

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Renata Alice Campos

O ensaio de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: Variações metodológicas e influência sobre a qualidade dos resultados.

Juiz de Fora

2023

Renata Alice Campos

O ensaio de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: Variações metodológicas e influência sobre a qualidade dos resultados.

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Professor José Marcello Salabert de Campos.

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Alice Campos, Renata.

O ensaio de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: : Variações metodológicas e influência sobre a qualidade dos resultados. / Renata Alice Campos. -- 2023.

42 f.

Orientador: José Marcello Salabert de Campos

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas, 2023.

1. *Allium cepa* test. 2. Citogenotoxicidade. 3. Estatística. 4. Delineamento experimental. 5. Diretriz. I. Salabert de Campos, José Marcello, orient. II. Título.

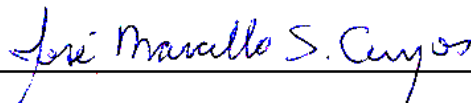
Renata Alice Campos

O ensaio de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.: Variações metodológicas e influência sobre a qualidade dos resultados.

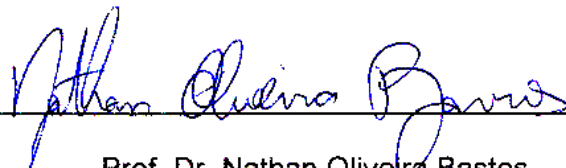
Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em 20 de janeiro de 2023

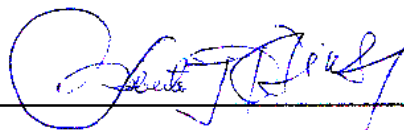
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr José Marcello Salabert de Campos - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Nathan Oliveira Bastos
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Roberto Junio Pedroso Dias
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico este trabalho aos meus pais, Mirian e Renato, afinal devo a vocês tudo que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, principalmente meus pais e minha irmã, Mirian, Luiz Renato e Ane Elise, por todo aporte, por toda ajuda financeira durante este período, por apoiarem minhas escolhas sejam elas quais forem, e obrigada por compreenderem os momentos de ausência dedicados aos estudos, espero poder retribuir vocês da melhor forma possível.

Ao meu orientador, José Marcello, por todo ensinamento, amizade e parceria durante esses anos. Sua paciência e dedicação em me auxiliar foram imprescindíveis para conclusão desta etapa. Obrigada por acreditar em mim e me direcionar a caminhar sempre em busca do meu sonho.

À minha parceira, Bárbara, compartilhar esta etapa com você tornou tudo mais leve. Afinal, não há nada melhor do que compartilhar uma conquista com quem se ama.

Às minhas amigas, Bruna, Ana Luiza e Carolina, Luízas e Lara, vocês se tornaram uma segunda família para mim, obrigada por todo companheirismo durante esses 4 anos de faculdade, os melhores momentos foram ao lado de vocês.

Aos demais, professores e parceiros de laboratório, pela troca de conhecimentos e por toda disponibilidade em ajudar quando necessário.

RESUMO

A mutagênese ambiental e a citogenotoxicidade são áreas que se preocupam com agentes químicos ou físicos com potencial de induzir danos citológicos e genéticos. Vários modelos biológicos têm sido utilizados para estudos de monitoramento ambiental, e *Allium cepa* L. é uma planta consagrada na avaliação de citogenotoxicidade. O método carece de uma diretriz, e uma ampla variação metodológica existe nos artigos, entre elas variações em delineamento e planejamento para análise estatística. Estas são importantes na obtenção de dados de qualidade essenciais para um bom teste de suas hipóteses. O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica, a fim de entender todas as variações encontradas no método e analisar qual o impacto destas variações na qualidade dos dados obtidos, e posteriormente, testar duas formas alternativas de análise estatística em um experimento de citogenotoxicidade em *A. cepa*. Para cada tratamento utilizado foram confeccionadas 9 lâminas sendo elas arranjadas de maneiras diferentes nas duas formas de análise. Na forma de análise A consideramos cada lâmina como uma repetição (9 repetições) e na forma de análise B consideramos a média da análise de cada 3 lâminas como uma repetição, onde tínhamos, então, 3 repetições. As lâminas que constituíram cada repetição foram previamente definidas. Nossa hipótese foi que a 2ª maneira de análise obteria melhores resultados e uma análise estatística mais robusta. Realmente a forma de análise B mostrou-se mais robusta, com maior F calculado na Análise de Variância, menor estimativa de erro experimental e maior detecção de diferenças entre médias nos testes de Tukey e Dunnett (todos os testes realizados a $p < 0,05$). No teste de Tukey a d.m.s. (diferença mínima significativa) foi menor no uso de 3 repetições (2,02) em comparação com o uso de 9 repetições (d.m.s = 2,80). No teste de Dunnett a redução de d.m.s. foi ainda maior (1,70 para o uso de 3 repetições em comparação com 2,33 no uso de 9 repetições). Em relação à obtenção das médias e desvios padrões dos tratamentos também percebemos a vantagem de se adotar a forma de análise B. Esta reduziu em 59,25% os valores médios entre tratamentos do desvio padrão, diminuindo conseqüentemente a estimativa de erro experimental. No entanto, as observações levantadas, não parecem ser conclusivas e não parecem funcionar para qualquer número de tratamentos, por essa razão continuamos investindo esforços para melhor compreensão destes métodos de análise.

Palavras-chave: Planejamento experimental. Delineamento experimental. Impacto em qualidade estatística. Mutagênese ambiental. Genotoxicidade em *Allium*. Teste em *Allium*.

ABSTRACT

Environmental mutagenesis and cytogenotoxicity are areas that are concerned with chemical or physical agents with the potential to induce cytological and genetic damage. Several biological models have been used for environmental monitoring studies, and *Allium cepa* L. is a consecrated plant in the evaluation of cytogenotoxicity. The method lacks guidelines, and a wide methodological variation exists in the articles, including variations in design and planning for statistical analysis. These are important in obtaining quality data essential to a good test of your hypotheses. The objective of this work was to perform a bibliographic review in order to understand all the variations found in the method and analyze the impact of these variations on the quality of the data obtained, and later to test two alternative forms of statistical analysis in a cytogenotoxicity experiment in *A. cepa*. For each treatment used, 9 slides were made and arranged in different ways in the two forms of analysis. In the form of analysis A we considered each slide as a repetition (9 repetitions) and in the form of analysis B we considered the mean analysis of each 3 slides as a repetition, where we had, then, 3 repetitions. The slides that constituted each repetition were previously defined. Our hypothesis was that the 2nd way of analysis would obtain better results and a more robust statistical analysis. Actually, the form of analysis B was more robust, with higher F calculated in the Variance Analysis, lower estimate of experimental error and greater detection of differences between means in the Tukey and Dunnett tests (all tests performed at $p < 0.05$). In the Tukey test, the d.m.s. (significant minimum difference) was lower in the use of 3 repetitions (2.02) compared to the use of 9 repetitions (d.m.s = 2.80). In Dunnett's test, the reduction of d.m.s. was even greater (1.70 for the use of 3 repetitions compared to 2.33 in the use of 9 repetitions). Regarding the achievement of the means and standard deviations of the treatments, we also perceived the advantage of adopting the form of analysis B. This reduced by 59.25% the mean values between treatments of the standard deviation, consequently reducing the estimate of experimental error. However, the observations raised do not seem to be conclusive and do not seem to work for any number of treatments, so we continue to make efforts to better understand these methods of analysis.

Keywords: Experimental planning. Experimental design. Impact on statistical quality. Environmental mutagenesis. *Allium* genotoxicity. *Allium* test

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Percentual total de alterações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> L. após exposição à concentrações de NaCl (Forma de análise A).....	22
Gráfico 2 - Percentual total de alterações cromossômicas em <i>Allium cepa</i> L. após exposição à concentrações de NaCl (forma de análise B).....	24
Gráfico 3 – Percentual total de alterações cromossômicas (dados do tratamento de 500 mM com NaCl).....	24
Gráfico 4 – Distribuição dos artigos por periódicos científicos e fatores de impacto dos mesmos.....	27
Gráfico 5 – Distribuição dos artigos por categorias de fator de impacto (FI).....	28
Gráfico 6 – Número de repetições empregadas na montagem do experimento nos diferentes artigos levantados na revisão bibliográfica sobre o ensaio em <i>Allium cepa</i> L. entre 2019 e 2022.....	29
Gráfico 7 – Número de células avaliadas por repetição nos diferentes artigos levantados na revisão bibliográfica sobre o ensaio em <i>Allium cepa</i> L. entre 2019 e 2022.....	29
Gráfico 8 – Percentual (+ DP) de subpartículas-G1 após exposição à concentrações de atrazina avaliadas por citometria de fluxo no ensaio de <i>Allium cepa</i> L.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variações metodológicas no ensaio de Allium cepa L. considerando 5 artigos publicados recentemente.....	18
Tabela 2 – Percentual de alterações cromossômicas nos diferentes tratamentos avaliados no ensaio de Allium cepa L. por Oliveira-Carvalho e Campos (submetido) após exposição à concentrações de NaCl.....	22
Tabela 3 – Percentual de alterações cromossômicas nos diferentes tratamentos avaliados no ensaio de Allium cepa L. por Oliveira-Carvalho e Campos (submetido) após exposição à concentrações de NaCl.....	23
Tabela 4 – Médias de subpartículas-G1 após exposição à diferentes concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., (2023).....	30
Tabela 5 – Resultados de Análise de Variância nas duas formas testadas de repetições no experimento de Souza et al., (2023).....	31
Tabela 6 – Diferenças entre médias dos tratamentos de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., (2023). Análise pela forma A (9 lâminas/9 repetições).....	32
Tabela 7 - Diferenças entre médias dos tratamentos de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., (2023). Análise pela forma B (9 lâminas/3 repetições).....	33
Tabela 8 – Diferenças entre médias dos tratamentos em relação ao controle negativo de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., (2023).....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

9I/3I	9 lâminas, considerando cada uma uma repetição (9 repetições).
9I/9r	9 lâminas, considerando cada conjunto de 3 lâminas uma repetição (3 repetições).
CN	Controle negativo.
CP	Controle positivo.
CV	Coeficiente de variação.
d.m.s.	Diferença mínima significativa.
DIC	Delineamento inteiramente ao acaso.
DP	Desvio Padrão.
F	Estatística-F.
FI	Fator de impacto.
FV	Fontes de variação.
G	Gramas.
GCM-UFJF	Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagenese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora-MG.
GL	Graus de liberdade
L	Litro
n°	Número
PBAT	<i>poly(butylene adipate-co-terephthalate)-PBAT mulch films.</i>
QM	Quadrado Médio
SIC	Sem informações claras
SQ	Soma de quadrados

LISTA DE SÍMBOLOS

μ	Micro
m	Mili

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Ecotoxicologia e Mutagênese ambiental (citogenotoxicidade).....	14
1.2 O ensaio de citogenotoxicidade em <i>Allium cepa</i> L.....	14
1.3 Variações metodológicas no ensaio de <i>Allium cepa</i> L.....	16
1.4 Considerações sobre delineamento e estatística.....	19
2 OBJETIVOS.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Revisão bibliográfica.....	25
3.2 Análise estatística de dados em trabalho previamente publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora), utilizando o modelo de <i>Allium cepa</i> L.....	26
4 RESULTADOS.....	27
4.1 Revisão bibliográfica.....	27
4.1.1 Dados gerais relacionados à distribuição dos artigos.....	27
4.1.2 Variações metodológicas.....	28
4.2 Análise estatística de dados em trabalho previamente publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora), utilizando o modelo de <i>Allium cepa</i> L.....	30
5 Discussão.....	34
6 Referências.....	39

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ecotoxicologia e Mutagênese ambiental (citogenotoxicidade).

A ecotoxicologia é uma área da ciência que se atenta ao estudo da exposição, acumulação e o efeito negativo da presença de agentes estressores no ambiente. A análise destes efeitos pode ser realizada em diferentes escalas, desde o efeito sobre moléculas e células até níveis maiores como o ecossistema (TLILI; MOUNEYRAC, 2021). A ecotoxicologia é uma área de estudo multidisciplinar e entre as suas sub-áreas está a mutagênese ambiental, também chamada de citogenotoxicidade. O conceito de citogenotoxicidade está relacionado com a presença de agentes químicos ou físicos, capazes de induzir danos citológicos ou genéticos (CHOUDHURI et al., 2021). Vários modelos biológicos estão disponíveis para o acesso a efeitos citogenotóxicos de agentes químicos ou físicos, tais como: *Salmonella* (EL MZIBRI et al., 1996), *Drosophila* (REYES-RODRÍGUEZ et al., 2021), *Danio rerio* (CANEDO et al., 2021), ratos ou camundongos (DE OLIVEIRA et al., 2021; GUO et al., 2022), células humanas (BALAJEE; HADJIDEKOVA, 2021; JIRSOVA et al., 2021; MIŠÍK et al., 2021), entre outros.

As plantas superiores também têm se apresentado como excelentes modelos de avaliação de citogenotoxicidade, tais como *Allium cepa* (PANDEY; KUMAR, 2021), *Vicia faba* (BASU; TRIPURA, 2021), *Zea mays* (HEMANTH KUMAR; JAGANNATH, 2020), *Tradescantia* (CAMPOS et al., 2020), *Nicotiana tabacum* (GHOSH et al., 2016), *Crepis capilaris* (GADEVA; DIMITROV, 2008) e *Hordeum vulgare* (YUN et al., 2019).

1.2 O ensaio de citogenotoxicidade em *Allium cepa* L.

Allium cepa L. é um dos modelos mais consagrados na avaliação de citogenotoxicidade (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Estes autores apresentam uma excelente revisão sobre o método em *A. cepa*. No ensaio, expomos os meristemas radiculares obtidos de raízes coletadas a partir de sementes ou bulbos. As variáveis analisadas são: variações no comportamento do ciclo celular, presença de alterações cromossômicas/micronúcleos e evidências de morte celular (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

O ensaio de *A. cepa* tem uma longa história na literatura científica. O método foi introduzido por Albert Levan em 1938 (LEVAN, 1938). Levan estudou o mecanismo de ação da colchicina sobre o fuso mitótico. Desde então, o método tem passado por algumas modificações. Geirid Fiskesjo em 1985, sugeriu a primeira modificação no ensaio em *A. cepa* (FISKESJO, 1985). O autor foi o pioneiro em propor o uso do ensaio como uma metodologia para monitoramento ambiental. A planta de *A. cepa* apresenta uma série de vantagens, tais como: fácil armazenamento e manejo, boas condições cromossômicas para análise (cromossomos grandes e em pequeno número), baixo custo e boa correlação com outros sistemas teste, mesmo em mamíferos. O autor também fez a proposta de ajustes na avaliação de compostos insolúveis e misturas complexas (FISKESJO, 1985). Jate Rank e Mette Hviid Nielsen em 1993, fizeram a proposta de um protocolo modificado para a avaliação de alterações cromossômicas, apresentando um método de avaliação somente de anáfases e telófases (100 por bulbo), pontes cromossômicas, fragmentos e cromossomos perdidos. A proposta destes autores estava em contradição com a prática comum nesta época, onde as outras fases da divisão celular também eram avaliadas e pontes, perdas cromossômicas, fragmentos, c-metáfase e cromossomos aderentes eram quantificados. De acordo com estes autores, era recomendado o uso deste ensaio modificado para a avaliação de citogenotoxicidade (RANK; NIELSEN, 1993). Em um artigo publicado em 1995, os autores apresentaram uma posição contrária à proposta publicada por Rank e Nielsen (1993) de avaliação de diversas alterações cromossômicas. Estes autores fizeram a proposta de avaliação somente de um tipo de alteração conhecida como micronúcleo e em células F1 ao contrário das células meristemáticas geralmente avaliadas (MA et. al, 1995). De acordo com Ma et al. (1995), entre todas as variáveis possivelmente avaliadas no ensaio, os micronúcleos seriam um indicador mais efetivo e simples para avaliar citogenotoxicidade. Contudo, Rank e Nielsen apresentaram uma opinião diferente, pois eles acreditavam que a avaliação mais ampla de alterações cromossômicas tornaria mais eficiente o entendimento do mecanismo de ação do agente poluente em análise (RANK; NIELSEN, 1997).

Na história de desenvolvimento do ensaio em *A. cepa* diversos outros trabalhos contribuíram. Geirid Fiskesjo apresentou o ensaio como uma alternativa para avaliação do efeito tóxico de metais pesados. Grant, (1994) publicou um excelente artigo de revisão intitulado "Present status of higher plant bioassays for the detection

of environmental mutagens”. O trabalho “Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater” foi publicado também em 1994 (RANK; NIELSEN, 1994).

Nos 84 anos de história do ensaio, vários agentes mutagênicos foram avaliados, tais como: metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, corantes da indústria têxtil, produtos de limpeza, misturas complexas (amostras de águas e solos, efluentes municipais e industriais, esgoto), poluição nuclear, radiação emitida por celular, dentre outros (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Mais recentemente, o ensaio tem sido utilizado na avaliação de nanopartículas (VIJEATA et al., 2022), extratos de plantas medicinais (BASU; TRIPURA, 2021), extratos líquênicos (PROKOPIEV; SLEPTSOV; FILIPPOVA, 2021), solo tratado com vermicompostagem (DATTA et al., 2018), conservantes alimentares (PANDEY; KUMAR, 2021), corantes alimentares (KHAN et al., 2020), corantes para cabelo (MONDAL; DEBNATH, 2022), fármacos (HARINI et al., 2022); microplásticos (MONDAL et al., 2022), compostos fenólicos (LIMAN; CIĞERCI; GÖKÇE, 2018), PBAT (SOUZA et al., 2020), resíduos de minas (QUADRA et al., 2019) e diversos outros contaminantes emergentes.

1.3 Variações metodológicas no ensaio de *Allium cepa* L.

Embora o ensaio em *Allium cepa* L. seja muito utilizado na literatura como um método de pesquisa, ele carece de um *guideline*. Com isso, a variação metodológica empregada no método é grande, o que dificulta muitas vezes o entendimento de trabalhos e a comparação de resultados entre estes diferentes estudos. Muito pouco avanço foi alcançado neste sentido. Usando como exemplo 5 trabalhos publicados recentemente (ALAGUPRATHANA et al., 2022; ANUSHA et al., 2023; DHAR et al., 2023; SOUZA et al., 2023; ZEYAD; KHAN; MALIK, 2022) podemos perceber esta variação (Tabela 1). Diversos aspectos metodológicos variam, tais como: **planejamento e delineamento experimental** (material de *A. cepa*, delineamento experimental, nº de repetições, especificação do representa a repetição, nº de células avaliadas por repetição e tratamento e planejamento para análise estatística); **variáveis envolvidas na montagem do experimento** (temperatura de germinação, fotoperíodo, pré-exposição de materiais de *A. cepa* e tempo de exposição, tamanho das raízes coletadas para tratamento, tempo de exposição aos agentes testados,

tempos de recuperação e fixação); **variáveis envolvidas na avaliação experimental** (técnica de preparo das lâminas, coloração da lâmina, corante e tempo, variáveis analisadas no ensaio, qualidade das figuras representativas das alterações cromossômicas e análise estatística).

Tabela 1 – Variações metodológicas no ensaio de *Allium cepa* L. considerando 5 artigos publicados recentemente.

Variações metodológicas	Artigos				
	Anusha et al., 2023	Dhar et al., 2023	Souza et al., 2023	Alaguprathana et al., 2022	Zeayd e Malik, 2022
Material de <i>Allium cepa</i>	Bulbos	Bulbos	Sementes	Bulbos	Bulbos
Delineamento experimental	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito	Não descrito
Número de repetições	8	3 bulbos ^(a)	10	5	3
Especificação do que é a repetição	Lâminas	? ^(b)	Lâminas	Lâminas	Lâminas
Número de células avaliadas por repetições	400 células para IM e IFases. 100 células para anormalidades cromossômicas	Não descrito	100	1000 células	2000 células para IM 100 células para alterações cromossômicas
Número de células avaliadas por tratamento	3200 para IM e IFases. 800 para anormalidades cromossômicas	Não descrito	1000	5000 células	6000 células para IM 300 células para alterações cromossômicas
Análise estatística	ANOVA-Tukey Kruskal-Wallis-Duns	ANOVA-Tukey	Mann-Whitney	Não descrito	ANOVA-Duncan

Outras variações^(c)

^(a) É comentado sobre a utilização de 3 bulbos por tratamento, entretanto, não fica claro se estes 3 bulbos constituem 3 repetições. Mesmo que os bulbos representassem as repetições, deveríamos ter a informação do número de lâminas confeccionadas a partir de cada bulbo.

^(b) Como comentado acima, fica difícil a compreensão do que é a repetição do ensaio.

^(c) Material de *A. cepa*, delineamento experimental, número de repetições, especificação do que é a repetição, número de células avaliadas por repetição, número de células avaliadas por tratamento, planejamento para análise estatística, temperatura de germinação, fotoperíodo, pré-exposição de materiais de *A. cepa*, tempo de exposição, tamanho das raízes coletadas para tratamento, tempo de exposição aos agentes testados, tempos de recuperação, fixação, técnica de preparo das lâminas, coloração da lâmina, corante e tempo, variáveis analisadas no ensaio, qualidade das figuras representativas das alterações cromossômicas e análise estatística.

Embora as variações metodológicas sejam extensas, neste trabalho trataremos apenas das variações envolvidas no planejamento e delineamento experimental.

1.4 Considerações sobre delineamento e estatística.

Na experimentação de qualidade é essencial lidar diariamente com fatores importantes, tais como, planejamento e delineamento experimental e a análise dos resultados com testes estatísticos robustos, que permitam um entendimento claro dos efeitos avaliados (RAMALHO et. al., 2012).

Quando trabalhamos com o ensaio em *Allium cepa* L. na avaliação de impacto ambiental, é necessário o conhecimento prévio do agente poluente a ser investigado, quais concentrações devem ser testadas (trabalhando com concentrações ambientalmente relevantes, como obter estas concentrações (em que diluente, temperatura, entre outros fatores) (FISKESJO, 1985; GRANT et al., 1994; LEME E MARIN-MORALES, 2009; LEVAN, 1938; MA et al., 1995; RANK; NIELSEN, 1993; RANK; NIELSEN, 1994; RANK; NIELSEN, 1997). É essencial o planejamento de coletas (quando estas são necessárias), frascos para coleta, etiquetas, caixas de acondicionamento, regiões de acesso aos pontos de coleta, veículos e detalhes do transporte das amostras coletadas e o seu correto armazenamento (FILIZOLA et al., 2006). Planejar a montagem do experimento no Laboratório é também extremamente importante. Poderíamos citar diversos outros fatores, mas o recado é que uma boa leitura e o acúmulo de conhecimento antes da bancada são elementos importantes no sucesso de um experimento (BARKER, 2002).

Toda experimentação visa ao teste de uma hipótese, teste este que só pode ser realizado quando estimamos o que é chamado de erro experimental (RAMALHO et al., 2012). O erro só pode ser medido se os tratamentos forem repetidos. Neste contexto, temos um dos princípios básicos da experimentação, as repetições. É fácil entender que o teste das hipóteses será tanto mais preciso quanto menor for a estimativa do erro experimental que, em realidade, reflete a variância da média dentro dos tratamentos. O uso de um número adequado de repetições possibilita boa estimativa do erro experimental, melhorando a precisão da estimativa das médias, além de melhorar o poder dos testes estatísticos (RAMALHO et. al., 2012).

Há vários fatores que interferem no número de repetições de um experimento, como o número de tratamentos (experimentos com poucos tratamentos necessitam de um maior número de repetições); disponibilidade de material experimental; disponibilidade de area experimental (RAMALHO et. al., 2012).

Aqui precisamos fazer uma consideração importante sobre as médias, que são medidas fortemente influenciadas pela existência de *outliers*. *Outliers* com valores altos em comparação com os demais podem jogar a sua média para cima e o contrário também é verdadeiro. A inclusão destes *outliers* em sua análise estatística, pode jogar os seus valores de desvio padrão para o alto (em relação às médias dos tratamentos), aumentando consideravelmente o seu erro experimental e, portanto, diminuindo a eficiência do seu teste estatístico (FREEMAN, 1995).

Em trabalho realizado pelo Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora (OLIVEIRA-CARVALHO; CAMPOS, submetido), tomamos como exemplo os dados de avaliação do percentual total de alterações cromossômicas, como exposto na Tabela 2. Para cada tratamento investigado, nosso Grupo de Pesquisa costuma avaliar 9 lâminas para estimação dos parâmetros no ensaio de *A. cepa*. Considere que utilizamos cada lâmina no nosso experimento como uma repetição, ou seja teríamos 9 repetições por tratamento (**vamos chamar essa forma de análise de A ou 9I/9r**). Note que os coeficientes de variação (CV) dos tratamentos variam entre 13,33% a 21,65% (Tabela 2). É uma medida útil para perceber a variabilidade de observações entre as repetições. No Gráfico 1, percebemos estes mesmos dados onde demonstramos as médias com seus respectivos desvios padrões (DP). Note que os desvios padrões (DP) são relativamente altos, juntamente com os coeficientes de variação (CV) de cada tratamento. Ao realizarmos a análise estatística isto tem um impacto negativamente forte na estimativa do erro experimental.

E se tivéssemos planejado o nosso experimento de uma outra maneira? Considere que antes da realização do experimento o planejamento tivesse sido também a confecção de 9 lâminas por tratamento, mas com a diferença que estas fossem divididas em apenas 3 repetições, sendo cada uma delas obtida da média de 3 lâminas analisadas (**vamos chamar esta forma de análise de B ou 9I/3r**). Considere que a lâmina 1, 2 e 3 representasse a repetição 1, as lâminas 4, 5 e 6 a repetição 2 e as lâminas 7, 8 e 9 a repetição 3. A Tabela 3 demonstra como ficaria a nossa análise em conjunto com o Gráfico 2.

É possível perceber que os desvios padrões (DP) (entre 0,09 e 0,41) e os coeficientes de variação (CV) (entre 1,58 e 12,00) diminuem substancialmente quando adotamos a forma B de análise dos dados (9 lâminas, divididas em 3 repetições, sendo cada repetição obtida da média da observação de 3 lâminas) (Tabela 3). No entanto, as médias dos tratamentos não se alteram. Esta estratégia de montagem do experimento demonstra que conseguimos diluir o efeito prejudicial de *outliers*. A consequência é que a estimativa de erro experimental do seu experimento irá cair, aumentando o poder de detecção de significância do teste estatístico empregado por você.

Tabela 2 – Percentual de alterações cromossômicas nos diferentes tratamentos avaliados no ensaio de *Allium cepa* L. por Oliveira-Carvalho e Campos, (submetido) após exposição a concentrações de NaCl.

Tratamentos	Repetições (lâminas)									Média	DP	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
500 mM	8,70	9,30	6,20	6,90	9,10	8,60	9,11	9,02	7,00	8,21	1,18	14,31
250 mM	7,31	6,12	5,93	7,67	5,13	8,01	7,15	7,45	7,03	6,87	0,94	13,66
125 mM	5,67	5,34	5,87	4,21	6,02	6,87	6,31	5,12	5,99	5,71	0,76	13,33
62,5 mM	1,99	3,23	3,78	3,21	3,24	3,89	4,78	3,45	3,23	3,42	0,74	21,65
Controle	2,23	1,77	3,02	1,66	2,78	2,65	2,89	2,97	2,13	2,46	0,52	21,23

DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação.

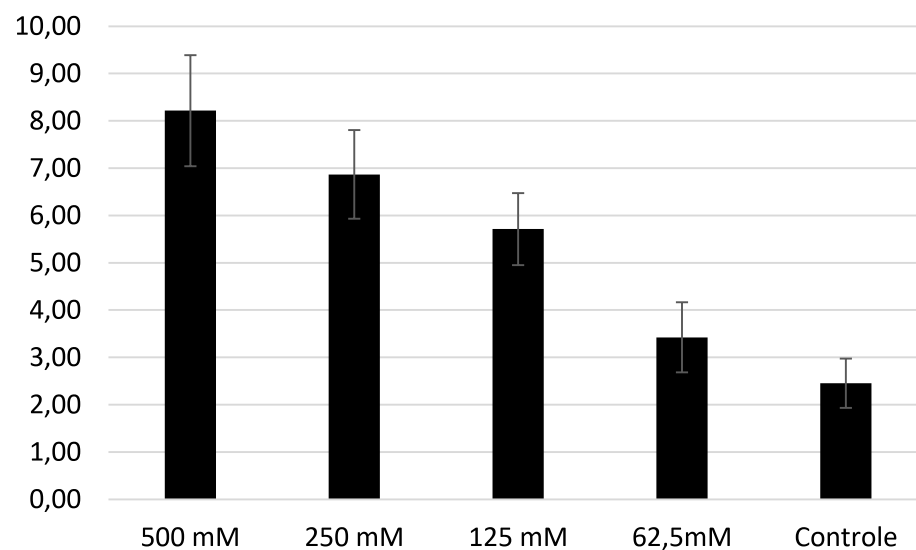


Gráfico 1 – Percentual total de alterações cromossômicas em *Allium cepa* L. após exposição a concentrações de NaCl. Dados de Oliveira-Carvalho e Campos, (submetido).

Tabela 3 – Percentual de alterações cromossômicas nos diferentes tratamentos avaliados no ensaio de *Allium cepa* L. por Oliveira-Carvalho e Campos, (submetido) após exposição a concentrações de NaCl.

Tratamentos	Lâminas									Média	DP	CV
	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
	Repetições									Média	DP	CV
	R1			R2			R3					
500 mM	8,70	9,30	6,20	6,90	9,10	8,60	9,11	9,02	7,00			
Média		8,07			8,20			8,38		8,21	0,16	1,89
250 mM	7,31	6,12	5,93	7,67	5,13	8,01	7,15	7,45	7,03			
Média		6,45			6,94			7,21		6,87	0,38	5,58
125 mM	5,67	5,34	5,87	4,21	6,02	6,87	6,31	5,12	5,99			
Média		5,63			5,70			5,81		5,71	0,09	1,58
62,5 mM	1,99	3,23	3,78	3,21	3,24	3,89	4,78	3,45	3,23			
Média		3,00			3,45			3,82		3,42	0,41	12,00
Controle	2,23	1,77	3,02	1,66	2,78	2,65	2,89	2,97	2,13			
Média		2,34			2,36			2,66		2,46	0,18	7,34

DP – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de variação

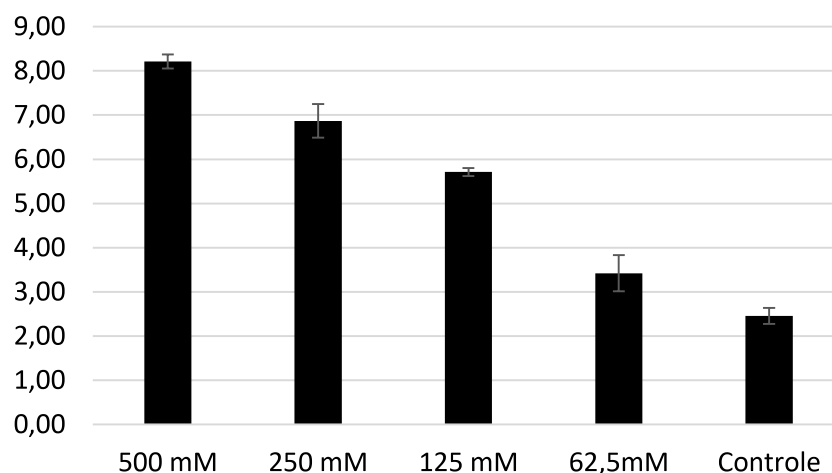


Gráfico 2 – Percentual total de alterações cromossômicas em *Allium cepa* L. após exposição a concentrações de NaCl. Dados de Oliveira-Carvalho e Campos, (submetido).

Quando comparamos os dados do tratamento de 500mM de NaCl nas duas situações de análise estatística (A e B), podemos verificar a contribuição da situação B em diminuir (ou diluir) o efeito de *outliers* (Gráfico 3). Na forma de análise A (com 9 lâminas, considerando 9 repetições) os dados se dispersam muito mais em relação à média de 8,21 (Gráfico 3a). Na forma de análise B (com 9 lâminas, divididas em três repetições, sendo cada repetição obtida da média da observação de 3 lâminas) os dados se dispersam muito menos em relação à média de 8,21 (Gráfico 3b). O mesmo comportamento demonstrado no Gráfico 3 para o tratamento de 500mM de NaCl, vale para qualquer outro tratamento.

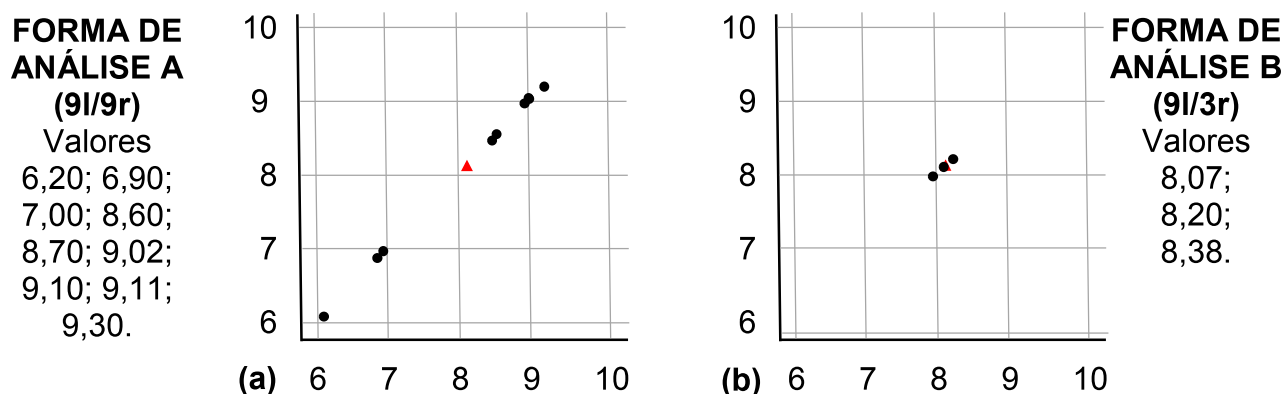


Gráfico 3 – Percentual total de alterações cromossômicas (dados do tratamento de 500mM com NaCl observados no trabalho Carvalho-Oliveira e Campos, (submetido). Formas diferentes de dispersão dos dados nas duas formas de análise alternativas, A (9 lâminas considerando 9 repetições) (a) e B (9 lâminas, divididas em três repetições, sendo cada repetição obtida da média da observação de 3 lâminas) (b). Média (8,21%) demonstrada pelo triângulo vermelho.

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram:

- a) Realizar uma revisão bibliográfica entre os anos de 2019 a 2022 e entender todas as variações metodológicas descritas na Tabela 1 (legenda ^(c)) e analisar o impacto destas variações na qualidade dos dados obtidos no ensaio de *Allium cepa* L. Embora as variações metodológicas sejam extensas, neste trabalho trataremos apenas das variações envolvidas no planejamento e delineamento experimental.
- b) Testar duas diferentes formas de análise estatística (A – 9 lâminas considerando 9 repetições; B – 9 lâminas, divididas em 3 repetições, sendo cada repetição obtida da média da observação de 3 lâminas) em um trabalho publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Revisão bibliográfica

A revisão bibliográfica foi realizada no bando de dados da Science Direct (Elsevier), onde se encontra as melhores revistas para publicação de artigos relacionados ao ensaio de *Allium cepa* L..

As seguintes palavras-chave foram utilizadas: *Allium* test, *Allium* genotoxicity, *Allium* cytogenotoxicity, *Allium* cytotoxicity, *Allium* chromosomal abnormalities, *Allium* chromosomal aberrations, *Allium* assay, *Allium* mutagenicity, *Allium cepa* model, *Allium* comet assay, *Allium* micronuclei, *Allium* DNA damage, *Allium* mitotic index, genotoxicity in plants, cytogenotoxicity in plants, cytotoxicity in plants, chromosomal abnormalities in plants, chromosomal aberrations in plants, mutagenicity in plants, comet assay in plants, micronuclei in plants, DNA damage in plants, mitotic index in plants.

Os artigos levantados foram codificados por números inteiros crescentes (1, 2, 3..., n). Mantemos neste trabalho o sigilo sobre estes artigos.

3.2 Análise estatística de dados em trabalho previamente publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora), utilizando o modelo de *Allium cepa* L.

Um trabalho previamente publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora) com o emprego do ensaio em *Allium cepa* L. foi utilizado na avaliação das duas formas de análise estatística dos dados (**A** – 9 lâminas/9 repetições e **B** – 9 lâminas/3 repetições obtidas da média da análise de 3 lâminas).

Neste trabalho, Souza et al., (2023) avaliaram o efeito ecogenotóxico de concentrações ambientalmente relevantes de atrazina. A citometria de fluxo em núcleos meristemáticos de *A. cepa* foi realizada por nosso Grupo de Pesquisa e os dados de partículas sub-G1 foram avaliados nas duas formas de análise estatística (A e B).

4 RESULTADOS

4.1 Revisão bibliográfica

4.1.1 Dados gerais relacionados à distribuição dos artigos.

Na revisão bibliográfica realizada entre os anos de 2019 e 2022, foram levantados 117 artigos (codificados pelos números entre 1 e 117). A distribuição destes artigos por periódicos científicos é demonstrada no Gráfico 4.

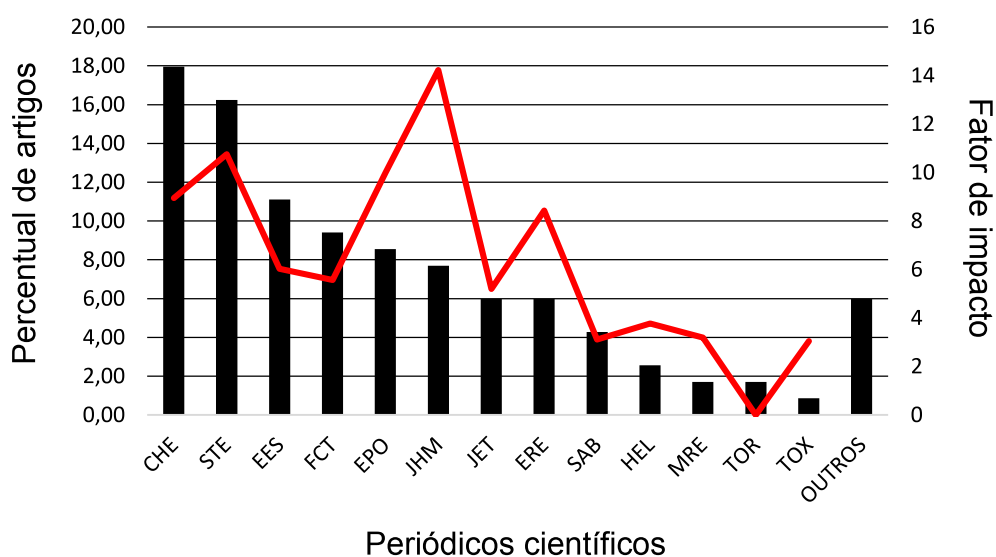


Gráfico 4 – Distribuição dos artigos por periódicos científicos e fatores de impacto dos mesmos. No eixo da esquerda (dados observados pelas barras), os percentuais de artigos por cada periódico científico. No eixo da direita (dados observados pela linha em vermelho), os fatores de impacto de cada periódico científico. Periódicos científicos: CHE – Chemosphere; STE – Science of the Total Environment; EES – Ecotoxicology and Environmental Science; FCT – Food and Chemical Toxicology; EPO – Environmental Pollution; JHM – Journal of Hazardous Materials; JET – Journal of Ethnopharmacology; ERE – Environmental Research; SAB – South African Journal of Botany; HEL – Helyon; MRE – Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis); TOR – Toxicology Reports; TOX – Toxicon.

A partir destes dados, podemos perceber a distribuição dos artigos nas seguintes faixas de fatores de impacto (Faixa 1 – de 3,0 a 5,0; Faixa 2 – de 5,1 a 7,1; Faixa 3 – 7,2 a 9,2; Faixa 4 – 9,3 a 11,3; Faixa 5 – acima de 11,4). Os resultados são demonstrados no Gráfico 5.

Percebemos que mais da metade dos artigos (58%) estão em revistas com fator de impacto acima de 7,2, sendo o fator de impacto médio destas publicações de

10,2. Todos os artigos incluídos nesta categoria são classificados no extrato A1 nas áreas de avaliação Ciências Ambientais e Ciências Biológicas I.

Notamos então a possibilidade de publicações de alto nível utilizando o ensaio de *Allium cepa* L.

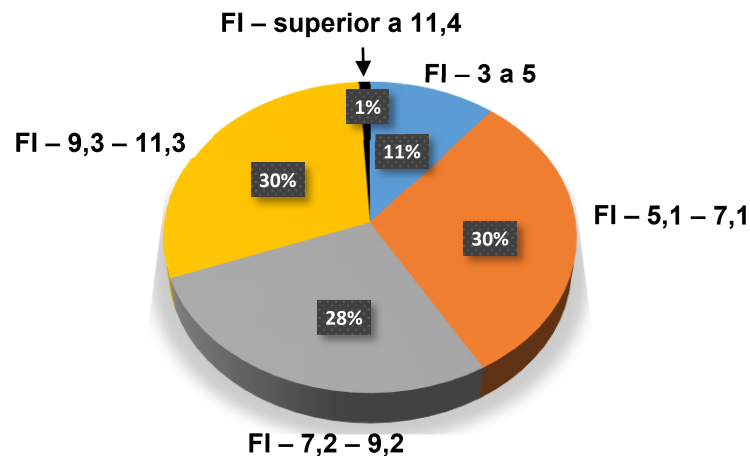


Gráfico 5 – Distribuição dos artigos por categorias de fator de impacto (FI).

4.1.2 Variações metodológicas

Dos 117 artigos avaliados, apenas 3 artigos (2,56%) citaram em sua metodologia o delineamento experimental utilizado, todos eles empregando o delineamento inteiramente ao acaso (DIC). Quanto ao número de repetições empregadas no experimento, encontramos nos artigos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 15 lâminas usadas como repetições (Gráfico 6). Apenas dois artigos usaram um planejamento diferente, onde a repetição foi obtida a partir da média da observação de diferentes lâminas (artigo 11 – 3 repetições composta cada uma de 2 lâminas; artigo 60 – 3 repetições composta cada uma de 10 lâminas). Os dados são demonstrados no Gráfico 6. O maior número de artigos (38,16% deles) não fornece nenhuma informação ou informações insuficientes para a compreensão do número de repetições utilizadas no experimento. Entre os números de lâminas utilizadas como repetições, a maioria dos artigos (23,68%) utilizam 5 lâminas como repetição. O uso de 10 (15,79%) ou 3 (11,84%) lâminas como repetições também é relativamente frequente entre os trabalhos avaliados.

O número de células avaliadas em cada repetição nos artigos analisados é demonstrado no Gráfico 7. Notamos, novamente, que o maior número de artigos

(35,23%) não fornece nenhuma informação ou informações insuficientes para a compreensão do número de células avaliadas por repetição. A maioria dos artigos avaliam 1000 células por repetição (19,32%), seguido da avaliação de 500 células (17,05% dos artigos).

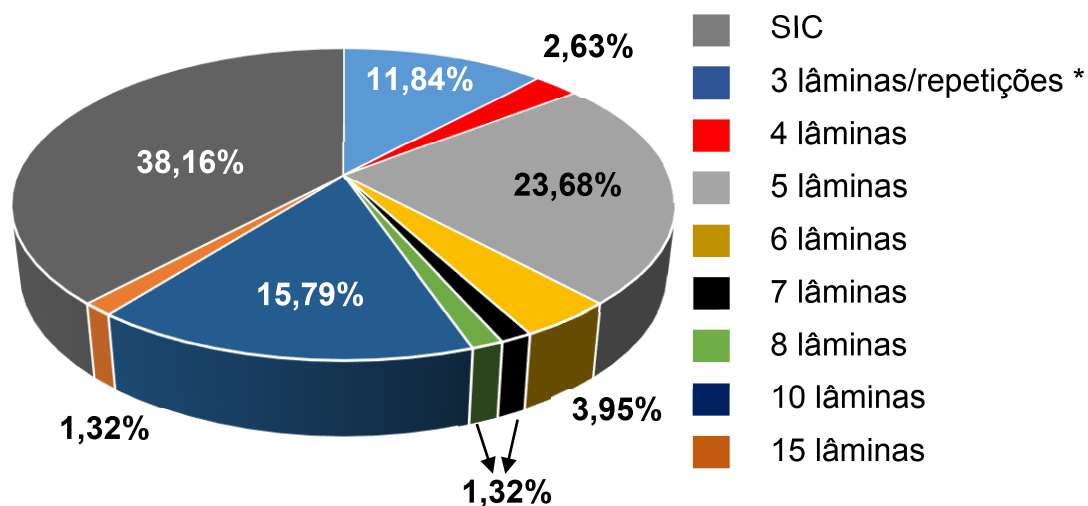


Gráfico 6 – Número de repetições empregadas na montagem do experimento nos diferentes artigos levantados na revisão bibliográfica sobre o ensaio em *Allium cepa* L. entre 2019 e 2022. Dados demonstrados em percentual. * Dos artigos que utilizaram 3 repetições, 2 utilizaram 3 repetições obtidas da média de análises de diferentes lâminas (artigo 11 e 60); SIC – Sem informações claras sobre repetições.

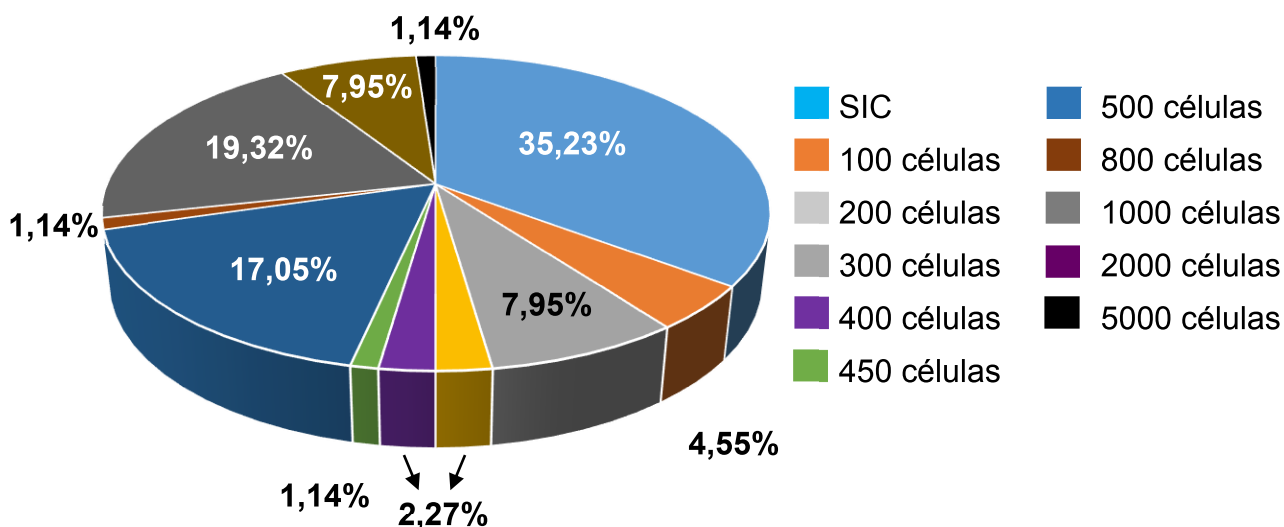


Gráfico 7 – Número de células avaliadas por repetição nos diferentes artigos levantados na revisão bibliográfica sobre o ensaio em *Allium cepa* L. entre 2019 e 2022. SIC – Sem informações claras sobre o número de células avaliadas.

4.2 Análise estatística de dados em trabalho previamente publicado pelo GCM-UFJF (Grupo de Citogenotoxicidade e Mutagênese Ambiental da Universidade Federal de Juiz de Fora), utilizando o modelo de *Allium cepa* L.

A variável sub-G1 foi avaliada em um trabalho publicado recentemente com a participação do GCM-UFJF (SOUZA et al., 2023).

Souza et al., (2023) utilizaram diversas estratégias experimentais e modelos biológicos para investigar a ecogenotoxicidade de concentrações ambientalmente relevantes de atrazina. Um dos modelos utilizados foi *Allium cepa* L. e uma das técnicas empregadas neste modelo foi a citometria de fluxo. Dentre as variáveis analisadas, temos o percentual de partículas sub-G1 e os dados de médias dos diferentes tratamentos são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Médias de subpartículas G1 após exposição à diferentes concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., (2023)

Tratamentos	Percentual de subpartículas G1
CN	1,81
CP	45,11
1 µg/L	3,45
2 µg/L	4,11
5 µg/L	6,21
10 µg/L	10,21
15 µg/L	13,45
20 µg/L	15,61

No planejamento do trabalho foram avaliadas 9 amostras de citometria de fluxo em cada tratamento. Os dados comparativos de médias e desvios padrões quando utilizamos as duas formas de análise estatística são demonstrados no Gráfico 8. É possível perceber que os desvios padrões reduzem quando utilizamos a forma B de análise estatística, aumentando teoricamente a robustez de análise do teste estatístico que iremos utilizar (Gráfico 8). Em média, os desvios padrões da forma de análise A (Gráfico 8a) foi de 1,38. Já quando utilizamos a forma de análise B (Gráfico 8b) este desvio padrão médio foi de 0,56, representando uma redução de 59,52%.

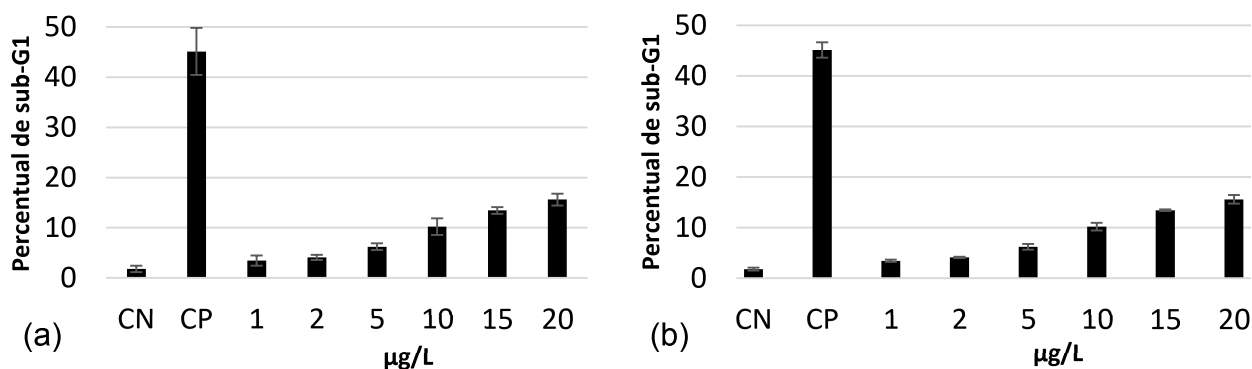


Gráfico 8 – Percentual (\pm DP) de subpartículas-G1 após exposição à concentrações de atrazina avaliadas por citometria de fluxo no ensaio de *Allium cepa* L. Em (a) dados coletados de 9 amostras considerando cada uma delas como uma repetição; em (b) dados coletados de 9 amostras, distribuídas em 3 repetições, cada uma delas obtidas da média da análise de 3 amostras. DP = Desvio padrão das médias. Dados de Souza et al., 2023.

Com os dados ajustados aos pressupostos de análise de variância, podemos proceder à análise estatística através deste método. Os dados da Tabela 5 demonstram os resultados de Análise de Variância nas duas formas de análise testadas neste trabalho, 9 ou 3 repetições.

Tabela 5 – Resultados da Análise de Variância nas duas formas testadas de repetições no experimento de Souza et al., (2023).

ANOVA	9 lâminas/9 repetições				9 lâminas/3 repetições			
	FORMA A				FORMA B			
F.V.	GL	SQ	QM	F	GL	SQ	QM	F
Tratamentos	7	12468,29	1781,18	494,7	7	4156,19	593,74	1164,20
Erro	64	230,73	3,60		16	8,18	0,51	
Total	71	12699,02			23	4164,37		

F.V. – Fontes de variação; GL – Graus de liberdade; SQ – Soma de quadrados; QM – Quadrado médio e F – Estatística F.

Quando utilizamos o preparo de 9 lâminas e consideramos cada uma delas como sendo uma repetição, temos um valor de soma de quadrados do erro (230,73) que representa 1,81% da soma de quadrados total (12699,02). Dizendo de outro modo, podemos afirmar que o erro representa 1,81% das fontes de variação no seu experimento. Neste caso a ANOVA encontrou um F calculado de 494,07. Quando utilizamos o preparo de 9 lâminas, mas previamente distribuímos as mesmas em 3

repetições obtidas da média da análise de 3 lâminas, temos um valor de soma de quadrados do erro (8,18) que representa 0,20% da soma de quadrados total (4164,37). Então, o método de análise B reduz em 9,05 vezes o efeito do erro experimental na sua análise estatística.

Nesta situação, os valores de F tabelados são respectivamente 4,43 para a forma de análise A e 4,90 para a forma de análise B. Em ambos os casos os valores de F calculados são superiores aos valores de F tabelados. Interpretamos então, que tanto pela forma A ou B, existe pelo menos duas médias estatisticamente diferentes entre os tratamentos de atrazina.

O uso do teste de Tukey ou Dunnett são comuns em nossos trabalhos. Quando testamos o uso de Tukey ($p < 0,05$) como teste de comparação entre médias temos uma diferença mínima significativa (d.m.s.) de 2,80 quando utilizamos a forma de análise A (com 9 lâminas/9 repetições). Alternativamente, a forma de análise B (9 lâminas/3 repetições) chega a uma diferença mínima significativa de 2,02. Das 28 comparações entre médias possíveis entre os tratamentos, a forma A detecta 22 significâncias entre médias (Tukey; $p < 0,05$). Já a forma de análise B, detecta 26 significâncias entre médias. Esta comparação é demonstrada pelas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Diferenças entre médias dos tratamentos de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., 2023. Análise pela forma A (9 lâminas/9 repetições)

Tratamentos		CN	CP	1*	2*	5*	10*	15*	20*
	Médias	1,81	45,11	3,45	4,11	6,21	10,21	13,45	15,61
CN	1,81		43,30	1,64	2,30	4,40	8,40	11,64	13,8
CP	45,11			41,66	41,00	38,90	34,90	31,66	29,5
1*	3,45				0,66	2,76	6,76	10,00	12,16
2*	4,11					2,10	6,10	9,34	11,50
5*	6,21						4,00	7,24	9,40
10*	10,21							3,24	5,40
15*	13,45								2,16
20*	15,61								

* Concentrações em $\mu\text{g/L}$; nas células marcadas em verde estão as comparações entre médias que são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; diferença mínima significativa (d.m.s = 2,80) (Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 7 – Diferenças entre médias dos tratamentos de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., 2023. Análise pela forma B (9 lâminas/3 repetições)

Tratamentos		CN	CP	1*	2*	5*	10*	15*	20*
	Médias	1,81	45,11	3,45	4,11	6,21	10,21	13,45	15,61
CN	1,81		43,30	1,64	2,30	4,40	8,40	11,64	13,8
CP	45,11			41,66	41,00	38,90	34,90	31,66	29,5
1*	3,45				0,66	2,76	6,76	10,00	12,16
2*	4,11					2,10	6,10	9,34	11,50
5*	6,21						4,00	7,24	9,40
10*	10,21							3,24	5,40
15*	13,45								2,16
20*	15,61								

* Concentrações em $\mu\text{g/L}$; nas células marcadas em verde estão as comparações entre médias que são consideradas estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$; diferença mínima significativa (d.m.s = 2,02) (Tukey, $p < 0,05$).

Quando testamos o uso de Dunnett ($p < 0,05$) como teste de comparação entre médias temos uma diferença mínima significativa (d.m.s.) de 2,33 quando utilizamos a forma de análise A (com 9 lâminas/9 repetições). Alternativamente, a forma de análise B (9 lâminas/3 repetições) chega a uma diferença mínima significativa de 1,70. Das 7 comparações entre médias possíveis (do controle com os demais tratamentos) a forma A detecta 5 médias com significâncias em relação ao controle (Dunnett; $p < 0,05$). Já a forma de análise B, detecta 6 significâncias entre médias. Esta comparação é demonstrada pela Tabela 8.

Tabela 8 - Diferenças entre médias dos tratamentos em relação ao controle de concentrações de atrazina. Dados de Souza et al., 2023.

Tratamentos (9l/9r)	Percentual de sub-g1	Tratamentos (9l/3r)	Percentual de sub-g1
CN	1,81	CN	1,81
CP	45,11*	CP	45,11*
1 µg/L	3,45	1 µg/L	3,45
2 µg/L	4,11	2 µg/L	4,11*
5 µg/L	6,21*	5 µg/L	6,21*
10 µg/L	10,21*	10 µg/L	10,21*
15 µg/L	13,45*	15 µg/L	13,45*
20 µg/L	15,61*	20 µg/L	15,61*

* Médias estatisticamente diferentes em relação ao controle (Dunnnett ($p < 0,05$); diferença mínima significativa (d.m.s = 2,33) e (d.m.s = 1,70) respectivamente para as formas de análise A e B). l – lâminas; r – repetições.

5 DISCUSSÃO

O ensaio em células meristemáticas de *Allium cepa* L. para detecção de alterações no comportamento do ciclo celular e alterações genéticas com consequência para eventos de morte celular vem sendo utilizado desde a sua implementação em 1938 por Levan et al., (1938), constituindo um ensaio extensivamente utilizado na área de mutagênese ambiental até os dias atuais (LEME; MARIN-MORALES, 2009; SOUZA et al., 2023). Diversos agentes ambientais potencialmente mutagênicos já foram avaliados, tais como, metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, corantes de indústria têxtil, produtos de limpeza, misturas complexas, poluição nuclear, radiação emitida por celular, nanopartículas, extratos de plantas medicinais e liquênicos, solo tratado com vermicompostagem, conservantes alimentares, corantes para cabelo, fármacos, microplásticos, compostos fenólicos, PBAT, resíduos de minas e diversos outros contaminantes emergentes (BASU; TRIPURA, 2021; DATTA et al., 2018; HARINI et al., 2022; KHAN et al., 2020; MONDAL et al., 2022; MONDAL; DEBNATH, 2022; PANDEY; KUMAR, 2021; PROKOPIEV; SLEPTSOV; FILIPPOVA, 2021; QUADRA et al., 2019; SOUZA et al., 2020; VIJEATA et al., 2022).

No entanto, o ensaio em *A. cepa* carece de um *guideline* que normatize o método. Esta carência conduz a uma grande variabilidade de metodologias empregadas e diversas variáveis envolvidas no ensaio são coletadas por diversas maneiras. Variações no planejamento e delineamento experimental, nas variáveis envolvidas na montagem do experimento e na avaliação dos dados experimentais são observadas (ALAGUPRATHANA et al., 2022; ANUSHA et al., 2023; DHAR et al., 2023; SOUZA et al., 2023; ZEYAD; KHAN; MALIK, 2022).

Embora as variações sejam extensas, neste trabalho concentramos em variáveis envolvidas no planejamento e delineamento experimental, como delineamento empregado, número de repetições utilizadas no ensaio e especificação do que representam estas repetições, número de células avaliadas por repetição e tratamento. Estas variações impactam diretamente na qualidade dos dados obtidos e na robustez da análise estatística empregada no teste (RAMALHO et al., 2012).

Na revisão bibliográfica realizada no presente trabalho, foram encontrados 117 artigos que foram numerados entre 1 e 117.

Com relação à definição do delineamento experimental utilizado, apenas 2,56% dos trabalhos citaram o delineamento inteiramente ao acaso (DIC) como sendo o delineamento utilizado. Embora fique subentendido que os trabalhos com *A. cepa* sempre utilizam o DIC como delineamento, nossa opinião é que esta informação deveria constar em todos os trabalhos científicos. O delineamento é caracterizado como o plano de distribuição dos seus tratamentos, que no caso do DIC deve ser ao acaso. Nesta situação, quando utilizamos a Análise de Variância como método estatístico, teremos apenas duas fontes de variação, os tratamentos e o erro experimental (RAMALHO et al., 2012).

No quesito de número de repetições realizadas no ensaio, os trabalhos utilizam uma ampla variação, desde a análise de apenas 3 lâminas (o mínimo possível) até a análise de 15 lâminas. O uso de repetições é um dos princípios básicos de experimentação. Com o emprego de diferentes repetições dentro de um tratamento é possível determinar o que chamamos de variância dentro dos tratamentos. Essa medida está diretamente relacionada com a estimativa do erro experimental, que em última análise impacta nas suas conclusões experimentais (RAMALHO et al., 2012). Entre os artigos investigados neste trabalho, diversos utilizaram apenas 3 lâminas, considerando cada lâmina uma repetição. Estes artigos representaram 11,84% dos artigos avaliados. Com a utilização de apenas 3 lâminas temos um risco crítico para a

análise estatística que é a presença de *outliers* entre os valores estimados para uma variável. A presença destes *outliers* impacta nos valores de desvio padrão (variância dentro de tratamentos), prejudicando sua análise estatística, devido ao aumento do erro experimental. Podemos citar como exemplo, o artigo 32, onde os autores utilizaram 3 lâminas como repetição. O coeficiente de variação médio para os tratamentos quando olhamos para a variável “percentual total de alterações cromossômicas” foi de 10,12%. Se comparamos estes dados com o artigo 55, onde os autores utilizaram 5 lâminas, neste caso o coeficiente de variação médio para “percentual total de alterações cromossômicas” foi de 6,32% (uma redução de 1,61 X). Entretanto, nem sempre a utilização de números maiores de repetições minimizam o efeito de *outliers*, diminuindo o coeficiente de variação. O artigo 108, onde os autores utilizaram 10 lâminas como repetições obteve um coeficiente de variação médio de 17,55%, sendo este um valor que impacta negativamente na robustez e detecção de significância na Análise de Variância (dados também obtidos do percentual total de alterações). Essa não relação entre o número de lâminas utilizadas como repetições e o coeficiente de variação dos dados está relacionada com o fato da utilização de uma única lâmina como repetição, o que parece ter um impacto negativo na análise estatística (discutiremos essa questão adiante). Curiosamente, a maioria dos artigos investigados, 38,16% deles, não possuem informações suficientes para o leitor entender o número de repetições utilizadas na técnica. Acreditamos que esta observação é fortemente negativa para a qualificação de um artigo científico.

Já quando olhamos para o número de células avaliadas por repetição, observamos trabalhos que avaliaram desde 100 células por lâminas até 2000 células, sendo a maioria utilizando 1000 células (19,32%). O tamanho amostral influencia muito na detecção das variáveis analisadas no ensaio. Muitas delas acontecem com baixa frequência, como o índice mitótico, percentuais de cada alteração cromossômica, tanto no controle e até mesmo em concentrações altas dos agentes mutagênicos avaliados. Em uma amostra de 100, 200 células avaliadas é simplesmente uma questão de probabilidade para não estimarmos o valor próximo ao real de uma determinada variável. Se tomarmos como exemplo, o artigo 86 onde foram avaliadas apenas 100 células dentro de cada repetição, os autores simplesmente não conseguiram estimar os percentuais de cada alteração cromossômica e apenas descreveram os números brutos. Se olharmos para a alteração ponte cromossômica, como exemplo, os autores detectaram 1, 0, 5, 5 e 10

alterações nos diferentes tratamentos, não conduzindo a uma interpretação sobre o efeito ou não mutagênico do agente testado neste trabalho. No próprio trabalho em que o nosso grupo de pesquisa participou como parceiro (SOUZA et al., 2023), os autores avaliaram somente 100 células por repetição (10 lâminas analisadas) e os resultados da análise citogenética não ficaram bons.

Nosso grupo de pesquisa acredita que pelo menos 1000 células devem ser analisadas em cada lâmina.

No presente trabalho, também utilizamos os dados de percentuais de sub-partículas G1 para avaliar a eficiência e robustez da análise estatística nas duas formas de análise, A (9 lâminas/9 repetições) e B (9 lâminas/3 repetições). Os valores de sub-G1 foram obtidos pelo nosso grupo de pesquisa (GCM-UFJF) através de análise por citometria de fluxo. Essa variável é um indicador da ocorrência de morte celular como efeito tóxico do agente mutagênico que está sendo testado no trabalho (ANDRADE-VIEIRA; DE CAMPOS; DAVIDE, 2012).

Souza et al., (2023) avaliaram 8 tratamentos, um controle negativo (CN), um controle positivo (CP) e 6 concentrações crescentes de atrazina. Na hipótese alternativa (H1) levantada pelo nosso trabalho, as formas de análise A e B conduziram a diferentes interpretações dos resultados. A análise realizada no trabalho de Souza et al., (2023) corrobora esta hipótese. Portanto, rejeitamos a H0.

Já na obtenção das médias e desvios padrões dos tratamentos, percebemos a vantagem de se adotar a forma de análise B. Esta reduz em 59,25% os valores médios entre tratamentos do desvio padrão. Como apontado por Freeman (1995), a existência de outliers pode aumentar as estimativas de desvios padrões das suas médias. Quando consideramos a análise estatística com 9 repetições (9 lâminas), o efeito destes outliers nos desvios padrões é maior. Como os desvios padrões refletem a variância da média dos tratamentos e esta impacta diretamente na estimativa do erro experimental (RAMALHO et al., 2012), podemos esperar que a estimativa de erro experimental na forma de análise A (9 lâminas/9 repetições) seja proporcionalmente maior.

Quando analisamos os dados por Análise de Variância, é exatamente este esperado que observamos. Comparando a forma de análise A com a B, a influência da Soma de Quadrados do Erro (SQE) nas fontes de variação reduz 9,05X na forma de análise B (a que considera a distribuição das 9 lâminas em 3 repetições). Este resultado observado na forma de análise B, se deve à diluição do efeito dos outliers

nas médias. Isso é corroborado por Freeman (1995). Ao mesmo tempo, o teste de hipóteses será tanto mais preciso quanto menor for a estimativa do erro experimental (RAMALHO et al, 2012). No caso do trabalho desenvolvido por Souza et al., (2023) essa maior precisão seria alcançada na forma de análise B. A estimativa de F (estatística F) na Análise de Variância corrobora ainda mais essa hipótese. O F calculado para a forma de análise A foi de 494,7 e para a forma de análise B foi de 1164,20. Embora ambos os F sejam maiores do que os valores tabelados e a interpretação seja a mesma (existem pelo menos duas médias estatisticamente diferentes) a precisão maior da Análise de Variância é alcançada por um F cada vez maior, como no caso da forma de análise B (F 2,35X maior do que a forma de análise A). Neste caso, a adoção de forma de análise B seria mais precisa como apontado por Ramalho et al., (2012).

Procedemos então, à utilização de testes de comparações entre médias após o resultado significativo da Análise de Variância. Foram testados o teste de Tukey e Dunnett, ambos com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Quando utilizamos o teste de Tukey, das 28 comparações possíveis entre médias, a forma de análise A detectou 22 diferenças e a forma de análise B, 26 diferenças estatísticas entre médias. Novamente concluímos a favor da forma de análise B. A maior detecção de diferenças na forma de análise B ocorreu devido a menor estimativa de diferença mínima significativa neste caso (d.m.s). O mesmo efeito foi observado a favor da forma de análise B quando utilizamos o teste de Dunnett.

No levantamento bibliográfico que realizamos, dois artigos utilizaram a estratégia B de análise. O artigo 11 trabalhou com 3 repetições, obtidas cada uma da análise de duas lâminas. O artigo 60 também trabalhou com 3 repetições, obtidas cada uma da análise de 10 lâminas. Estes trabalhos demonstram desvios padrões relativamente baixos, o que pode corroborar a hipótese por nós levantada aqui.

No entanto as observações levantadas neste trabalho, não parecem ser conclusivas e não parecem funcionar para qualquer número de tratamentos. Nosso grupo tem investido esforços para compreender melhor essa questão de análise estatística.

6 REFERÊNCIAS

ALAGUPRATHANA, M. et al. Cytogenotoxicity assessment in *Allium cepa* roots exposed to methyl orange treated with *Oedogonium subplagiostomum* AP1. **Environmental Research**, v. 213, p. 113612, out. 2022.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DE CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140–146, set. 2012.

ANUSHA, P. et al. Eco-friendly bioremediation of pollutants from contaminated sewage wastewater using special reference bacterial strain of *Bacillus cereus* SDN1 and their genotoxicological assessment in *Allium cepa*. **Science of The Total Environment**, v. 863, p. 160935, mar. 2023.

BALAJEE, A. S.; HADJIDEKOVA, V. Retrospective cytogenetic analysis of unstable and stable chromosome aberrations in the victims of radiation accident in Bulgaria. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 861–862, p. 503295, jan. 2021.

BASU, S.; TRIPURA, K. Differential sensitivity of *Allium cepa* L. and *Vicia faba* L. to aqueous extracts of *Cascabela thevetia* (L.) Lippold. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 67–78, jul. 2021.

BARKER, K. Na bancada. **Manual de Iniciação Científica**. Editora Artmed. Porto Alegre-RS. 474 p. 2002.

CAMPOS, C. F. et al. Analysis of genotoxic effects on plants exposed to high traffic volume in urban crossing intersections. **Chemosphere**, v. 259, p. 127511, nov. 2020.

CANEDO, A. et al. Micronucleus test and nuclear abnormality assay in zebrafish (*Danio rerio*): Past, present, and future trends. **Environmental pollution (1987)**, v. 290, p. 118019–118019, 2021.

CHOUDHURI, S. et al. A review on genotoxicity in connection to infertility and cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, p. 109531, ago. 2021.

DATTA, S. et al. Assessment of genotoxic effects of pesticide and vermicompost treated soil with *Allium cepa* test. **Sustainable Environment Research**, v. 28, n. 4, p. 171–178, jul. 2018.

DE OLIVEIRA, L. C. et al. Prednisone is genotoxic in mice and *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 865, p. 503334, maio 2021.

DHAR, K. et al. Efficient bioremediation of laboratory wastewater co-contaminated with PAHs and dimethylformamide by a methylotrophic enrichment culture. **Journal of Environmental Management**, v. 325, p. 116425, jan. 2023.

EL MZIBRI, M. et al. The Salmonella sulA-test: a new in vitro system to detect genotoxins. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 369, n. 3–4, p. 195–208, ago. 1996.

FILIZOLA, H.F. et al. **Manual de procedimentos de coleta de amostras**. Editora **Embrapa**. Porto Alegre-RS. 159p. 2006.

FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas** 102 (1985) 99–112.

FREEMAN, J. Outliers in statistical data. 3rd edition. **Journal of the Operational Research Society**, 46(8): 1034–1035. 1995.

LEVAN, A. The effect of colchicines in root mitosis in Allium. **Hereditas**. 24: 471-486. 1938.

GADEVA, P.; DIMITROV, B. Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 2, p. 191–197, abr. 2008.

GHOSH, M. et al. Effects of ZnO nanoparticles in plants: Cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 807, p. 25–32, set. 2016.

GUO, Y. et al. Therapeutic function of iPSCs-derived primitive neuroepithelial cells in a rat model of Parkinson's disease. **Neurochemistry International**, v. 155, p. 105324, maio 2022.

HARINI, G. et al. Enhanced photodegradation of rifampicin and co-trimoxazole by ZnO/ZnMn₂O₄/ZnS-PVA and its genotoxicity studies on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 308, p. 136238, dez. 2022.

HEMANTH KUMAR, N. K.; JAGANNATH, S. Cytological effects of herbicide alachlor in somatic cells of maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* Merrill.). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, p. 101560, mar. 2020.

JIRSOVA, K. et al. The micronucleus cytome assay – A fast tool for DNA damage screening in human conjunctival epithelial cells. **The Ocular Surface**, v. 20, p. 195–198, abr. 2021.

KHAN, I. S. et al. Genotoxic effect of two commonly used food dyes metanil yellow and carmoisine using *Allium cepa* L. as indicator. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 370–375, 2020.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, jul. 2009.

LIMAN, R.; CIĞERCI, İ. H.; GÖKÇE, S. Cytogenetic and genotoxic effects of Rosmaniric Acid on *Allium cepa* L. root meristem cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 444–449, nov. 2018.

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

MIŠÍK, M. et al. Micronucleus assays with the human derived liver cell line (Huh6): A promising approach to reduce the use of laboratory animals in genetic toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 154, p. 112355, ago. 2021.

MONDAL, N. K. et al. Effects of polyethylene terephthalate microplastic on germination, biochemistry and phytotoxicity of *Cicer arietinum* L. and cytotoxicity study on *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 103908, ago. 2022.

MONDAL, N. K.; DEBNATH, P. Impact of two commercially available hair dyes on germination, morpho-physiology, and biochemistry of *Cicer arietinum* L. and cytotoxicity study on *Allium cepa* L. root tip. **Environmental Research**, v. 208, p. 112681, maio 2022.

OLIVEIRA-CARVALHO, C.E.; CAMPOS, J.M.S. Flow cytometry in *Allium cepa* L. test. Cytometry – Part A. submetido.

PANDEY, H.; KUMAR, S. Butylated hydroxytoluene and Butylated hydroxyanisole induced cyto-genotoxicity in root cells of *Allium cepa* L. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07055, maio 2021.

PROKOPIEV, I.; SLEPTSOV, I.; FILIPPOVA, G. Effect of several phenolic compounds of lichens on the physiological, cytological, and biochemical characteristics of *Allium fistulosum* seedlings. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 102000, maio 2021.

QUADRA, G. R. et al. Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. **Chemosphere**, v. 215, p. 753–757, jan. 2019.

RAMALHO, M.A.P; FERREIRA, D.N.; OLIVEIRA, A.C. **Experimentação em genética**. Editora UFLA, Lavaras-MG. 2ª edição. 326 páginas. 2012.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas** 18: 49-53. 1993.

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. **Mutation Research**. 390: 121-127. 1997.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the Allium anaphase–telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater, **Mutation Research**. 312 17–24. 1994.

REYES-RODRÍGUEZ, M. DE LOS Á. et al. Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of two thallium compounds using the Drosophila wing somatic mutation and recombination test. **Heliyon**, v. 7, n. 5, p. e07087, maio 2021.

SOUZA, V. V. DE et al. Ecogenotoxicity of environmentally relevant atrazine concentrations: A threat to aquatic bioindicators. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 189, p. 105297, jan. 2023.

SOUZA, P. M. S. et al. PBAT biodegradable mulch films: Study of ecotoxicological impacts using Allium cepa, Lactuca sativa and HepG2/C3A cell culture. **Chemosphere**, v. 256, p. 126985, out. 2020.

TLILI, S.; MOUNEYRAC, C. New challenges of marine ecotoxicology in a global change context. **Marine Pollution Bulletin**, v. 166, p. 112242, maio 2021.

VIJEATA, A. et al. Sustainable agronomic response of carbon quantum dots on Allium sativum: Translocation, physiological responses and alternations in chromosomal aberrations. **Environmental Research**, v. 212, p. 113559, set. 2022.

YUN, Y. et al. Exposure to Nitro-PAHs interfere with germination and early growth of Hordeum vulgare via oxidative stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 180, p. 756–761, set. 2019.

ZEYAD, M. T.; KHAN, S.; MALIK, A. Genotoxic hazard and oxidative stress induced by wastewater irrigated soil with special reference to pesticides and heavy metal pollution. **Heliyon**, v. 8, n. 9, p. e10534, set. 2022.