 124, 426–434, 2016.

GARG, N.; SINGLA, P. Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms. **Environ. Chem. Lett.** 9, 303–321, 2011.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutat. Res. Regul.** Pap. 310, 175–185, 1994.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature** 460, 208–212, 2009.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). Agents classified by the iarc monographs, v. 1–123, 2019.

ISLAM, S.; RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.R.; NAIDU, R. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environ. Int.** 96, 139–155, 2016.

KADER, M.; LAMB, D.T.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Sorption parameters as a predictor of arsenic phytotoxicity in Australian soils. **Geoderma** 265, 103–110, 2016.

KAUR, S. et al. Arsenic (As) inhibits radicle emergence and elongation in *Phaseolus aureus* by altering starch-metabolizing enzymes vis-à-vis disruption of oxidative metabolism. **Biol. Trace Elem. Res.** 146, 360–368, 2012.

KUMAR, S. et al. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: Current updates and prospective. **Environ. Int.** 74, 221–230, 2015.

LIU, X.; ZHANG, S.; SHAN, X.; ZHU, Y.G. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. **Chemosphere**

61, 293–301, 2005.

MCLEAN, J.E., BLEDSOE, B.E. Behavior of metals in soils. (EPA/540/S-92/018). U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, D.C., 1992.

MATSCHULLAT, J.; OTTENSTEIN, R.; REIMANN, C. Geochemical background - Can we calculate it? **Environ. Geol.** 39, 990–1000, 2000.

MEHARG, A.A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154, 29–43, 2002.

MOREIRA, C.G. et al. Ecological risk assessment of cerium for tropical agroecosystems. **Chemosphere** 221, 124–131, 2019.

NEWMAN, M.C. et al. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: Assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. **Environ. Toxicol. Chem.** 19, 508–515, 2000.

NRIAGU, J.O. Mercury pollution from the past mining of gold and silver in the Americas. **Sci. Total Environ.** 149, 167–181, 1994.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n°208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

PACYNA, J. Atmospheric emissions of arsenic, cadmium, lead and mercury from high temperature processes in power generation and industry. Lead, Mercur. Cadmium Arsen. **Environ.** 69–88, 1987.

PALMIERI, M.J. et al. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 133, 442–447, 2016.

PANDA, S.K.; UPADHYAY, R.K.; NATH, S. Arsenic Stress in Plants. **J. Agron. Crop Sci.** 196, 161–174, 2010.

PEPPER, I.; GALANTI, N.; SANS, J.; LÓPEZ-SÁEZ, J.F. Reversible inhibition of root growth and cell proliferation by pentavalent arsenic in *Allium cepa* L. **Environ. Exp. Bot** 28, 9–18, 1988.

PITA-BARBOSA, A. Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae), 2009.

REIS, G.B. DOS et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 142, 110–116, 2017.

SAKUMA, Y. et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-

inducible gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 290, 998–1009, 2002.

SELVARAJ, V.; ARMISTEAD, M.Y.; COHENFORD, M.; MURRAY, E. Arsenic trioxide (As_2O_3) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. **Chemosphere** 90, 1201–1209, 2013.

SHRI, M. et al. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 1102–1110, 2009.

SINGH, A.P. et al. Salicylic acid modulates arsenic toxicity by reducing its root to shoot translocation in rice (*Oryza sativa* L.). **Front. Plant Sci.** 6, 1–12, 2015.

SMEDLEY, P.L.; KINNIBURGH, D.G. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. **Appl. Geochemistry** 17, 517–568, 2002.

SOUZA, J.M.O. et al. Arsênio e arroz: Toxicidade, metabolismo e segurança alimentar. **Quim. Nova** 38, 118–127, 2015.

SUSAN, A.; RAJENDRAN, K.; SATHYASIVAM, K.; KRISHNAN, U.M. An overview of plant-based interventions to ameliorate arsenic toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 109, 838–852, 2019.

SUTER, G.W. North American history of species sensitivity distributions. **Species Sensit. Distrib. Ecotoxicol.** 11–17, 2001.

VAN DEN BRINK, P.J.; BLAKE, N.; BROCK, T.C.M.; MALTBY, L. Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. **Hum. Ecol. Risk Assess.** 12, 645–674, 2006.

VIEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, G.L. Cyto(Geno)Toxic Endpoints Assessed via Cell Cycle Bioassays in Plant Models. **Cytotoxicity**, 2018.

WANG, X.; PENG, B.; TAN, C.; MA, L., Rathinasabapathi, B. Recent advances in arsenic bioavailability, transport, and speciation in rice. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 5742–5750, 2015.

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: A review. *Mutat. Res. - Rev.* **Mutat. Res.** 567, 227–345, 2004.

WU, C. et al. Effect of silicate on arsenic fractionation in soils and its accumulation in rice plants. **Chemosphere** 165, 478–486, 2016.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **J. Hazard. Mater.** 176, 952–956, 2010.

YADAV, G.; SRIVASTAVA, P.K.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Light intensity alters the extent of arsenic toxicity in *Helianthus annuus* L. seedlings. **Biol. Trace Elem. Res.** 158, 410–421, 2014.

YADAV, J.S.; SRINIVAS, C. An efficient approach for the synthesis of the hexahydroazepine segment of balanol. **Tetrahedron Lett.** 43, 3837–3839, 2002.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Sci. Total Environ.** 383, 232–236, 2007.

YOON, Y.; LEE, W.M.; AN, Y.J. Phytotoxicity of arsenic compounds on crop plant seedlings. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 11047–11056, 2015.

ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S.P.; MEHARG, A.A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annu. Rev. Plant Biol.** 61, 535–559, 2010.

SEGUNDA PARTE

METODOLOGIA PROPOSTA - Ensaio vegetais em microplacas para avaliação de risco eco-geno-toxicológicas em solo: germinação, desenvolvimento inicial e efeitos sobre o DNA.

Relatório Descritivo de Patente de Invenção

Ensaio vegetais em microplacas para avaliação de risco eco-genotoxicológicas em solo: germinação, desenvolvimento inicial e efeitos sobre o DNA.

Considerações Gerais

Este capítulo trata de um relatório descritivo com as informações exigidas pela Lei n° 9.279/1996 e pela Instrução Normativa n° 30/2013 a respeito de uma nova metodologia proposta para fins de avaliação de risco de poluentes ambientais utilizando plantas superiores como modelo. A proposta apresentada foi redigida conforme formulário ligado a novas tecnologias de processo (metodologia) disponibilizado pelo INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) e é fruto de uma série de experimentos realizados com intuito de obter uma metodologia mais rápida, viável, barata e sustentável em relação às normativas já existentes.

O pedido de abertura de processo está sob responsabilidade e adequação do NINTEC-UFLA (Núcleo de Inovação Tecnológica da UFLA).

Campo da Invenção

A presente proposta de invenção pertence aos campos da Ecotoxicologia e das Ciências Ambientais. Especificamente, a invenção propõe uma nova metodologia para análise de toxicidade em solos, através de bioensaios em microplacas, que permite resultados mais eficientes, rápidos, de baixo custo e sustentáveis para alertar sobre o risco de substâncias potencialmente tóxicas à biota e à população exposta.

Antecedentes da Invenção

Diversas abordagens são utilizadas para avaliar os impactos que a contaminação do solo causa aos organismos vivos e ao ecossistema, contaminação esta que pode ser tanto relativa à elevados teores naturais de

poluentes ou contaminantes no solo, quando por ação antropogênica (FINNEGAN e CHEN, 2012). As metodologias empregadas para avaliação de risco dos potenciais elementos tóxicos que utilizam organismos vivos como modelos são denominadas bioensaios e, estão inseridas dentro da área da ciência denominada Ecotoxicologia (ALVARENGA et al., 2008; CHIOCHETTA et al., 2014). Os bioensaios são considerados eficientes para o monitoramento e avaliação de risco de possíveis poluentes ambientais, sendo importantes para avaliar o nível de prejuízo ambiental decorrido da contaminação e podem complementar as análises químicas realizadas para a prospecção dos efeitos tóxicos (PANDARD et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013). Tais ensaios são realizados em ambiente controlado que determinam o grau ou o efeito biológico de uma substância-teste em um organismo-modelo (U.S.EPA, 1980).

Os bioensaios utilizados e recomendados para avaliação de risco ecológico são os que possuem padronização. (i.g. “ISO” - International Organization for Standardization). As normativas para avaliações de risco ecotoxicológico para substâncias presentes no solo que utilizam plantas como modelos, possuem como parâmetros as variáveis macroscópicas que envolvem a germinação, desenvolvimento das plantas e sintomas visuais no vegetal. Tais testes são interessantes por serem relativamente de fácil condução, rápidos e de baixo custo (PEREIRA et al., 2013; SIMÕES et al., 2013). Os resultados de testes em vegetais somado aos estudos ecotoxicológicos com outros organismos resultam em informações importantes para tomadas de decisões referentes à gestão de áreas contaminadas (BIANCHI et al., 2015).

Ademais, os bioensaios com plantas superiores são considerados de alta sensibilidade e os resultados obtidos apresentam correlação positiva à de outros organismos para detectar o efeito genotóxico de poluentes ambientais (U.S. EPA, 1980; GRANT et al., 1978), apresentando inclusive equivalência à ensaios com células humanas (GRANT, 1978; REIS et al., 2017). Por fim, os ensaios com vegetais não dependem de anuência de comissões éticas (ANDRADE-VIEIRA et al., 2014) e estão em conformidade com as diretrizes toxicológicas para o século XXI, cuja sugestão é redução e, se possível, a substituição de testes com modelos animais, em especial os vertebrados (HARTUNG, 2009).

Além dos protocolos com creditações nacionais e internacional, outros ensaios com plantas modelos são mundialmente utilizados para prospectar

genotoxicidade de poluentes ambientais (BIANCHI et al., 2015). Tais ensaios baseiam-se em avaliações de parâmetros citogenéticos, que permitem compreender melhor os mecanismos de ação do poluente. Em tais experimentos, as fases do ciclo celular, incluindo a divisão mitótica, são avaliadas e as alterações de cada etapa (intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase) são anotadas e, quando possível, calculadas as frequências de cada alteração e o índice mitótico (ANDRADE-VIEIRA et al., 2012). Desta forma, a depender dos resultados, a substância objeto de estudo pode ser considerada citotóxica quando altera o índice mitótico normal da planta modelo e/ou genotóxica quando as alterações observadas são relacionadas com quebras no DNA e formação de micronúcleos (ALVARENGA et al., 2019; CAMPOS et al., 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Os resultados de bioensaios genéticos com plantas são reportados ainda como relevantes, pois o alvo para toxicidade é o DNA, o qual possui universalidade de estrutura e função em todas as células vivas, logo, é possível extrapolar os resultados obtidos com os modelos vegetais para mamíferos e humanos uma vez que se o composto testado afeta o material genético da planta modelo, possui potencial para produzir efeitos semelhantes em outros organismos (HOUK, 1992). Para exemplificar, em análises de risco toxicológico de agroquímicos foi demonstrado excelente correlação entre frequência de cromossomos com anormalidades e c-metáfases entre plantas e animais; assim como alta frequência para testes de carcinogenicidade feitos em roedores e *A. cepa* (RANK e NIELSEN, 1997).

No entanto, apesar da importância de tais parâmetros, esses ainda não são realizadas e/ou não há normatização para avaliações de risco ecotoxicológico de substâncias presentes no solo que conciliem parâmetros macroscópicos e microscópicos (citogenotóxicos) em modelos vegetais, para fins de prospecção de efeitos eco-geno-toxicológicos de possíveis poluentes ambientais. Diante do exposto, os resultados dos ensaios realizados com modelos vegetais para acessar potencial eco-geno-tóxico de compostos químicos poderiam contribuir para uma real avaliação de risco em solos.

Estudos já demonstraram que bioensaios utilizando plantas como modelo são excelentes indicadores de efeitos citogenotóxicos e mutagênicos de químicos ambientais e, que os mesmos deveriam ser indicados pelas

autoridades reguladoras como testes para detecção de possíveis danos genéticos resultantes de substâncias potencialmente poluidoras presentes no ambiente e somar informações para tomada de decisões mais assertivas (GRANT, 1994). No entanto, até o presente não existia um protocolo padronizado.

Neste sentido, o presente relatório descritivo trata de uma metodologia inédita para avaliar o potencial eco-geno-tóxico de contaminantes do solo, de forma mais eficiente, sustentável e consistente, através da germinação, desenvolvimento inicial, ciclo celular e fragmentação de DNA em plantas superiores. Tal teste será conduzido em microplacas contendo solos, e com isso visando maior sustentabilidade e realização de experimentos mais rápidos.

O conceito de sustentável utilizado na proposta engloba os três pilares da sustentabilidade: econômico, por se tratar de protocolos mais baratos que utilizam menor quantidade de material, são mais rápidos e com tomadas de decisões na gestão de áreas contaminadas mais eficientes; social, com os valores orientadores para tomadas de decisões mais próximos da realidade com a implementação de novas variáveis (genotóxicas e mutagênicas); ambiental, os protocolos propostos contaminam menos solo e as novas formas de propor os valores orientadores são mais eficientes para garantir um meio ambiente equilibrado e sadio. Com isso, damos um passo a mais na busca em garantir a harmonia no desenvolvimento humano, garantindo a integridade do planeta.

Sumário da Invenção

A presente invenção refere-se à uma metodologia para análise de toxicidade em solos que permite resultados mais eficientes e sustentáveis para alertar sobre o potencial tóxico de possíveis contaminantes para a biota e população exposta.

A vantagem em relação à tecnologia disponível até o momento consiste em um teste com maior controle, reprodutibilidade, sustentabilidade, baixo custo e rapidez. Tais vantagens são úteis e auxiliam as indústrias e empresas que têm a necessidade de avaliar o risco toxicológico de potenciais contaminantes ambientais em organismos vivos com a finalidade de produzir, regularizar e

comercializar seus produtos, além dos testes necessários para cumprimento de condicionantes ambientais.

O teste de eco-geno-toxicologia aqui apresentado tem aplicabilidade para empresas produtoras de insumos agroquímicos, mineradoras, indústrias e têxteis, para laudos que compõem o licenciamento ambiental ou para qualquer empresa que gere resíduos. Além disso, esses testes podem auxiliar também os órgãos ambientais na tomada de decisão para proteção, fiscalização e mensuração de danos ambientais. Portanto, devida à ampla utilização em vários patamares, é essencial a maior reprodutibilidade e confiabilidade do teste.

Os protocolos atuais contaminam um grande volume de solo (aproximadamente 500 g de solo para cada repetição) para a realização dos testes, enquanto que, na nova metodologia aqui apresentada, esse volume é reduzido de forma drástica (aproximadamente 50 g por placa de Petri). Da mesma forma a nova metodologia reduz o tempo de resposta em mais de 15 dias (i.e., de 21 para 5 dias). Em suma, torna o desenvolvimento dos testes mais “limpo” ao meio ambiente, sendo uma proposta mais sustentável. E, por ser realizado em um ambiente controlado, elimina as interferências externas e falsos resultados, aumentando a confiabilidade.

Ademais, além dos parâmetros já avaliados em testes com plantas superiores em solo contaminado, o novo protocolo incrementa novas variáveis, relacionadas ao ciclo celular e fragmentação de DNA, as quais possibilitam a avaliação de possíveis efeitos mutagênicos. Desta forma, os resultados obtidos são mais eficientes e sustentáveis para alertar sobre o potencial tóxico de possíveis contaminantes para a biota e população exposta, bem como mais consistentes para a tomada de decisões por órgãos gestores ambientais.

Breve Descrição das Figuras

Figura 1:

Fluxograma da metodologia indicando as etapas para acessar os índices eco-geno-toxicológicos obtendo resultados não só de crescimento e desenvolvimento, mas também relacionados ao ciclo celular e fragmentação de DNA.

Figura 2:

1. Classes de solos representativas da área de interesse.
2. Contaminação com a substância a se conhecer a potencialidade tóxica. O número de doses testadas deve possibilitar uma relação dose-resposta e aplicar testes de regressão para obter os índices de ecotoxicologia.
3. Preparo do solo nas placas de Petri, determinação da capacidade de campo, semeadura das espécies modelos testadas e o acondicionamento nas circunstâncias para realização do teste.
4. Análise das variáveis macroscópicas.
5. Detecção de danos ao DNA.
6. Coleta e fixação de material.
7. Análises do ciclo celular e a visualização das alterações cromossômicas.

Descrição Detalhada da Invenção

A invenção está relacionada com uma nova metodologia para determinação de potenciais efeitos tóxicos de poluentes em solos - baseada na avaliação de germinação, desenvolvimento inicial e ciclo celular de plantas superiores. A metodologia tem o diferencial e o aspecto inovador pautados na estrutura, adaptação e avaliação de ciclo celular das espécies de plantas testadas trazendo resultados mais conclusivos, confiáveis e sustentáveis. Isso, como consequência irá proporcionar uma melhor identificação e gestão de áreas contaminadas e maior segurança à saúde humana.

Os testes são realizados em Placa de Petri (de Poliestireno, Ø 90mm) em ambiente controlado (mantidas em BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio, a 24 ± 1 ° C, sem fotoperíodo, UR – Umidade relativa 75%), com cinco repetições (cada placa de Petri considerada uma repetição) para cada dose, eliminando interferências. Em cada repetição são distribuídas pelo menos 10 sementes da espécie modelo a ser testada e a duração é de 120 horas.

Solo Natural e Substrato Artificial

Para testes com possíveis poluentes ambientais, são utilizados substratos artificiais para minimizar a variabilidade dos solos naturais e aumentar a comparabilidade dos resultados dos testes, e assim os substratos devem ser

inertes. Na presente metodologia, para solos tropicais, é utilizado um Solo Artificial Tropical produzido através da mistura de 70% de areia fina, 20% de argila caulinita e 10% de fibra de coco (pH = 5). Devem ser fornecidos os nutrientes para o crescimento e desenvolvimento inicial das espécies testadas para garantir que não ocorra estresse por deficiências nutricionais e, deve ser realizada a avaliação visual das plantas em relação ao tratamento controle.

Para testar solos naturais, devem ser utilizadas as classes de solos objetos do estudo. A fim de homogeneizá-lo e remover as partículas grossas, o solo natural coletado deve ser seco e peneirado para obter partículas < 2 mm. Deve ser realizada a classificação química e física dos mesmos.

Para cada classe de solo utilizada nos testes (solos naturais e artificial), é necessário realizar teste para medir a capacidade de campo e utilizar sempre entre 50-60% da capacidade de campo do solo. Deverão ser utilizados 50 g de cada solo (natural ou artificial) em cada Placa de Petri.

Seleção das espécies para o teste

A seleção de espécies para realização dos testes deverá seguir a lista disponível nas normativas ISO 11269-2 e OECD-208, que consideram espécies-modelo sensíveis para teste de substâncias potencialmente tóxicas. Para validação dos resultados e maior confiabilidade dos mesmos, deverão ser utilizadas pelo menos duas espécies de monocotiledôneas e duas eudicotiledôneas, presentes na referida lista. As espécies determinadas deverão apresentar, em condições controle (sem contaminante), uma taxa de germinação superior a 70% (OECD, 2006) após o início do teste. Além disso, as sementes devem ter alto vigor, com os testes de germinação para embalagem realizados com data inferior a 6 meses da utilização.

Substância Aplicada

A substância ou contaminante testado deverá ser misturado no veículo apropriado (e.g., água ou solventes orgânicos). Tal veículo utilizado para diluição deve estar na mesma concentração que aplicada nas diluições, como um controle negativo interno aos testes, para eliminar dos efeitos observados como efeito do veículo *per se*.

As doses a serem aplicadas deverão ser múltiplos de 1,8, segundo a normativa OECD-208. O número de concentrações ou soluções testadas deve ser maior que 8 e suficientes para gerar uma relação dose-resposta confiável e uma equação de regressão bem como fornecer uma estimativa da ECx (concentração efetiva que resultara em inibição de X das variáveis testadas). As concentrações / taxas selecionadas devem incluir os valores ECx a serem determinados.

Incorporação no solo / substrato artificial

O volume da solução contaminante aplicado deverá ser adicionado ao solo / substrato seco e a quantidade adicionada deve ser a mesma para cada concentração testada, lembrando de limitar-se à capacidade de campo.

Variáveis analisadas

Parâmetros macroscópicos e microscópicos reunindo efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Tais como: germinação, índice de velocidade de germinação, peso fresco, índice mitótico, alterações cromossômicas, micronúcleos e fragmentação de DNA.

Análise estatística

A relação dose-resposta deve ser estabelecida com base em uma equação de regressão e diferentes modelos podem ser usados para estimar ECx (e. g., EC₂₅, EC₅₀). Sempre que possível, o R² deve ser maior ou igual a 0,7.

Reivindicações

Ensaio vegetais em microplacas para avaliação de risco eco-genotoxicológicas em solo: germinação, desenvolvimento inicial e efeitos sobre o DNA.

1. Metodologia para análise da eco-genotoxicologia em microplacas com plantas superiores, caracterizada pelas etapas:

- testes das condições experimentais (coleta, preparo e contaminação do solo e determinação das espécies sensíveis);

- realização das avaliações macroscópicas;
- realização das avaliações microscópicas;
- obtenção da curva de distribuição de sensibilidade.

2. Metodologia de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a etapa das condições experimentais contamina um menor volume de solo, pois são realizadas em placas de Petri e não em vasos;

3. Metodologia de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que nas condições experimentais possui maior controle de temperatura, fotoperíodo e de fitopatógenos. Tal manejo evita interferências nos resultados que não dizem respeito às substâncias testadas.

4. Metodologia de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que atende às normativas que regulamentam os testes com plantas superiores em casa de vegetação e possui o acréscimo de variáveis para aumento da confiabilidade dos resultados.

5. Caracterizada pela metodologia de acordo com a reivindicação 4, em que se acrescentam variáveis citotóxicas e genotóxicas que, até então, não eram utilizadas em metodologia padronizada para composição da curva de distribuição de sensibilidade das espécies para avaliações eco-genotoxicológicas de substâncias em solo.

6. Metodologia de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que o acréscimo das variáveis microscópicas possibilita a avaliação de possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos.

7. Padronização de todas as etapas da reivindicação 1, a fim de proporcionar reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados obtidos, além de permitir comparação com outros resultados.

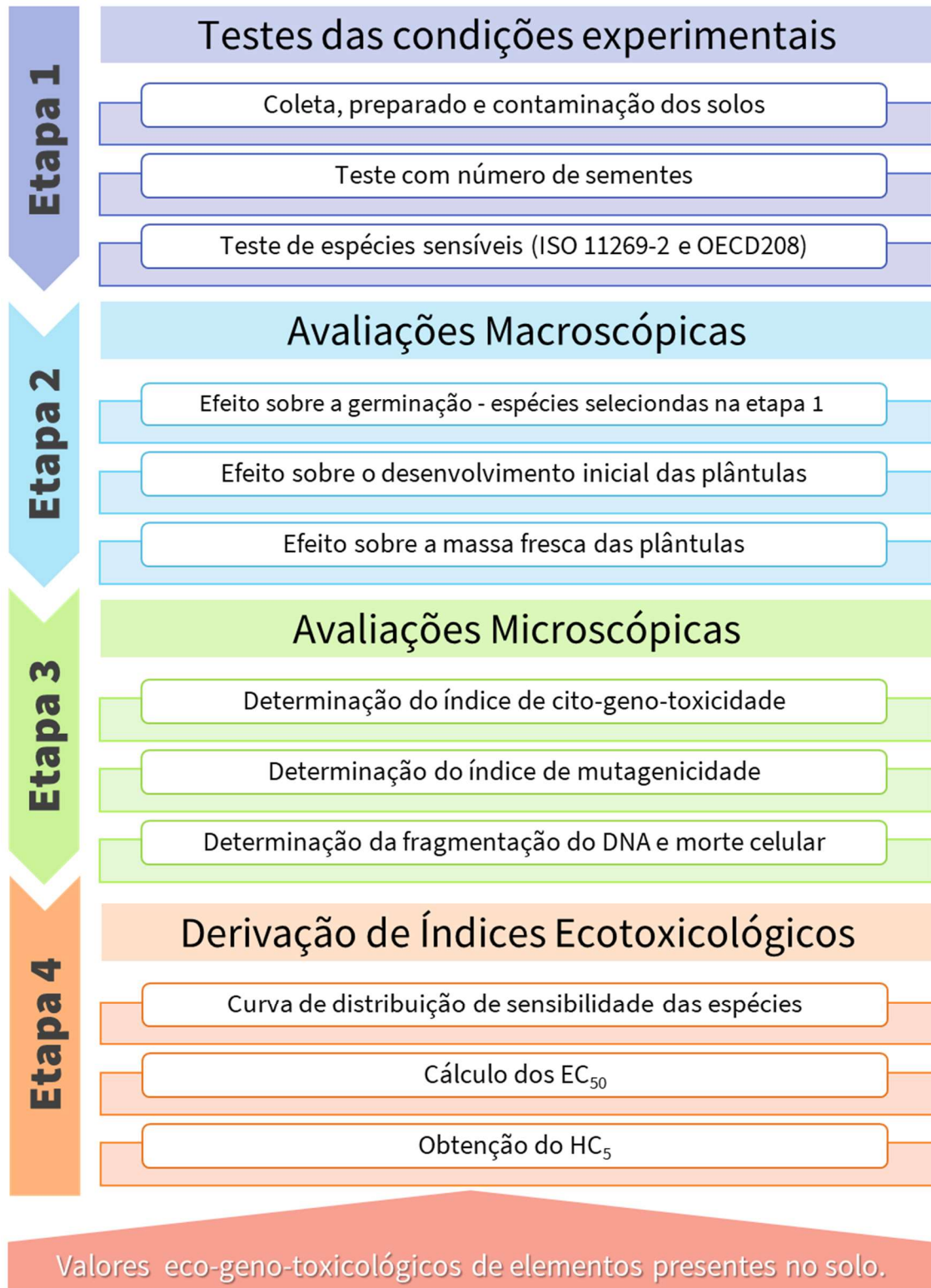
8. Metodologia de acordo com a reivindicação 1, resultados equivalentes aos realizados em casa de vegetação (que exigem maior tempo de duração, menor controle de fatores externos e maior quantidade de resíduos gerados);

9. Metodologia de acordo com a reivindicação 8, propicia a redução da duração do tempo.

10. Metodologia de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que são informações adicionais obtidas com a presente metodologia importantes para a compreensão do possível dano ao meio ambiente e aos seus organismos e, isso auxilia na tomada de decisão para manter o meio ecologicamente equilibrado.

ENSAIOS EM MICROPLACAS COM PLANTAS SUPERIORES: GERMINAÇÃO, DESENVOLVIMENTO INICIAL E EFEITOS SOBRE O DNA.

FLUXOGRAMA



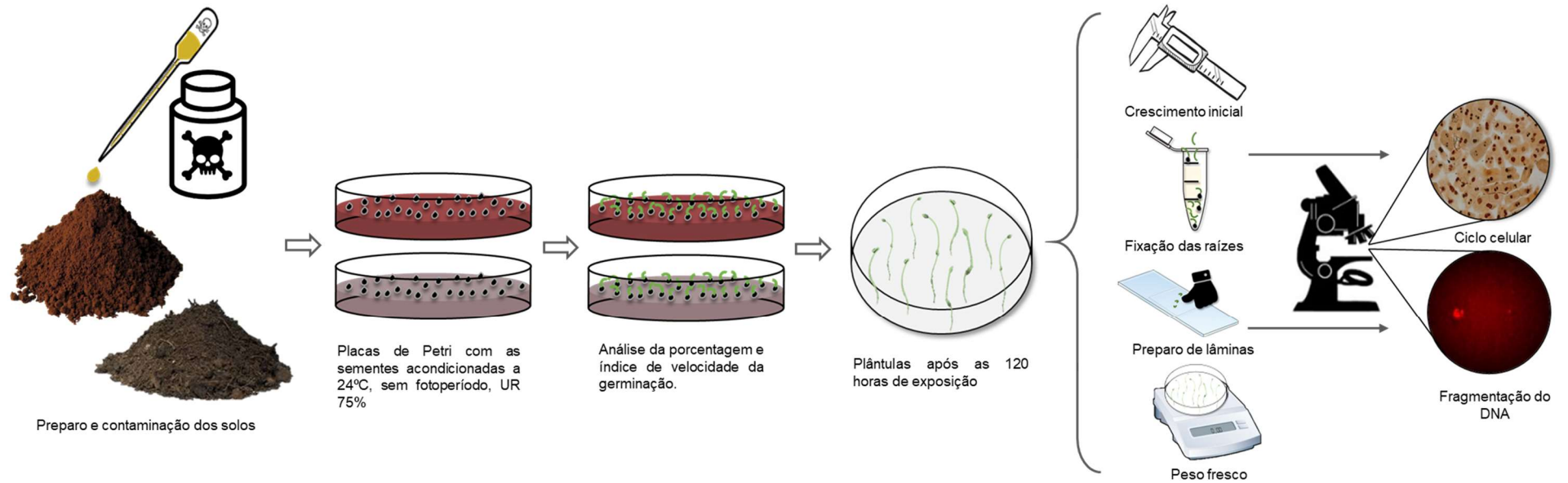


Figura 2: Esquema das etapas da nova metodologia proposta para ensaios vegetais em microplacas para avaliação de risco eco-genotóxicas em solo: germinação, desenvolvimento inicial e efeitos sobre o DNA

Referências

ALVARENGA, I. F. S. et al. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Sci. Total Environ**, 698, 134272, 2019.

ALVARENGA, P. et al. Assessment of chemical, biochemical and ecotoxicological aspects in a mine soil amended with sludge of either urban or industrial origin. **Chemosphere** 72, 1774–1781, 2008.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **An. Acad. Bras. Ciênc** 86, 373–382, 2014.

BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARIN-MORALES, M.A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 120, 174–183, 2015.

CAMPOS, J. M. S. et al. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic, in: **Plant Bioassays**. pp. 1–344, 2008.

CHIOCHETTA, C.G. et al. Leachates from solid wastes: Chemical and eco(geno)toxicological differences between leachates obtained from fresh and stabilized industrial organic sludge. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 21, 1090–1098, 2014.

FINNEGAN, P.M.; CHEN, W. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. **Front. Physiol.** 3 jun, 1–18, 2012.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutat. Res. Regul.** Pap. 310, 175–185, 1994.

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environ. Health Perspect.** Vol. 27, 37–43, 1978.

HARTUNG, T. Toxicology for the twenty-first century. **Nature** 460, 208–212, 2009.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. A review. **Mutat. Res. Genet. Toxicol.** 277, 91–138, 1992.

ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 28 p. 2013.

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 650, 80–86, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals nº208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

PANDARD, P. et al. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Sci. Total Environ.** 363, 114–125, 2006.

PEREIRA, M.P. et al. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Rev. Agro@Mambiente on-Line** 7, 36, 2013.

RANK, J., NIELSEN, M.H. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 390, 121–127, 1997.

REIS, G.B. DOS et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 142, 110–116, 2017.

RODRIGUES, L.C. DE A. et al. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient.** 17, 1099–1108, 2013.

SIMÕES, M.S.; MADAIL, R.H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M.D.L. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas** 26, 29–36, 2013.

ARTIGO 1 – Avaliação da ecotoxicidade de arsênio em solos tropicais: uma abordagem utilizando uma nova metodologia

Avaliação da toxicidade de arsênio em solos tropicais: uma abordagem utilizando uma nova metodologia

Autores: Ingrid Fernanda Santana Alvarenga¹, Luiz Roberto Guimarães Guilherme², Larissa Fonseca Andrade-Vieira¹

Afiliações:

¹ - Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² - Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente:

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

E-mail: larissa.vieira@ufla.br; Tel: +55 35 3829-1356, Fax: +55 35 3829-1341.

Resumo

O arsênio (As) é um metaloide conhecido pela sua alta toxicidade e, devido a isso, o efeito da exposição de seres humanos ao As tem sido muito estudado, embora pouca atenção tem sido dada aos solos contaminados. A acumulação de As no solo é uma via expressiva de contaminação da cadeia trófica, sendo, por isso, de extrema importância o seu estudo. Nesse sentido, objetivou-se, com este estudo: i) avaliar a toxicidade de As para plantas superiores em solos tropicais contaminados com esse elemento; e ii) validar uma nova metodologia para avaliação ecotoxicológica em solo contaminado com As, a qual tem caráter mais sustentável. Para tanto, sementes de *Lactuca sativa*, *Allium cepa*, *Zea mays*, *Pennisetum glaucum* e *Phaseolus vulgaris* foram expostas em placas de Petri a solos tropicais típicos (Latossolo e Cambissolo) e a um solo artificial tropical (ATS) contendo doses crescentes de As (0, 8, 14,5, 26, 46,5, 84, 150 e 270 mg kg⁻¹) e acondicionadas em estufa tipo B.O.D. a 24°C, sem fotoperíodo, por 120 horas. Em seguida, foram realizadas análises macroscópicas para todas as espécies, as quais incluíram a avaliação da porcentagem e velocidade de germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas. Para os solos testados, o ATS apresentou maior potencial em disponibilizar o As a níveis que causem prejuízos, seguido do Latossolo e Cambissolo. O parâmetro mais sensível e que possui confiabilidade e facilidade para obtenção é a matéria fresca. Das espécies testadas, devido à sensibilidade, *L. sativa* e *A. cepa* são espécies recomendadas para tais testes, enquanto que o *Z. mays* foi a espécie menos sensível. Os resultados são semelhantes aos resultados da bibliografia de testes realizados em casa de vegetação e, por isso, a metodologia em microplacas para avaliar a toxicidade do As em plantas superiores cultivadas em solos tropicais é válida.

Palavras-chave: Plântula, Crescimento, Desenvolvimento, Toxicologia, Arsenato

1. Introdução

O arsênio (As) é um metaloide que está presente nos solos de forma natural ou devido a ações antropogênicas, como atividades industriais e agrícolas. No solo tal metaloide apresenta pouca mobilidade quando complexado com óxidos de ferro, alumínio e magnésio, no entanto, torna-se móvel e pode ser liberado na fase sólida sob condições redutoras. Tal elemento não é essencial às plantas e é reconhecido pelo seu alto potencial nocivo ao homem, animais e aos vegetais (FINNEGAN e CHEN, 2012). A acumulação de As no solo é uma via expressiva de contaminação da cadeia trófica e, por isso, é importante gerenciar as concentrações de As no solo, pois as plantas podem absorver e translocar o As para a parte aérea (ISLAM et al., 2016; ZHAO et al., 2010).

O correto gerenciamento do elemento no solo é complexo pois, a real disponibilidade do As é influenciada pelos atributos químicos e físicos do solo, variando com cada classe de solo (FAROOQ et al., 2016). Além disso, as plantas possuem sensibilidade e capacidade de acúmulo diferentes, apresentando comportamentos distintos quando expostas ao As a depender do estágio de desenvolvimento, fisiologia, anatomia e mecanismos de tolerância do vegetal (ALVARENGA et al., 2019; FREITAS et al., 2016; KADER et al., 2016; KAUR et al., 2012).

Devido ao grande potencial de toxicidade do As, existem limites permissíveis do elemento em solos, água e insumos agrícolas. Uma das metodologias utilizadas para determinar os valores orientadores para solos é através de ensaios ecotoxicológicos com vegetais superiores (OECD, 2006). Tais ensaios são padronizados pelas normativas OECD-208 e ISO-11.269-2, que estabelecem avaliações de parâmetros macroscópicos envolvendo germinação e crescimento das plantas modelo, sendo normalmente realizados com vasos, em casa de vegetação (FREITAS et al., 2016; KADER et al., 2016). Tais ensaios requerem a contaminação de um grande volume de solo e, em função disso, a possibilidade de realizar ensaios em microplacas atenderia a diretrizes de sustentabilidade, por requererem menor volume de solo, além de terem a duração reduzida.

Neste sentido, objetiva-se com esse trabalho avaliar a toxicidade de solos tropicais contaminados com As, através de uma metodologia que utiliza microplacas

e comparar os resultados obtidos com aqueles reportados em ensaios realizados em casa de vegetação. Além disso, dentro desta abordagem comparativa, espera-se validar uma nova metodologia para avaliação de risco de elementos potencialmente tóxicos presentes em solos, a qual tem caráter mais sustentável, econômico e de mais baixo custo, podendo ser executada em menor tempo em relação às atualmente aplicadas para tal fim. Espera-se, com essa nova metodologia indicar quais são os parâmetros mais sensíveis para esse tipo de teste.

2. Material e Métodos

Foram utilizadas duas classes de solos tropicais, típicos do Brasil: Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico com textura média a moderado (Tabela 1) e Cambissolo Háptico Tb distrófico típico a moderado (Tabela 1). O Latossolo foi coletado em Itumirim-MG, Brasil (21° 17' 08 " S, 44° 47' 43 " W) e o Cambissolo em Lavras-MG, Brasil (21° 13' 46 " S, 44° 59' 17 " W). Utilizou-se também para fins de comparação um solo artificial tropical (areia fina, argila caulínica e fibra de coco na proporção 7:2:1 de peso seco), conforme recomendações e diretrizes da OECD 208 (OECD, 2006).

Em cada solo testado, foram utilizadas concentrações crescentes de As (0; 8; 14,5; 26; 46,5; 84; 150 e 270 mg kg⁻¹). Doses superiores a 270 mg kg⁻¹ não foram testadas pois já são consideradas perigosas para humanos (CONAMA, 2009). As doses de As foram diretamente adicionadas ao solo através de uma solução estoque de arsenato de sódio heptahidratado (Na₂HAsO₄ 7H₂O, pureza a 98%, Sigma-Aldrich) em água.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas de dois solos naturais (Latossolo e Cambissolo) e do Solo Artificial Tropical (ATS) utilizados no experimento de avaliação da toxicidade de arsênio em plantas cultivadas em solos tropicais

Solos	Textura			pH (H ₂ O)	CTC	MO	P-rem	As	Fe ₂ O ₃
	Argila	Silte	Areia						
	-----%-----				<i>cmol_c dm⁻³</i>	%	<i>mg L⁻¹</i>	<i>mg kg⁻¹</i>	%
Latossolo	26	8	66	4.4	0,27	0,24	6,84	0,026	2,40 ± 0,00
Cambissolo	33	48	19	4.6	2,01	1,87	4,31	< 0,01	17,4 ± 1,03
ATS	19	8	73	5.2	2,27	7,84	36,1	< 0,01	1,80 ± 0,10

CTC - capacidade de troca catiônica a pH 7; MO - conteúdo de matéria orgânica; P - rem - fósforo restante; Fe₂O₃ - Óxidos de ferro.

As espécies testadas foram selecionadas a partir de experimentos prévios, tendo sido utilizadas como material vegetal, sementes de *Lactuca sativa* L. var. great lakes – americana (alface), *Allium cepa* L. var. baia periforme (cebola), *Zea mays* L. (milho), *Pennisetum glaucum* L. (milheto) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. BRSMG Uai (feijão). As sementes de *L. sativa* L., *A. cepa* L. e *P. glaucum* L. foram adquiridas comercialmente da marca Isla® sementes sendo, para cada espécie, todas de um mesmo lote. Já as sementes de *P. vulgaris* L. foram cedidas pelo programa de Melhoramento de Milho do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições (placa de Petri de polietileno com Ø de 9 cm) por tratamento. Cada placa de Petri foi preenchida com 50g de Latossolo, Cambissolo ou Solo Artificial Tropical e mantida a capacidade de campo em 60% (ISO, 1998). Como controle interno (CI) utilizou-se placa de Petri contendo papel filtro embebido em 3 mL de água ultrapura. Como controle negativo (CN), utilizaram-se os solos aqui testados considerados limpos, sem adição de As. As placas de Petri foram acondicionadas em estufa tipo B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a $24 \pm 2^\circ\text{C}$, sem fotoperíodo (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009; PINHEIRO, 2014), por 120 horas.

2.1 Testes Macroscópicos

A germinação das sementes das cinco espécies utilizadas foi avaliada anotando-se o número de sementes germinadas (com a protrusão da radícula) até completar um total de 120 h e calculada segundo Maguire (1962) (os dados da porcentagem de germinação foram transformados em $\text{ArcSen}\sqrt{\%/100}$ para atender à normalidade). Para calcular o índice de velocidade de germinação (IVG) foram realizadas contagens diárias (a cada 24h) das sementes protundidas, sendo utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + GN/NN$$

Em que:

G1, G2 e GN representam o número de sementes germinadas no enésimo dia.

N1, N2 e NN representam o número de dias em que foram avaliadas as germinações G1, G2 e GN.

No final do experimento, o comprimento das raízes e da parte aérea emitidas foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital. Após isso, foi realizada a lavagem das plântulas em água destilada, retirado o excesso de água e em seguida determinou-se a matéria fresca (MF) das espécies, através da pesagem das mesmas em balança de precisão.

2.2 Análises Estatísticas

Todos os parâmetros obtidos nos resultados dos ensaios foram avaliados quanto à distribuição de normalidade e ANOVA, e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnet como nível de significância de 5%. As análises estatísticas foram realizadas no programa R (2019). Foi realizado um teste de correlação de Pearson (5% de significância) entre os parâmetros comprimento e matéria fresca, a fim de avaliar a similaridade entre os resultados.

3. Resultados e Discussão

3.1 Efeitos do As sob a germinação

Os valores de porcentagem de germinação (%G) e índice de Velocidade de Germinação (IVG) variaram dependendo dos tipos de solo e da espécie testada (Figura 1). O ATS foi o solo que apresentou as menores %G com o acréscimo das doses de As em todas as espécies, seguido do Latossolo e Cambissolo. O IVG das espécies cultivadas em ATS também sofreu uma influência maior das concentrações crescentes de As quando comparadas ao Latossolo e Cambissolo (Figura 1). A contaminação por As, causou efeitos negativos mais graves na %G de feijão e milho, quando comparada com as demais espécies nos três solos testados. Diferentemente, a alface foi a espécie de planta mais tolerante nessas condições ao As, com comportamento similar para IVG. No entanto, somente Cambissolo todas as espécies germinaram, o que demonstra que, para esse solo, as espécies testadas não eram sensíveis o suficiente para As (Figura1).

As diferenças observadas em relação à porcentagem de germinação entre as sementes observadas podem ser explicadas pelas diferentes propriedades físico-química dos solos testados, como por exemplo: pH, matéria orgânica, potencial redox, CTC. Tais características inerentes a cada solo interferem na disponibilidade

do As para as espécies testadas. O solo que apresentou maior fitotoxicidade foi o ATS, e suas características auxiliam para entender o motivo. O ATS, entre os solos testados, contém os menores teores de óxido de ferro e argila (Tabela 1) e, por consequência, ocorre a maior fitodisponibilidade quando comparado aos solos naturais testados (DAI et al., 2016; WANG et al., 2015).

Outra causa da redução na germinação pode ser explicada em relação aos efeitos conhecidos do As nas plantas. Sabe-se que o As atua como um inibidor metabólico, uma vez que compete com o fosfato e substitui o fósforo na molécula de ATP, interrompendo o fluxo de energia que é necessário para a germinação (WU et al., 2010; YI et al., 2007), além de interagir e prejudicar a atividade enzimática responsável pela quebra da reserva energética da semente. Por isso, em altas concentrações de As, a falta de energia proveniente do ATP e a redução da atividade enzimática pode ser responsável pela inibição da germinação (SRIVASTAVA et al., 2013).

Assim como nos resultados obtidos no presente estudos, em que a germinação foi um parâmetro sensível para avaliação de solos com As, (MARTINS et al., (2019) em trabalho realizado em casa de vegetação com solos tropicais contaminado com As (dose máxima $270 \text{ mg As kg}^{-1}$), concluíram que a germinação inicial é o *endpoint* mais sensível para avaliação da toxicologia do As em plantas.

No entanto, existem pesquisas que divergem do presente resultado: ao expor sementes de *O. sativa* L. (SHRI et al., 2009) e *Triticum aestivum* L. as As, Chun-Xi et al. (2007) e Liu et al. (2005) mostraram que as avaliações de crescimento e desenvolvimento são mais sensíveis que a germinação. Outros autores inferem que o parâmetro germinação é menos sensível, pois as sementes são mais dependentes das reservas contidas nos cotilédones para germinação, não tendo a toxicidade externa muita influência (CHUN-XI et al., 2007).

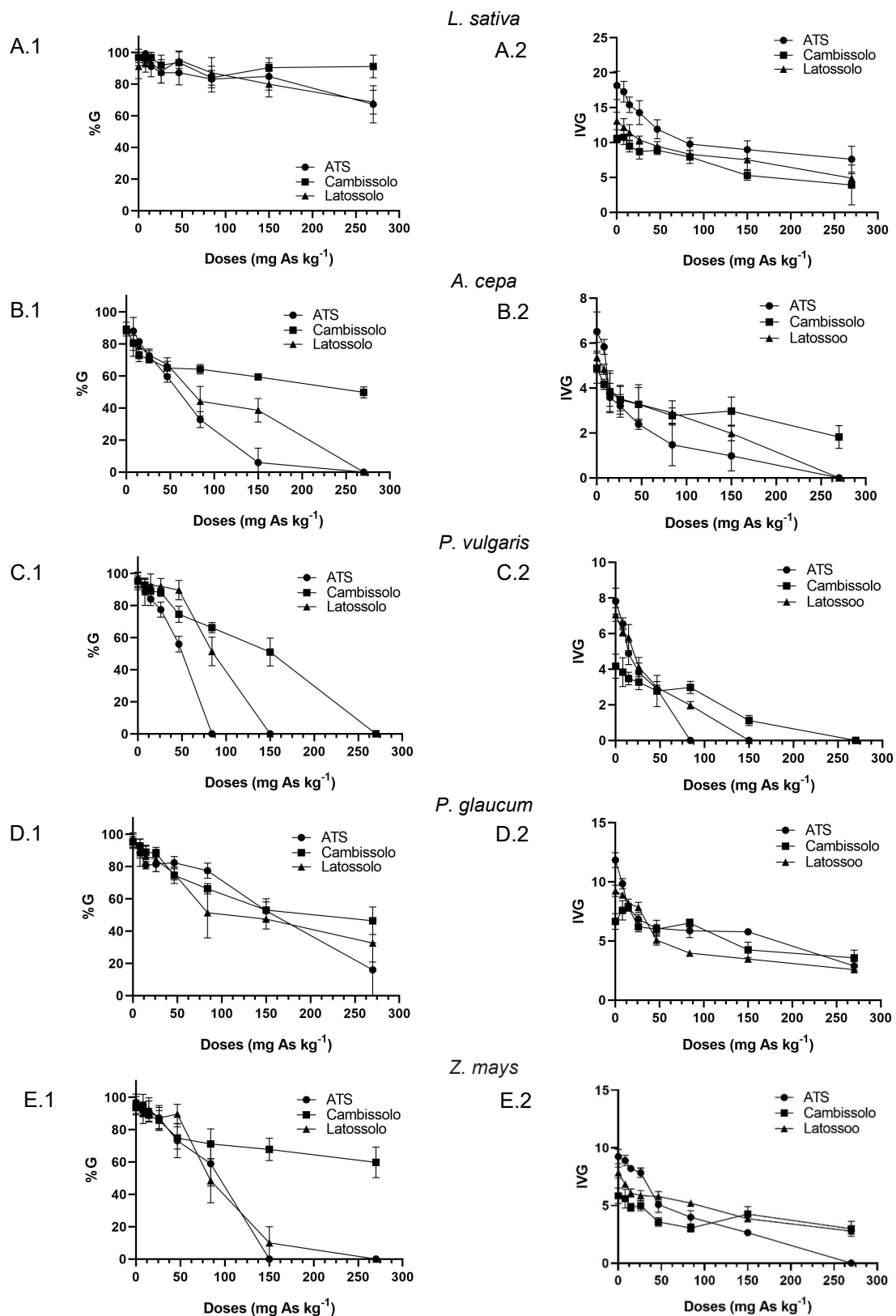


Figura 1: Porcentagem de germinação (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de vegetais (A: *L. sativa*, B: *A. cepa*, C: *P. vulgaris*, D: *P. glaucum*; E: *Z. mays*) cultivadas em Latossolo, Cambissolo e Solo Artificial Tropical com doses crescentes de As. Os pontos são as médias (n = 5) e as barras verticais o erro padrão. Os pontos fechados indicam diferença estatística significativa em relação ao controle (teste de Dunnet; p < 0,05).

3.2 Efeitos do As sobre o desenvolvimento inicial das plântulas

As plântulas de *L. sativa* cultivadas nos solos contaminados com As apresentaram diferenças significativas em relação ao desenvolvimento inicial para os três solos avaliados. Foi observado que as doses de As interferiram negativamente no comprimento da raiz e parte aérea das plântulas de alface (Figura 2). Plântulas cultivadas em ATS obtiveram a maior redução de crescimento quando comparado com os outros solos e na dose 8 mg As kg⁻¹ já houve redução significativa da raiz e parte aérea quando comparado ao solo controle (sem As) (Figura 2).

Para *A. cepa* o solo que induziu maior redução no comprimento da plântula foi o Latossolo seguido do ATS e posteriormente o Cambissolo. No Latossolo, não houve desenvolvimento da parte aérea nas doses 26, 84 e 150 mg As kg⁻¹ e no ATS não houve na dose 150 mg As kg⁻¹. No Latossolo, o crescimento já diferiu do controle na concentração de 8 mg As kg⁻¹ para parte aérea e na concentração de 14,5 mg As kg⁻¹ para a raiz. E, em relação ao ATS, já houve redução significativa do crescimento na dose 14,5 mg As kg⁻¹ para parte aérea e 8 mg As kg⁻¹ para raiz. No Cambissolo, apesar da diferença no crescimento ter sido significativa a partir da primeira dose testada (8 mg As kg⁻¹), houve desenvolvimento da raiz e parte aérea em todas as doses testadas (Figura 2).

Em relação às espécies *Z. mays* e *P. glaucum*, as doses de As testadas também influenciaram negativamente no crescimento da raiz e da parte aérea das plântulas e o comportamento em relação aos solos foi similar: as plântulas cultivadas em ATS tiveram o crescimento mais prejudicado, seguido do Latossolo e posteriormente o Cambissolo. No entanto, dentre as espécies avaliadas, tais espécies foram as menos sensíveis para expressar a toxicidade do As presente nos solos testados (Figura 2).

Após os processos descritos anteriormente, que influenciaram a porcentagem e a velocidade da germinação das sementes expostas ao As, quando em concentrações tóxicas o As passa a interferir nos processos metabólicos posteriores à germinação e, a alteração visual subsequente, é no crescimento e desenvolvimento inicial das plântulas (SRIVASTAVA et al., 2013). Como observado nos resultados do presente estudo, em proporções diferentes, todas as espécies testadas tiveram o crescimento da parte aérea e raiz das plântulas prejudicadas.

Tais respostas podem ser devido ao fato de que quando absorvido pelas raízes, o As causa danos na integridade da membrana das células das raízes e também possui como efeito negativo conhecido a diminuição do índice mitótico, inibindo o alongamento radicular (FINNEGAN e CHEN, 2012; FREITAS et al., 2016; YOON et al., 2015).

Após a absorção, o processo de redução do arsenato em arsenito causa um estresse oxidativo, pois gera espécies reativas de oxigênio. Tal estresse demanda realocação energética do vegetal para reparar os possíveis danos e efeitos deletérios, prejudicando assim o normal desenvolvimento da plântula (FINNEGAN e CHEN, 2012; GARG e SINGLA, 2011; ZHAO et al., 2010). Ademais, o As presente nas células altera o fluxo de energia nas mesmas, pois como possui a característica de substituir o fósforo, como já discutido, convertendo o ATP a uma molécula instável (ADP-As) (FINNEGAN e CHEN, 2012; GARG e SINGLA, 2011; KAUR et al., 2012; MEHARG e HARTLEY-WHITAKER, 2002), também a estrutura do DNA (ROSAS-CASTOR et al., 2014).

Além disso, devido à presença do As, há menor disponibilidade de sacarose em consequência do aumento na atividade da invertase ácida (KAUR et al., 2012). Apesar do presente estudo tratar de plântulas, tais efeitos danosos ao sistema radicular no decorrer do desenvolvimento da planta implicam em uma menor absorção dos nutrientes, prejudicando o desenvolvimento da raiz e parte aérea (SHRI et al., 2009).

Os fatores acima são possíveis explicações do efeito negativo do As observado no desenvolvimento das espécies vegetais testadas no presente trabalho e no resultado encontrado por outros autores (FINNEGAN e CHEN, 2012; FREITAS et al., 2016; YADAV et al., 2014; YOON et al., 2015). Tais parâmetros demonstraram ser responsivos e sensíveis para testes toxicológicos em diferentes solos com As, sendo que as espécies testadas tiveram respostas negativas e dose-dependentes, independentemente se eram monocotiledôneas ou eudicotiledôneas. O desenvolvimento do vegetal (comprimento raiz e parte aérea e peso) tem sido relatado como um parâmetro mais sensível para avaliar a toxicidade quando comparado com a germinação (BIANCHI et al., 2015; MOREIRA et al., 2019).

Como no presente estudo, a redução do crescimento da raiz e da parte aérea, quando expostas a diferentes doses de As, já foi relatada anteriormente para

diversas espécies, como em *P. vulgaris* e *Z. mays* (HARTLEY-WHITAKER et al., 2001). Estudos realizados em casa de vegetação com solos tropicais e doses crescentes de As (até 270,0 mg As kg⁻¹) também relataram que apesar dos resultados negativos, *Z. mays* foi uma espécie pouco sensível para avaliações toxicológicas de germinação e crescimento (MARTINS et al., 2019).

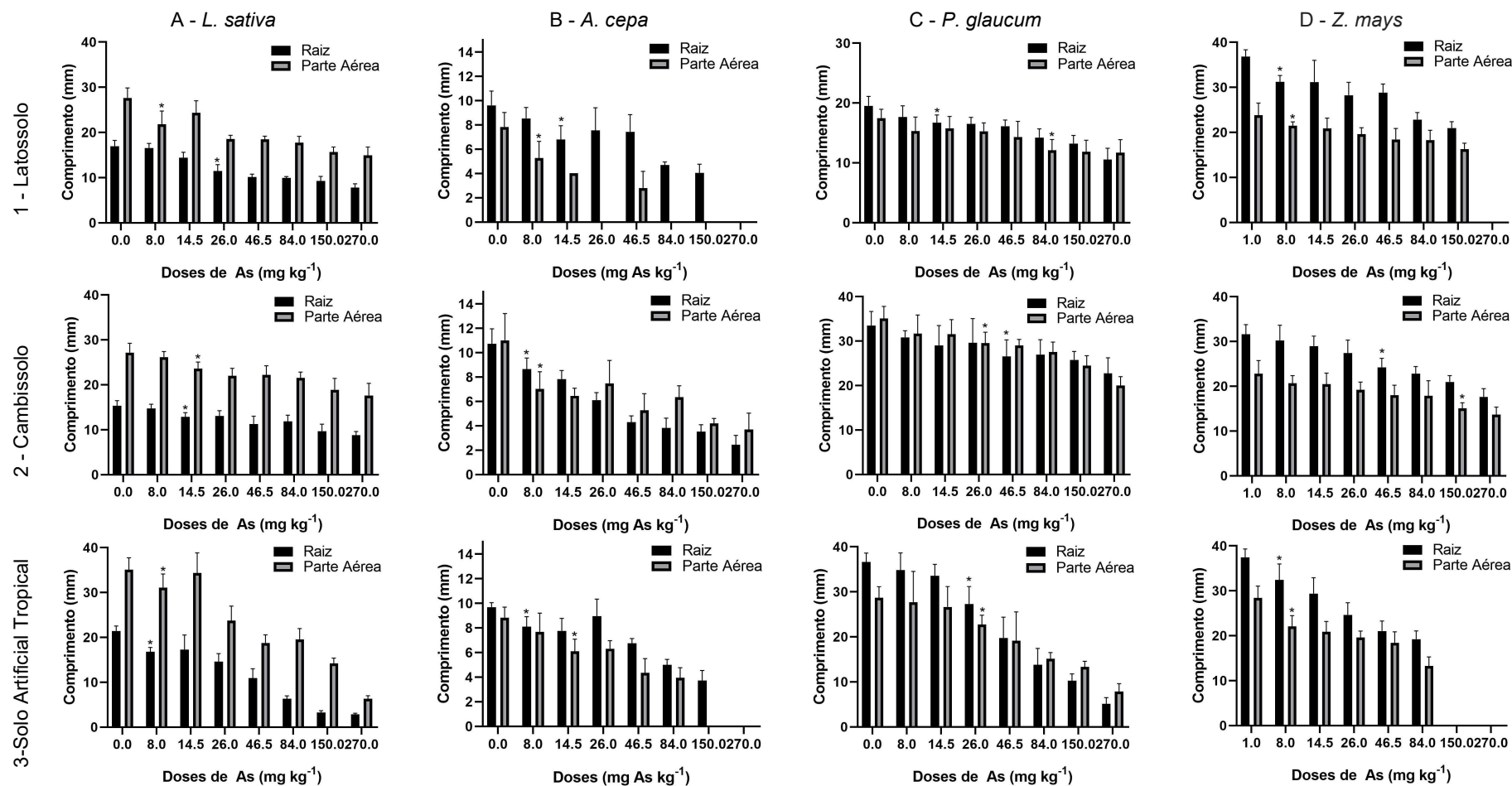


Figura 2: Comprimento da raiz e parte aérea de espécies vegetais (dispostas nas colunas: 1-*L. sativa*, 2-*A. cepa*, 3-*P. glaucum*; 4-*Z. mays*) cultivadas em Latossolo, Cambissolo e Solo Artificial Tropical (linhas 1, 2 e 3, respectivamente) contaminados com doses crescentes de As. Os barras representam as médias (n = 5) e as barras verticais representam o erro padrão. Os “*” indicam a primeira dose que apresentou diferença estatística significativa em relação ao tratamento controle (teste de Dunnet; p < 0,05).

3.3 Efeitos do As sobre a matéria fresca

Sobre o efeito das concentrações de As na matéria fresca (MF) das plântulas das espécies cultivadas em Latossolo, Cambissolo e ATS. O efeito do As na *L. sativa* causou redução na MF quando cultivadas em Latossolo e ATS, mas não houve diferença estatística na redução da MF nas plântulas cultivadas em Cambissolo, principalmente devido a disponibilidade do As no solo devido as características do mesmo. Em ATS e Latossolo, na primeira dose testada de As, 8 mg As kg⁻¹, já houve diferença em relação ao tratamento controle (Figura 3A).

Em relação a MF do *P. glaucum* e *Z. mays* (Figura 3C e 3D), as doses de As causaram efeito negativo significativo, sendo o ATS o solo que causou maior redução do peso fresco, seguido do Latossolo e Cambissolo para todas as espécies. No entanto, como no parâmetro de crescimento, estas espécies foram as que apresentaram a menor sensibilidade ao As quando comparadas com as demais.

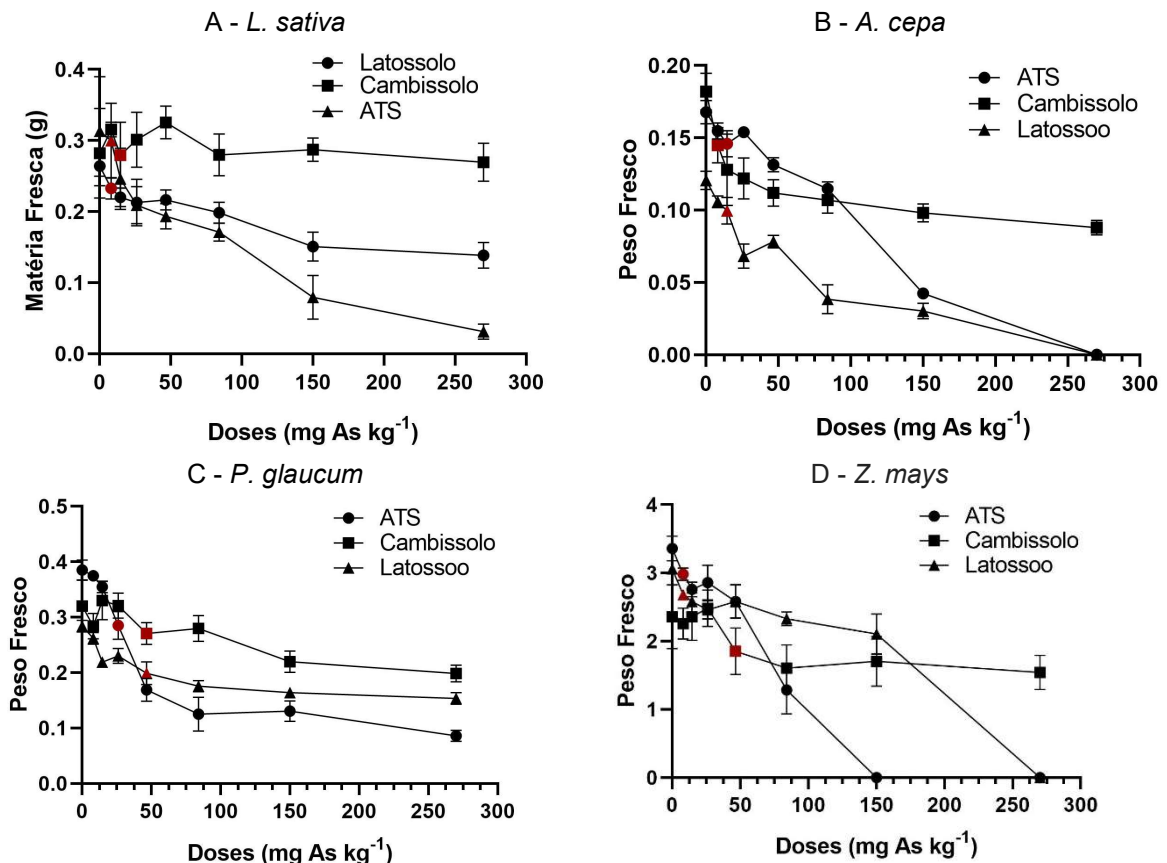


Figura 3: Matéria fresca de plântulas de espécies vegetais (A: *L. sativa*, B: *A. cepa*, C: *P. glaucum*; D: *Z. mays*) cultivadas em Latossolo, Cambissolo e Solo Artificial contaminados com doses crescentes de As. Os pontos representam as médias (n = 5) e as barras verticais representam o erro padrão. Os itens em vermelho indicam a primeira dose que apresentou diferença estatística significativa em relação ao tratamento controle (teste de Dunnet; p < 0,05).

Em uma avaliação de toxicidade o ideal é que os *endpoints* sejam confiáveis e de fácil acesso. Ao comparar os parâmetros de comprimento da raiz e parte aérea da plântula com o peso fresco, observa-se que os resultados possuem o mesmo comportamento de acordo com a espécie e o solo testado.

Em relação a *L. sativa*, o comportamento da redução do comprimento da raiz e parte aérea foi semelhante à redução do peso fresco. As menores doses que tiveram perda significativa em relação ao tratamento controle foram iguais entre os parâmetros: ATS e Latossolo 8 mg As kg⁻¹, e Cambissolo 14,5 mg As kg⁻¹.

Para *A. cepa*, algumas doses em ATS e Latossolo comprometeram o desenvolvimento da parte aérea e ao observar a curva da matéria fresca também é possível observar o decréscimo expressivo em tais doses. A primeira dose distinta significativa do tratamento controle foi 14,5 mg As kg⁻¹ para ATS e Latossolo e 8 mg As kg⁻¹ para Cambissolo para os parâmetros de comprimento (parte aérea e raiz) e matéria fresca.

Em relação ao *P. glaucum* e a *Z. mays*, tanto para comprimento quanto para matéria fresca, os resultados diferiram estatisticamente do controle, embora essas duas espécies tenham sido menos responsivas.

A correlação entre os dois parâmetros ($p < 0,05$) é positiva para cada espécie testada e em cada solo. Tal correlação pode trazer resultados práticos durante a realização deste tipo de teste, uma vez que a medição do comprimento da plântula é uma avaliação demorada e com muitas fontes de erro. Já a matéria fresca - que resultou em observações semelhantes - é mais acessível, sendo obtida em equipamento preciso. Tais resultados também já foram reportados por outros autores. Portanto, a matéria fresca é um parâmetro mais adequado para esse tipo de teste.

3.4 Propriedades do solo e o As

Os resultados de toxicidade de As contrastantes obtidos para uma mesma espécie só que em solos distintos podem ser explicados pelos diferentes atributos entre os solos. Por isso, a concentração disponível do As varia conforme o solo testado. O solo que apresentou maior toxicidade foi o ATS, pois contém os menores teores de óxido de ferro e argila (Tabela 1) e, por consequência, ocorre a maior fitodisponibilidade quando comparado aos solos naturais testados (DAI et al., 2016; WANG et al., 2015).

O pH do solo, outro fator que influencia diretamente a adsorção e a disponibilidade de As nas raízes das plantas, foi maior no ATS em comparação com o Latossolo e o Cambissolo. Alves et al. (2018) mostraram que aumentos no pH poderiam aumentar a fitodisponibilidade de As na solução do solo. Quando o pH é alto, há mais disponibilidade de OH^- , que compete com As nos locais de sorção, aumentando assim a disponibilidade de As (KADER et al., 2016). Portanto, a toxicidade mais pronunciada de As em ATS provavelmente também está ligada a essa característica distintiva (isto é, maior pH do solo).

3.5 Comparação entre a metodologia em microplaca e casa de vegetação

A metodologia para fitotestes agudos em microplacas aplicadas no presente estudo mostrou ser eficiente e apresentou resultados semelhantes quando reportados aos resultados obtidos em casa de vegetação utilizando solos tropicais e concentrações até $270 \text{ mg As kg}^{-1}$ que foram realizados por Martins et al. (2019).

Tal correlação com o experimento em placas de Petri com os realizados em casa de vegetação é importante por alguns aspectos: 1- tempo de duração do teste: os testes realizados em casa de vegetação possuem duração mínima de 21 dias (OECD, 2006), enquanto o aqui realizado teve duração de 4 dias. Tal fato possibilita alcançar resultados mais rápidos. 2 - Quantidade de solo contaminado para realização do teste: o realizado em casa de vegetação necessita contaminar um volume muito maior de solo para preencher todos os vasos necessários, enquanto o protocolo aqui realizado reduz em mais de dez vezes a quantidade contaminada.

4. Conclusões

A metodologia em microplacas para avaliar a toxicidade do As em plantas superiores é válida e, através dos parâmetros de germinação e crescimento e desenvolvimento inicial, possibilitou obter resultados semelhantes aos testes realizados em casa de vegetação. Aliado a isso, os testes são realizados de forma mais sustentável, em ambiente controlado e em menor tempo.

Os resultados obtidos diferiram em cada solo testado, sendo que o ATS (substrato artificial recomendado pela OCDE, 2006) apresentou maior potencial em disponibilizar o As a níveis que causem prejuízos, seguido do Latossolo e Cambissolo.

As propriedades químicas e físicas de cada solo são essenciais para determinar o nível de fitotoxicidade do As.

O parâmetro mais sensível e que possui mais confiabilidade e facilidade para se obtenção é a matéria fresca. Das espécies testadas, devido à sensibilidade, *L. sativa* e *A. cepa* são espécies recomendadas para tais testes, por outro lado, o *Z. mays* foi a espécie menos sensível.

5. Referências

- ALVARENGA, I. F. S. et al. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Sci. Total Environ**, 698, 134272, 2019.
- ALVES, P.R.L.; DA SILVA, E.B.; CARDOSO, E.J.B.N.; ALLEONI, L.R.F. Ecotoxicological impact of arsenic on earthworms and collembolans as affected by attributes of a highly weathered tropical soil. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 25, 13217–13225, 2018.
- BIANCHI, J.; CABRAL-DE-MELLO, D.C.; MARIN-MORALES, M.A. Toxicogenetic effects of low concentrations of the pesticides imidacloprid and sulfentrazone individually and in combination in in vitro tests with HepG2 cells and *Salmonella typhimurium*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 120, 174–183, 2015.
- CHUN-XI, L.I. et al. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. **J. Environ. Sci.** 19, 725–732, 2007.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.
- DAI, M.; XIA, L.; SONG, S.; PENG, C.; LOPEZ-VALDIVIESO, A. Adsorption of As(V) inside the pores of porous hematite in water. **J. Hazard. Mater.** 307, 312–317, 2016.
- FAROOQ, M. A. et al. Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. **Environ. Exp. Bot.** 132, 42–52, 2016.
- FINNEGAN, P.M.; CHEN, W. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. **Front. Physiol.** 3 jun, 1–18, 2012.
- FREITAS, A.S.; FONTES CUNHA, I.M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V.H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 124, 426–434, 2016.
- GARG, N.; SINGLA, P. Arsenic toxicity in crop plants: Physiological effects and tolerance mechanisms. **Environ. Chem. Lett.** 9, 303–321, 2011.
- HARTLEY-WHITAKER, J. et al. Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. **Plant Physiol.** 126, 299–306, 2001.
- ISLAM, S.; RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.R.; NAIDU, R. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environ. Int.** 96, 139–155, 2016.
- ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination

of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 28 p. 2013.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION **ISO 11274:1998** Soil quality -- Determination of the water-retention characteristic -- Laboratory methods. Int. Organ. Stand, 1998.

KADER, M.; LAMB, D.T.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Sorption parameters as a predictor of arsenic phytotoxicity in Australian soils. **Geoderma** 265, 103–110, 2016.

KAUR, S. et al. Arsenic (As) inhibits radicle emergence and elongation in phaseolus aureus by altering starch-metabolizing enzymes vis-à-vis disruption of oxidative metabolism. **Biol. Trace Elem. Res.** 146, 360–368, 2012.

LIU, X.; ZHANG, S.; SHAN, X.; ZHU, Y.G. Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. **Chemosphere** 61, 293–301, 2005.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, Mar. 1962.

MARTINS, G.C. et al. Assessing the Brazilian prevention value for soil arsenic: Effects on emergence and growth of plant species relevant to tropical agroecosystems. **Sci. Total Environ.** 694, 133663, 2019.

MEHARG, A.A.; HARTLEY-WHITAKER, J. Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. **New Phytol.** 154, 29–43, 2002.

MOREIRA, C.G. et al. Ecological risk assessment of cerium for tropical agroecosystems. **Chemosphere** 221, 124–131, 2019.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: NARWAL et al. (Org.). **Plant Bioassays**. Texas: Studium Press Houston, p. 3-20, 2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n°208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

PINHEIRO, G. S. et al. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena**. Aracaju, v. 10, n. 11, 2014.

ROSAS-CASTOR, J.M. et al. Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. **Sci. Total Environ.** 488–489, 176–187, 2014.

SHRI, M. et al. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 1102–1110, 2009.

SRIVASTAVA, S., AKKARAKARAN, J.J., SUPRASANNA, P., D'SOUZA, S.F., 2013. Response of adenine and pyridine metabolism during germination and early seedling

growth under arsenic stress in *Brassica juncea*. **Acta Physiol. Plant.** 35, 1081–1091, 2013.

WANG, X.; PENG, B.; TAN, C.; MA, L., Rathinasabapathi, B. Recent advances in arsenic bioavailability, transport, and speciation in rice. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 5742–5750, 2015.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **J. Hazard. Mater.** 176, 952–956, 2010.

YADAV, G.; SRIVASTAVA, P.K.; SINGH, V.P.; PRASAD, S.M. Light intensity alters the extent of arsenic toxicity in *Helianthus annuus* L. seedlings. **Biol. Trace Elem. Res.** 158, 410–421, 2014.

YOON, Y.; LEE, W.M.; AN, Y.J. Phytotoxicity of arsenic compounds on crop plant seedlings. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 11047–11056, 2015.

ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S.P.; MEHARG, A.A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annu. Rev. Plant Biol.** 61, 535–559, 2010.

ARTIGO 2 - Investigating arsenic toxicity in tropical soils: a cell cycle and DNA fragmentation approach

(Article published in Science of The Total Environment)

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134272>

ORIGINAL PAPER

Investigating arsenic toxicity in tropical soils: a cell cycle and DNA fragmentation approach

Authors: Ingrid Fernanda Santana Alvarenga¹, Fabio Eduardo dos Santos¹, Graciele Lurdes Silveira¹, Larissa Fonseca Andrade-Vieira^{1*}, Gabriel Caixeta Martins², Luiz Roberto Guimarães Guilherme³

Affiliations:

¹Departament of Biology, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

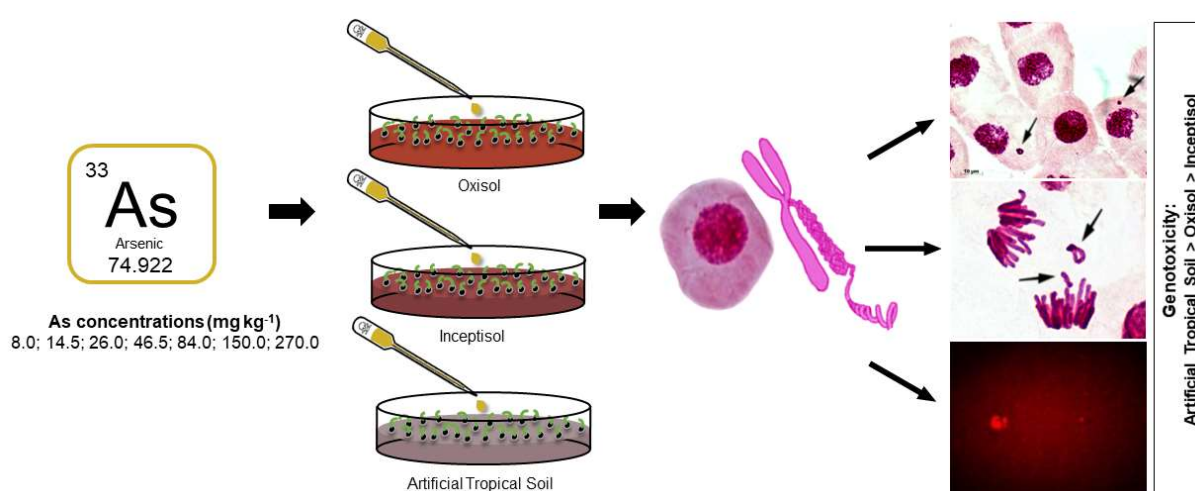
²Vale Institute of Technology, 66055-090, Belém, PA, Brazil.

³Departament of Soil Science, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

*Corresponding author:

Departament of Biology, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil.

E-mail: larissa.vieira@ufla.br; Tel: +55 35 3829-1356, Fax: +55 35 3829-1341.

Graphical Abstract:

Abstract

Arsenic (As) is a metalloid and a toxicant that is found naturally in many environmental compartments, soils included. Soils with high levels of As occur worldwide and might pose a threat not only to humans, but also to many ecosystems. Considering the scarcity of studies regarding cytogenotoxic effects of model plants in As-contaminated soil, mainly in tropical areas, this study proposes the use of *Allium cepa* root tip bioassays for a fast-track assessment of As toxicity in tropical soils. For this end, root tip cells of *A. cepa* were exposed to an Oxisol, an Inceptisol and a Tropical Artificial Soil (TAS) contaminated with increasing doses of As (0, 8, 14.5, 26, 46.5, 84, 150, and 270 mg kg⁻¹). The effects of As on cell cycle, micronucleus formation, and DNA fragmentation were evaluated. In general, root tip cells exposure to As increases the frequency of chromosome abnormalities and micronucleus, in turn, decreasing the frequency of mitotic index. As-treated cells also presented an increase in the percentage of DNA damage observed in comet assay. Overall, the effects of As in TAS were more pronounced, than in the Oxisol, being the Inceptisol the less toxic. A discussion of each As effect in cells and the link with the soil type is presented and reveals that clastogenic effects of As in *A. cepa* cells seemed to be the mode of action of this soil contaminant.

Keywords: *Allium cepa*; comet assay; clastogenic action; condensed nuclei; micronuclei; genotoxicity.

Highlights

- Exposure to As increased the frequency of DNA alteration and fragmentation in *A. cepa*.
- Clastogenic effects caused by As were evident in *Allium cepa* root tip cells.
- The comet assay showed that arsenic generates cell damage.

1. Introduction

Arsenic is undoubtedly the metalloid of greatest concern in environmental toxicology and its occurrence encompasses natural systems and anthropogenic discharges (Selvaraj et al., 2013). Increases in As concentrations in the environment are related to both natural sources (volcanic emissions, rock weathering, and discharge from hot springs) and anthropogenic activities (smelting, use of the arsenicals as pesticides and herbicides, mining processes and wood preservatives) (Farooq et al., 2016). Arsenic is the 20th most ubiquitous element in the environment (Drewniak and Sklodowska, 2013), and has been ranked first in the list of priority substances by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (USA) since 1997 (ATSDR, 2017).

In nature As can exist as inorganic or organic species. Among inorganic forms, arsenate (As^{+5}) predominates in aerobic environments, while arsenite (As^{+3}) is the predominant form in anaerobic conditions (Finnegan and Chen, 2012). Normally in cells, the oxidized state, As^{+5} , is transformed in reduced As^{+3} (Susan et al., 2019). Once transformed in the cell, As acts in cell components resulting in increased production of reactive oxygen species (ROS) (Farnese et al., 2014). In addition, As have been classified as a class-1 carcinogen by the International Agency of Research on Cancer (IARC, 2019). Therefore, As is considered, among all toxicants, the most dangerous to human health, even in small quantities (Susan et al., 2019).

Although much has been studied concerning the exposure of humans in Latin America to arsenic through ingestion of water (surface or groundwater) and contaminated food (Ciminelli et al., 2017), little attention has been given to contaminated soils. It is important to manage soil arsenic concentrations and the

effects in plants because plants may absorb and accumulate arsenic in edible parts, which represents a route for arsenic exposure (Islam et al., 2016).

Roots are usually the first plant tissue to be exposed to toxic elements in soils. Root extension and proliferation is inhibited as a consequence of As exposure. This metalloid also inhibits the growth of the whole plant, altering metabolic processes, as well as compromising the plant's reproductive capacity (Farnese et al., 2014; Finnegan and Chen, 2012).

Studies related to potential genotoxic effects of arsenic might be of interest for a better understanding of the effects of this metalloid in living beings and may also help setting safe limits for As concentrations in soils. In this sense, plant bioassays are of special importance, as they deal with organisms that are directly affected by soil pollutants in contaminated areas. Bioassays using plant as model systems are well established and commonly employed to evaluate mutagenic activity of a given pollutant (White and Claxton, 2004).

Plant bioassays were validated in early 1980's in international collaborative studies and demonstrated to be efficient, sensitive, of low cost, and simpler than most standard methods and bioassays conducted with other models (Grant, 1999; Ma et al., 1995). The results attained by using plant bioassays also demonstrate good correlations with animals systems, including humans (Grant, 1999; Reis et al., 2017). In addition, White and Claxton (2004) showed that plant assays revealed excellent response ranges and significant differences between heavily contaminated, industrial, rural/agricultural, and reference sites.

Allium cepa L. is one of the widely accepted cytogenetic test systems in toxicological studies (Bandyopadhyay, 2016) and as an indicator of arsenic exposure (Yi et al., 2007). However, until the present, the experiments conducted to assess the

effects of As in *Allium* used arsenic salts directly diluted in solution, i.e., As is promptly available to the roots (Bandyopadhyay, 2016; Wu et al., 2010; Yi et al., 2007). Yet, White and Claxton (2004) demonstrates that the direct contact of contaminated soil with the root is more efficient and reliable for toxicological assessments using plant species.

Although arsenic is one of the most studied chemical elements, to the best of our acknowledgment, there are no studies dedicated to assessing cytogenotoxic effect of As in *Allium cepa*, especially in contaminated tropical soils. Besides, this is a matter of importance for Latin America as there are several reports about high levels of arsenic in soil for this area.

This study aimed to investigate the effects of As exposure in *Allium cepa* roots tips cells by performing cell cycle and DNA fragmentation analyses, exposing the roots to three different soils: an Oxisol, an Inceptisol and a Tropical Artificial Soil (TAS). With that, we hope to develop a fast protocol for assessing ecotoxicological risks of As in tropical environments, which might help setting regulatory levels for this metalloid in soils of Brazil and conceivable other soils in Latin America.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Fresh (< 6 months) *Allium cepa* L. (onion) seeds (Baia Periforme variety, Isla ® Seeds) were purchased in local agricultural stores in the city of Lavras, State of Minas Gerais, Brazil. The same seed lot was used for all conditions tested to avoid a potential “lot effect” so as to evaluate only the effects of As in different soils in *Allium cepa*. The packages containing the seeds were kept at 4°C under dry conditions until use.

2.2 Soil preparation

The following tropical soils were used for the laboratory test: i) Red-yellow Latosol (Oxisol) collected in Itumirim (Minas Gerais) (21°17'08" E, 44°47'43" N), Brazil; ii) Haplic Cambisol (Inceptisol) collected in Lavras, State of Minas Gerais, Brazil (Latitude E-21°13'46", Longitude N-44°59'10"); and iii) Tropical Artificial Soil (TAS) produced by mixing kaolinite clay (20%), fine sand (70%), and coconut fiber (10%). The Inceptisol and the Oxisol were selected based on their representativeness in the Brazilian territory, and because they are commonly found under native vegetation or anthropic activity. The OECD-208 recommends the use of an artificial substrate, which was used for comparison with the natural soils from Brazil.

The natural soils (Oxisol and Inceptisol) were collected at the 0-20-cm depth. Soils' attributes are presented in Table 1 and were determined according to standard procedures (EMBRAPA, 1997). The maximum water retention capacity was established according to ISO 11274 (ISO, 1998). Soil samples were previously air dried and sieved (<2 mm). Before the beginning of the experiment, the soil was fertilized with nutrient rates proportional to the experimental period, according to the recommendation of OECD 208, by applying N = 100 mg; P = 100 mg; K = 50 mg; Ca = 37 mg; Mg = 15 mg; S = 25 mg; B = 0.25 mg; Cu = 0.75 mg; Zn = 2.5 mg; Mn = 5 mg; and Mo = 0.1 mg per kg⁻¹ dry soil (Malavolta, 1980).

In each soil samples, arsenic was applied at concentrations that followed a 1.8 multiplication factor according to OECD-208 (0, 8, 14.5, 26, 46.5, 84, 150, and 270 mg kg⁻¹) and determined in order to cover the soil guideline values for As adopted by Brazil (Benchmark Value = 8 mg kg⁻¹ of As; Prevention Value = 15 mg kg⁻¹ of As; Investigation Value = 35-150 15 mg kg⁻¹ of As) (CONAMA, 2009). Doses higher than 270 mg kg⁻¹ were not used since they already present potential risks to humans (CONAMA, 2009).

Arsenic doses were applied by preparing a stock solution of sodium arsenate dibasic heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, purity 98%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in water. The As solution was directly added to the soil in different proportions, along with different amounts of water in order to obtain 60% of water holding capacity (WHC) of each experimental soil. These soils were used in seedling emergence and seedling growth test according to the OECD protocol no. 208 (OECD, 2006).

2.3 Exposition of the roots

The experiment was planned in a complete random design with five replicates (petri dish) per treatment. Each petri dish was filled with 60 g of Oxisol, 60 g of Inceptisol or 50 g of TAS with 60% of WHC and then 25 seeds were distributed over the soil surface. A set of five Petri dishes (a replicate) containing paper filter moistened with distilled water represented an internal control. The soil without arsenic was used as a negative control to compare the results obtained with arsenic-contaminated soils. The petri dishes were kept in the dark on an Oxygen Demand Incubator under $21 \pm 2^\circ\text{C}$ for 4d.

2.4 Cell cycle analysis

The root tips of onion plants were collected after exposure and fixed on ethanol:acetic acid solution (3:1 v/v) for at least 24 h. Fixed roots were kept under -4°C until use. The slides were prepared as reported by Silveira et al. (2017). The cell cycle parameters were evaluated in meristematic and F1 cells as described in Palmieri et al. (2016). As per these authors' observations, for meristematic cells we evaluated the frequency of each mitotic phase and the frequency of the alterations in cell cycle during chromosome segregation or interphases. For F1 cells we have recorded only the

frequency of micronuclei and condensed nuclei (CN). Next, the mitotic index (MI), the percentage of chromosome aberration, micronuclei (MN), bud and condensed nuclei were calculated, as convenient, following Palmieri et al. (2014). Moreover, the total chromosome abnormalities in mitosis was given as the reason between the total number of cells with abnormalities observed per the number of cells in mitosis.

A sum of 1,000 cells were recorded in each slide for each evaluated root tip region, totaling 5,000 meristematic or F1 cells analyzed per concentration per tested soil. Slide evaluations were performed in a light microscope Olympus CX 41 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) at a magnification of 400×. Representative images (magnification of 1,000×) of each type of alteration observed were acquired with a micro camera (AxioCam ERc 5s) coupled to the microscope through the software AxioVision.

2.5 Comet assay

For the comet assay, the root tips were collected just after the exposition (4 d) and immediately submitted to the protocol steps described by Dos Santos et al. (2018). The comet assay was performed just for the lowest doses (8 to 26 mg kg⁻¹) of As applied in the chromosome aberration assay. Afterward, three prepared slides, stained with propidium iodide solution (2 µg mL⁻¹), per treatment, were evaluated at a magnification of 400× under epifluorescence microscope (Olympus BX 60) at wavelength of 530-550 nm. The observed nucleoids were classified in visual scores as defined by Reis et al. (2017) and the frequency of each score, as well as the frequency of total damaged cell and the arbitrary units were calculated.

2.5 Statistical analysis

All the parameters obtained in the assays were evaluated for their normality distribution and ANOVA, and means were compared by the Tukey test at the 5% significance level. The statistical analyses were performed in the R program (R Core Development Team, 2016).

3 Results

3.1 Cell cycle alterations in meristematic cells

Mitotic index (MI) values for the internal control (distilled water) did not differ statistically for the negative controls, which comprise the experimental soils (without arsenic application) with 60% of WHC.

Root tips growth in Oxisol presents the MI ranging from 2.55% (first As doses applied – 8 mg kg⁻¹ of As) to 7.30% (higher doses of As applied - 270 mg kg⁻¹ of As), while in negative control the frequency of cells in mitotic division were 2.65%. Statistical differences from the control were noticed for the doses from 14.5 mg kg⁻¹ of As, which increases the frequency of cells in mitosis (Table 2).

For the Inceptisol the MI ranged from 6.8% to 8.3% within the applied As doses (Table 2). On the other hand, for TAS, As concentrations greater than 84 mg kg⁻¹ significantly reduced the MI, reaching an inhibition of 90% for the greatest dose applied (270 mg kg⁻¹ of As) (Table 2).

The effects of As in MI, considering each soil separately, corroborates with the frequency of each mitotic phase observed individually. Statistical differences in increase of all mitotic phases (prophase, metaphase, anaphases, and telophases) were observed in root-tip cells treated with Oxisol contaminated with > 14.5 mg kg⁻¹ of As (Table 2). For the Inceptisol, there was no difference in the frequency of cell cycle phases in As-contaminated soils compared with the control. Whilst for TAS a

significantly augment in prophase was noticed in treatments $> 14.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As (Table 2) besides a decrease in anaphases and telophases was remarked in specific As concentrations (Table 2).

Regarding the alterations observed in the mitotic cell cycle, the frequency of total chromosome alterations (TCA) recorded between prophase and telophase did not differ ($P < 0.05$) from the control (without arsenic application) in all As doses of the Inceptisol. Still, they increased significantly for As treatments in Oxisol $> 46.5 \text{ mg kg}^{-1}$ and in TAS in all doses, except the most concentrated one (Table 2). If the frequency of alteration is considered as a percentage of the ongoing division cells (prophase to telophase) (TCA/number of cells in division), a significant dose-dependent increase was recorded for treatments with $> 46.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As in TAS (Table 2).

Amongst the type of alterations observed, lost chromosome and anaphase-telophase bridges were recorded in low frequencies, which were not significant. In contrast, the presence of fragments (Figure 1A), stickiness metaphases (Figure 1B) and non-oriented chromosomes were variable between the doses of As applied in the three soils, but increased significantly in some treatments. The Oxisol was the only soil where the frequency of observed alterations were not significant. For the Inceptisol, non-oriented chromosome and lost chromosomes were not observed, but significant effects after increasing As doses were observed for chromosome fragments (26 mg kg^{-1} of As) and stickiness (46.5 and 270 mg kg^{-1} of As). Lastly, As doses in the TAS induced significant augment in fragments (26 to 84.0 mg kg^{-1} of As).

3.2 Interphases alteration - condensed nucleus and micronucleus

Interphase alterations were recorded in both meristematic and F1 cells regions. The frequency of condensed nuclei (Figure 1D) in the meristematic region was less

than 10% (Table 3). The soil treatments differ from the control (soil without As): in the Oxisol doses $\geq 14.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As significantly increased the frequency of CN (Table 3). In the Inceptisol or TAS contaminated with increasing doses of As did not differ from those containing just soil with 60% of WHC (negative control). On the other hand, in F1 cells the frequency of CN was greater than 15% in some As doses (see Table 3). In such case the increases in CN frequency were significant ($P < 0.05$). For the Oxisol there was no statistical difference from As treatments and the control, while in Inceptisol, differences were recorded for 8 to 26 mg kg^{-1} of As, whilst for TAS the difference was observed just for soil samples containing 14.5 and 26 mg kg^{-1} of As (Table 3).

In meristematic cells the frequency of MN (Figure 1C) in the Oxisol doses $\geq 8.0 \text{ mg kg}^{-1}$ of As significantly increased, for Inceptisol this augmentation in MN was recorded in doses $\geq 14.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As, whereas in TAS the frequency of MN did not differ from the control (without arsenic application) (Table 3). Still for meristematic region, cells treated with As presented in Oxisol and TAS presented the formation of buds, which were not observed in the Inceptisol (Table 3). Meanwhile, in F1 cells buds in nuclei were not observed. In such region, a significant increase in MN frequency was observed just in TAS for 8 mg kg^{-1} of As in comparison with the control (without arsenic application). Further, a significant decreasing in MN was observed in treatments with $\geq 8.0 \text{ mg kg}^{-1}$ of As for Oxisol, $\geq 46.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As in Inceptisol and $\geq 14.5 \text{ mg kg}^{-1}$ of As in TAS (Table 3).

3.3 Comet assay

The comet assay was performed just for the lowest doses (8 to 26 mg kg^{-1}) of As applied in the chromosome aberration assay. For the Oxisol, the control (without

arsenic application) presented 96.7% of the nucleoids recorded classified as class 0, without damage (Figure 2). In the treatment with 8 mg kg⁻¹ of As in the Oxisol, 83.7% of the nucleoids recorded were classified as class 0 and the remaining 16.3% were distributed into classes 1 and 2 (Figure 2a). Nucleoids scored as 3 and 4, which are associated to high damage, were recorded only in the highest doses tested (14.5 and 26 mg kg⁻¹) (Figure 2a).

In the Inceptisol, the control presented 87.3% of the nucleoids recorded classified as class 0 (without damage), whereas the other nucleoids (12.7%) were classified in classes 0 to 3 (Figure 3a). In the treatment with 8 mg kg⁻¹ of As in the Inceptisol, 80.7% of the nucleoids recorded were classified as class 0 and the remaining 19.3% were distributed into classes 1 to 4 (Figure 3a). This treatment (8 mg kg⁻¹ of As) presented no significant difference in comparison with the control (without arsenic application), regarding the percentage of damage (Figure 3b). The maximum AU (197 AU) was observed for the dose 14.5 mg kg⁻¹ of As (Figure 3c). Still, this treatment presented no significant difference in relation to the dose with 26 mg kg⁻¹ of As. Concerning the percentage of damaged cells, the maximum value observed was for 26 mg kg⁻¹ in the Inceptisol, representing 63.7% of nucleoids evaluated, yet with no significant difference from the dose 14.5 mg kg⁻¹ of As (Figure 3b). In such case (26 mg kg⁻¹ of As), 33% of the nucleoids recorded were scored as class 3, while for doses containing 14.5 mg kg⁻¹ of As 19.3% of the nucleoids were scored as class 3 and 29.7% as class 4 (Figure 3a).

Cells exposed to TAS soil without arsenic application (control) presented just nucleoids scored as 0, without damage (Figure 4a). Nucleoids scored as 1 and 2 were recorded in treatments with 8 to 26 mg kg⁻¹ of As, while nucleoids 3 and 4, which are associated to high damage, were recorded only in the highest doses tested (14.5 and

26 mg kg⁻¹) (Figure 4a). Thus, the comet assay revealed that As increases significantly the percentage of damaged cells, which represented 90% of the total nucleoids observed in the higher dose tested for TAS (Figure 4b), reaching more than 300 AU in such case (Figure 4c).

Comparing the damage recorded in the treatments for the three types of soils, the control of the Inceptisol and Oxisol induced more damage in cells than the control of TAS, while the higher treatment in TAS was more genotoxic than the same dose in the Oxisol and Inceptisol.

4 Discussion

4.1 Arsenic effects in cell cycle

Several studies acknowledged that arsenic in its ionic forms is a strong disruptor of cell signaling pathways, inducing the generation of ROS. These oxygenated species formed in cells due As toxicity interact with macromolecules contributing to cell impairment oxidative stress, DNA damage, metabolic disturbances and alterations in regulatory mechanisms of cell proliferation, and death (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009). Cell proliferation can be measured by simple cytogenetic methods, where the frequency of cells in each phase of mitosis is accounted. This evaluation is the basis of the “*Allium* assay”, which was applied in the present study, and the MI assessed reveals the index of cell proliferation. Moreover, there is few information regarding citogenotoxic effects of model plants in As-contaminated soils, mainly in tropical areas. So, our findings are interesting for creating a database to support future research by countries located in tropical regions in order to better understand the mechanisms of As contamination.

Arsenic addition in TAS reduced the MI and, consequently cell proliferation, while the addition of As in the Oxisol and Inceptisol increased the MI. This difference on the effects of As in MI in the three soils is due to the unique properties of each one, which reflects in distinctive As availability to the cell, as discussed afterwards

According to Pepper et al. (1988) As^{+5} inhibited root growth and meristematic cell proliferation in onion bulbs. Studying the frequency of each stage of cell cycle (G_1 , S, G_2 -M), these authors proposed that the effects of As^{+5} were related to an inhibition in the synthesis of phosphoproteins, which is necessary to the cell cycle progress. As a consequence, an increase in G_1 and G_2 cells was observed in detriment of a reduction of cells in mitosis. This augmentation in interphasic cells was linked to a blockage in G_1 and G_2 stages in lower concentrations of As^{+5} and for a short-exposure period. In a continuous treatment (up to 72h) this blockage was not observed, thus, pointing out that the *Allium* root system possesses a detoxifying mechanism against As^{+5} , mainly in meristematic zone, as cell elongation and differentiation regions showed more sensitivity to As^{+5} exposure.

To the best of our knowledge, this report from the 1980's is the only work where the effects of As^{+5} were studied in *Allium* cells and some observations from this study corroborates to ours, since we expect As^{+5} to be the main anionic form of arsenic in the Oxisol, Inceptisol and TAS used for our *Allium* root tips bioassay. The roots tips were exposed to As for 96 h in our study, characterizing a long-exposure treatment as reported elsewhere (Andrade-Vieira et al., 2017), while in the previously observations of Pepper et al. (1988) the maximum exposure time applied was 72 h. In our study, no disturbance in the frequency of mitotic phases was observed for the Inceptisol treatments despite the slight augmentation in the cells in division (MI) was noticed. In the other hand, no citogenotoxic effects was note in those cells, probably because of

the mechanisms of DNA repair and detoxification pathways in the cells explained by Pepper et al. (1988). In addition, for F1 cells in differentiation region, the frequency of cells undergone to death increased, which is in accordance, once again, with the sensitivity described for As⁺⁵ exposure in Pepper et al. (1988).

Other authors studied the effects of As⁺³ in root tip cells of *Allium cepa* and other plant models. Yi et al. (2007) reported that in *A. cepa* root tips exposed for 12 h to As doses ranging from 0 a 100 mg L⁻¹ the number of MI and prophase cells declined as a consequence of a slow progression of the S phase. In addition, Wu et al. (2010) observed that increasing concentrations of As⁺³ decreased MI after exposure of *Vicia faba* and *A. cepa* roots to 1 to 30 mg L⁻¹ As⁺³ for 12 h. An 85% and 70% reduction of MI versus control was reported in *Vicia* and *Allium* roots, respectively, after exposure to the maximum dose (30 mg L⁻¹ of As⁺³). These observations corroborate the previously affirmation of Pepper et al. (1988) for cells exposed to As⁺⁵ in short-exposure time.

In the case of Yi et al. (2007), the reductions observed were from 50% for 10 mg L⁻¹ of As⁺³ to more than 90% in the more concentrated solution (100 mg L⁻¹ of As⁺³). These observations corroborate ours for root tips exposed to As in artificial-contaminated soils, even at long As-exposure periods, yet in such case, the cell repair/detoxification mechanism did not act. This same remark was noticed in root tips of *V. faba* and *Zea mays* treated with 134 a 668 µM of As⁺⁵ and As⁺³ for 192 h (eight days, i.e., a longer exposure period too, as ours) (Duquesnoy et al., 2010). These authors observed reductions of 40% and 80% in MI for *V. faba* root tip cells treated with As⁺³ and As⁺⁵, respectively, and decreases of 20% and 50% for *Z. mays* cells exposed to As⁺³ and As⁺⁵, respectively. Some authors point that this slower progression of cell cycle is resulted from the energy shortage as As competes with P (phosphorus)

for the chemical bond in ADP (adenosine diphosphate) from the citric acid cycle, impairing the formation of ATP (adenosine triphosphate) (Yi et al., 2007). The presence of As^{+5} in arsenic-treated cells has previously been associated with retarded DNA replication in the S phase and delays in the beginning of mitosis, which consequently decrease the MI (Abedin et al., 2002; Ullrich-Eberius et al., 1989).

In comparison to our observations, these investigations presented decreases in MI more strong than the depletion observed in our study. In fact, all of these previous works treated the root tip cells of the model-system with an aqueous solution containing As, thus allowing that the total amount of As in solution coming from the dissolved salts would be available for root uptake. In turn, in the present study, As doses were mixed with the soil and the root enters in contact with arsenic contaminated-soils in different conditions that diminished As availability to roots. Indeed, our study is the first that considered the effect of As in cells of a model plant with the direct exposure to soil system.

The investigation of clastogenic and aneugenic potentials of As was also performed. Likely for MI, the response of cells to As^{+5} was directly related to soil characteristics, which, in turn, affect the availability of As in solution for root uptake. For Inceptisol conditions, no relations were established with As concentrations and the induction of chromosome aberrations. Yet, a sharp augmentation in cell cycle alterations was reported for TAS and Oxisol.

The observed alterations comprise chromosome fragments, sickness, anaphase-telophase bridges, and lost and laggards chromosomes. The major frequency of such alterations was associated to clastogenic effects. For instance, the clastogenic mode of action or mechanism of a given compound is related to induction of DNA strand breaks (Leme and Marin-Morales, 2008). The observation of the

clastogenic mode of action for As exposure corroborates with reports from previous studies (Duquesnoy et al., 2010; Wu et al., 2010). Lesions in DNA induced by a pollutant - As in this case - leads to the observation of chromosome alterations as fragments and bridges. As-treated cells present increased concentration of ROS (Farooq et al., 2016), which attack purine and pyrimidine bases and the deoxyribose unit in DNA, causing DNA breakage (Yi et al., 2007). These DNA-strands-breaks are consequently observed as chromosome fragments in mitosis. DNA break-sites, in turn, induce chromosome instability, being the basis for chromosome fusions. Therefore, after chromosome fusion, it is common the occurrence of a double-centromere-chromosome. In such case, each centromere of the chromosome is linked and pulled for the spindle of opposite cells sides and, as a consequence, bridges are visualized in anaphase and telophase (Campos et al., 2008; Silveira et al., 2017).

In addition to clastogenic effects, aneugenic alterations are also associated with As exposure, as previously reported (Duquesnoy et al., 2010). Aneugenic changes occur as a consequence of failures in chromosome attachment to the mitotic spindle (Silveira et al., 2017) and was also noticed in this present study as chromosome laggard and lost. Spindle formation depends on microtubule assembly and arsenic could bind to microtubules precluding the attachment of it to chromosomes (Duquesnoy et al., 2010). The chromosome fails to attach to mitotic spindle also as a consequence of a non-phosphorylation in serine 10 of histone H3 in the pericentromere region, a signal required to ensure mechanical stability to the centromere in the chromosome movement (Freitas et al., 2016). As arsenic is known to affect proteins and enzymes synthesis, it might be another hypothesis for As effects related to the aneugenic mode of action.

Apart from fragments, bridges, laggards, and lost chromosome, chromosome stickiness was also noticed. Stickiness is an intriguing chromosome alteration that could be considered clastogenic or even aneugenic, depending on the point of view. Some authors consider that stickiness rises after several breaks in the DNA, which leads to chromosome instability and adherent appearance. As a consequence, adjacent chromosomes become connected, forming a homogeneous mass (Silveira et al., 2017). Other authors affirmed that stickiness is consequence of an approximation of chromosomes in nucleus with high quantity of DNA, as in the case of polyploidy. In such situation, the chromosomes have wispy space in nucleus and are very close to each other, making feasible the formation of bridge-links and chromatin agglomeration (Fernandes et al., 2009). Irrespectively of the mechanism of origin, chromosome stickiness is considered a severe alteration that is unsuccessful to repair, leading to cell death (Fernandes et al., 2009; Silveira et al., 2017).

Kesari et al. (2012) also observed significant increases in the frequencies of chromosome abnormalities in bone marrow cells of mice exposure to 0.30 to 30 mg L⁻¹ of As⁺³ day⁻¹ for 15 d. The authors reported that As exhibited a preferential clastogenic effect over its aneugenic effect, corroborating with our results. They also affirmed that aneuploidogenic effects were induced by higher doses of arsenic, which again corroborates our findings as the aneugenic alterations (laggards and lost) were observed just for the Oxisol and TAS, where As availability is expected to be greater.

Another alteration commonly observed in arsenic-treated cells was the condensed nucleus. The condensed nucleus is an interphase alteration characterized as picnotic nucleus with a hard coloration, well-defined circle form and small than the conventional nucleus. It is also a cytological marker for the cell death process, activated by the cells as consequences of stress (Andrade-Vieira et al., 2011). The

mechanism of cell death could be activated as a prevention to avoid the heritage of cell damages to next generations (De Vizcaya-Ruiz et al., 2009). In the present study, the frequency of condensed nucleus did not exceed 10% of the cells recorded in meristematic whereas was recorded in significant amounts (more than 15%) in F1 zone. It demonstrates that all of the aneugenic and clastogenic alterations previously reported for As in some doses lead to cell death, and, in others, somehow, are repaired or compensated for cells. The occurrence of pycnosis in *Allium* root tip cells exposed to high concentrations of As was previously reported by Yi et al. (2007).

4.2 Arsenic induced micronucleus and DNA fragmentation

DNA fragmentation is usually repaired by cell-repair mechanisms, but it has been reported that As binds to sulfhydryl groups of important enzymes involved in DNA repair and expression. Moreover, As can replace phosphorus in DNA, also interfering in the link between the mitosis spindle and the chromosome (Wu et al., 2010). Altogether, the consequence of these miss-repair and effects of As is the formation of micronucleus. Fragments, laggards, and lost chromosomes observed in the present work failed to incorporate into main nucleus or either of the daughter nuclei during telophases in the end of mitosis (Campos et al., 2008).

According to Yi et al. (2007) the MN induction by As exposure indicates that *Allium* root cells can enter the M phase with DNA damage, proceed through a cell cycle and then form MN, which demonstrates the dysfunction of mitotic checkpoint and cell cycle regulation after exposure to As.

In the present work, the MN frequency was recorded in both meristematic and F1 cells. The presence of bud, which is closely associated to MN formation, according to Fernandes et al. (2007), was also noticed. In the meristematic zone, the maximum

frequency of micronucleus was <2 . In contrast, the daughter F1 cells reach >20 MN. This observation is in accordance with those of Palmieri et al. (2016), who stated that F1 cells are more appropriate to be used when the aim of the study is to evaluate the frequency of MN.

In addition, Yi et al. (2007) concluded that the *Allium* root MN assay is a simple, efficient, and reproducible method to study As toxicity. By observing the effects of arsenic trioxide (0.5 to 20 mg L⁻¹ of As) and sodium arsenite (1 to 100 mg L⁻¹ of As) upon the occurrence of MN in meristematic cells and daughter cells of *Allium* roots, these authors revealed that MN increased significantly after a short-term (1 h) exposure to 10 mg L⁻¹ of As (as sodium arsenite), demonstrating an effective rapid response specific for F1 cells, which corroborates once again with our findings as well as the observations of Palmieri et al. (2016).

Wu et al. (2010) observed that As⁺³ induced MN formation in a concentration-dependent manner in *V. faba* and *A. cepa* root tip cells. Although the frequency of MN decreased in *V. faba* roots after 12 h of exposure to 30 mg L⁻¹ of As, it increased in *A. cepa* cells. It is important to note that in our study concentrations > 26 mg kg⁻¹ of As also diminished the frequency of MN, especially in the tropical artificial soil (TAS), where the availability of As is higher.

High concentrations of As are supposed to cause higher toxicity, declining mitotic activity (Wu et al., 2010; Yi et al., 2007) and, as a consequence, the MN frequency, as this is the consequence of alterations in the cell cycle. So far, in the absence of mitotic activity, no MN is supposed to form. All of these observations corroborate with the results observed for TAS, i.e., the MI was smaller and the MN frequency decreased for higher As concentrations in the above-mentioned soil, where arsenic is more available for root uptake.

In the course of this discussion, we already mentioned that As links to ADP forming arsenate-ATP, impairing cell cycle and inducing the formation of ROS, thus culminating in the formation of DNA strand-breaks. Therefore, we could expect DNA fragmentation by the comet assay as a consequence of As exposure. The comet assay has previously been used as method to study As toxicity in several organisms. In reality, Basu et al. (2005) observed DNA damage in human lymphocytes exposed to As-contaminated water, whereas Yáñez et al. (2003) studied the frequency of DNA damage in children living in a mining site contaminated with arsenic. The results of the comet assay showed that the tail length and the tail moment in As-affected populations were higher than those observed for children in control group. Furthermore, As induced DNA damage, as observed by the comet assay, in earthworms exposed to contaminated soils, as well as in mice (Banu et al., 2001), fishes (Ahmed et al., 2011; Datta et al., 2007) and *A. cepa* exposed to As solutions (Bandyopadhyay, 2016).

4.3 Linking the soil properties to arsenic effects in cell and DNA

The anionic form of arsenic (i.e., As^{+5}) used in the present study can be directly uptaken from the soil solution by the roots, entering into cells and moving from one cell to another through membrane-Pi transporters (Finnegan and Chen, 2012). However, the properties of the soils (e.g., pH, organic matter, competing ions, redox potential, texture, CEC, and mineral constituents) make the assess of As toxicity on contaminated soils a not-easy task (Farooq et al., 2016; White and Claxton, 2004). Moreover, it has been reported that As phytotoxicity depends on the chemical species supplied to the plant and also, to the plant species used in the assays.

Several experiments have been done to understand As-bioavailability for plants, using either aquatic solutions (i.e., hydroponics conditions) or soil exposure (i.e., plants

growing directly in soil, washed sand, or artificial matrices) (Finnegan and Chen, 2012). Nevertheless, predicting arsenic toxicity in contaminated soils by mixing As in different types of soils and exposing plant roots directly to these samples is still a less explored technique. This approach was applied in the present work, where the roots emerged from *A. cepa* seeds grew directly in contact with the contaminated soils. White and Claxton (2004) suggested that the *Allium* root tips test is well suited to the detection of clastogens in soils and affirmed that direct-contact assessment is far more effective for soil genotoxicity assessment.

Soil pH, other factor that directly influences the adsorption and the availability of As for plant roots, was higher in TAS in comparison with the Oxisol and Inceptisol. Alves et al. (2018) showed that increases in pH could enhance the phytoavailability of As in soil solution. When the pH is high, there is more availability of OH⁻ which competes with As for sorption sites, thus increasing As availability (Kader et al., 2016). So, the more pronounced toxicity of As in TAS is likely also linked to such distinctive feature (i.e., higher soil pH).

The Inceptisol presents 1.7-times more clay than the TAS and 6-times more silt (Table 1). The Oxisol presents 1.4-fold more clay than the TAS. In addition, there is more Fe and Al oxides/hydroxides in the Oxisol and Inceptisol, while the TAS is composed only of kaolinite, as the main component of the clay fraction. These factors consequently lead to a smaller availability of As to plant roots in the Inceptisol, followed by Oxisol and bigger availability of As in the TAS (Gulz et al., 2005). Thus, *A. cepa* cells exposed to the Inceptisol underwent lesser harmful effects of As, being less affected. For the cell cycle parameters analyzed, the TAS presented some effects in samples with > 84 mg L⁻¹, while for DNA fragmentation, the damage were noticed in solutions containing > 14.5 mg L⁻¹ of As.

To sum it up, the concentrations tested in this study, which are related to the accepted limits of As in Brazilian soils, did not present negative effects in the cell cycle, as mitotic depletion, induction of chromosome abnormalities, or micronucleus (aside from 8 mg kg⁻¹ of As in TAS). However, for the comet assays, doses of 14.5 and 26 mg kg⁻¹ present significant damages to DNA, showing AU values close to 200, which represents a medium toxic potential.

5 Conclusion

In *Allium cepa*, the model plant tested, arsenic exposure increases the frequency of chromosome abnormalities and micronucleus, as well as decreases the frequency of mitotic index in root tips cells directed exposure to As-contaminated tropical soils. The damage recorded due to As contamination in TAS was more genotoxic, then in the Oxisol, than the same doses in the Inceptisol. Clastogenic effects of As in cells was highlighted as the mode of action of this soil contaminant. The effects of As additions in TAS were more pronounced than in the others soils (Oxisol and Inceptisol), evidencing that genotoxicity tests must consider soil properties.

Acknowledgments

The authors would like to thank the funding agencies Minas Gerais State Research Foundation (FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support in the development of this work and for the scholarships provided.

References

- Abedin, M. J., Cresser, M. S., Meharg, A. A., Feldmann, J. and CotterHowells, J., 2002. Arsenic Accumulation and Metabolism in Rice. *Env. Sci. Technol.* 36, 962–968.
- Agency for toxic substances and disease control (ATSDR), 2017. The Priority List of Hazardous Substances 201. URL <http://www.atsdr.cdc.gov/spl/> (accessed 12.12.18).
- Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M., 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. *Chemosphere* 84, 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.025>
- Alves, P.R.L., da Silva, E.B., Cardoso, E.J.B.N., Alleoni, L.R.F., 2018. Ecotoxicological impact of arsenic on earthworms and collembolans as affected by attributes of a highly weathered tropical soil. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 13217–13225. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6839-2>
- Andrade-Vieira, L.F., Gedraite, L.S., Campos, J.M.S., Davide, L.C., 2011. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 882–888. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.010>
- Andrade-Vieira, L.F.; Palmieri, M.J.; Davide, L.C., 2017. Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L.. *Environmental Monitoring and Assessment* 189, 489-496.
- Bandyopadhyay, A., 2016. Role of oxidative stress in arsenic(III)induced genotoxicity in cells of meristematic tissue of *Allium cepa*: An in vivo study. *Materials Today: Proceedings* 3, 3194–3199. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2016.10.002>
- Banu, B.S., Danadevi, K., Jamil, K., Ahuja, Y.R., Rao, K.V., Ishaq, M., 2001. ASTM E316 - 11.pdf 162, 171–177.
- Basu, A., Som, A., Ghoshal, S., Mondal, L., Chaubey, R.C., Bhilwade, H.N., Rahman, M.M., Giri, A.K., 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood lymphocytes of individuals susceptible to arsenic induced toxicity in West Bengal, India. *Toxicology Letters* 159, 100–112. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.05.001>
- Campos, J. M. S. ; Viccini, L. F. ; Andrade, L. F. ; Davide, L. C. ; Rodrigues, G.S., 2008. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic, in: *Plant Bioassays*. pp. 1–344.
- Ciminelli, V.S.T., Gasparon, M., Ng, J.C., Silva, G.C., Caldeira, C.L., 2017. Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. *Chemosphere* 168, 996–1003. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.111>
- Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

- Datta, S., Saha, D.R., Ghosh, D., Majumdar, T., Bhattacharya, S., Mazumder, S., 2007. Sub-lethal concentration of arsenic interferes with the proliferation of hepatocytes and induces in vivo apoptosis in *Clarias batrachus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145, 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.01.005>
- De Vizcaya-Ruiz, A., Barbier, O., Ruiz-Ramos, R., Cebrian, M.E., 2009. Biomarkers of oxidative stress and damage in human populations exposed to arsenic. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.020>
- Dos Santos, F.E., Carvalho, M.S.S., Silveira, G.L., Correa, F.F., Cardoso, M.D.G., Andrade-Vieira, L.F., Vilela, L.R., 2018. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum* Ait. and *Solanum betaceum* Cav. (Solanaceae) in the plant model *Lactuca sativa*. *Environmental Science and Pollution Research* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1015-x>
- Drewniak, L., Sklodowska, A., 2013. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 7728–7739. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1449-0>
- Duquesnoy, I., Champeau, G.M., Evray, G., Ledoigt, G., Piquet-Pissaloux, A., 2010. Enzymatic adaptations to arsenic-induced oxidative stress in *Zea mays* and genotoxic effect of arsenic in root tips of *Vicia faba* and *Zea mays*. *Comptes Rendus - Biologies* 333, 814–824. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.07.004>
- Elisabeth, M., Claessen, C., 1997. *Metodos Embrapa Analise Solo*. <https://doi.org/1517-2627>
- Farnese, F.S., Oliveira, J.A., Farnese, M.S., Gusman, G.S., Silveira, N.M., Siman, L.I., 2014. Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. *Idesia (Arica)* 32, 99–106. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000100012>
- Farooq, M.A., Islam, F., Ali, B., Najeeb, U., Mao, B., Gill, R.A., Yan, G., Siddique, K.H.M., Zhou, W., 2016. Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. *Environmental and Experimental Botany* 132, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.08.004>
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2009. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent-Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1680–1686. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 252–259. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.12.003>
- Finnegan, P.M., Chen, W., 2012. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. *Frontiers in Physiology* 3 JUN, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00182>
- Freitas, A.S., Fontes Cunha, I.M., Andrade-Vieira, L.F., Techio, V.H., 2016. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 124, 426–434. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.017>

- Grant, W.F., 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations-a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 426, 107–112. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00050-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00050-0)
- Gulz, P.A., Gupta, S.K., Schulin, R., 2005. Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant and Soil* 272, 337–347. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-5960-z>
- International Agency of Research on Cancer (IARC), 2019. AGENTS CLASSIFIED BY THE IARC MONOGRAPHS, VOLUMES 1–123 [WWW Document]. URL monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/.
- Islam, S., Rahman, M.M., Islam, M.R., Naidu, R., 2016. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. *Environment International* 96, 139–155. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.09.006>
- ISO, 1998. ISO 11274:1998 Soil quality -- Determination of the water-retention characteristic - Laboratory methods. Int. Organ. Stand.
- Kader, M., Lamb, D.T., Megharaj, M., Naidu, R., 2016. Sorption parameters as a predictor of arsenic phytotoxicity in Australian soils. *Geoderma* 265, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.11.019>
- Kesari, V.P., Kumar, A., Khan, P.K., 2012. Genotoxic potential of arsenic at its reference dose. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.02.018>
- Leme, D.M., Marin-Morales, M.A., 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650, 80–86. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>
- Ma, T.H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Valtierra Rabago, E., Adriana Arreola, G., Zhang, H., 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 334, 185–195. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(95\)90010-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(95)90010-1)
- Malavolta, E., 1980. Elementos de nutrição mineral de plantas. Agronômica Ceres, Piracicaba.
- OECD, 2006. Test No. 208: Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling growth test, OECD guidelines for the testing of chemicals, OECD guidelines for the testing of chemicals, section 2. [WWW Document]. OECD Publishing.
- Palmieri, M.J., Andrade-Vieira, L.F., Campos, J.M.S., dos Santos Gedraite, L., Davide, L.C., 2016. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 442–447. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.016>
- Palmieri, M.J., Lubber, J., Andrade-Vieira, L.F., Davide, L.C., 2014. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 763, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.008>

- Pepper, I.; Galanti, N.; Sans, J.; López-Sáez, J.F., 1988. Reversible inhibition of root growth and cell proliferation by pentavalent arsenic in *Allium cepa* L. *Environ. Exp. Bot* 28, 9–18.
- R Core Development Team, 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Reis, G.B. dos, Andrade-Vieira, L.F., Moraes, I. de C., César, P.H.S., Marcussi, S., Davide, L.C., 2017. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.004>
- Selvaraj, V., Armistead, M.Y., Cohenford, M., Murray, E., 2013. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. *Chemosphere* 90, 1201–1209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.039>
- Silveira, G.L., Lima, M.G.F., Reis, G.B. dos, Palmieri, M.J., Andrade-Vieira, L.F., 2017. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere* 178, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>
- Susan, A., Rajendran, K., Sathyasivam, K., Krishnan, U.M., 2019. An overview of plant-based interventions to ameliorate arsenic toxicity. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 109, 838–852. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.10.099>
- Ullrich-Eberius, C.I., Sanz, A. and Novacky, A.J., 1989. Evaluation of arsenate and vanadate-associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba* Gl. *J. Exp. Bot.* 40, 119–128.
- White, P.A., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 567, 227–345. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.09.003>
- Wu, L., Yi, H., Yi, M., 2010. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. *Journal of Hazardous Materials* 176, 952–956. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.11.132>
- Yáñez, L., García-Nieto, E., Rojas, E., Carrizales, L., Mejía, J., Calderón, J., Razo, I., Díaz-Barriga, F., 2003. DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area. *Environmental Research* 93, 231–240. <https://doi.org/10.1109/LCOMM.2017.2677423>
- Yi, H., Wu, L., Jiang, L., 2007. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. *Science of the Total Environment* 383, 232–236. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.05.015>

Table Caption

Table 1. Physical and chemical properties of two natural soils (Inceptisol and Oxisol) and a tropical artificial soil (TAS) used in laboratory growth tests with higher plants. CEC – cation exchange capacity at pH 7; OM – organic matter content; P-rem – remaining phosphorous; Fe₂O₃ – Iron oxides.

Soil	Texture			pH (H ₂ O)	CEC	OM	P-rem	As	Fe ₂ O ₃
	Clay	Silt	Sand						
	-----%-----				<i>cmol_c dm⁻³</i>	%	<i>mg L⁻¹</i>	<i>mg kg₁⁻¹</i>	%
Oxisol	26	8	66	4.4	0.27	0.24	6.84	0.026	2.40 ± 0.00
Inceptisol	33	48	19	4.6	2.01	1.87	4.31	< 0.01	17.4 ± 1.03
TAS	19	8	73	5.2	2.27	7.84	36.1	< 0.01	1.80 ± 0.10

Table 2. Mean \pm standard deviation frequency of analyzes of the Cell Cycle phases and alterations in cell cycle in meristematic cells of *Allium cepa* (onion) root tips exposed to a Oxisol, an Inceptisol and a tropical artificial soil (TAS) contaminated with increasing doses of arsenic.

Arsenic concentrations (mg kg ⁻¹)	Soils	Prophase	Metaphase	Anaphase	Telophases	MI	TCA (%)	Freq (%)
0.0	Oxisol	17.0 \pm 2.94	2.7 \pm 1.25	3.0 \pm 0.11	3.3 \pm 0.94	2.65 \pm 0.33	0.07 \pm 0.04	0.24 \pm 0.17
	Inceptisol	58.53 \pm 2.32	14.12 \pm 1.73	17.35 \pm 1.73	10.00 \pm 2.03	6.80 \pm 0.59	0.15 \pm 0.09	02.05 \pm 0.97
	TAS	49.01 \pm 2.98	17.88 \pm 1.43	17.88 \pm 1.73	15.23 \pm 2.43	5.91 \pm 0.93	0.12 \pm 0.04	01.99 \pm 0.99
8.0	Oxisol	14.3 \pm 2.62	3.0 \pm 2.16	2.0 \pm 1.41	5.3 \pm 2.87	2.55 \pm 0.66	0.07 \pm 0.09	0.21 \pm 0.20
	Inceptisol	58.47a \pm 2.60	15.35 \pm 5.92	14.45 \pm 2.39	11.74 \pm 1.79	7.90 \pm 0.19*	0.15 \pm 0.08	01.69 \pm 0.76
	TAS	51.11 \pm 4.34	20.15 \pm 1.64	16.46 \pm 2.32	12.29 \pm 2.95	7.96 \pm 0.28*	0.25 \pm 0.09*	3.07 \pm 1.02
14.5	Oxisol	22.7 \pm 2.40*	5.7 \pm 3.09	7.0 \pm 4.24	6.7 \pm 3.40	4.20 \pm 0.82*	0.16 \pm 0.09	0.55 \pm 0.18
	Inceptisol	54.34 \pm 4.38	15.29 \pm 4.47	15.07 \pm 1.89	15.29 \pm 2.90	8.00 \pm 0.49*	0.12 \pm 0.07	01.48 \pm 0.73
	TAS	58.31 \pm 4.12*	16.09 \pm 1.03	16.36 \pm 3.23	9.23 \pm 1.65*	7.44 \pm 0.35*	0.27 \pm 0.10*	3.56 \pm 1.52
26.0	Oxisol	31.6 \pm 4.57*	9.8 \pm 3.83*	8.4 \pm 2.15*	6.0 \pm 1.67*	5.56 \pm 1.17*	0.10 \pm 0.10	0.18 \pm 0.17
	Inceptisol	53.38 \pm 6.38	19.39 \pm 4.83	15.47 \pm 3.34	11.76 \pm 2.54	8.80 \pm 0.34*	0.44 \pm 0.26	04.29 \pm 1.22
	TAS	54.37 \pm 2.32*	16.50 \pm 2.12	15.78 \pm 3.65	13.35 \pm 2.65	7.65 \pm 0.67*	0.28 \pm 0.09*	03.76 \pm 1.65
46.5	Oxisol	35.8 \pm 4.02*	12.8 \pm 2.96*	11.3 \pm 3.20*	8.8 \pm 2.03*	6.84 \pm 1.35*	0.28 \pm 0.12*	0.42 \pm 0.13
	Inceptisol	55.88 \pm 4.80	15.88 \pm 3.97	15.05 \pm 2.32	13.20 \pm 4.23	9.00 \pm 0.38*	0.14 \pm 0.12	01.86 \pm 1.05
	TAS	59.69 \pm 3.32*	14.38 \pm 2.21	14.69 \pm 2.54	11.25 \pm 1.96	6.20 \pm 0.67	0.31 \pm 0.09*	05.77 \pm 2.77*
84.0	Oxisol	38.5 \pm 1.66*	10.5 \pm 3.20*	12.3 \pm 1.09*	9.3 \pm 1.79*	7.02 \pm 0.65*	0.25 \pm 0.10*	0.28 \pm 0.19
	Inceptisol	50.34 \pm 8.71	17.91 \pm 5.32	18.82 \pm 3.43	12.93 \pm 3.01	8.60 \pm 0.15*	0.18 \pm 0.09	02.27 \pm 0.79
	TAS	59.06 \pm 3.01*	14.77 \pm 2.01	12.08 \pm 2.45*	14.10 \pm 2.06	2.96 \pm 1.54*	0.20 \pm 0.07*	06.71 \pm 1.98*
150	Oxisol	36.8 \pm 4.85*	12.0 \pm 2.93*	10.7 \pm 1.09*	9.0 \pm 1.58*	6.91 \pm 1.26*	0.24 \pm 0.11*	0.25 \pm 0.22
	Inceptisol	54.33 \pm 7.80	14.52 \pm 2.12	17.56 \pm 4.54	13.58 \pm 3.34	8.40 \pm 0.72*	0.14 \pm 0.11	01.64 \pm 0.98
	TAS	43.48 \pm 3.63	17.39 \pm 2.12	18.48 \pm 2.65	20.65 \pm 3.89*	1.79 \pm 0.73*	0.22 \pm 0.08*	11.96 \pm 3.12*
270	Oxisol	33.3 \pm 2.86*	13.3 \pm 1.79*	11.0 \pm 0.94*	10.7 \pm 2.49*	7.30 \pm 0.29*	0.36 \pm 0.08*	0.58 \pm 0.10
	Inceptisol	56.87 \pm 2.51	16.35 \pm 3.01	14.93 \pm 2.98	11.85 \pm 2.89	8.30 \pm 0.24*	0.25 \pm 0.08	03.32 \pm 0.46
	TAS	55.55 \pm 4.32*	14.81 \pm 1.98	11.11 \pm 2.02*	18.51 \pm 2.65*	0.54 \pm 0.4*	0.08 \pm 0.07	14.81 \pm 2.98*

Means followed by standard deviation. * - treatments that significantly differ from control by Dunnett's test ($p \leq 0.05$). Abbreviations: TAS – Tropical artificial soil; MI - Mitotic index; TCA – Total of Chromosome Alterations; Freq – Frequency of Chromosome Alterations/number of cells in division

Table 3. Analyzes in meristematic and F1 cells of *Allium cepa* (onion) root tips exposure to Oxisol, Inceptisol and tropical artificial tropical (TAS) contaminated with increasing doses of arsenic.

arsenic concentrations (mg kg ⁻¹)	----- Meristematic cells -----									----- F1 -----					
	Oxisol	Inceptisol	TAS	Oxisol	Inceptisol	TAS	Oxisol	Inceptisol	TAS	Oxisol	Inceptisol	TAS	Oxisol	Inceptisol	TAS
	Condensed Nucleus (%)			Micronuclei per 1,000 cells			Nuclear Bud per 1,000 cells			Condensed Nucleus (%)			Micronuclei per 1,000 cells		
0.0	1.8 ± 0.08	2.69 ± 1.00	2.91 ± 1.93	1.70 ± 0.90	1.70 ± 1.20	14.50 ± 6.31	1.30 ± 0.90	-	1.60 ± 0.80	25.80 ± 13.50	12.60 ± 12.80	78.80 ± 34.4	13.60 ± 2.80	160.00 ± 20.00	208.00 ± 31.40
8.0	2.0 ± 0.33	3.13 ± 0.73	4.69 ± 1.53	3.30* ± 0.50	2.90 ± 1.90	12.70 ± 2.10	1.00 ± 0.40	-	0.60 ± 0.70	31.40 ± 5.60	176.00* ± 25.60	138.00 ± 21.60	17.40 ± 1.10	228.00 ± 50.40	292.00* ± 35.20
14.5	2.37* ± 0.42	1.97 ± 0.57	3.06 ± 1.58	5.00* ± 0.80	7.80* ± 2.50	11.40 ± 4.80	0.30 ± 0.40	-	1.00 ± 0.40	18.60 ± 1.51	176.00* ± 80.80	152.00* ± 11.41	6.60* ± 1.80	202.00 ± 74.42	58.00* ± 25.60
26.0	2.9* ± 0.59	2.58 ± 1.56	3.50 ± 1.36	2.20 ± 1.70	7.40* ± 2.52	16.54 ± 6.61	0.40 ± 0.40	-	2.22 ± 0.80	6.60 ± 6.50	66.00* ± 23.20	179.00* ± 12.40	5.80* ± 0.40	154.00 ± 35.22	78.00* ± 22.42
46.5	4.23* ± 1.03	2.19 ± 1.00	3.58 ± 1.63	11.32* ± 2.30	8.22* ± 1.11	11.62 ± 7.81	0.30 ± 0.40	-	3.30 ± 1.90	13.80 ± 9.00	108.00 ± 11.20	118.00 ± 22.40	2.20* ± 1.20	82.00* ± 10.40	104.00* ± 14.40
84.0	2.18* ± 0.18	2.26 ± 0.95	4.80 ± 0.64	8.32* ± 1.11	8.11* ± 2.22	9.73 ± 2.82	0.00	-	1.00 ± 1.20	19.60 ± 25.80	94.00 ± 32.80	59.00 ± 48.00	6.82* ± 2.60	104.00* ± 27.22	160.00* ± 12.00
150	2.88* ± 0.42	2.75 ± 1.62	5.57 ± 1.46	7.82* ± 2.52	8.11* ± 3.73	8.22 ± 3.62	2.00 ± 0.70	-	0.60 ± 0.90	16.20 ± 7.10	102.00 ± 38.40	128.00 ± 27.60	9.00 ± 4.11	62.00* ± 22.40	80.00* ± 16.00
270	5.63* ± 1.16	2.74 ± 1.80	4.72 ± 1.93	9.3* ± 3.2	4.1* ± 1.6	12.2 ± 7.6	0.70 ± 0.90	-	1.22 ± 1.10	19.80 ± 1.11	142.00 ± 53.60	142.00 ± 18.64	11.60 ± 5.50	56.00* ± 20.80	126.00* ± 8.80

Means followed by standard deviation. * - treatments that significantly differ from control by Dunnett's test ($p \leq 0.05$). "-": non-observed

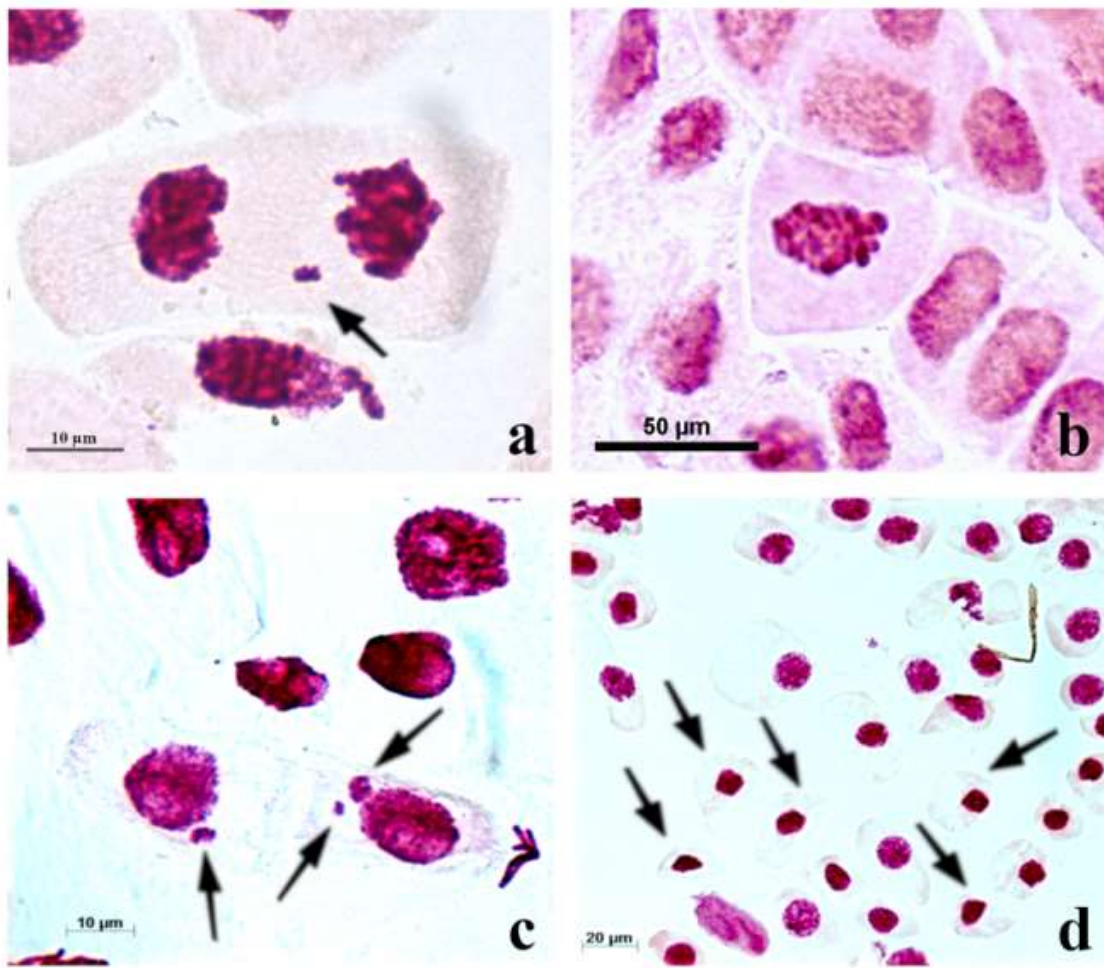


Figure 1: Example of cell cycle alterations in meristematic cells of *Allium cepa* (onion) root tips cultivated in soils (Oxisol; Inceptisol; Tropical artificial soil) contaminated with increasing doses of arsenic. A: Chromosome fragments; B: Stickiness; C: Micronucleus (arrow) (magnification 1000×); D: Condensed nuclei (arrow) (magnification 400×).

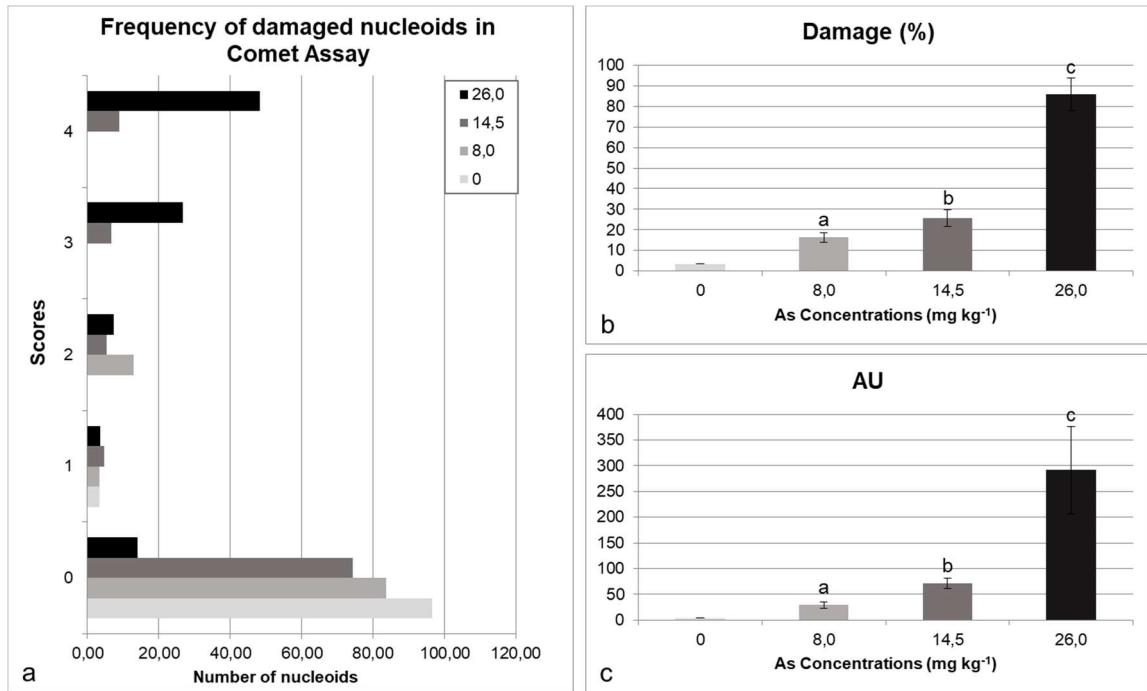


Figure 2: DNA fragmentation observed in nucleoids of *Allium cepa* cells cultivated in an Oxisol contaminated with increasing doses of arsenic. (a) Frequency of nucleoids classified by visual score from 0 to 4, according to the level of DNA damage, considering the sizes of the comet's tail and head. Data provided as a average of three slides with 100 nucleoids analyzed per slide. (b) Percentage of damage. (c) Arbitrary unit (AU) values calculated as described by Collins (2004). The means of damage (b) and AU (c) was compared by Tukey's test ($p < 0.05$) and frequency bars followed by different letters represent significant differences.

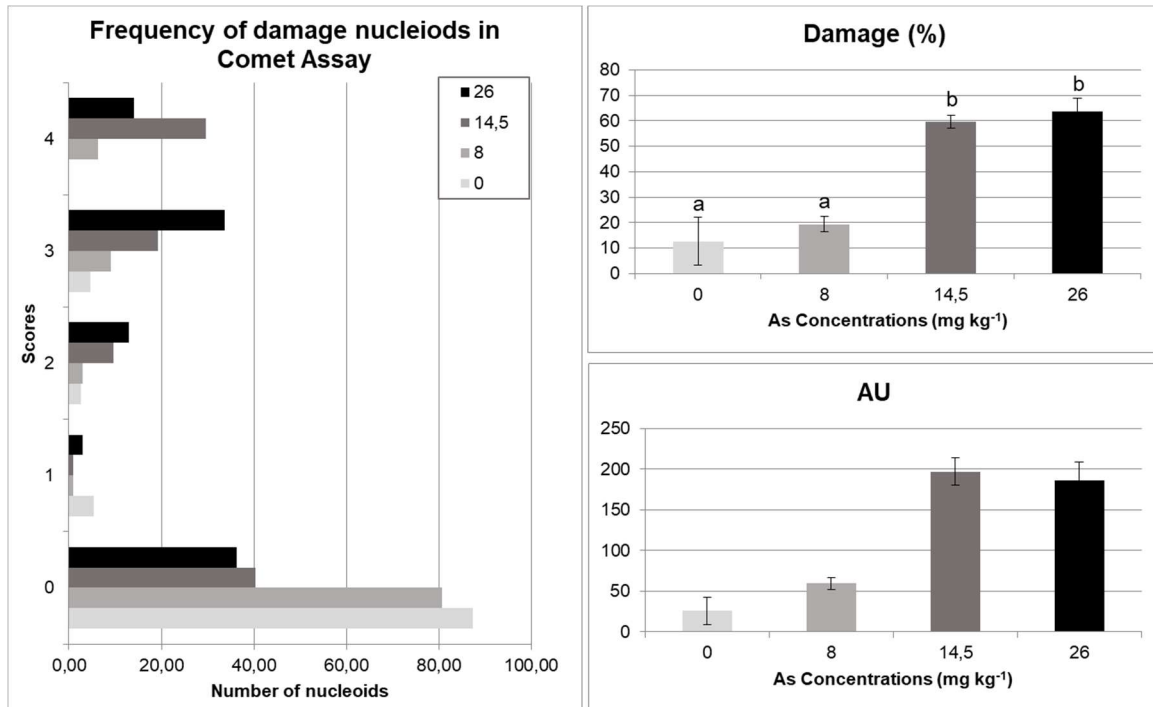


Figure 3: DNA fragmentation observed in nucleoids of *Allium cepa* cells cultivated in an Inceptisol contaminated with increasing doses of arsenic. (a) Frequency of nucleoids classified by visual score from 0 to 4, according to the level of DNA damage, considering the sizes of the comet's tail and head. Data provided as a average of three slides with 100 nucleoids analyzed per slide. (b) Percentage of damage. (c) Arbitrary unit (AU) values calculated as described by Collins (2004). The means of damage (b) and AU (c) was compared by Tukey's test ($p < 0.05$) and frequency bars followed by different letters represent significant differences.

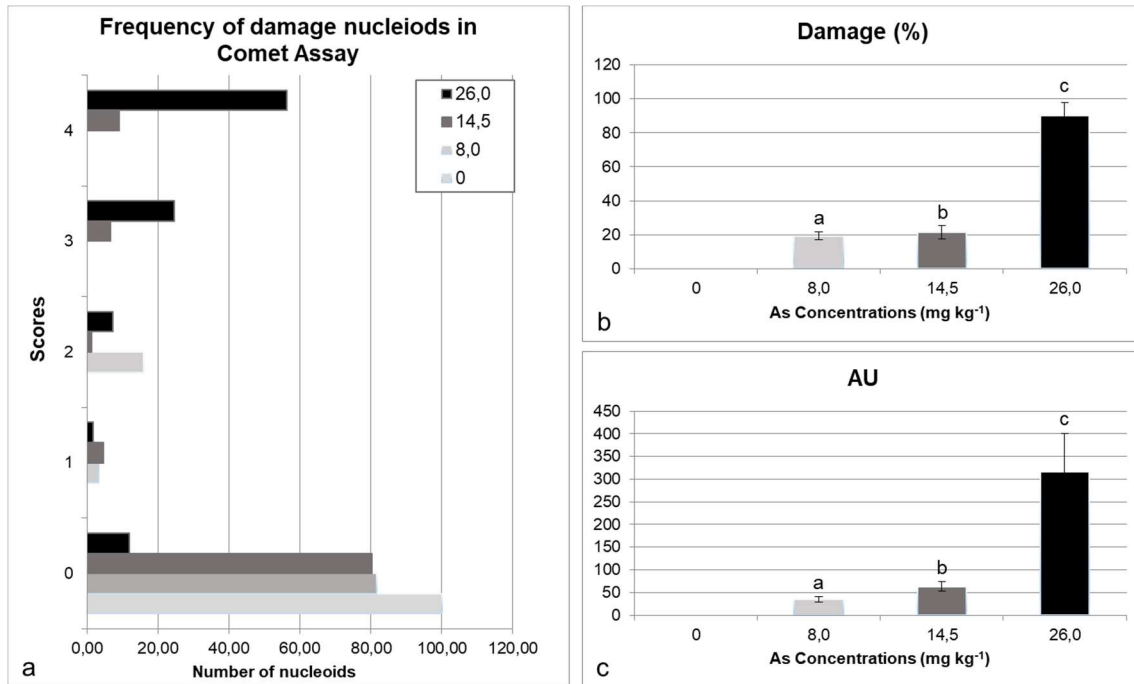


Figure 4: DNA fragmentation observed in nucleoids of *Allium cepa* cells cultivated in a Tropical artificial soil contaminated with increasing doses of arsenic. (a) Frequency of nucleoids classified by visual score from 0 to 4, according to the level of DNA damage, considering the sizes of the comet's tail and head. Data provided as a medium of three slides with 100 nucleoids analyzed per slide. (b) Percentage of damage. (c) Arbitrary unit (AU) values calculated as described by Collins (2004). The means of damage (b) and AU (c) was compared by Tukey's test ($p < 0.05$) and frequency bars followed by different letters presents significantly difference.

ARTIGO 3 – Avaliação de risco eco-geno-toxicológica do arsênio em solos tropicais através de ensaios vegetais em microplacas

Avaliação de risco eco-geno-toxicológica do arsênio em solos tropicais através de ensaios vegetais em microplacas

Autores: Ingrid Fernanda Santana Alvarenga¹, Luiz Roberto Guimarães Guilherme², Larissa Fonseca Andrade-Vieira¹

Afiliações:

¹ - Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

² - Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Campus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-000, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente:

Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil.

E-mail: larissa.vieira@ufla.br; Tel: +55 35 3829-1356, Fax: +55 35 3829-1341.

Resumo

O arsênio (As) é um metaloide tóxico que ocorre naturalmente no solo e seus teores são incrementados devido às ações antropogênicas. Solos com altos níveis de As representam uma ameaça para os seres humanos e também para os ecossistemas, por isso, a importância de valores orientadores para As em solos. No entanto, as metodologias atuais que utilizam plantas superiores incluem apenas parâmetros macroscópicos, não incluindo a prospecção genotóxica. Logo, objetivou-se avaliar a toxicidade de plantas superiores cultivadas em solos tropicais com As em microplacas e incluir avaliação de efeitos mutagênicos. Para tanto, sementes das espécies *Lactuca sativa* L., *Allium cepa* L., *Zea mays* L., *Pennisetum glaucum* L. e *Phaseolus vulgaris* L. foram expostas em placas de Petri a solos tropicais típicos (Latossolo e Cambissolo) e a um solo artificial tropical (ATS) contendo doses de As (0; 8; 14,5; 26; 46,5; 84; 150 e 270 mg kg⁻¹) e acondicionadas em estufa tipo B.O.D. a 24°C, sem fotoperíodo, por 120 horas. Em seguida, foram realizadas análises macroscópicas (germinação e crescimento) e microscópicas (aberrações cromossômicas e alterações nucleares) apenas em *A. cepa*. Para os parâmetros macroscópicos a *L. sativa* e *A. cepa* foram as espécies mais sensíveis. A porcentagem e a velocidade de germinação demonstraram não ser tão sensíveis para avaliar a fitotoxicidade de As nos solos tropicais testados. O desenvolvimento inicial das espécies testadas foi mais afetado no ATS, seguido do Latossolo e Cambissolo. Os valores de EC₅₀ (concentração efetiva que resulta em inibição de 50% dos parâmetros testados) permitiram plotar a curva de distribuição de sensibilidade das espécies e obter o valor da concentração perigosa para 5% das espécies vegetais testadas (HC₅) de 15,58 mg As kg⁻¹. O valor encontrado foi semelhante ao obtido em casa de vegetação e é similar ao Valor de Prevenção (VP) para As no Estado de MG. Tal resultado indica que tal metodologia é válida e que as variáveis relacionadas ao ciclo celular e fragmentação de DNA são importantes e devem ser utilizadas em uma avaliação ecotoxicológica. Finalmente, este estudo forneceu valores de orientadores importantes para a triagem ecotoxicológica para As em solos tropicais.

Palavras-chave: Avaliação de Risco Ambiental; Valores Orientadores para solo. Citogenotoxicidade. Mutagênese.

1 Introdução

O arsênio (As) é um elemento químico de ocorrência natural e por ação antropogênica, tal metaloide é o 20º elemento mais onipresente do meio ambiente (DREWNIAK e SKLODOWSKA, 2013). Devido à sua toxicidade o As ocupa o primeiro lugar na lista de substâncias prioritárias pela Agência de Registro de Substâncias e Doenças Tóxicas (EUA) desde 1997 (ATSDR, 2017) e, além disso, foi classificado como cancerígeno de classe 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 2019). Por isso, causa grande preocupação e na toxicologia ambiental é considerado para efetivo monitoramento para evitar que as concentrações cheguem a níveis deletérios aos seres humanos, plantas e organismos do solo (SUSAN et al., 2019).

Embora tenha sido estudada a exposição de seres humanos ao As pela ingestão de água (água superficial ou subterrânea) e alimentos contaminados (CIMINELLI et al., 2017), pouca atenção tem sido dada aos solos contaminados. É importante gerenciar as concentrações de arsênio no solo e os efeitos nas plantas, porque as plantas podem absorver e acumular arsênio em partes comestíveis, o que representa um caminho para a exposição ao arsênio (ISLAM et al., 2015).

As raízes são geralmente o primeiro tecido vegetal a ser exposto a elementos tóxicos nos solos. A extensão e proliferação das raízes é inibida como consequência da exposição ao As. Esse metaloide também inibe o crescimento de toda a planta, alterando os processos metabólicos, além de comprometer a capacidade reprodutiva da planta (FARNESE et al., 2014; FINNEGAN e CHEN, 2012).

Uma das formas de gerenciar e conhecer as concentrações do elemento que podem causar prejuízos é através de estudos ecotoxicológicos. Esses estudos, visam assegurar as condições naturais – ou com mínima interferência - dos ecossistemas prevenindo a perda das funções ambientais do meio. Por isso, tais estudos, constituem-se em importantes ferramentas para o monitoramento ambiental, avaliação de danos e identificação das causas, bem como subsídios para a tomada de decisão.

Uma das metodologias padronizadas e aceitas para determinar valores orientadores para solos são através de ensaios com vegetais superiores (OECD, 2006). Tais ensaios são padronizados pelas normativas OECD-208 e ISO-11.269-2 que estabelecem avaliações de parâmetros macroscópicos envolvendo germinação e

crescimento das plantas modelo e são realizados com vasos em casa de vegetação (FREITAS et al., 2016; KADER et al., 2016).

No entanto, esses ensaios não preveem as análises microscópicas, que incluem a observação de células no ciclo mitótico, frequência de aberrações cromossômicas e de micronúcleos. E, devido à toxicidade do As, são importantes os estudos para compreender os efeitos genotóxicos em organismos vivos e, com isso, auxiliar a estabelecer limites seguros para as concentrações de As nos solos. Nesse sentido, os bioensaios vegetais são de especial importância, pois lidam com organismos diretamente expostos aos poluentes do solo em áreas contaminadas.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a toxicidade de plantas superiores em solos tropicais contaminados com As, através de metodologia que utiliza microplacas, incluindo a avaliação de efeitos mutagênicos. Por conseguinte, com os resultados obtidos, derivar índices ecotoxicológicos (EC_{50} e HC_5) para avaliação de risco de solos contaminados com As.

2 Material e Métodos

2.1. Material vegetal

Foram utilizados como material vegetal, sementes de *Lactuca sativa* L. var. great lakes – americana (alface), *Allium cepa* L. var. baia periforme (cebola), *Zea mays* L. (milho), *Pennisetum glaucum* L. (milheto) e de *Phaseolus vulgaris* L. cv. BRSMG Uai (feijão). As sementes de *L. sativa* L., *A. cepa* L. e *P. glaucum* L. foram adquiridas comercialmente da marca Isla® sementes sendo, para cada espécie, todas de um mesmo lote. Já as sementes de *P. vulgaris* L. foram cedidas pelo programa de Melhoramento de Feijão do Departamento de Biologia da UFLA.

2.2 Preparação do solo

Foram selecionados duas classes de solo consideradas representativas do território brasileiro: Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico, textura média a moderado (Tabela 1); Cambissolo Háplico Tb distrófico típico a moderado (Tabela 1), ambos encontrados em grande parte do território brasileiro; e solo artificial tropical (areia fina, argila caulinítica e fibra de coco na proporção 7:2:1 de peso seco) conforme as diretrizes da OECD 208 (OECD, 2006), as quais recomendam o uso de um substrato artificial para comparação com os solos naturais.

O Latossolo foi coletado em Itumirim-MG, Brasil (21° 17' 08" S, 44° 47' 43" W) e o Cambissolo em Lavras-MG, Brasil (21° 13' 46" S, 44° 59' 17" W). Ambos os solos foram coletados sob floresta semi-decídua tropical minimamente perturbada.

Em cada solo testado, foram utilizadas concentrações crescentes de As (0; 8; 14,5; 26; 46,5; 84; 150 e 270 mg kg⁻¹), múltiplos de 1,8 (U.S. EPA 1996). Doses superiores a 270 mg kg⁻¹ não foram testadas pois já são consideradas perigosas para humanos (CONAMA, 2009). As doses de arsênio foram diretamente adicionadas ao solo em diferentes proporções através de uma solução estoque de arsenato de sódio heptahidratado (Na₂HAsO₄ 7H₂O, pureza a 98%, Sigma-Aldrich) em água.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas de dois solos naturais (Latossolo e Cambissolo) e um Solo Artificial Tropical (ATS)

Solos	Textura			pH (H ₂ O)	CTC	MO	P-rem	As	Fe ₂ O ₃
	Argila	Silte	Areia						
	-----%-----				<i>cmol_c dm⁻³</i>	%	<i>mg L⁻¹</i>	<i>mg kg⁻¹</i>	%
Latossolo	26	8	66	4,4	0,27	0,24	6,84	0,026	2,40 ± 0,00
Cambissolo	33	48	19	4,6	2,01	1,87	4,31	< 0,01	17,4 ± 1,03
ATS	19	8	73	5,2	2,27	7,84	36,1	< 0,01	1,80 ± 0,10

CTC - capacidade de troca catiônica a pH 7; MO - conteúdo de matéria orgânica; P - rem - fósforo restante; Fe₂O₃ - Óxidos de ferro.

2.3 Tratamentos

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (placa de Petri de polietileno com Ø de 9 cm) por tratamento. Cada placa de Petri foi preenchida com 50 g de Latossolo, Cambissolo ou Solo Artificial Tropical e mantida a capacidade de campo em 60% (ISO, 1998). Como controle interno utilizou-se placa de Petri contendo papel filtro embebido em 3 mL de água ultrapura para validar a germinação das sementes. Como controle negativo utilizou-se os solos testados, sem adição de As. As placas de Petri foram acondicionadas em B.O.D. (Biochemistry Oxygen Demand) a 24°C, sem fotoperíodo (NARWAL; SAMPIETRO; CATALÁN, 2009; PINHEIRO, 2014), por 120 horas.

2.4 Testes macroscópicos

A germinação das sementes das quatro espécies utilizadas foi avaliada anotando-se o número de sementes germinadas (com a protrusão da radícula) a cada 24 h até completar um total de 120 h e calculada segundo Maguire (1962) (os dados da porcentagem de germinação foram transformados em $\text{ArcSen}\sqrt{\%/100}$ para atender

à normalidade). Para calcular o índice de velocidade de germinação (IVG) foram realizadas contagens diárias das sementes protundidas, sendo utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962):

$$IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + GN/NN$$

Em que:

G1, G2 e GN representam o número de sementes germinadas no enésimo dia.

N1, N2 e NN representam o número de dias em que foram avaliadas as germinações G1, G2 e GN.

No final do experimento, o comprimento das raízes e da parte aérea emitidas foi aferido com o auxílio de um paquímetro digital. Após isso, foi realizada a lavagem das plântulas em água destilada, retirado o excesso de água e em seguida determinou-se a matéria fresca (MF) das espécies, através da pesagem das mesmas em balança de precisão.

2.5 Análise do ciclo celular

O ensaio para acesso aos parâmetros microscópicos foi realizado em pontas de raízes de *A. cepa* L. Após as 96h de experimento, as raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v) e armazenadas a -4°C, por pelo menos 24 h. As raízes passaram por hidrólise com HCl 1 mol L⁻¹ a 60°C por 10-12 min em banho-maria e posteriormente foram expostas ao Reativo de Schiff, no escuro, por 1 h e 30 min. Para montagem das lâminas foi usado carmim acético 2%. As lâminas foram preparadas segundo Silveira et al. (2017).

Os parâmetros do ciclo celular foram avaliados em células meristemáticas e F1, conforme descrito em Palmieri et al. (2016). Em seguida, o índice mitótico (IM) e núcleos condensados foram calculados, como conveniente, seguindo Palmieri et al. (2014). Foram avaliadas, para células meristemáticas, a frequência das alterações no ciclo celular durante a segregação ou interfase cromossômica. Para células F1, registramos apenas a frequência de micronúcleos e núcleos condensados (CN). Uma soma de 1.000 células foi registrada em cada lâmina para cada região (meristemáticas ou F1) avaliada da ponta da raiz, totalizando 5.000 células analisadas por região, por concentração e por solo testado. As avaliações das lâminas foram realizadas em microscópio óptico.

2.6 Análises estatísticas

Com os resultados dos parâmetros avaliados, quando possível, foi derivada a concentração efetiva (EC_x) de As que resultou em inibição de 25% (EC_{25}) ou 50% (EC_{50}) através de curvas de concentração-resposta, conforme descrito por Cedergreen et al. (2005).

A análise de risco foi desenvolvida usando os valores de EC_{50} considerados válidos para todas as espécies cultivadas no Latossolo e no Cambissolo. A derivação da curva de distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) (POSTHUMA et al., 2002) foi realizada para estimar a concentração perigosa (HC_5), que é a concentração de As que causaria risco a 5% ou menos de todas as espécies vegetais testadas.

Para avaliar como a inclusão de dados de plantas cultivadas no solo artificial influencia a derivação do HC_5 , a mesma análise foi realizada usando todos os três solos testados. Além disso, a derivação do HC_5 utilizando somente os parâmetros normalmente utilizados e com o acréscimo dos parâmetros microscópicos foi realizada.

3 Resultados e discussão

3.1 Efeitos do As sob a germinação

As respostas da %G e IVG para concentrações crescentes de As diferiram em relação a espécie testada e o solo cultivado. O solo que teve os menores valores de EC_x foi o ATS para %G e IVG, seguido do Latossolo e, por último, o Cambissolo (Tabela 2). Ou seja, o solo em que, em concentrações crescentes de As, houve o menor efeito negativo significativo na %G e IVG nas espécies testadas foi o Cambissolo.

Para %G, *A. cepa* foi a espécie mais sensível, ou seja, que apresentou menores valores de EC_{50} e EC_{20} quando cultivada em Latossolo e *L. sativa* foi a espécie menos sensível, não foi possível calcular a dose de EC_{50} . Já para o IVG do Latossolo, *P. vulgaris* foi a espécie mais sensível, apresentando os menores valores de EC_x e a espécie que apresentou menor sensibilidade foi *L. sativa* (Tabela 2).

No Cambissolo, as variáveis %G e IVG não foram muito responsivas, somente foi possível calcular o valor de EC_{50} da %G para *P. vulgaris* e *P. glaucum* e a espécie que obteve o menor valor foi a primeira (EC_{50} 198,5 mg As kg^{-1}). No IVG, *P. vulgaris*

também foi a espécie mais sensível com EC_{50} de 95,8 mg As kg^{-1} e EC_{25} de 48,7 mg As kg^{-1} (Tabela 2).

Os resultados dos EC_{50} e EC_{25} encontrados para %G e IVG podem ser explicados já que um dos efeitos conhecidos do As no vegetal é como inibidor metabólico, uma vez que compete com o fosfato e o substitui na molécula de ATP, interrompendo o fluxo de energia que é necessário para a germinação (FINNEGAN e CHEN, 2012; KAUR et al., 2012). Além disso, o As interage e prejudica a atividade de enzimas responsáveis pela quebra da reserva energética nas sementes (SRIVASTAVA et al., 2013). Por isso, em altas concentrações de As, a falta de energia proveniente do ATP e a redução da atividade enzimática podem causar inibição da germinação, como foi observado nas espécies testadas no presente estudo.

A grande discrepância dos índices ecotoxicológicos observada entre os solos testados pode ser explicado devido as diferentes propriedades físico-química (por exemplo: pH, matéria orgânica, potencial redox, textura, CTC) de cada um. O solo que apresentou maior fitotoxicidade foi o ATS, e suas características auxiliam para entender o motivo. O ATS, entre os solos testados, contém os menores teores de óxido de ferro e argila (Tabela 1) e, por consequência, ocorre a maior fitodisponibilidade quando comparado aos solos naturais testados (DAI et al., 2016; WANG et al., 2015).

O pH do solo, outro fator que influencia diretamente a adsorção e a disponibilidade de As nas raízes das plantas, foi maior no ATS em comparação com o Latossolo e o Cambissolo. Alves et al. (2018) mostraram que aumento no pH poderia aumentar a fitodisponibilidade de As na solução do solo. Quando o pH é alto, há mais disponibilidade de OH^- , que compete com As nos locais de sorção, aumentando assim a concentração disponível de As (KADER et al., 2016). Portanto, a toxicidade mais pronunciada de As em ATS também está ligada a essa característica distintiva).

Além disso, o Latossolo apresenta 1,4 vezes mais argila que o ATS (Tabela 1). E, há mais óxidos/hidróxidos de Fe e Al no Latossolo e no Cambissolo, enquanto o ATS é composto apenas por caulinita, como componente principal da fração argila (Tabela 1). Esses fatores levam, conseqüentemente, a uma menor disponibilidade de As nas raízes das plantas no Cambissolo, seguido pelo Latossolo e maior disponibilidade de As no ATS (GULZ et al., 2005). Tais observações corroboram com os resultados obtidos no presente estudo para %G e IVG e auxiliam a entender os resultados das variáveis apresentados a seguir.

Tabela 2: Concentração efetiva que resulta em inibição de 50% (EC₅₀) e concentração efetiva que resulta em inibição de 25% (EC₂₅) estimadas para a porcentagem de germinação de sementes (%G) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de *L. sativa*, *A. cepa*, *P. vulgaris*, *P. glaucum* e *Z. mays* expostas a solos (Latosolo, Cambissolo e solo tropical artificial (ATS)) contaminados com arsênio (As).

Espécies	Parâmetros	Solos	EC ₅₀ ----mg As kg ⁻¹ de solo----	EC ₂₅
<i>L. sativa</i>	Germinação	Latossolo	-	95.2 (74.8-19.8)
		Cambissolo	-	98.18
		ATS	-	84.45
	IVG	Latossolo	215.2 (185.5-156.1)	98.5 (75.2-142.2)
		Cambissolo	259.8 (190.8-278.1)	112.8 (87.4-145.6)
		ATS	92.8 (69.2-195.8)	49.5 (32.9-78.6)
<i>A. cepa</i>	Germinação	Latossolo	95.9 (67.5-134)	62.5 (42.5-95.1)
		Cambissolo	-	-
		ATS	76.5 (67.8-198.8)	40.69 (32.9-18.11)
	IVG	Latossolo	102.6 (89.5-135.9)	27.5 (14.2-49.9)
		Cambissolo	190.8 (142.2-224.7)	43.2 (21.6-75.2)
		ATS	42.5 (21.3-68.9)	18.3 (10.6-33.9)
<i>P. vulgaris</i>	Germinação	Latossolo	102.5 (84.8-139.5)	85.7 (58.7-102.9)
		Cambissolo	198.5 (144.6-218.6)	130.7 (114.7-181.3)
		ATS	75.2 (44.1-115.7)	41.5 (29.7-75.1)
	IVG	Latossolo	52.3 (45.1-69.9)	27.4 (15.1-42.9)
		Cambissolo	95.8 (78.8-112.4)	48.7 (32.5-79.6)
		ATS	37.5 (21.5-58.2)	19.8 (12.5-32.9)
<i>P. glaucum</i>	Germinação	Latossolo	172.3 (152.4-205.3)	73.5 (44.8-96.8)
		Cambissolo	225.6 (154.8-271.8)	157.9 (122.9-182.8)
		ATS	86.5 (53.6-187.2)	46.7 (26.2-69.8)
	IVG	Latossolo	71.7 (54.0-94.8)	44.4 (22.4-58.7)
		Cambissolo	-	249.1 (217.5-298.7)
		ATS	68.3 (49.3-145.8)	41.0 (33.5-86.8)
<i>Z. mays</i>	Germinação	Latossolo	126.6 (99.2-187.3)	67.7 (59.9-85.1)
		Cambissolo	-	223.5 (190.8-232.8)
		ATS	144.1 (114.9-175.7)	71.5 (54.8-83.9)
	IVG	Latossolo	-	-
		Cambissolo	-	-
		ATS	116.3 (70.4-154.7)	40.7 (29.1-73.2)

(limite de confiança de 95%)

3.2 Efeitos do As sobre o desenvolvimento inicial das plântulas

A exposição ao As diminuiu o desenvolvimento inicial da parte aérea e raiz das plântulas de todas as espécies testadas. Os valores de EC_x para o desenvolvimento inicial foram inferiores aos encontrados na %G e IVG e também variaram entre as espécies testadas e tipos de solo.

No Latossolo a espécie mais sensível e que teve o menor EC_x foi a *L. sativa* (EC_{50} da raiz 47,4 mg As kg^{-1} e da parte aérea 132,7 mg As kg^{-1} ; EC_{25} da raiz 29,1 mg As kg^{-1} e da parte aérea 42,3 mg As kg^{-1}), seguida de *A. cepa*, *P. glaucum* e *Z. mays*. No mesmo solo, a espécie que apresentou menor sensibilidade foi o *Z. mays* com valores de EC_{50} para raiz de 156,8 mg As kg^{-1} e na parte aérea não houve diferença para o cálculo dentro das testadas e o EC_{25} para raiz de 45,8 mg As kg^{-1} e parte aérea de 56,5 mg As kg^{-1} (Tabela 3).

Nas espécies cultivadas em Cambissolo foram obtidos os menores valores de EC_{50} e EC_{25} para parte aérea e raiz quando comparado ao Latossolo e ATS. Ou seja, o Cambissolo apresentou menor fitotoxicidade para as espécies testadas. Para o ATS com diferentes concentrações de As, o desenvolvimento de raiz e parte aérea teve o mesmo padrão que em Latossolo. *L. sativa* foi a espécie que teve os menores valores de EC_{50} e EC_{25} e, a espécie que teve menor redução do crescimento da parte aérea e raiz e, com isso os maiores valores de EC_x para doses crescentes de As, foi *Z. mays* (Tabela 3).

Nas avaliações de crescimento inicial realizadas em espécies cultivadas em Latossolo, Cambissolo e ATS com diferentes concentrações de As, a *L. sativa* foi a espécie mais sensível e que apresentou menores valores de EC_{50} e EC_{25} e a que apresentou menos sensibilidade foi *Z. mays* (Tabela 3). No geral, os valores de EC_{50} e EC_{25} foram menores no ATS, quando comparados ao Latossolo e Cambissolo.

A principal forma de absorção do As pelas plantas é através das raízes e a taxa de translocação deste elemento não essencial para a parte aérea é baixa (ZHAO et al., 2010). Por isso, normalmente os danos mais severos são observados no sistema radicular, onde o As se acumula em maiores concentrações, mas a parte aérea também é prejudicada e quando exposta ao As (QUAGHEBEUR e RENGEL, 2004), como observado no presente estudo.

De acordo com Requejo e Tena, (2005), o estresse oxidativo causado pelo As pode ser o principal fator responsável pela sua fitotoxicidade. Esses autores identificaram aumento nos níveis e da atividade de enzimas antioxidativas, através da

análise proteômica do efeito da exposição de *Zea mays* ao As, demonstrando a participação do mecanismo antioxidativo na tolerância ao As (REQUEJO e TENA, 2005).

Além das perturbações metabólicas, Pita-Barbosa (2009) e Singh et al. (2015) verificaram modificações estruturais em raízes de plantas expostas ao As, como alterações micromorfométricas, inibição no crescimento/desenvolvimento de raízes laterais e alterações no padrão de divisão celular de células do câmbio e do felogênio, o que pode, possivelmente, ser atribuído a disfunções genéticas nessas células.

Tabela 3: Concentração efetiva que resulta em inibição de 50% (EC₅₀) e concentração efetiva que resulta em inibição de 25% (EC₂₅) estimadas para o comprimento da raiz e parte aérea de *L. sativa*, *A. cepa*, *P. glaucum* e *Z. mays* expostas a solos (Latossolo, Cambissolo e solo tropical artificial (ATS)) contaminados com arsênio (As).

Espécies	Parâmetros	Solos	EC ₅₀	EC ₂₅
			----mg As kg ⁻¹ de solo----	
<i>L. sativa</i>	Raiz	Latossolo	47,4 (34,4 – 65,5)	29,1 (17,1 – 37,5)
		Cambissolo	56,9 (41,5 – 67,7)	45,5 (34,1-86,5)
		ATS	40,1 (26,1 – 66,5)	11,9 (8,3 -15,7)
	Parte Aérea	Latossolo	112,7 (88,5-166,4)	42,3 (22,6 – 59,7)
		Cambissolo	<270,0	93,8 (81,3-106,0)
		ATS	92,4 (75,3 – 126,0)	31,0 (18,1 – 53,5)
<i>A. cepa</i>	Raiz	Latossolo	86,29 (55,7 – 132,8)	55,6 (34,4 – 66,8)
		Cambissolo	167,4 (109,7 – 195,6)	45,1 (21,2 – 92,1)
		ATS	61,2 (34,8 – 80,7)	22,2 (8,8 – 36,3)
	Parte Aérea	Latossolo	51,8 (39,9-61,4)	11,4 (08,5 -25,4)
		Cambissolo	98,8 (83,6-132,6)	33,8 (10,9 – 58,4)
		ATS	26,9 (11,3 – 38,9)	10,8 (08,2 -14,6)
<i>P. glaucum</i>	Raiz	Latossolo	212,1 (171,4-296,4)	137,8 (121,8-188,3)
		Cambissolo	<270,0	227,9 (148,2-294,6)
		ATS	45,9 (21,3-78,5)	20,2 (9,1-31,2)
	Parte Aérea	Latossolo	150,4 (98,2-212,6)	106,5 (91,5-132,9)
		Cambissolo	197,2 (103,4-257,8)	114,7 (80,1-167,6)
		ATS	69,5 (28,6-102,7)	33,5 (25,4-69,2)
<i>Z. mays</i>	Raiz	Latossolo	156,8 (90,7-195,3)	45,8 (23,6-71,8)
		Cambissolo	164,5 (94,4-192,8)	64,6 (24,4-91,1)
		ATS	101,8 (93,8-219,4)	44,4 (23,5-90,1)
	Parte Aérea	Latossolo	<270,0	56,5 (27,7-84,2)
		Cambissolo	<270,0	118,1 (75,1-179,6)
		ATS	147,6 (94,8-210,4)	42,2 (14,1-101,5)

*(limite de confiança de 95%)

3.3 Efeitos do As sobre a matéria fresca

Sobre o efeito das concentrações de As na matéria fresca das plântulas das espécies cultivadas em Latossolo, Cambissolo e ATS, a *L. sativa* foi a espécie mais responsiva. Para a *L. sativa* cultivada em Latossolo, o valor de EC₅₀ relativo à matéria fresca foi de 94,0 mg As kg⁻¹ e EC₂₅ de 47,4 mg As kg⁻¹, em ATS os valores obtidos

foram 78,6 mg As kg⁻¹ e EC₂₅ de 33,7 mg As kg⁻¹, para Cambissolo as concentrações de As não influenciaram significativamente no peso da matéria fresca e, por isso, não obteve-se resultados.

Já *P. glaucum* e *Z. mays*, foram as espécies que tiveram os maiores valores de EC₅₀ e EC₂₅, ou seja, os efeitos negativos do As foram observados em doses mais altas. Para todas as espécies testadas, assim como no comprimento da raiz e parte aérea, o ATS apresentou a maior fitotoxicidade para a matéria fresca das espécies, seguido do Latossolo e Cambissolo.

Tabela 4: Concentração efetiva que resulta em inibição de 50% (EC₅₀) e concentração efetiva que resulta em inibição de 25% (EC₂₅) estimadas para a matéria fresca das plântulas de *L. sativa*, *A. cepa*, *P. glaucum* e *Z. mays* expostas a solos (Latossolo, Cambissolo e solo tropical artificial (ATS)) contaminados com arsênio (As).

Espécies	Solos	EC ₅₀ ----mg As kg ⁻¹ de solo----	EC ₂₅
<i>L. sativa</i>	Latossolo	94,0 (88,7 – 149,4)	47,4 (28,67 – 89,3)
	Cambissolo	-	-
	ATS	78,6 (35,9 – 160,8)	33,7 (19,8 – 48,4)
<i>A. cepa</i>	Latossolo	99,7 (102,6-182,0)	34,8 (13,3-53,9)
	Cambissolo	179,4 (134,3-236,7)	44,9 (30,8-64,8)
	ATS	80,7 (72,2-133,5)	20,7 (46,8-90,8)
<i>P. glaucum</i>	Latossolo	232,0 (163,4-277,9)	140,8 (46,5-176,4)
	Cambissolo	245,9 (194,4-280,3)	86,9 (54,5-109,7)
	ATS	69,5 (55,8-101,6)	21,5 (18,2-24,6)
<i>Z. mays</i>	Latossolo	139,9 (71,8-174,8)	54,3 (46,8-69,2)
	Cambissolo	155,9 (124,4-204,4)	96,9 (54,5-142,7)
	ATS	102,9 (71,3-135,1)	49,6 (36,2-67,6)

(limite de confiança de 95%)

-: Os dados obtidos não permitiram estimar o EC_x.

3.4 Alterações no ciclo celular de células meristemáticas

Os valores de EC₂₅ e EC₅₀ para as alterações das células meristemáticas, variaram dependendo dos tipos de solo (Tabela 5) e tais parâmetros só foram avaliados em *A. cepa*. O Latossolo e o ATS no geral apresentaram os menores valores de EC_x gerados a partir do ciclo celular, seguidos pelo Cambissolo.

Em relação às análises do ciclo celular, o Índice Mitótico (IM) no ATS os valores de EC₅₀ e EC₂₅ foram de 80,5 mg As kg⁻¹ e 51,5 mg As kg⁻¹, respectivamente. No

Latossolo, a dose encontrada para EC₅₀ foi de 11,57 mg As kg⁻¹ e o valor de EC₂₅ 9,04 mg As kg⁻¹. Em Cambissolo, através dos valores de IM observados nas doses testadas, não foi possível calcular o EC₅₀ e o EC₂₅ foi de 22,5 mg As kg⁻¹ (Tabela 5).

Com relação às alterações cromossômicas, foi possível calcular os índices ecotoxicológicos para os três solos testados e o ATS obteve os menores valores de EC₅₀ e EC₂₅ com, respectivamente, 12,3 mg As kg⁻¹ e 7,9 mg As kg⁻¹, seguido pelo Latossolo e, posteriormente, Cambissolo. Com tais valores, é possível entender que o ATS apresentou aumento de 50% e 25% das alterações cromossômicas com doses menores em relação ao Latossolo e Cambissolo.

Foram encontradas alterações nucleares em células meristemáticas de todos os solos analisados, como núcleos condensados (NC), micronúcleos (MCN) e broto, e obtidos os valores de EC₅₀ e EC₂₅. No Latossolo, para NC os valores de EC₅₀ e EC₂₅, respectivamente foram, 24,7 mg As kg⁻¹ e 13,8 mg As kg⁻¹. Para MNC os valores foram de 13,7 mg As kg⁻¹ e 6,9 mg As kg⁻¹ e para brotos foram 113,5 mg As kg⁻¹ e 85,4 mg As kg⁻¹ (Tabela 5).

No Cambissolo, ao gerar os EC_x para NC e brotos os valores extrapolaram as doses testadas e os valores de MNC o EC₅₀ foi de 14,5 mg As kg⁻¹ e EC₂₅ 8,2 mg As kg⁻¹. Também foi possível obter tais parâmetros para ATS, os valores encontrados para NC foram de 62,7 mg As kg⁻¹ e 44,3 mg As kg⁻¹, respectivamente para EC₅₀ e EC₂₅. Os valores para MNC foram de 83,7 mg As kg⁻¹ e 55,3 mg As kg⁻¹ e para broto os valores foram de 64,7 mg As kg⁻¹ e 25,8 mg As kg⁻¹.

Poucos são os estudos dedicados à avaliação citotóxica de plantas modelos cultivadas diretamente em solos contaminados com As, principalmente solos tropicais, visto que a maioria dos estudos são realizadas em solução de As. O IM avaliado no presente estudo em raízes de *A. cepa*, refere-se ao número total de células em divisão durante o ciclo celular, e alterações em tal índice auxilia a identificar a citotoxicidade que algum elemento causou a um organismo (D'AQUINO et al., 2009; FERNANDES et al., 2007). Tais parâmetros são importantes na prospecção do potencial genotóxico de elementos (VIEIRA e SILVEIRA, 2018) presentes no solo.

Autores como Yi et al. (2007) relataram uma redução no índice mitótico (IM) e no número de células em prófase como consequência de uma lenta progressão da fase S em raízes de *A. cepa* expostas por 12h em soluções de até 100 mg As L⁻¹. Além disso, Wu et al. (2010) observaram que a exposição de *V. faba* e *A. cepa* em

soluções de 1 a 30 mg As⁺³ L⁻¹ causou diminuição do IM nas raízes. No presente estudo o EC_x encontrado para ATS refere-se à redução do IM em relação ao controle.

Alguns autores apontam que a progressão mais lenta do ciclo celular é resultado da falta de energia, uma vez que o As compete com P (fósforo) pela ligação química no ADP (adenosina difosfato) do ciclo do ácido cítrico, prejudicando a formação de ATP (adenosina trifosfato) e formando ADP-As (Yi et al., 2007). Já índice EC_x encontrado em Latossolo refere-se ao aumento efetivo do IM em relação ao controle, muito provavelmente tal fato é devido as características do solo e menor disponibilidade do As quando comparado ao ATS.

A avaliação da frequência das alterações cromossômicas é importante pois amplia as informações sobre a potencialidade tóxica do As (KOTELNIKOVA et al., 2019). Quando a toxicidade é baixa a célula pode realizar o reparo das alterações cromossômicas, no entanto a depender do nível de toxicidade e se exceder a capacidade do mecanismo de reparo, pode-se iniciar o processo de morte celular (VIEIRA e SILVEIRA, 2018). Algumas das alterações cromossômicas (e.g., cromossomos aderentes) são consideradas como grave, a qual pode não ser reparada pela célula, vindo a induzir a formação de núcleos condensados (NC) (VIEIRA e SILVEIRA, 2018).

No presente estudo, alterações cromossômicas foram observadas em doses menores no ATS e Latossolo e em seguida no Cambissolo. Anormalidades cromossômicas também foram observadas por Kaesari (2012) em células da medula óssea de camundongos expostos a concentrações de 0.3 a 30 µg L⁻¹ de arsenito durante 15 dias. Esses autores também relatam que a formação dessas alterações é provocada pelos efeitos aneugênicos e clastogênicos do As como já comentado acima.

Wu et al. (2010) e Yi et al. (2007) relatam que a redução de MN em maiores concentrações de As pode ser causada pela maior toxicidade fisiológica do As e pelo declínio na atividade mitótica das células expostas, tal fato foi observado no presente estudo no ATS. As inferências desses autores se correlacionam muito bem com os resultados do presente estudo, uma vez que no ATS, onde o As possivelmente está mais disponível para absorção pelas raízes de *A. cepa*.

Tabela 5: Concentração efetiva que resultara em inibição de 50% (EC₅₀) e concentração efetiva que resultara em inibição de 25% (EC₂₅) estimadas para índice mitótico (IM), alterações cromossômicas, núcleo condensado (NC) e micronúcleo (MNC) de raízes de *A. cepa* expostas a solos (Latossolo, Cambissolo e Solo Tropical Artificial (ATS)) contaminados com arsênio (As).

Espécies	Solos	EC ₅₀ ----mg As kg ⁻¹ de solo----	EC ₂₅
IM	Latossolo	11,57 (14,3-21,7)	9,04 (6,2-19,4)
	Cambissolo	-	22,5 (14,1-29,8)
	ATS	80,5 (62,8-105,1)	51,5 (29,3-75,5)
Alteração Cromossômica	Latossolo	23,7 (14,4-38,7)	10,5 (7,2-17,7)
	Cambissolo	157,0 (112,5-217,4)	79,7 (52,7-112,9)
	ATS	12,3 (9,8-19,5)	7,9 (4,2-16,1)
NC	Latossolo	24,7 (13,8-37,8)	13,8 (9,8-20,8)
	Cambissolo	<270,0	<270,0
	ATS	62,7 (27,5-104,1)	44,3 (24,1-79,1)
MNC	Latossolo	13,8 (9,7-24,1)	6,9 (5,1-13,6)
	Cambissolo	14,5 (10,2-27,3)	8,2 (6,3-15,2)
	ATS	83,7 (65,7-115,1)	55,3 (34,3-79,1)
Broto	Latossolo	113,5 (98,2-135,1)	85,4 (62,7-102,1)
	Cambissolo	-	-
	ATS	64,7 (35,5-85,2)	25,8 (14,6-38,3)

(limite de confiança de 95%)

3.5 Frequência de Micronúcleos e Núcleo Condensados na região F1

Na região F1, localizada acima da meristemática que possuem células iniciando o processo de diferenciação, observou-se a presença de NC e MCN. Foi possível calcular os índices ecotoxicológicos para os três solos testados (Tabela 6).

Em relação aos NC, o ATS foi o solo que apresentou diferença de EC₅₀ e EC₂₅ para o controle em menores doses 11,8 mg kg⁻¹ e 7,9 mg kg⁻¹, respectivamente. Em seguida veio o Latossolo e por último o Cambissolo. Os MCN no ATS, apresentaram os menores valores, com 29,3 mg kg⁻¹ e 7,3 mg kg⁻¹ para EC₅₀ e EC₂₅, respectivamente. Seguidos pelo Latossolo, que apresentou o valor de EC₅₀ 31,2 mg kg⁻¹ e EC₂₅ 25,3 mg kg⁻¹. Os maiores valores foram obtidos no Cambissolo com 35,2 mg kg⁻¹ para EC₅₀ e 14,1 mg kg⁻¹ para EC₂₅ (Tabela 6).

A fragmentação do DNA é geralmente reparada por mecanismos de reparo celular, mas tem sido relatado que o As se liga a grupos sulfidril de importantes enzimas envolvidas no reparo e na expressão do DNA. Além disso, o As pode substituir o fósforo no DNA, interferindo também na ligação entre o eixo da mitose e o cromossomo (WU et al., 2010). Tal fato ressalta a alta toxicidade do As.

Os testes em células F1 para avaliar a fragmentação do DNA são considerados precisos e responsivos. O teste de MCN é o *endpoint* mais simples e confiável para a análise de efeitos mutagênicos causados por compostos químicos (SHIMIZU et al., 2000; VIEIRA e SILVEIRA, 2018). Se presentes nas células filhas, como foi observado e calculado os EC_{50} e EC_{25} , os MNC indicam efeitos mutagênicos devido ao fato de resultarem de danos que não foram reparados ou reparados incorretos nas células meristemáticas (ALVARENGA et al., 2019; LEME e MARIN-MORALES, 2008; VIEIRA e SILVEIRA, 2018). A manutenção dos MNC e a possibilidade de calcular os índices ecotoxicológicos na região F1 das células, corroboram as informações de Palmieri et al. (2016a), que afirmaram que as células F1 são apropriadas para avaliar danos em decorrência de compostos químicos.

No presente trabalho, a presença de MCN na região F1 e a possibilidade de obter valores de EC_{50} e EC_{25} para MCN induzido pelo As nos três solos, permitiu comprovar e avaliar a ação mutagênica do As. Além disso, existem poucas informações sobre os efeitos citogenotóxicos de plantas modelo cultivadas diretamente no solo contaminado. Portanto, tais informações são interessantes para a criação de um banco de dados para apoiar pesquisas futuras de países localizados em regiões tropicais.

Tabela 6: Concentração efetiva que resultara em inibição de 50% (EC₅₀) e concentração efetiva que resultara em inibição de 25% (EC₂₅) estimadas para núcleo condensado (NC) e micronúcleo (MNC) da região F1 das raízes de *A. cepa* expostas a solos (Latossolo, Cambissolo e solo tropical artificial (ATS)) contaminados com arsênio (As).

Espécie	Solo	EC ₅₀	EC ₂₅
		-----mg kg ⁻¹ -----	
NC	Latossolo	28,6 (15,8-39,4)	13,1 (9,4-21,6)
	Cambissolo	31,4 (24,3-55,6)	19,6 (15,9-26,8)
	ATS	11,8 (8,3-21,8)	7,9 (4,9-15,2)
MNC	Latossolo	31,2 (23,3-49,6)	25,3 (11,5-52,8)
	Cambissolo	35,2 (21,6-58,4)	14,1 (48,9-31,4)
	ATS	29,3 (19,8-57,2)	7,3 (5,7-16,4)

(limite de confiança de 95%)

3.6 Avaliação de Risco Ecotoxicológico

Em uma avaliação de risco ecotoxicológico, um ecossistema é considerado protegido quando as espécies em questão possuem 95% dos valores de EC₅₀ protegidos. Para tanto, com os valores de EC₅₀ que foi possível calcular, foram plotados gráficos de distribuição das espécies de acordo com a sensibilidade (SSD) e o valor de HC₅ derivado para As (Figuras 1 e 2). O HC₅ derivado para As com base nos resultados dos parâmetros macroscópicos e microscópicos para Latossolo e Cambissolo são mostrados na Figura 1, o valor estimado através da curva SSD foi de 11,87 mg As kg⁻¹ de solo seco.

Além disso, foi calculado o valor do HC₅ do Latossolo e Cambissolo excluindo os parâmetros microscópicos, ou seja, com base somente nos resultados macroscópicos, a fim de observar a influência dos dados microscópicos na curva de SSD, o valor de HC₅ obtido foi 25,75 mg As kg⁻¹ de solo seco (Figura 2).

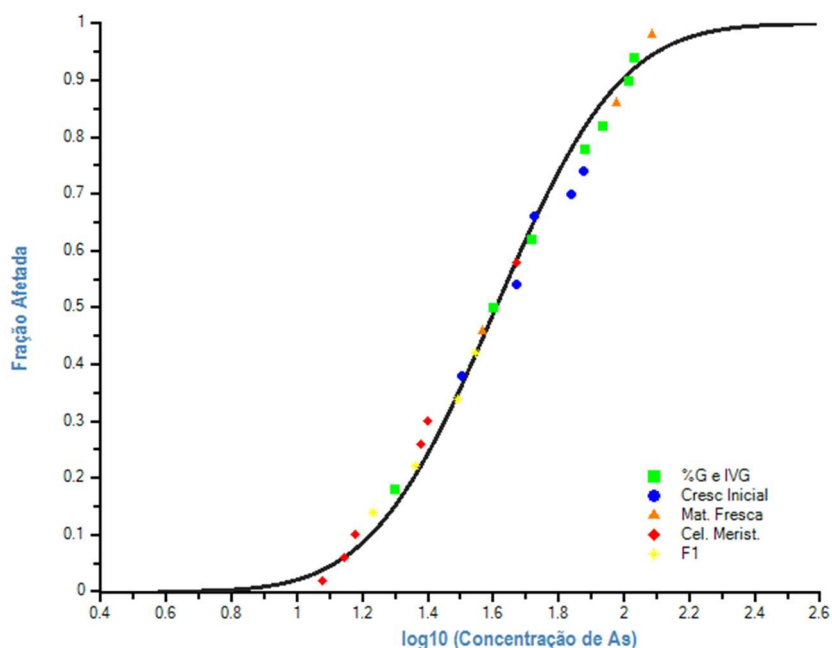


Figura 1: Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) e a concentração perigosa a 5% ou menos de todas as espécies vegetais testadas (HC_5) estimados a partir dos valores de EC_{50} (concentração efetiva que resultaram em inibição de 50%) usando os parâmetros macroscópicos e microscópicos das espécies de plantas cultivadas em Latossolo e Cambissolo contendo As.

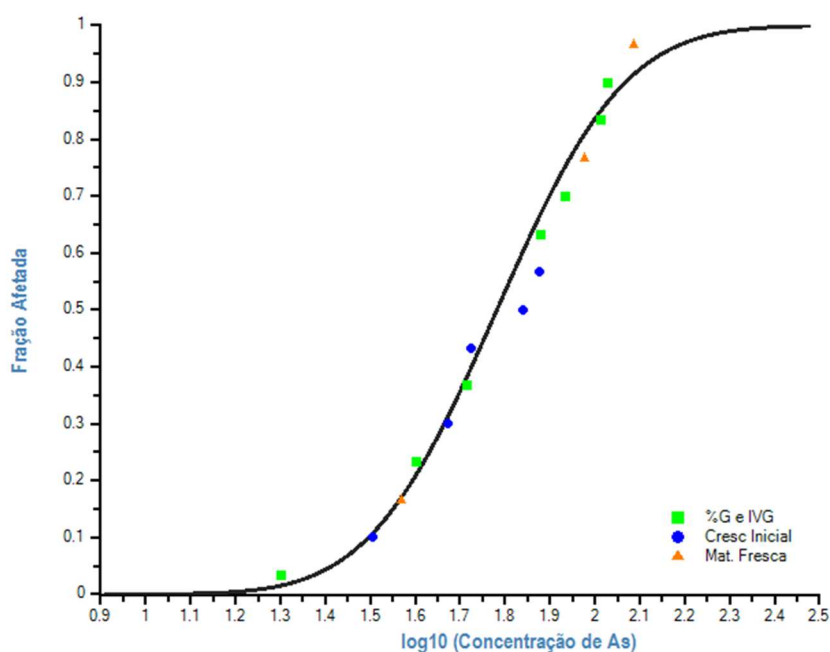


Figura 2: Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) e a concentração perigosa a 5% ou menos de todas as espécies vegetais testadas (HC_5) estimados a partir dos valores de EC_{50} (concentração efetiva que resultaram em inibição de 50%), usando somente os parâmetros macroscópicos das espécies de plantas cultivadas em Latossolo e Cambissolo contendo As.

Ao calcular o HC₅ não foram utilizados os valores dos resultados do ATS, uma vez que se trata de um substrato artificial utilizado somente para comparação com os solos naturais. O ATS disponibiliza maior concentração de As para as raízes das plantas, causando maior fitotoxicidade e menores valores de EC₅₀, o que resultaria em um menor valor de HC₅. Como os resultados do ATS não são encontrados na natureza, diminuiriam a confiabilidade dos resultados encontrados. Entende-se que tal conduta melhora a veracidade na avaliação dos impactos do As nas plantas.

Adotou-se então, no presente estudo o HC₅ calculado para Latossolo e Cambissolo. O valor de HC₅ obtido para Latossolo e Cambissolo com parâmetros macroscópicos e microscópicos, apesar de mais restritivo, é similar ao Valor de Prevenção (VP) atualmente adotado para As pelo Estado de Minas Gerais, 15 mg As kg⁻¹, indicando que tal metodologia pode ser útil, uma vez que é mais sustentável e os testes são mais rápidos, e contribuir com futuras avaliações.

Quando comparado o valor de HC₅ obtido utilizando os dados macroscópicos com o valor de HC₅ dos dados obtidos com os parâmetros macroscópicos e microscópicos é possível observar que as análises citogenéticas tornaram o resultado mais restritivo. Ou seja, o HC₅ com todos os parâmetros foi menor e, portanto, mais protetivo. Provavelmente isso é explicado pois, ao expor o organismo aos elementos-traço como o As, os distúrbios que se manifestam inicialmente são em nível molecular, podendo atingir até modificações celulares para, posteriormente, manifestar-se em órgãos, atingindo crescimento e desenvolvimento, quando os mesmos se tornam visíveis (FERNANDES et al., 2007).

E, acredita-se que a adição de novos parâmetros citogenéticos como variáveis adicionais para avaliar os riscos ecológicos de solos contaminados pode ser relevante para a melhoria da sensibilidade dos ensaios com plantas superiores. Os bioensaios utilizando as variáveis microscópicas para ensaios ecotoxicológicos, demonstram grande eficiência no monitoramento de poluentes ambientais, sendo importantes para avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade, permitindo dessa forma a avaliação simultânea de múltiplos mecanismos de ação de tais agentes (LEME e MARIN-MORALES, 2008).

Ao analisar os resultados obtidos no presente estudo e comparar com os resultados dos trabalhos realizados por Martins et al. (2019), em casa de vegetação com os mesmos solos com diferentes doses de As (8; 14,5; 26; 46,5; 84; 150 e 270 mg kg⁻¹), é possível comprovar a similaridade dos resultados. Mesmo utilizando-se

espécies distintas, os valores de HC₅ não foram tão distintos, no entanto, os encontrados aqui são mais protetivos. Acredita-se que tal fato ocorreu devido aos índices citogenéticos, que detectaram os danos antes dos mesmos se tornarem visíveis.

Portanto, a proposta de metodologia para fitotestes agudos em microplacas com parâmetros macroscópicos e microscópicos, demonstrou ser eficiente e adequada para avaliações ecotoxicológicas em solos contaminados com As. Ao acrescentar parâmetros citogenéticos em uma avaliação de risco, foi possível observar que tais índices tendem a ser mais sensíveis, derivando valores mais restritivos e protetivos, que a depender da situação, podem ser interessantes e deve ser considerado.

Tal correlação com o experimento em placas de Petri com os realizados em casa de vegetação são importantes por alguns aspectos: 1 - tempo de duração do teste: os testes realizados em casa de vegetação possuem duração mínima de 21 dias (OECD, 2006), enquanto o aqui realizado teve duração de 5 dias. Tal fato possibilita alcançar resultados mais rápidos. 2 - Quantidade de solo contaminado para realização do teste: o realizado em casa de vegetação necessita contaminar um volume muito maior de solo para preencher todos os vasos necessários, enquanto o protocolo aqui realizado reduz em mais de dez vezes a quantidade contaminada. 3 - Além dos parâmetros já avaliados em testes com plantas superiores, o protocolo aqui utilizado incrementou novas variáveis, relacionadas ao ciclo celular e fragmentação de DNA, as quais possibilitam a avaliação de possíveis efeitos mutagênicos.

4 Conclusões

Os resultados nos solos tropicais utilizados foram distintos, o ATS apresentou maior capacidade de disponibilizar o As a níveis prejudiciais, seguido do Latossolo e Cambissolo. As propriedades físico-químicas de cada solo, são essenciais para determinar o nível de fitotoxicidade do As. A sensibilidade das espécies testadas mostrou ser específica e, no geral, de todos os parâmetros avaliados, *L. sativa* e *A. cepa* foram espécies sensíveis e responsivas, indicando serem adequadas para este tipo de teste.

A metodologia para fitotestes agudos em microplacas com parâmetros macroscópicos e microscópicos, demonstrou ser eficiente e adequada para

avaliações ecotoxicológicas em solos contaminados, além de ser mais rápido e sustentável. Portanto, acredita-se que tal metodologia possa ser uma alternativa aos testes realizados em casa de vegetação. Além disso, restou comprovado que os resultados microscópicos são importantes para uma avaliação de risco, devido a variáveis relacionadas ao ciclo celular e fragmentação de DNA, que possibilitam a avaliação de possíveis efeitos mutagênicos. Nesse caso, deve ser considerado utilizar tais parâmetros de avaliação.

A resposta obtida na presente avaliação de risco ($HC_5 = 11,87 \text{ mg As kg}^{-1}$ de solo seco), apesar de mais restritiva, é similar ao Valor de Prevenção (VP) atualmente adotado para As pelo Estado de Minas Gerais indicando que tal metodologia pode ser útil, uma vez que é mais sustentável e os testes são mais rápidos, contribuindo ainda com futuras avaliações. Finalmente, o estudo utilizou uma metodologia válida e forneceu informações importantes que podem ser utilizadas nas avaliações ecotoxicológica para As em solos tropicais.

Referências

ALVARENGA, I. F. S. et al. Investigating arsenic toxicity in tropical soils: A cell cycle and DNA fragmentation approach. **Sci. Total Environ**, 698, 134272, 2019.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE CONTROL (ATSDR). The Priority List of Hazardous Substances **201**, 2017.

ALVES, P.R.L. et al. Ecotoxicological impact of arsenic on earthworms and collembolans as affected by attributes of a highly weathered tropical soil. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 25, 13217–13225, 2018.

CEDERGREEN, N. et al. Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on Kow or mode of action? **Aquat. Toxicol.** 71, 261–271, 2005.

CIMINELLI, V.S.T. et al. Dietary arsenic exposure in Brazil: The contribution of rice and beans. **Chemosphere** 168, 996–1003, 2017.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

D'AQUINO, L. et al. Effect of some light rare earth elements on seed germination, seedling growth and antioxidant metabolism in *Triticum durum*. **Chemosphere** 75, 900–905, 2009.

DAI, M. et al. Adsorption of As(V) inside the pores of porous hematite in water. **J. Hazard. Mater.** 307, 312–317, 2016.

DREWNIAK, L.; SKLODOWSKA, A. Arsenic-transforming microbes and their role in biomining processes. **Environmental Science and Pollution Research** 20, 7728–7739, 2013.

FARNESE, F.S. et al. Uptake arsenic by plants: Effects on mineral nutrition, growth and antioxidant capacity. **Idesia** (Arica) 32, 99–106, 2014.

FERNANDES, T.C.C., MAZZEO, D.E.C., MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic. Biochem. Physiol.** 88, 252–259, 2007.

FINNEGAN, P.M.; CHEN, W. Arsenic toxicity: The effects on plant metabolism. **Front. Physiol.** 3 jun, 1–18, 2012.

FREITAS, A.S.; FONTES CUNHA, I.M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V.H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 124, 426–434, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY OF RESEARCH ON CANCER (IARC). Agents classified by the iarc monographs, v. 1–123, 2019.

ISLAM, S.; RAHMAN, M.M.; ISLAM, M.R.; NAIDU, R. Arsenic accumulation in rice: Consequences of rice genotypes and management practices to reduce human health risk. **Environ. Int.** 96, 139–155, 2016.

ISO. INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 28 p. 2013.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION **ISO 11274:1998** Soil quality -- Determination of the water-retention characteristic -- Laboratory methods. Int. Organ. Stand, 1998.

KADER, M.; LAMB, D.T.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Sorption parameters as a predictor of arsenic phytotoxicity in Australian soils. **Geoderma** 265, 103–110, 2016.

KAUR, S. et al. Arsenic (As) inhibits radicle emergence and elongation in phaseolus aureus by altering starch-metabolizing enzymes vis-à-vis disruption of oxidative metabolism. **Biol. Trace Elem. Res.** 146, 360–368, 2012.

Kotelnikova, A. et al. Toxicity assay of lanthanum and cerium in solutions and soil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 167, 20–28, 2019.

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water-A case study. **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 650, 80–86, 2008.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, Mar. 1962.

MARTINS, G.C. et al. Assessing the Brazilian prevention value for soil arsenic: Effects on emergence and growth of plant species relevant to tropical agroecosystems. **Sci. Total Environ.** 694, 133663, 2019.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n°208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2019.

NARWAL, S. S.; SAMPIETRO, D. A.; CATALÁN, C. A. N. Chapter 1: Laboratory Bioassays in Allelopathy. In: NARWAL et al. (Org.). **Plant Bioassays**. Texas: Studium Press Houston, p. 3-20, 2009.

PALMIERI, M.J. et al. Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 133, 442–447, 2016a.

PALMIERI, M.J. et al. Cytogenotoxic Effects of Spent Pot Liner (SPL) and Its Main Components on Human Leukocytes and Meristematic Cells of *Allium cepa*. **Water. Air. Soil Pollut.** 227, 2016b.

PALMIERI, M.J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; DAVIDE, L.C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.** 763, 30–35, 2014.

PINHEIRO, G. S. et al. Efeito da temperatura sobre a germinação de sementes de cebola. **Scientia Plena.** Aracaju, v. 10, n. 11, 2014.

PITA-BARBOSA, A. Efeitos do arsênio em raízes de plântulas de *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae), 2009.

POSTHUMA, L.; SUTER II, G. W.; TRAAS, T. P. (Eds.). Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. New York: CRC press, 617 p. 2001

QUAGHEBEUR, M., RENGEL, Z. Arsenic uptake, translocation and speciation in pho1 and pho2 mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Physiol. Plant.** 120, 280–286, 2004.

REQUEJO, R., TENA, M. Proteome analysis of maize roots reveals that oxidative stress is a main contributing factor to plant arsenic toxicity. **Phytochemistry** 66, 1519–1528, 2005.

SHIMIZU, N., SHIMURA, T., TANAKA, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.** 448, 81–90, 2000.

SILVEIRA, G.L. et al. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere** 178, 359–367, 2017.

SINGH, A.P. et al. Salicylic acid modulates arsenic toxicity by reducing its root to shoot translocation in rice (*Oryza sativa* L.). **Front. Plant Sci.** 6, 1–12, 2015.

SRIVASTAVA, S., AKKARAKARAN, J.J., SUPRASANNA, P., D'SOUZA, S.F., 2013. Response of adenine and pyridine metabolism during germination and early seedling growth under arsenic stress in *Brassica juncea*. **Acta Physiol. Plant.** 35, 1081–1091, 2013.

SUSAN, A.; RAJENDRAN, K.; SATHYASIVAM, K.; KRISHNAN, U.M. An overview of plant-based interventions to ameliorate arsenic toxicity. **Biomedicine and Pharmacotherapy** 109, 838–852, 2019.

VIEIRA, L.F.A.; SILVEIRA, G.L. Cyto(Geno)Toxic Endpoints Assessed via Cell Cycle Bioassays in Plant Models. **Cytotoxicity**, 2018.

WANG, X.; PENG, B.; TAN, C.; MA, L., Rathinasabapathi, B. Recent advances in arsenic bioavailability, transport, and speciation in rice. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 22, 5742–5750, 2015.

WU, L.; YI, H.; YI, M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays. **J. Hazard. Mater.** 176, 952–956, 2010.

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Sci. Total Environ.** 383, 232–236, 2007.

ZHAO, F.-J.; MCGRATH, S.P.; MEHARG, A.A. Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. **Annu. Rev. Plant Biol.** 61, 535–559, 2010.