



# AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE DEJETOS DE USINAGEM UTILIZANDO O TESTE DE *ALLIUM CEPA*

Diego Santiago

Gabriel José Silva Júnior; Luciana Pereira Silva; Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Departamento de Ciências Biológicas Faculdade de Ciências e Letras-Campus Assis, Universidade Estadual Paulista-UNESP  
iago\_s99@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

O Programa Internacional de Bioensaios com Plantas (IPPB) estabelecido em 1993, dentro do Programa Ambiental das Nações Unidas, envolve 14 Países de quatro Continentes; o Brasil é membro deste grupo. O objetivo do IPPB é continuar monitorando o meio ambiente em escala global, tendo como grandes missões: a promoção de metodologia de uso simples, rápido e de baixo custo para monitoramento ambiental e o estabelecimento de uma cadeia internacional de trabalhos para monitorar e identificar condições perigosas que existem em diferentes áreas do mundo; com a ajuda de análises químicas e físicas poderão ser identificadas as fontes de poluição e sugerir a remediação do processo

Dentro deste contexto, os bioensaios em plantas fornecem parâmetros significativos para avaliar a toxicidade de misturas complexas tais como dejetos industriais, mesmo sem conhecimento de sua composição química (Odeigah *et al.*, 1997). Atualmente, muitos trabalhos têm empregado com sucesso bioensaios com plantas, assim como: *Allium cepa*, *Vicia faba*, e *Tradescantia pallida* como bioferramentas rápidas e sensíveis para o monitoramento de contaminantes ambientais em solos, águas superficiais e subterrâneas, depósitos de lixo urbanos e efluentes de esgoto doméstico e industrial. Análises de partes vegetativas e reprodutivas destes vegetais têm sido largamente utilizadas para determinação dos efeitos biológicos de agentes químicos (Ma e Grant, 1982)

Avaliações da toxicidade de poluentes ambientais com plantas foram enfatizadas em diversos workshops e programas Gene - Tox. Conseqüentemente, muitos estudos de curto prazo baseados em testes *in vitro* e *in vivo* foram realizados com sucesso na detecção e monitoramento de uma grande variedade de agentes químicos ambientais com potencial mutagênico e carcinogênico. Entretanto, com a crescente lista desses agentes, muitos não foram testados ou ainda esperam confirmação de seus efeitos (ATEEQ *et al.*, 002)

Experimentos que avaliam o impacto ecológico e genético da poluição nuclear em populações de plantas são necessários, já que plantas são produtos comerciais importantes e são

consumíveis pelas pessoas. Além disso, plantas podem ser utilizadas como biossensores da toxicidade genética de poluentes ambientais (Kovalchuk *et al.*, 1998)

É estabelecido que a poluição diminui a qualidade de vida em vários aspectos, afetando a saúde e a longevidade dos seres humanos. Além dos efeitos diretos sobre a saúde, o perigo inerente dos poluentes está no fato que eles podem levar a diversas condições patológicas como câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares e envelhecimento precoce. De tempos em tempos, agências verificam o estado de poluição do ar, água e solos em cidades e unidades industriais. Porém esta verificação diária da mutagenicidade e carcinogenicidade de poluentes não é realizada (Grover e Kaur, 1999)

Assim, as indústrias destacam - se por representar os principais emissores de poluentes no meio ambiente. Os dejetos industriais geralmente contêm misturas complexas de químicos que substancialmente contaminam reservatórios superficiais e subterrâneos de água potável (Mumtaz, 1995; Dewhurst *et al.*, 002), e podem tornar - se extremamente perigosos para a saúde humana, induzindo a alterações genéticas, sendo que metais pesados são os toxicantes mais comumente encontrados em dejetos de esgoto (Rank e Nielsen, 1998)

Portanto, metais pesados como o níquel, mercúrio e cádmio têm mostrado elevada genotoxicidade em diferentes testes de detecção. Além dos metais pesados, diversos químicos orgânicos têm sido detectados em lodo e águas de dejetos industriais e esgoto doméstico, alguns destes já conhecidos como mutágenos tais como nitrosaminas, bifenis policlorados (PCBs), dibenzo - p - dioxinas policloradas e furanos (PCDD/F), e hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) (Rank e Nielsen, 1998)

Ainda sobre os resíduos de processos industriais e esgoto doméstico lançados no ambiente, estes, contêm químicos genotóxicos que não se submeterão à degradação durante o tratamento, devido seu alto grau de persistência. Como esses químicos freqüentemente apresentam natureza lipofílica, eles irão depositar - se predominantemente no lodo dos esgotos. Devido ao crescimento da aplicação de lodo

de esgoto tratado na fertilização de campos agrícolas, há um sério interesse considerando a possibilidade de químicos genotóxicos danificarem organismos e ecossistemas, assim como humanos durante sua acumulação na cadeia alimentar. Conseqüentemente, é importante conhecer a ocorrência desses químicos no lodo, portanto, várias análises químicas têm sido realizadas com este propósito (Rank e Nielsen, 1998)

Os efeitos de agentes químicos integrantes de desejos industriais, que representam importantes mutágenos, podem atuar no material genético dos núcleos eucarióticos e ser avaliados citologicamente pela observação da inibição do crescimento ou divisão celular, interrupção da metáfase, indução de aberrações cromossômicas numéricas ou estruturais e alterações ao longo das cromátides irmãs e outras cromátides (Knöll *et al.*, 006)

Quanto ao biomonitoramento ambiental de resíduos industriais e de esgoto, pode ser realizado por testes em animais e também por meio de bioensaios com plantas indicadoras. Entretanto, a maioria dos ensaios em animais apresenta elevado custo e assim as agências de regulamentação não os utilizam para a realização do monitoramento. Tendo isso em vista, bioensaios com plantas indicadoras, que são consideravelmente menos onerosos, têm sido propostos para a monitoração rotineira da poluição. Alguns bioensaios com plantas, por exemplo, *Tradescantia pallida*, *Vicia faba*, e *Allium cepa*, têm sido utilizados por mais de 60 anos, inicialmente para os estudos dos efeitos mutagênicos da radiação ionizante e mutágenos químicos, mas, recentemente, também para a avaliação da mutagenicidade/clastogenicidade de poluentes ambientais (Grover e Kaur, 1999)

No que se diz respeito aos testes realizados com *V. faba* e *A. cepa*, têm - se reportado significantes efeitos genotóxicos em suas células somáticas expostas a águas de esgotos provenientes de indústrias de curtume (Chandra e Gupta, 2002; Chandra *et al.*, 004). Os testes de micronúcleo em ápices de raiz de *Allium cepa* substituíram os experimentos de aberração cromossômica previamente realizados em células de plantas (MA *et al.*, 995). A contagem de micronúcleos em populações de células sincronizadas, as quais são localizadas na vizinhança da secção meristemática do ápice da raiz, é mais eficiente que o teste de aberração cromossômica, que normalmente é realizado com uma pequena fração de núcleos metafásicos acumulados mediante utilização de colchicina ou outro inibidor das fibras do fuso mitótico. Tais agentes podem por si só afetar os resultados do teste (Majer *et al.*, 003)

Em relação a citotoxicidade e poluição ambiental, têm sido avaliadas *in vivo* por testes em ápice de raízes de cebola, fornecendo resultados similares aos testes *in vitro* de citotoxicidade em animais. Os testes de citotoxicidade em ápice de raiz de cebola são baseados nas análises de vários parâmetros incluindo padrões de núcleos atípicos (por exemplo, emparelhamento de núcleos heteromórficos) e o aparecimento de micronúcleos como conseqüência de mitose desordenada e quebra cromossomal (Knöll *et al.*, 006)

Inúmeros estudos têm demonstrado a importância do biomonitoramento ambiental em situações de poluição por diferentes meios de dispersão, como por exemplo: incidências elevadas de aberrações cromossômicas em células,

assim como inibição do desenvolvimento de raízes foram documentadas utilizando bulbos e sementes de cebola expostos à radiação. Entretanto, ainda existe uma grande necessidade de quantificar as alterações no genoma de plantas após sua exposição crônica à radiação, metais pesados e agentes químicos, sendo que muitas áreas cultivadas sofreram tais influências pela ação do homem. O teste em *Allium* pode ser uma ferramenta útil para a medida quantitativa das alterações no genoma de cebolas e desse modo, monitorar os efeitos, a eficiência do teste de M cito e genotóxicos de solos poluídos (Kovalchuk *et al.*, 998)

Portanto, o teste em *Allium* é um simples, sensível e rápido bioensaio que tem sido largamente utilizado como padrão para o biomonitoramento de contaminantes ambientais, utilizando vários parâmetros genotóxicos. O teste em *Allium* geralmente fornece uma estimativa muito útil do efeito tóxico total resultante do tratamento das células do ápice das raízes por agentes potencialmente mutagênicos (DeMarini, 1991; Fiskesjo, 1993)

## OBJETIVOS

Verificar através do teste de *Allium cepa* a toxicidade dos contaminantes ambientais proveniente da água de efluentes doméstico/industrial da cidade Patos de Minas - MG em comparação com o extrato de óleo sintético para retífica Ultracorte 2000®

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 bulbos de cebola (*Allium cepa*, 2n = 16) saudáveis, de tamanhos uniformes (3,0 - 3,5 cm de diâmetro) e massas equivalentes (15g ± 400 mg) obtidos de uma população comercial. As camadas mais externas da casca dos bulbos foram removidas cuidadosamente antes do tratamento. Os bulbos de *Allium cepa* foram adaptados em béqueres de vidro com suas extremidades inferiores imersas em água destilada aerada e originaram raízes a uma temperatura controlada (22 ± 2°C) após 48h. Quando as novas raízes atingiram um comprimento médio de 2,0 cm foram utilizadas no teste

Os extratos de óleo solúvel foram preparados utilizando - se o óleo sintético para retífica Ultracorte 2000®, fabricado pela DNC Industrial Campinas Ltda., Hortolândia - SP. Para a preparação dos extratos, foram realizadas diluições do óleo em água destilada, nas concentrações de 25 e 75% respectivamente

A amostra de água proveniente de efluente doméstico/industrial da cidade Patos de Minas - MG foi coletada em recipiente de vidro âmbar limpo e com tampa, não propiciando condições de contaminação da amostra até o momento em que foi utilizada no tratamento experimental. No momento do tratamento a amostra de água foi diluída em água destilada, obtendo - se três concentrações diferentes: 25, 50 e 100%. Dois bulbos de *Allium cepa* foram expostos aos extratos preparados com óleo solúvel. Seis bulbos foram expostos às amostras de água de efluente doméstico/industrial, dois para cada concentração. Grupos Controle Positivo e Controle Negativo foram preparados

utilizando - se Cloridrato de Doxorrubicina (Doxolem®) na concentração de 0,125 mg/mL de água destilada, e água destilada respectivamente, sendo utilizados dois bulbos de *Allium cepa* para exposição em cada grupo controle. As exposições foram realizadas por um período fixo de 48h para todos os tratamentos, exceto para o grupo Controle Positivo que foi realizado por 6h, procedimento este, utilizada para evitar o aparecimento de resultado falso negativo, de acordo com metodologia descrita por Majer e colaboradores (2003)

Após o período de exposição das raízes, 0,5 cm do ápice de três raízes foi coletado e imediatamente fixado em solução de ácido acético e etanol (1:3) por 24h. Após a fixação, as raízes foram transferidas para uma solução de etanol 70% e mantidas em refrigerador à temperatura média de 2 °C por 72h. Solução de ácido acético 45% (9 partes) e HCl 1 N (1 parte) foi utilizada para promover a hidrólise e maceração das raízes. As raízes foram então dispostas sobre uma lâmina e o primeiro milímetro do ápice das raízes removido, de forma que os 2 mm correspondentes à região meristemática ou geração de células F1 foram isolados para análise em microscópio óptico. A identificação dos micronúcleos foi feita com solução de Carmim 2% em ácido acético 45%, sendo que 300 células em média por lâmina foram contadas em um aumento de 400x e a frequência de micronúcleos determinada. Para as análises estatísticas foi realizado o teste do Qui - Quadrado para identificar uma reposta positiva entre os grupos experimentais e controle

## RESULTADOS

Dejetos industriais e urbanos depositam - se no meio ambiente principalmente através dos sistemas fluviais receptores dos efluentes de esgoto doméstico e industrial, contendo predominantemente misturas complexas químicas de especificidade desconhecida, eliminados de forma não segura, podendo infligir sérios danos aos seres vivos. Portanto, o tratamento adequado dos dejetos é essencial para que seja realizado seu descarte no ambiente. Adicionalmente, a utilização de bioensaios sensíveis realizados com plantas podem ser importantes ferramentas para o monitoramento sistemático da genotoxicidade de tais efluentes

De acordo com as frequências de micronúcleos encontrados nas raízes de *Allium cepa* tratadas é possível evidenciar que a Doxorrubicina, utilizada como controle positivo, induziu uma quantidade significativamente mais elevada de micronúcleos (5,168 MN/100 células), porém, ao compararmos individualmente o efluente doméstico/industrial com o controle positivo, o tratamento 100% não apresentou diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,5\%$ ). O número de micronúcleos induzidos pelos tratamentos com óleo solúvel não foi elevado ( $1,426 \pm 1,63$  MN/100 células), apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparado com o controle negativo (água destilada). No entanto, ao compararmos com o efluente doméstico/industrial nas concentrações de 25 e 50%, não apresentou diferença estatisticamente significativa, embora exista diferença significativa entre os tratamentos óleo solúvel e efluente doméstico/industrial na concentração 100%. Entretanto, os resultados dos tratamentos com a amostra de

efluente doméstico/industrial nas concentrações 25 e 50% comparadas com o controle negativo apresentaram diferença significativa, da mesma forma que as frequências de micronúcleos do óleo solúvel quando comparado com o controle positivo

De acordo com Grover e Kaur (1999) a indução de micronúcleos em ápices de células meristemáticas de raiz de *A. cepa* ou em qualquer célula de outro organismo é a manifestação de um dano cromossomal ou de algum distúrbio no processo mitótico. Os micronúcleos são formados pelo desenvolvimento de uma nova membrana envolvendo o material da cromatina que não foi capaz de migrar para um dos pólos da célula durante a anáfase na mitose. Tais materiais cromáticos surgem tanto de disjunções cromossômicas defeituosas devido a anormalidades ou quebra cromossomal resultando na formação de fragmentos acêntricos, cromossomos dicêntricos e pontes cromossômicas (bridges). Portanto, a indução de micronúcleos pode sugerir que alguns compostos agem como inibidores das fibras do fuso ou mesmo como clastógenos

Como observado nos resultados, a amostra de água do efluente doméstico/industrial causou uma maior indução de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* que o óleo solúvel isoladamente, sendo assim, podemos inferir que outros componentes presentes no efluente apresentam atividade genotóxica e provavelmente são os responsáveis pelos efeitos mutagênicos observados. Conforme Claxton, Houk e Hughes (1998) os compostos tóxicos predominantemente relacionados com a genotoxicidade ambiental são principalmente os PCBs (Polychlorinated Biphenyls), PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), NCPs (Non Conventional Pollutants), metais pesados e corantes utilizados em curtumes. Traços de bifenis policlorados ou simplesmente PCBs no ambiente (ar e água) são detectados por todo o planeta, incluindo áreas remotas. De acordo com um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde do Canadá (2005), liberações acidentais e também práticas impróprias de descarte destes compostos são causas já antigas desta contaminação. Atualmente, os PCBs são dispersos no ambiente por correntes de ar, acumulando - se nas células de animais, sendo que as concentrações mais elevadas são encontradas nos organismos que estão no ápice da cadeia alimentar, incluindo humanos

Atualmente, PCBs fazem parte da composição de vários óleos industriais e inseticidas organoclorados, e são conhecidos principalmente por persistirem intactos no ambiente por longos períodos. Da mesma forma que os PCBs, os hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs) também estão dispersos no ambiente e apresentam atividade mutagênica relatada em vários estudos ecotoxicológicos (Riffat e Masood, 2006), derivados predominantemente da combustão incompleta de produtos petroquímicos, óleos, gorduras, tabaco e carvão

## CONCLUSÃO

Pode - se concluir que nos resultados, a amostra de água do efluente doméstico/industrial causou uma maior indução de micronúcleos nas raízes de *A. cepa* que o óleo solúvel isoladamente, sendo assim, podemos inferir que outros componentes presentes no efluente apresentam atividade

genotóxica e provavelmente são os responsáveis pelos efeitos mutagênicos observados

## REFERÊNCIAS

- Alves E. S., Giusti P. M., Domingos, M., Saldiva P. H. N., Guimarães, E. T., Lobo, D. J. A. Estudo anatômico filiar do clone híbrido 4430 de Tradescantia: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Revista Brasileira de Botânica*. São Paulo, v.24, n.4 (suplemento), p. 567 - 576, 2001.
- Ateeq, B., Farah, M. A., Ali, M. N., Ahmad, W. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4 - D and butachlor evaluated by Allium root tip test. *Mutation Research* 2002;514:105 - 13.
- Batalha, J. R., Guimarães, E. T., Lobo, D. J., Lichtenfels, A. J., Deur, T., Carvalho, H. A., Alves, E. S., Domingos, M., Rodrigues, G. S. and Saldiva, P. H. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in Sao Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. *Mutation Research* 1999;426:229-232.
- Chandra, S., Gupta S. K. Genotoxicity of leachates of tannery solid waste in root meristem cells of Allium cepa. *Journal of Ecophysiology and Occupational Health* 2002;2:225 - 34.
- Chandra, S., Chauhan, L. K. S., Pande, P. N., Gupta, S. K. Cytogenetic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of Vicia faba. *Environmental Toxicology* 2004;19:129 - 33.
- Claxton, L. D., Houk, V. S., Hughes, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research* 1998; 410: 237-243.
- Demarini, D. M. Environmental mutagens/complex mixtures. In: LI, A. P., Heflich, R. H., editors. *Genetic Toxicology*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1991. p. 290.
- Dewhurst, R. E., Wheeler, J. R., Chummun, K. S., Mather, J. D., Callaghan, A., Crane, M. The comparison of rapid bioassays for the assessment of urban ground water quality. *Chemosphere* 2002;47:547 - 54.
- Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/iyh-vsv/alt-formats/cmcd-dcmc/pdf/pcbs\\_e.pdf](http://www.hc-sc.gc.ca/iyh-vsv/alt-formats/cmcd-dcmc/pdf/pcbs_e.pdf). Acesso em 14/03/07.
- Fiskesjo, G. The Allium test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality* 1993;8:291 - 8.
- Grover, I. S., Kaur, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research* 1999;426:183 - 188.
- Knoll, M. F., da Silva, A. C. F., Dorow - Canto, T. S. and Tedesco, S. B. Effects of Pterocaulon polystachyum DC. (Asteraceae) on onion (Allium cepa) root - tip cells. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, n.3, p. 539 - 542, 2006.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B., Kovalchuk, L. The Allium cepa chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutation Research* 1998;415:47 - 57.
- Ma, T. H., Grant, W. F. The Tradescantias - adventurous plants. *Herbalist* 1982;48:36 - 44.
- Majer, B. J., Gottman, E., Knasmüller, S. 2003: The micronucleus test with Vicia faba and Allium cepa. In: J. Maluszynska, M. Plewa (Eds): *Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health*. Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego. Katowice, pp. 150.
- Mumtaz, M. M. Risk assessment of chemical mixtures from a public health perspective. *Toxicology Letters* 1995;82/83:527 - 32.
- Odeigah, G. P., Ijimakinwa, J., Lawal, B., Oyeniyi, R. Genotoxicity screening of leachates from solid industrial wastes evaluated with the Allium cepa test. *Alternatives to Laboratory Animals* 1997;25:311 - 21.
- Rank, J., Nielsen, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the Allium cepa anaphase - telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research* 1998; 418:113 - 9.
- Riffat, A. F., Masood, A. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2006; v.609, n.1, 81 - 91.