

POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS EM CEBOLA¹

CYTOGENOTOXIC EFFECTS OF SOFT DRINK INDUSTRY EFFLUENTS ON ONIONS

**Marleen da Rosa², Alessandra Breitenback², Julia Piovesan Somavilla², Felipe Farcili Scremin³,
Rodrigo Fernando dos Santos Salazar⁴ e Noeli Júlia Schüssler de Vasconcelos⁵**

RESUMO

A planta *Allium cepa* (cebola) é considerada um dos organismos mais eficazes na detecção de toxicidade. Neste trabalho, foi avaliado o potencial citogenotóxico do efluente de indústria de bebidas não alcoólicas em *Allium cepa*. O experimento foi completamente casualizado com cinco repetições de 20 sementes, em placas de petri, adicionados 6 mL de solução do efluente tratado, efluente bruto e o controle. A citotoxicidade foi estimada pelo índice de germinação, e a genotoxicidade, por meio do percentual de micronúcleos. A germinação e o crescimento relativo das radículas tiveram comportamento muito semelhante entre os tratamentos, porém o crescimento das radículas dentro dos tratamentos foi bem heterogêneo. O percentual de micronúcleos foi elevado no efluente bruto, na concentração 100% em comparação ao controle e ao efluente tratado. Concluiu-se que o efluente, mesmo sem tratamento, nas condições testadas neste trabalho, não é fitotóxico para *Allium cepa*.

Palavras-chave: *Allium cepa*, lodo industrial, toxicidade.

ABSTRACT

Allium cepa (onion) is considered one of the most effective plants in detecting toxicity. This study analyzed the cytogenotoxic effects of soft drink industry effluents on *Allium cepa*. The experimental design was a completely randomized one, with 5 replicates of 20 seeds in petri dishes. To the petri dishes, 6 mL of treated, raw, and control effluents were added. Cytotoxicity was associated with the germination index, and genotoxicity, with the percentage of micronuclei. Both seed germination and growth of rootlets revealed a very similar behavior between the treatments, but the growth of rootlets during the treatments was very heterogeneous. The percentage of micronuclei was high in the raw effluent at 100% concentration when compared to the control and treated effluents. It was concluded that the effluent, even without treatment, that is, under the conditions tested in this study, is not phytotoxic to *Allium cepa*.

Keywords: *Allium cepa*, industrial effluents, toxicity.

¹ Trabalho Final de Graduação - TFG.

² Acadêmicas do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Centro Universitário Franciscano. E-mails: marleenrosa@gmail.com; ale_breitenbach@hotmail.com; julia29@hotmail.com

³ Coautor. Engenheiro Ambiental - Supervisor Técnico de Meio Ambiente. E-mail: fscremin@civism.com.br

⁴ Colaborador. Docente do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária - Centro Universitário Franciscano. E-mail: r.f.s.salazar@gmail.com

⁵ Orientadora - Centro Universitário Franciscano. E-mail: noejuabio@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

Os testes ecotoxicológicos são exigidos tanto no estado do Rio Grande do Sul como em outros estados da federação e são de extrema importância por trazerem outras evidências que os testes físico-químicos não evidenciam (CONSEMA, 2006). Entretanto, os ensaios toxicológicos não substituem estes que identificam e quantificam contaminantes, e sim avaliam os efeitos biológicos em corpos hídricos receptores, de forma que ambos se complementam mutuamente (PIRES; CHAPARRO, 2010). Os estudos ecotoxicológicos que utilizam diferentes organismos são uma ferramenta eficiente para avaliar quão prejudicial um efluente pode ser quando liberado em corpos hídricos, pois integram interações entre misturas complexas de contaminantes presentes no efluente, independentemente de composição física e química (PEREIRA et al., 2009).

A Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico (OECD, 1984) descreve os testes de fitotoxicidade como uma das técnicas mais comuns na avaliação de compostos químicos. Vários autores (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999; GUERRA; SOUZA, 2002) delineiam a espécie *Allium cepa* L. como um eficiente sistema-teste para medir o potencial citogenotóxico de produtos poluidores no ambiente por apresentar alta sensibilidade e correlação com outros bioensaios. O *Allium cepa* é indicado como um eficiente organismo teste (FISKESJÖ, 1985) devido às características que apresenta como crescimento rápido das suas raízes, grande número de células em processo de divisão, adaptação a diferentes meios de cultivos, sua disponibilidade durante todo o ano, seu fácil manuseio, e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho.

O uso de *Allium cepa* como material teste foi originalmente introduzido por Levan (1938) e, a partir daí, vem sendo utilizado como um eficiente modelo de monitoramento ambiental no que se refere à avaliação e classificação da toxicidade de químicos presentes no meio ambiente (FISKESJÖ, 1985).

Os testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações de organismos vivos à poluição ambiental (SOUZA; FONTANETTI, 2006). O teste com *Allium cepa* pode ser utilizado sem que a amostra necessite passar por um processo de esterilização, purificação e ou condensação, permitindo assim, que seja feita uma análise da amostra total e de acesso mais rentável às pesquisas. Os efeitos dos poluentes sobre as plantas, conforme Souza e Fontanetti (2006), podem ocorrer em diversos níveis, sendo que a maioria dessas reações pode ser utilizada como critérios para auxiliar na avaliação das alterações ambientais em estudos de biomonitoramento.

Neste trabalho, visou-se estimar o potencial citogenotóxico do efluente bruto e tratado, oriundo de uma indústria de bebidas não alcoólicas, por meio de biotestes com o organismo *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em uma indústria de bebidas não alcóolicas na região Central do Rio Grande do Sul, Brasil. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Engenharia Ambiental e Sanitária do Centro Universitário Franciscano, de março a junho de 2015.

Para a avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos, sementes de *Allium cepa* foram submetidas aos tratamentos, com efluente bruto (efluente da parte administrativa, industrial e refeitório da empresa) com características de DBO = 680 mg/L, DQO = 3090 mg/L, pH = 5,77, efluente tratado por sistema de lodo ativado e água destilada (controle negativo). As amostras de ambos os efluentes utilizados no experimento foram diluídas em água destilada nas concentrações 25%, 50%, 75%, e uma amostra 100%. O ensaio de germinação foi conduzido em placas de petri com um disco de papel filtro no fundo, no qual foram dispostas 20 sementes equidistantes e adicionados 6 mL de cada solução teste (efluente bruto, efluente tratado e água destilada). O delineamento adotado foi completamente casualizado, com 5 repetições por tratamento (efluentes nas concentrações 25%, 50%, 75% e 100%). As placas foram mantidas em condições controladas, com temperaturas de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ por cinco dias. As sementes germinadas foram contadas, e as radículas da concentração 100% de ambos os tratamentos e do branco foram fixadas em fixador de Carnoy (três partes de etanol para uma parte de ácido glacial acético). Para a determinação do percentual de micronúcleos, foram preparadas conforme descrito em Fiskesjö (1985), coradas com carmin acético 1%. Foram analisadas 1500 células por tratamento e avaliados os percentuais de micronúcleos resultantes de efeito clastogênico (micronúcleo, quebras e pontes cromossômicas).

A determinação da citotoxicidade foi expressa em porcentagem de germinação (%GR), crescimento médio relativo da radícula (%CCR) e índice de germinação (%IG) por meio das seguintes fórmulas descritas em Nascimento (2002):

$$\%GR = \frac{N^\circ \text{ de sementes germinadas na solução teste}}{N^\circ \text{ de sementes germinadas no controle}} \times 100$$

As radículas foram medidas com paquímetro (instrumento de medida), e as médias dos dados foram realizadas para obtenção do crescimento relativo da raiz:

$$\%CCR = \frac{\text{Média do crescimento das raízes na solução teste}}{\text{Média do crescimento das raízes no controle}} \times 100$$

Esses dados foram compilados para o cálculo de índice de germinação, o qual identificou o nível de citotoxicidade dos tratamentos:

$$GI(\%) = GR(\%) \times CRR(\%)$$

Para verificar a presença de micronúcleos, as radículas foram analisadas ao microscópio óptico Olympus CX 41 em objetiva de 40X, pelo método *squash* (espalhamento das células). A análise foi feita em vinte e cinco radículas de cada tratamento (cinco radículas de cada repetição), totalizando 7500 células. O número de micronúcleos detectados em cada uma das cinco lâminas analisadas em cada repetição do tratamento, constituído por efluente bruto 100% e controle, foi somado, e a média foi expressa em número de micronúcleos por 1500 células. A comparação entre as frequências de micronúcleos foi realizada por análise da variância pelo software PAST 5.0, (ANOVA) e teste Tukey (TUKEY, 1953) para comparação de médias. O nível crítico de rejeição da hipótese nula foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade com *Allium cepa* avalia o efeito tóxico das amostras sobre a germinação e sobre o crescimento das radículas, dois processos que podem apresentar sensibilidade a diferentes compostos em diferentes concentrações. Os dados de germinação são apresentados na tabela 1, os quais evidenciam que tanto o efluente bruto como o efluente tratado não inibiu a germinação bem como não alterou o crescimento das radículas.

Tabela 1 - Dados de germinação e crescimento de radículas das sementes de *A. cepa* expostas aos efluente bruto e tratado, nas concentrações 25%, 50%, 75% e 100% e água destilada (controle negativo).

Concentração	Efluente Bruto				Efluente Tratado			
	Germinação (%)	Desvio padrão	Crescimento das raízes (%)	Desvio padrão	Germinação (%)	Desvio Padrão	Crescimento das raízes (%)	Desvio padrão
25%	40	2,12	12,27	6,06	39	2,38	14,68	7,33
50%	28	1,81	9,48	5,04	40	1,00	11,72	6,50
75%	21	2,94	10,78	4,44	34	2,77	11,32	6,20
100%	31	1,48	8,96	4,71	29	1,30	10,07	5,08
Controle	37	5,43	11,92	5,43	37		11,92	

As diferenças de %GR observadas nas concentrações 25, 50, 75 e 100% não diferiram significativamente em relação ao controle. Apesar disso, o %GR visualizado no controle é suficiente para validar o teste (Tabela 2). Pode-se inferir, assim, que os efluentes bruto e tratado não inibiram a germinação e nem afetaram o crescimento das radículas.

Os valores de %CCR também evidenciaram que tanto o efluente bruto como o tratado não alteraram o metabolismo das sementes a ponto de inibir seu crescimento. Da mesma forma, o %IG (correlaciona a germinação e crescimento da radícula) não afetou o crescimento da radícula, indicando que não houve efeito tóxico capaz de alterar o metabolismo da plântula.

Tabela 2 - Comprimento das raízes (cm) após cinco dias de exposição aos tratamentos: efluente bruto e efluente tratado (25%, 50%, 75% e 100%) e água destilada (controle negativo).

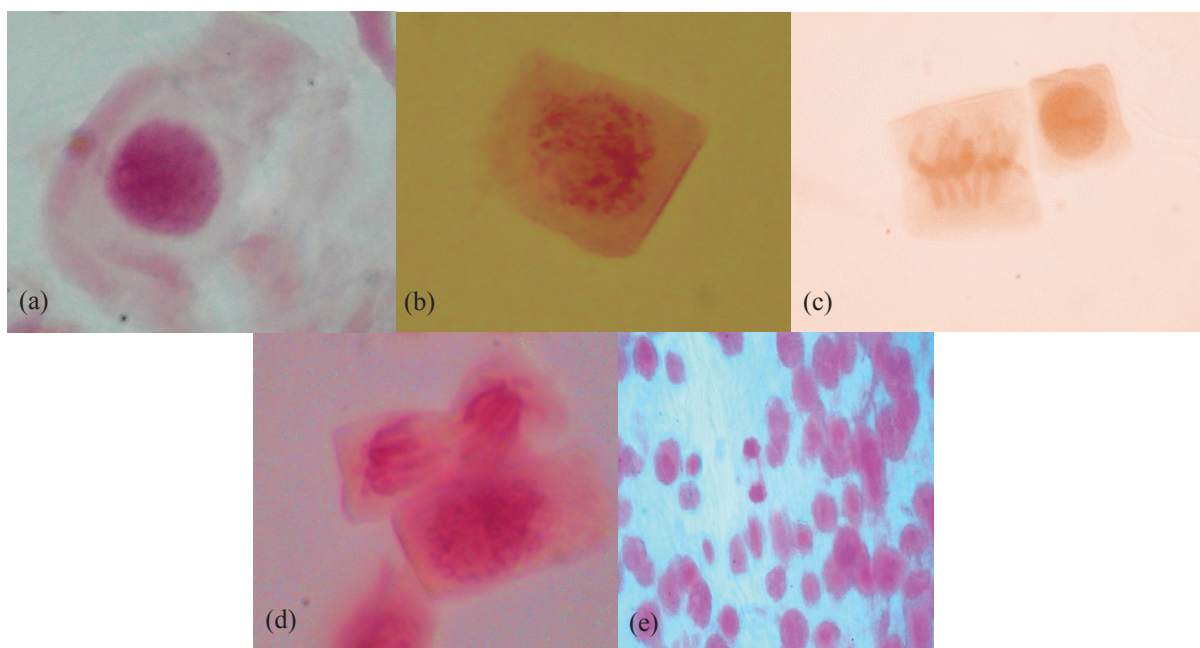
Efluente Bruto			Efluente Tratado			
Concentração (%)	GR	CCR	IG	GR	CCR	IG
25	100,00	96,97	0,10	105,41	91,89	9686,12
50	75,68	75,54	429,06	108,11	11,72	1267,05
75	56,76	85,90	51,08	91,89	11,32	1040,19
100	83,78	71,39	5981,05	78,38	10,07	789,29
Controle	100,00	99,00	9900,00	99,00	99,00	9900,00

GENOTOXICIDADE

Existe uma inter-relação entre fatores ambientais desencadeantes da mutagênese e os fatores genéticos individuais. As mutações podem ser observadas pela formação de micronúcleos, pequenos núcleos individuais com DNA, localizados próximos ao núcleo normal de células em divisão como resultado de quebras cromossômicas. Os fragmentos ou sequências de cromossomos inteiros contidos nos micronúcleos não se prendem ao fuso mitótico e, dessa forma, não chegam aos polos das células durante a mitose ou a meiose (MILLER, 1973).

Na figura 1, são ilustradas as fases da divisão celular visualizadas nas células de *A. cepa*, expostas ao tratamento controle e ao tratamento de efluente tratado 100%, nas quais não são observados micronúcleos.

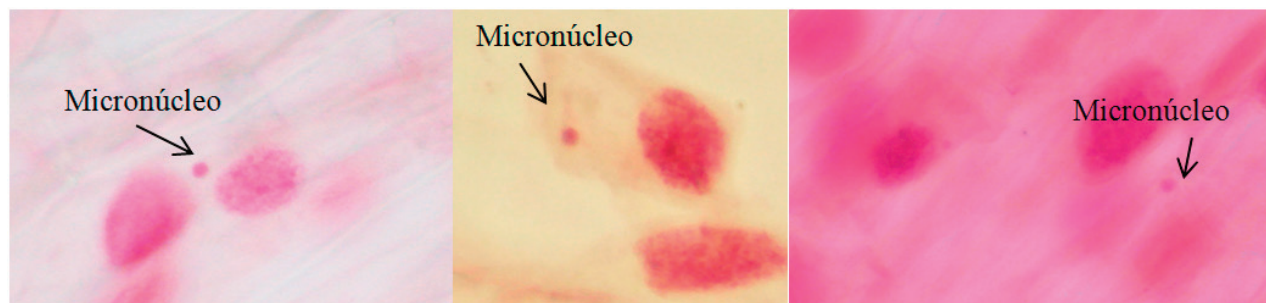
Figura 1 - Células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos tratamentos com efluente tratado - 100% e água destilada, nas fases prófase, metáfase, anáfase e telófase de uma divisão celular normal, sem manifestação de micronúcleos.



(a) Prófase inicial - normal (b) Prófase final - normal (c) Metáfase - normal
(d) Anáfase final - normal (e) Telófase - normal

Entretanto, na figura 2, observam-se células meristemáticas em prófase mitótica com micronúcleos.

Figura 2 - Células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos tratamentos com efluente bruto - 100%, nas fases prófase, metáfase, anáfase e telófase da divisão celular com manifestação de micronúcleos.



Os valores de micronúcleos obtidos no presente trabalho e apresentados na tabela 3 correspondem à contagem de cinco lâminas por repetição, dos tratamentos 100% efluente bruto e controle.

Tabela 3 - Número de micronúcleos observados na análise microscópica de 1500 células de *Allium cepa* expostas aos tratamentos constituídos por efluente bruto e efluente tratado, na concentração 100% e controle (água destilada).

	Número de micronúcleos					Percentual de micronúcleos
	R1	R2	R3	R4	R5	
Efluente bruto	R1	R2	R3	R4	R5	
	3	6	22	10	105	1,95%
Efluente tratado	R1	R2	R3	R4	R5	
	0	0	0	0	0	
Controle	R1	R2	R3	R4	R5	
	0	2	0	0	0	0,026%

As células das radículas de *A. cepa* expostas aos tratamentos controle e efluente tratado não apresentaram micronúcleos em número indicativo de toxicidade. No efluente bruto, o número de micronúcleos detectado foi superior ao efluente tratado e ao controle. A heterogeneidade dos dados observados nas repetições do tratamento 100% efluente bruto se deve ao diferente grau de desenvolvimento das raízes analisadas. Após cinco dias da germinação, a quantidade de tecido meristemático primário com células em divisão é menor, o que dificulta a análise. O ideal é utilizar radículas com 2 a 3 mm de comprimento, nas quais o tecido meristemático é mais abundante.

Pela análise da variância pelo software PAS 0.5 (One Way - ANOVA) da frequência de micronúcleos, apresentada na tabela 2, e teste Tukey (TUKEY, 1953) de comparação de pares de médias, observou-se que não houve significância estatística entre as frequências analisadas ($p > 0.05 = 0,5611$), não existindo, portanto, diferença significativa entre as médias dos micronúcleos encontrados nos tratamentos testados.

CONCLUSÃO

As diferenças entre as médias de micronúcleos observadas são mera variabilidade amostral, ocorreram ao acaso e, portanto, não há indícios de mutagenicidade do efluente, concluindo-se, portanto, que o efluente gerado na indústria de bebidas não alcoólicas avaliada não tem potencial fitotóxico em *Allium cepa*, nas condições testadas neste experimento. O teste de germinação utilizando *A. cepa* como organismo teste foi eficiente para avaliar tanto citotoxicidade como genotoxicidade de efluentes industriais.

REFERÊNCIAS

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. M.; GUPTA, S. K. Cytogenetics effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 181-189, 1999.

CONSEMA (CONSELHO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE). **Resolução 129**, de 24 de novembro de 2006. Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio Grande do Sul, 2006.

FANTIN, A.C.M. Teste de sensibilidade em sementes de Rúcula (*E. sativa*) Alface (*Lactuca spp*) em contato com diferentes concentrações, do pesticida Glifosato. **VI Congresso de Meio Ambiente das Universidades Grupo de Montevideu**. São Carlos: UFSCar, 2009.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, p. 99-112, 1985.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002. 131p.

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

MILLER, R. C. **The Micronucleus Test as an in Vivo Cytogenetic Method. Environmental Health Perspectives**. New Jersey: Institute for Medical Research Camden, 1973.

NASCIMENTO W. M. **Circular Técnica** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Germinação de Sementes de Alface. Brasília, 2002.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD guidelines for testing of chemicals**: terrestrial plants growth test. Paris, France, 1984. 11p.

PEREIRA, R. et al. The effectiveness of a 32 biological treatment with *Rhizopus oryzae* and of a photo-Fenton oxidation in the mitigation of toxicity of a bleached kraft pulp mill effluent. **Water Research**, v. 43, n. 9, p. 2471-2480, 2009.

PIRES, E. C.; CHAPARRO, T. R. Toxicity evaluation as a tool to assess the performance of an anaerobic immobilized biomass reactor. **Dyna rev. fac. nac. minas**, Medellín, Colômbia, v. 77, n. 164, p. 284-391. 2010.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 605, p. 87-93, 2006.

TUKEY, J. W. **The problem of multiple comparisons**. Unpublished manuscript. Princeton University, 1953.