



MUTAGENICIDADE DAS ÁGUAS DO AÇUDE DO CAMPUS II DA UEPB EM LAGOA SECA, PB, UTILIZANDO O TESTE *Allium cepa*

Mariana Coelho Bezerra¹. Allan Félix Mourão². Luanna Maria Beserra Filgueiras³.
Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses^{4*}.

RESUMO

A mutagenicidade pode estar relacionada com quebras cromossômicas induzidas por poluentes ambientais. O objetivo deste estudo foi caracterizar o potencial mutagênico dos poluentes presentes na água do Campus II, na cidade de Lagoa Seca – PB, analisando alterações cromossômicas em células meristemáticas de *Allium cepa*, no período de estiagem de 2013. Os bulbos foram expostos aos tratamentos por 72 h: água do açude, solução de Hoagland (controle negativo) e 15 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de MMS – metilmetanosulfonato (controle positivo). Em cada tratamento, três bulbos foram expostos, para cada bulbo, cinco lâminas foram confeccionadas. Para análise do índice mitótico (IM) e frequência de micronúcleos (MN) foram analisadas 2.000 células por raiz.lâmina⁻¹ e 100 células para aberrações cromossômicas (AC). Os poluentes exerceram alto potencial mutagênico nas células meristemáticas de *A. cepa*, a frequência de MN, *stickiness* (cromossomos pegajosos) e AC do tipo não identificadas, foram maiores em relação ao controle negativo. Não houve alteração significativa para o IM. Esses resultados indicam que os efluentes de origem variada estão exercendo efeitos nocivos no bioindicador utilizado, sendo importante manter o biomonitoramento e adotar medidas de controle de efluentes. Essas medidas são importantes porque essas águas são utilizadas para abastecimento público, irrigação, entre outras utilidades.

Unitermos: Poluição, Mutagenicidade, Bioindicador, Aberrações Cromossômicas.

¹ Bacharelado do curso de Agroecologia – Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca – PB, Brasil, mary.uepb@hotmail.com

² Bacharelado do curso de Agroecologia – Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca – PB, Brasil, kazuafelix@gmail.com

³ Mestranda pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil, luannabeserra-uepb@hotmail.com

⁴ Professor do Departamento de Agroecologia / Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande – PB, Brasil, carlos@ccaa.uepb.edu.br



MUTAGENICITY THE WATER OF THE CAMPUS II UEPB DAM IN LAGOA SECA, PB, BRAZIL, USING THE *Allium cepa* TEST

ABSTRACT

The mutagenicity can be related to chromosomic breaks induced by environmental pollutants. The aim of this research was to characterize the mutagenic potential of the pollutants in the water of the Campus II of UEPB dam, in Lagoa Seca city, Paraíba State, Brazil, analyzing chromosomal changes in the meristematic cells of *Allium cepa*, in the dry period of 2013. The bulbs were exposed for 72 h to the treatments: water from dam, Hoagland solution (negative control) and 15 $\mu\text{g.l}^{-1}$ from MMS – methyl methanesulfonate (positive control). In each treatment, three bulbs were exposed and for each bulb, five slides were prepared. For mitotic index (MI) and micronucleus (MN) frequency rate, a total of 2,000 cells per root/slide were analyzed and 100 cells for the chromosome aberrations (CA). The pollutants induced a high mutagenic potential in the meristematic cells of *Allium cepa*, the frequency rate of MN, stickiness and CA from nonidentified type were greater than the negative control. There was no significant change for MI. These results indicate that the effluents which have varied sources are inducing harmful effects on the bioindicator, therefore, it is important to keep biomonitoring and adopting effluents control measures. The measures are important because these waters are used primarily for public supply and irrigation.

Uniterms: Pollution, Mutagenicity, Bioindicator, Chromosomes Aberrations.

INTRODUÇÃO

Resíduos industriais, urbanos e agrícolas são lançados indiscriminadamente nos cursos d'água acrescentando vários contaminantes às águas superficiais e sedimentos (Egito et al., 2007). Esses resíduos são caracterizados como misturas complexas contendo numerosos compostos orgânicos e inorgânicos genotóxicos que muitas vezes não sofrem degradação durante o processo de tratamento de água devido a um alto grau de persistência, alguns são mutagênicos conhecidos (Rank e Nielsen, 1998). Metais pesados potencialmente tóxicos lançados na natureza são perigosos e frequentemente indestrutíveis e, mesmo quando precipitados e conseqüentemente acumulados no fundo de rios, o processo pode ser revertido voltando os metais à sua forma tóxica inicial (Tommasi, 1979). Além dos efeitos diretos à saúde, o perigo dos poluentes está no fato de poderem ter efeitos tóxicos ou mutagênicos indiretos e, ao longo do tempo, causar várias doenças como: infertilidade, câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, entre outros (Grover e Kaur, 1999).

Substâncias tóxicas, muitas das quais químicas, promovem a ocorrência de mutações genéticas e aberrações cromossômicas e existe um grande número de protocolos desenvolvidos para detectar essas alterações (Majer et al., 2005).



Para a avaliação, monitoramento e detecção de genotóxicos no ambiente os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados desde a década de 70 (Grant, 1999). O teste *Allium* é bem conhecido e comumente utilizado em laboratórios do mundo inteiro para análise de várias substâncias das quais se deseja conhecer o possível potencial mutagênico, estimado pela frequência de aberrações e quebras cromossômicas indicando riscos de aneuploidia e fornecendo valiosas informações em relação à avaliação de amostras ambientais (Rank e Nielsen, 1993).

Os resultados positivos no teste *Allium* devem ser considerados como uma indicação de que a amostra testada pode ser um perigo biológico também para os outros organismos (Fiskesjö, 1989), podendo indicar a presença de certas substâncias citotóxicas, genotóxicas ou mutagênicas no ambiente (Smaka-Kincl et al., 1996). A alta sensibilidade do teste *Allium* determina que contaminações não passem despercebidas, mesmo quando são testadas misturas complexas como no caso de esgotos. É recomendado para uma rápida avaliação da genotoxicidade de efluentes, sendo uma valiosa ferramenta que pode ser usada como padrão em monitoramentos ambientais para se traçar a localização da fonte de contaminação, identificando influências de baixas concentrações de substâncias citotóxicas e genotóxicas em águas naturais (rios ou açudes), os quais são usados como recipientes para efluentes domésticos e industriais e que, posteriormente, têm suas águas utilizadas na agricultura e no abastecimento público (Amaral et al., 2007).

Este trabalho avaliou o potencial mutagênico da água do açude do Campus II da UEPB no município de Lagoa Seca - PB, no período de estiagem de 2013.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo

As amostras de água do açude do Campus II da UEPB foram coletadas nas coordenadas 07°28'34''S, 36°08'37''W no município de Lagoa Seca – PB estação de estiagem de 2013.

As amostras de água coletadas das margens do açude foram armazenadas em frascos âmbar com capacidade de 1000 ml e levada para o Laboratório de Ecofisiologia Vegetal da Universidade Estadual da Paraíba, campus I, onde foi imediatamente usada para o tratamento dos bulbos de cebola.

Ensaio citogenético

Os experimentos foram conduzidos como descrito por Fiskesjö (1989) no protocolo Invitox nº 8.

Foram colocados cinco bulbos de cebola (*Allium cepa*) com seis cm em média de diâmetro procedentes do comércio local para cada um dos tratamentos. O anel das raízes primordiais foram cuidadosamente limpos para o experimento. Os bulbos foram colocados em recipientes contendo as soluções de controles positivo e negativo e amostra da água do rio, de modo a poderem enraizar durante um período de 72 h. Após essa fase, os ápices radiculares dos três bulbos com maior desenvolvimento das raízes foram cortados e fixados em etanol/ácido acético glacial numa proporção de 3:1 (v/v)



por cinco minutos e conservados em microtubos contendo 1 ml de álcool 70% sob refrigeração.

As pontas das raízes foram submetidas à reação de Feulgen, consistindo de hidrólise ácida com HCl 4 N a 24 °C por 75 minutos interrompida com uma rápida lavagem em HCl 0,1 N (gelado), depois imersas por 40 minutos em reagente de Schiff (corante púrpura nucleofílico), lavadas com água sulfurosa e água destilada posteriormente. Em seguida, foram colocadas sobre lâminas para microscopia junto com uma ou duas gotas de ácido acético 45%, cobertas com lamínulas e esmagadas com leve pressão sobre o material entre lâmina e lamínula e por fim montadas com bálsamo do Canadá.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz com aumento de 400x ou 1000x quando necessário.

Controles

Para o controle positivo foram usados 15 $\mu\text{g.l}^{-1}$ de MMS (Metilmetanosulfonato - CAS# 66273), substância capaz de promover alterações celulares como aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos. Esse tipo de agente se caracteriza por sua reatividade com os centros nucleofílicos no DNA, promovendo alquilação nas bases ou no grupo fosfato (Vogel, 1982). No controle negativo, a solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950) foi empregada.

Análise estatística

A média e o erro padrão (EP) foram obtidos pela contagem de cinco raízes provenientes de cada bulbo e cada grupo experimental foi composto por três bulbos.

As aberrações cromossômicas (AC) foram determinadas pela contagem de 500 células mitóticas por bulbo ($100.\text{raiz}^{-1}$), 1.500 por tratamento.

O índice mitótico (IM) e micronúcleos (MN) foram avaliados pela análise de aproximadamente $2.000.\text{células.raiz}^{-1}$, $10.000.\text{bulbo}^{-1}$, portanto $30.000.\text{células}$ por tratamento.

Os dados de frequências de AC, fases mitóticas, IM, MN e número total de células aberrantes foram comparados entre os tratamentos (Ponto 1 e Ponto 2 com controle negativo) utilizando teste estatístico Kruskal-Wallis. As análises foram realizadas no software SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram observados seis tipos de aberrações cromossômicas (AC): pontes, anáfases com multipolaridades, c-mitoses, *stickiness*, desgarrados e “não identificadas – NI”. Os micronúcleos foram analisados separadamente, durante o período interfásico.

O primeiro mecanismo de ação dos agentes genotóxicos é promover lesões no DNA (oxidação e dimerização de bases, adutos de DNA, entre outras). Essas lesões podem ter três destinos: reparo, alterações irreversíveis e morte celular (Majer et al., 2005). Os danos genéticos detectados neste estudo são indicativos da presença de substâncias clastogênicas (indutoras de quebras) nas amostras testadas. Classicamente

os MN e as pontes cromossômicas são exemplos desse tipo de mecanismo. Outro mecanismo bastante frequente na indução de variados tipos de AC também observados neste estudo corresponde à falhas no processo de disjunção dos cromossomos durante a divisão celular, efeito promovido por substâncias aneugênicas – aquelas que interferem na formação do fuso acromático. As anomalias mitóticas como c-mitoses e *stickiness* (cromossomos pegajosos) podem surgir por processos aneugênicos ou mutações em proteínas importantes na compactação da cromatina. As c-mitoses se originam quando há inativação do fuso acromático de modo que os cromossomos fiquem dispersos na célula (Levan, 1938), muitas substâncias químicas, como as presentes em pesticidas, podem promover esse efeito.

Quanto às alterações nas células, foi observado que a água do açude, no Ponto 1, revelou um alto potencial mutagênico quando comparado ao controle negativo (Tabela 1), tanto na frequência de anomalias do tipo *stickiness* e outras denominadas NI, assim como a frequência de micronúcleos, indicando a presença de contaminantes que promoveram genotoxicidade em células de *Allium cepa*. A amostra do Ponto 2 teve uma diminuição dos efeitos genotóxicos em relação ao tratamento do Ponto 1, mas quando comparada ao controle negativo, houve também um aumento das anomalias do tipo ponte. Pode-se inferir que a água do açude possui substâncias nocivas aos organismos que vivem nesse ambiente e que o potencial mutagênico dos poluentes na água varia em função do espaço, dependendo das descargas vindas dos efluentes. Fatores como espaço, sazonalidade, vazão e índice de chuva podem influenciar a concentração de poluentes na água. A variação na sazonalidade (época de estiagem) é um fator que pode influenciar significativamente a frequência de danos genéticos e promover alterações fisiológicas nos organismos expostos. Essa variação pode sofrer alterações de acordo com o nível de poluição em determinado local (Hayashi et al., 1998).

A anomalia do tipo *stickiness*, foi a mais frequente na amostra do açude coletada no ponto 1, esta mostrou frequência similar ao controle positivo, um conhecido agente alquilante promotor de quebras no DNA, indicando alta genotoxicidade nas amostras testadas. Esses resultados estão de acordo com estudos de outros autores para situações diversas (Smaka-Kincl et al., 1996; Amaral et al., 2007; Egito et al., 2007; Türkoğlu, 2007). A presença desse tipo de anomalia é indicativa de alto teor de toxicidade que promove danos irreversíveis à célula, conduzindo-a, portanto, à morte celular (Fiskesjö, 1989; Türkoğlu, 2007).

Tabela 1. Frequência de alterações microscópicas (média ± erro padrão) nas células radiculares de *Allium cepa* tratadas com água do açude do Campus II da UEPB.

	Ponto 1	Ponto 2	Controle -	Controle +
Micronúcleos	5,25±0,13*	0,21±0,02	0,09±0,21	8,65±2,00*
<i>Stickiness</i>	19,88±2,55*	6,68±0,35	6,00±2,65	25,44±3,88*
Desgarrados	0,45±0,65	0,29±0,11	0,31±0,11	3,01±0,65
Pontes	3,43±0,67	4,23±1,01*	2,00±0,11	5,98±0,76
C-mitoses	2,25±0,44	2,32±0,66	2,11±0,11	5,00±1,42
Anáfases Multipolares	0,76±0,28	1,23±0,63	0,80±0,10	1,19±0,11



Outras (NI)	12,43±0,38*	0,76±0,84	0,50±0,23	13,43±1,20*
Total de células anômalas	39,46±2,58*	13,56±2,67	10,67±2,97	45,12±1,54*

Resultados significantes (teste de Kruskal-Wallis; $\alpha < 0.05$) estão indicados por * quando comparados com o controle negativo.

A frequência de MN, observada nas células do meristema radicular de *A. cepa* foi significativa para o ponto amostrado somente no Ponto 1, indicando a presença de substâncias clastogênicas e/ou aneugênicas (inibidoras das fibras do fuso acromático) (Grover e Kaur, 1999; Egito et al., 2007).

O IM e fases do ciclo celular em amostras coletadas nos pontos 1 e 2, não diferiram do controle negativo (Tabela 2). Vale ressaltar que estudos com *A. cepa* mostram que nem sempre a toxicidade está correlacionada com a genotoxicidade, porque alterações relacionadas com o crescimento da raiz e IM são parâmetros indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações como anomalias cromossômicas (*stickiness*, micronúcleos, pontes cromossômicas, entre outras), indicam genotoxicidade (Fiskesjö, 1989).

Tabela 2. Frequência dos Índices de Fase do ciclo celular (média ± erro padrão) em células radiculares de *Allium cepa* tratadas com água do açude do Campus II da UEPB.

	Ponto 1	Ponto 2	Controle -	Controle +
Interfases	1874,40±4,75	1869,45±20,87	1874,33±13,13	1888,22±11,00
Prófases	27,20±2,54	33,69±12,22	36,76±3,78	34,55±3,87
Metáfases	24,97±3,02	32,43±3,43	25,67±4,56	32,80±1,56
Anáfases	13,34±3,13	25,75±6,88	14,66±3,73	16,32±1,45
Telófases	19,74±5,12	27,83±3,38	26,36±2,99	26,66±6,10
IM	80,60±4,34	119,77±17,77	110,19±13,65	107,99±4,65
Total de células	30.000	30.000	30.000	30.000

CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível detectar a existência de um potencial genotóxico decorrente da presença de substâncias tóxicas na água do açude do Campus II da UEPB nos locais e amostrados.

Devido à importância em se preservar os recursos naturais, em especial este açude utilizado para fins acadêmicos, fazem-se necessários estudos de biomonitoramento de modo a auxiliar e contribuir com redes de monitoramento e ações de manejo agroecológico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Amaral, A. M.; Barbério, A.; Voltolini, J. C.; Barros, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade da água na bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia*, São Paulo, v.20, n.1/2, p. 65-71, 2007.

Egito, L. C. M.; Medeiros, M. G.; De Medeiros, S. R. B.; Agnez-Lima, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 435-441, 2007.

Fiskesjö, G. *INVITTOX Protocol nº 8 - Allium test*. Nottingham: Russel and Burch House, 1989.

Grant, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations: a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutation Research*, Leiden, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

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*, Leiden, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.

Hayashi, M.; Ueda, T.; Uyeno, K.; Wada, K.; Kinae, N.; Saotome, T. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research*, Leiden, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. *The water: culture method for growing plants without soil*. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

Levan, A. Effect of colchicines on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, New Jersey, v. 24, n. 1, p. 471-486, 1938.

Majer, B. J.; Grummt, T.; Uhl, M.; Knasmüller, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. *Acta Hydrochimica Hydrobiologica*, Weinheim, v. 33, n. 1, p. 45-55, 2005.

Rank, J.; Nielsen, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, New Jersey, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

Rank, J.; Nielsen, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutation Research*, Leiden, v. 418, n. 1-2, p. 113-119, 1998.

Smaka-Kincl, V.; Stegnar, P.; Lovka, M.; Toman, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research*, Leiden, v. 368, n. 3/4, p. 171-179, 1996.

Tommasi, L. R. *A degradação do meio ambiente*. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1979. 169 p.



ISSN 1983-4209 – Volume 10 – Número 01 – 2014

Türkoğlu, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, Leiden, v. 626, n. 1/2, p. 4-14, 2007.

Vogel, E. W. Assessment of chemically induced genotoxic events. In: *Prospectives and limitations*. Leiden: The Netherlands University Press, 1982. p. 2-24.