

AValiação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do BTEX, utilizando o sistema teste de *Allium cepa*.

Mazzeo, D.E.C.; Marin-Morales, M.A.

Departamento de Biologia - Instituto de Biociências - UNESP – Campus Rio Claro
decm@rc.unesp.br

Palavras-chave: mutagenicidade, genotoxicidade, BTEX, *Allium cepa*

Introdução

Derivados do petróleo como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são compostos que tem despertado um interesse especial pela sua toxicidade e por serem relativamente móveis no meio-ambiente, tanto na fase gasosa como na líquida e na sólida (LOVLEY, 1997). Para compreender melhor o comportamento destes compostos no solo, na água e no ar, é muito importante para avaliar os seus efeitos sobre a saúde humana e de toda a biota exposta (PEDROZO, 2002).

A espécie *Allium cepa* tem sido utilizada como organismo teste em diversos trabalhos, a fim de identificar químicos potencialmente genotóxicos e mutagênicos (MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). Segundo Ateeq et al. (2002), as células de meristemas radiculares de *Allium cepa* apresentam características que as credenciam como um eficiente material para estudos citogenéticos, sendo indicadas para ensaio de aberrações cromossômicas com poluentes ambientais.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos pela mistura BTEX, utilizando células meristemáticas de *Allium cepa* como sistema-teste.

Material e Métodos

Químico testado

Foram preparadas quatro amostras da mistura BTEX (Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno), sendo a mais alta concentração obtida com o índice de solubilidade do BTEX em água (benzeno: 1780mg/L, tolueno: 535mg/L, etilbenzeno: 152mg/L e xilenos: 135mg/L – valor este que corresponde à solubilidade do isômero menos solúvel, *m*-xileno). As outras duas amostras foram obtidas pela diluição desta solução pelos fatores 10 e 100. A quarta amostra foi elaborada simulando a presença do composto com valores abaixo das concentrações limite para água potável (benzeno: 1,25µg/L, tolueno: 42,5µg/L, etilbenzeno: 50µg/L e xilenos totais: 75µg/L).

Sistema-teste

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste vegetal para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, para as quatro concentrações determinadas constituiu-se de sementes de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade (cebola baía periforme).

Tratamento

Sementes de *A. cepa* foram submetidas à germinação, em temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ$), em recipientes individuais vedados com tampas de teflon (para impedir a volatilização

do composto), contendo as quatro concentrações do BTEX, água ultra-pura (controle negativo) e uma solução de metil metano sulfonato $4 \times 10^{-4} \text{M}$ (MMS) como controle positivo. Após as raízes atingirem cerca de 1,5cm, uma parte dessas raízes foram coletadas e o restante delas foi transferido para placas de Petri com água ultra pura por um período de recuperação de 48 h. Todas as raízes coletadas foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético, v/v) por 6-12h.

As raízes fixadas foram coradas com reativo de Schiff, como descrito por Feulgen e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978). Na preparação das lâminas, a região meristemática foi sobreposta por uma lamínula e esmagada cuidadosamente em uma gota de carmim acético a 2%. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética para posterior análise.

Para análise das irregularidades celulares, foram confeccionadas 10 lâminas de cada ensaio, sendo que em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células, totalizando 5000 células por ensaio para cada tratamento.

O efeito genotóxico foi avaliado pela quantificação de aberrações cromossômicas, tais como, pontes anafásicas e telofásicas, perda cromossômica, brotos nucleares, aderência cromossômica, C-metáfase, atraso cromossômico, célula binucleada e com multipolaridade. A análise dos efeitos mutagênicos foi feito por meio da observação e contagem de células micronucleadas e de células com quebras cromossômicas registradas para todas as lâminas de todos os tratamentos.

Todos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo por meio do teste estatístico de Mann-Whitney, com nível de significância de 0,05.

Resultados e Discussão

Os resultados dos efeitos genotóxicos e mutagênicos, observados em células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição às diversas concentrações da mistura testada, são mostrados nas figuras 1 e 2.

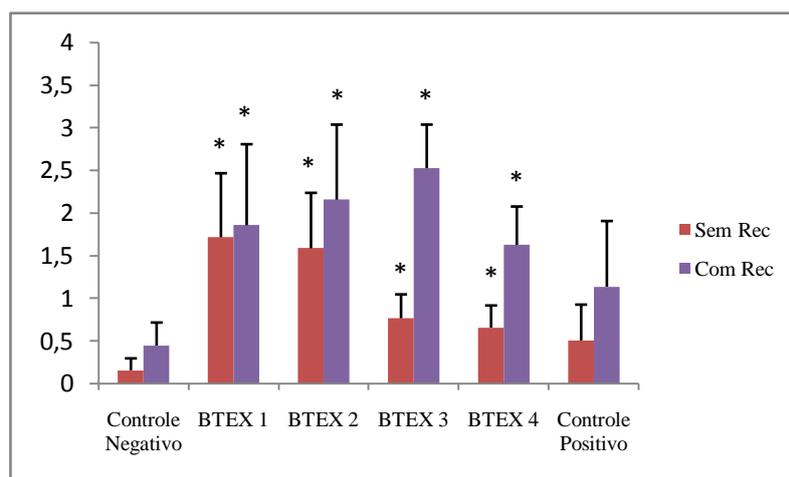


Figura 1. Média das alterações genotóxicas (Aberrações cromossômicas) encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas à germinação em diferentes concentrações de BTEX. * $p < 0,05$

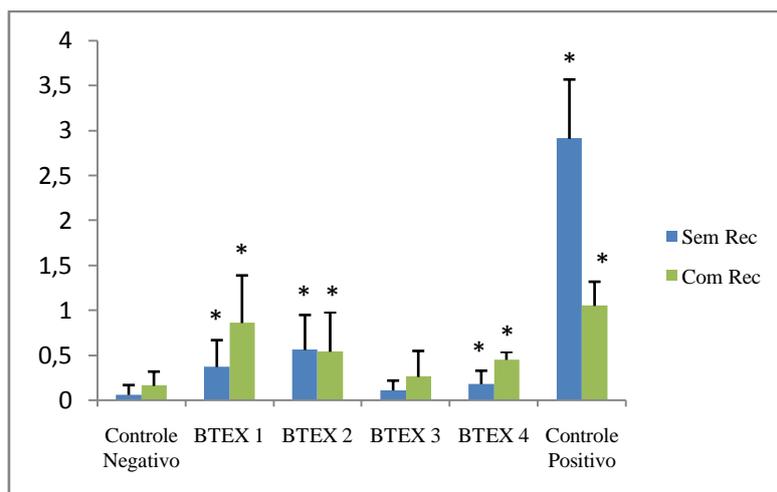


Figura 2. Média das alterações mutagênicas (micronúcleos e quebras cromossômicas) encontradas em células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas à germinação em diferentes concentrações de BTEX. * $p < 0,05$

A avaliação do potencial genotóxico foi estatisticamente significativa, em relação ao controle negativo, para as quatro concentrações do BTEX, nos tratamentos com e sem recuperação. O potencial mutagênico, quando comparado com os dados obtidos no controle negativo, foi estatisticamente significativo nos ensaios com as duas concentrações mais altas e a menor concentração do BTEX, além do controle positivo, nos tratamentos com e sem recuperação. Nossos resultados corroboram com Roma-Torres et al. (2006), que ao estudarem trabalhadores expostos ao BTX, mostraram que esses compostos juntos foram capazes de induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos como aberrações cromossômicas, micronúcleos e danos ao DNA.

A partir dos dados obtidos nesse estudo, também podemos sugerir que a mistura BTEX parece possuir um efeito acumulativo nas células meristemáticas de *A. cepa*, levando a um aumento das alterações genotóxicas e mutagênicas quando as raízes são submetidas a um período de recuperação em condição de normalidade.

Assim, as concentrações testadas parecem promover alterações danosas ao material genético de células meristemáticas de *A. cepa*, mesmo após um período de recuperação induzido.

Referências

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, M.; AHMAD, A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 514, p. 105-113, 2002.

CARITA, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, n.5, p.722-725.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

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**, Amsterdam, v. 650, p.80-86, 2008.

LOVLEY, D. R. Potential for anaerobic bioremediation of BTEX in petroleum-contaminated aquifers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 18, p. 75-81, 1997.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.30, p. 665-676, 1978.

PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia e avaliação de risco do petróleo**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais, 2002. 246p.

ROMA-TORRES, J.; TEIXEIRA, J. P.; SILVA, S.; LAFFON, B., CUNHA, L. M.; MÉNDEZ, J.; MAYAN, O. Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 604, p. 19-27, 2006.