

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EFLUENTE DERIVADO DO BIODIESEL (WEPBP) SOB O TESTE *Allium cepa*

America Vitoria Duarte Castagna
Universidade Federal da Fronteira Sul
americalcastagna@gmail.com

Suzymeire Baroni
Universidade Federal da Fronteira Sul
suzymeire.baroni@uffs.edu.br

Eixo 02: Ciências Biológicas

RESUMO

O biodiesel é considerado um combustível alternativo, e para sua produção, utiliza-se excesso de água gerando alto volume de resíduos. O Efluente do Pré-tratamento Enzimático da Produção de Biodiesel (WEPBP) obtidos na produção de biodiesel podem apresentar compostos persistentes com potencial tóxico e genotóxico. Esse estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade desse efluente com o uso do teste *Allium cepa*. Bulbos da cebola foram expostos no período de 24 horas a três concentrações diferentes do efluente WEPBP: 0,1mL/L; 0,01mL/L e 0,001mL/L, além do controle positivo com Nitrato de Chumbo ($Pb(NO_3)_2$) e o controle negativo com água destilada. Os resultados obtidos mostram que o efluente possui potencial clastogênico e genotóxico em células de *Allium cepa* e ainda que os grupos com as diluições se equiparam ao grupo testado com o controle positivo.

Palavras-chave: Cebola. Erros celulares. Mitose.

INTRODUÇÃO

O biodiesel representa um grande risco ambiental se não tratado adequadamente, pois, é considerado um combustível alternativo e para sua produção, utiliza-se excesso de água o que gera altos volumes de resíduos, apresentando alta carga orgânica, ácidos graxos e presença de outros contaminantes ambientais (BORBA *et al.*, 2020).

Testes de avaliação toxicológica e ensaios biológicos são de grande valia, dado que, possibilitam o entendimento da contaminação ambiental e os riscos para a população de organismos expostos. Logo, entende-se que os biomarcadores de exposição e de efeito são ferramentas úteis no monitoramento ambiental. Pesquisadores como Leme e Marin-Morales (2008); Peron *et al.* (2009); e Araes e Longhin (2012), tem validado testes de citotoxicidade utilizando sistemas vegetais *in vivo*, como a cebola, em estudos de monitoramento verificando a existência ou não da contaminação ambiental, alegando que as plantas

vasculares são reconhecidas como excelentes modelos genéticos para detecção de mutações ambientais.

Os testes com a *Allium cepa*, são definidos como resultados confiáveis, em que se mostram suscetíveis à padronização de condições experimentais, a disponibilidade e a reprodutibilidade dos resultados (RODRIGUES *et al.*, 2010), onde podem apontar os efeitos causados pela população humana, no que diz respeito aos impactos ambientais oriundos de resíduos despejados por indústrias que possuem composições químicas, e os riscos trazidos pela urbanização, através da carga genotóxica global do lixo urbano (NUNES *et al.*, 2011).

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a toxicidade do efluente WEPBP através do Teste *Allium cepa*. Por meio do teste foi verificado a indução de anormalidades nucleares de forma qualitativa e quantitativa, avaliando o índice mitótico para investigar a genotoxicidade de três concentrações distintas do efluente WEPBP oriundo da produção de biodiesel.

MATERIAIS E MÉTODOS

O Efluente do Pré-tratamento da Produção de Biodiesel (WEPBP), foi cedido por uma usina localizada na região noroeste do Rio Grande do Sul – Brasil. Esse material foi processado pela equipe de pesquisa de Engenharia Ambiental da UFFS, a fim de quantificar e qualificar o efluente, onde o mesmo passou pelo sistema Foto-Eleto Fenton-O₃(PEF-O₃), onde se buscou converter os compostos orgânicos que possuem uma cadeia longa em compostos menores, aumentando a taxa de biodegradabilidade do WEPBP.

Após o enraizamento, os bulbos foram expostos às amostras do efluente do pré-tratamento da produção de biodiesel (WEPBP) por 24 horas, sendo que o grupo considerado controle, foi mantido em água destilada pelo mesmo período e outro grupo foi submetido ao Nitrato de Chumbo (Pb(NO₃)₂), que é um conhecido mutagênico e genotóxico.

Para os testes foram feitas diluições do WEPBP tratado pelo sistema Foto-Eleto Fenton-O₃(PEF-O₃), nas seguintes proporções: 0,1mL/L; 0,01mL/L e 0,001mL/L, além dos bulbos submetidos aos controles Negativo e Positivo. Após o tempo de exposição as raízes foram coletadas e acondicionadas por um período de 24 horas em microtubos contendo o fixador de Carnoy (3: etanol / 1: ácido acético). Foi feita a coloração das lâminas conforme o protocolo de Feulgen com modificações, onde as raízes foram submetidas à hidrólise ácida com HCl 1N por 15 minutos a 60°C. Para interromper a hidrólise, as mesmas foram novamente lavadas em

água destilada, por três vezes. Em seguida, foram imersas em reagente de Schiff por 60 minutos no escuro e em temperatura ambiente.

Em Microscopia Óptica, foram observadas 1000 células por lâmina (cinco lâminas), em aumento de 400X, contabilizando as células micronucleadas (MN) e as anomalias nucleares (AN) dos tipos: Binucleação, Broken-egg, Ponte Anafásica, Stikness, C-Mitose, perda de cromossomo e algumas outras possíveis intercorrências como mostradas no artigo do Morales (2008). O Índice Mitótico foi obtido seguindo as recomendações de Oliveira *et al.* (1996). Os dados extraídos das contagens totais foram submetidos à análise estatística Anova, aplicando-se o Teste de Tukey, por meio do software SISVAR, a fim de verificar se houve diferença significativa entre os controles e os tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O uso de biomarcadores sensíveis, como o *Allium cepa*, traz vantagens quando a proposta é determinar se um composto tem ação sobre as etapas da mitose onde os cromossomos estão expostos devido à ausência da membrana nuclear. Neste estudo os resultados obtidos evidenciam que esse organismo é capaz de determinar a ação genotóxica do composto WEPBP.

Tabela 1 – Valores obtidos do Índice Mitótico (IM) submetidos a teste estatístico.

Tratamentos	Médias
Controle negativo	9,36 * a
0,001mL/L	6,54 b
Controle positivo	6,14 b
0,1mL/L	3,98 c
0,01mL/L	3,12 c

*Médias não seguidas por mesma letra diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Pode-se observar que o Índice Mitótico nos tratamentos em 0,1mL/L; 0,01mL/L e 0,001mL/L e no controle positivo (Nitrato de Chumbo) foram menores que o IM do controle negativo.

Desta forma, os dados obtidos dos experimentos indicam que mesmo diluindo o WEPBP os resultados ainda não são promissores. A redução ou o aumento de IM são indicadores na avaliação de poluição ambiental, inclusive para detecção de contaminantes indutores de citotoxicidade (MORALES, 2009), diante dessa premissa, nossos resultados mostram que o efluente, mesmo sob Foto-Eleto Fenton-O₃(PEF-O₃) e diluição, não teve diminuição de compostos persistentes.

Outro marcador usado nos testes, foi Anormalidades Nucleares (AN), eventos que são decorrentes de danos nos cromossomos quando estes estão passando pela mitose e se caracterizam por alterações morfológicas nos núcleos decorrentes dos agentes testados.

Quando os dados de anormalidades nucleares foram computados e analisados percebemos que a diferença entre o grupo controle e os outros tratamentos foi significativa como está demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores obtidos de células com Anormalidades Nucleares (AN) e submetidos a teste estatístico.

Tratamentos	Médias
Controle negativo	8,6 * b
0,01mL/L	27,6 a
0,001mL/L	31 a
0,1mL/L	36,8 a
Controle positivo	37,2 a

*Médias não seguidas por mesma letra diferem pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

Os danos mais frequentes encontrados foram: C-mitoses, pontes anafásicas, células binucleadas, Stikiness e micronúcleos (MN). Os danos que envolvem a etapa de mitose, como os erros na disjunção dos cromossomos (C-mitoses, pontes anafásicas), são induzidos por substâncias que agem na estrutura dos fusos mitóticos no momento da metáfase a anáfase.

Fica evidente diante dos dados da Tabela 2 que, na amostra testada ainda persistem elementos clastogênicos (quebra), aneugênicos (perdas) que potencializam significativamente o aumento de ANs em relação ao grupo controle negativo. Os dados também mostram que os grupos com as diluições se equiparam ao grupo testado com Nitrato de Chumbo, um conhecido elemento mutagênico e genotóxico.

A anormalidade mais frequente foi o da C-mitose, evento esse induzido por qualquer erro na estrutura e funcionamento dos microtúbulos do fuso mitótico que ocasionam perdas, atrasos, aderências cromossômicas e não posicionamento correto dos cromossomos na placa metafásica. Esse tipo de erro é aneugênico é o que induz aneuploidia ou segregação anormal de cromossomos na fase da mitose. Inúmeros compostos são capazes de promover esse tipo de erro (MORALES, 2009).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam que a amostra do WEPBP diluído nas três concentrações testadas, diminui o índice de mitoses na raiz da cebola, bem como aumenta erros do tipo

aneugênico. Desta forma o efluente tem potencial genotóxico e citotóxico e mesmo sob tratamento do tipo Foto-Eleto Fenton-O3(PEF-O3) não se consegue quebrar compostos persistentes.

REFERÊNCIAS

ARAES, A. L. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Centro Científico Conhecer** - Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1958-1972, 2012. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/engenharia/otimizacao.pdf>. Acesso em: 02 fev. 2023.

BORBA, F. H.; HAHN, C. L.; MAYER, I.; SEIBERT, D.; GUIMARÃES, R. E.; INTICHER, J. J.; ZORZO, C. F.; KREUTZ, G. F. Occurrence, statutory guideline values and removal of contaminants of emerging concern by Electrochemical Advanced Oxidation Processes: A review. **Science of The Total Environment**, v. 748, n. 141527, dec. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969720350567?casa_token=dzEYvLc-mNYAAAAA:zPAyPr03ms-bHnRWawfkPgWW_hlFl_hyjVx29ibjOkQHsO2sqsPIY8uV9IQPzpzdxuEgxxS8w4. Acesso em: 19 fev. 2023.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, v. 650, p. 80-86. 2008. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357180700294X?casa_token=wVIBAGKMBolIAAAAA:QKssBIXHDrvXP3zg-b9I9o61Hx7ZKOVfbk4NrnmlIINf3lxOJ7Tn3BBSQ-btMswxKtnZCwwC89U

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383574209000404>. Acesso em 14 jan. 2023.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 155-159, abr./jun. 2009.

NUNES, E. A.; LEMOS, C. T. GAVRONSKI, L. MOREIRA, T. N.; OLIVEIRA, N. C. D.; SILVA, J. da. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v. 84, p. 47-53, 2011.

RODRIGUES, F. P.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; GUEDES, C. L. B; JORDÃO, B. Q. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 1, p. 169-175, 2010.