

AValiação DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DA CINZA DE CASCA DE ARROZ POR MEIO DO TESTE *Allium cepa* COMO BIOINDICADOR.

Prof. João Nelci Brandalise¹; Prof.^a Dr.^a Luciana Bilhalva²; Prof. Dr.^o Willian Silva Barros³; Prof. Dr.^a Vera Lucia Bobrowski⁴; Gabriel Afonso Martins⁵ e Prof. Dr. Érico Kunde Corrêa⁶

¹Universidade Federal de Pelotas - jnbrandalise@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - luciarabc@terra.com.br

³Universidade Federal de Pelotas - wsbarros@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - vera.bobrowski@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - gabrimartins1@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - ericokundecorreia@yahoo.com-orientador

1. INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa*, L.), é um dos principais componentes da dieta humana, a produção mundial para 2016 é estimada em 746,9 milhões de ton, (FAO, 2016), deste montante o Brasil contribui com 10.6 milhões de ton. O Rio Grande do Sul - RS, maior produtor brasileiro, 75,5 %, produz 7.5 milhões de ton. e a Região Sul do RS, 553 mil ton. (CONAB, 2016). Considerando que as cascas de arroz - CA correspondem de 20 % a 23% do peso do arroz em casca, (SOLTANI, 2015) no beneficiamento serão gerados anualmente no mundo aproximadamente 149,3 milhões de ton. de CA, no Brasil, 2,1 milhões de ton.; no RS 1.5 milhões de ton. e na Região Sul do RS o montante de 217.5 mil ton. por industrializar entorno de 14,5% da produção do Estado.

A busca de soluções de uso sustentável da CA tem sido alvo de muitas investigações científicas e publicações a exemplo de Foo (2009) e Soltani (2015). De acordo com Gomes (2013) o aproveitamento da CA como fonte de energia renovável, tendo em vista o seu poder calorífico de 13-16 MJ/Kg é uma alternativa plausível ambientalmente e difundida no mundo, apesar de se saber que a cinza de casca de arroz - CCA representa $\pm 20\%$ do peso da CA ou $\pm 4\%$ do peso do grão (SOLTANI, 2015). O desafio é dar um destino adequado à CCA gerada, uma vez que, se toda a CA for queimada se estima uma produção mundial 29.89 milhões de t anuais, no Brasil 420 mil de t, no RS 300 mil de t e na Região Sul-RS 43.5 mil t.

Nos últimos anos várias pesquisas foram desenvolvidas e significados avanços foram alcançados na busca de transformar a CCA em novos produtos com valor agregado com baixo impacto ambiental, (CHEN, 2015 e SOLTANI, 2015). Contudo, quantidade significativa de CCA é depositada em aterros ou incorporada ao solo, sendo exposta a intempérie o que facilita a dispersão pondo em risco a saúde Yang (2015) e a impactos ambientais. Neste cenário, cabe considerar os estudos de Bilo (2015) metais traços na cultura do arroz; Thind (2012) aplicação de cinzas no cultivo, arroz-trigo e Yang (2015) compostos orgânicos voláteis bioativos.

As plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos genéticos para detectar agentes citogenéticos e mutagênicos, (FISKESJÖ, 1989). O teste *Allium cepa* introduzido por Levan (1938) adaptado por Fiskesjö (1989) é um dos testes mais utilizados no monitoramento de poluição ambiental, na avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade por ser de baixo custo, de fácil manuseio e mostrar boa concordância com os resultados de outros sistemas de ensaio e ao se constatar pelo número e diversidade de trabalhos científicos desenvolvidos a exemplo de Leme (2009). Diante do exposto este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial citotóxico e genotóxico da cinza de casca de arroz por meio do teste *Allium cepa* como bioindicador.

2. METODOLOGIA

O trabalho foi desenvolvido nos laboratórios do Centro de Engenharia - NEPERs e no Instituto de Biologia - DEZG e DM - UFPEL- RS. CCA, safra 2014, foi obtida de três empresas dos municípios de Capão do Leão, Pelotas, e Rio Grande - RS, que utilizam a CA para produzir vapor, calor e energia elétrica. A CA é queimada em fornalhas de grelha deslizante a temperaturas que variam de 650° C a 800° C e tempo de queima entre 3 min a 15 min. As amostras foram coletadas e identificadas segundo ABNT NBR 10007:2004, na operação de carregamento da CCA para a área de incorporação ao solo, sem tratamento, num período de 5 dias consecutivos, na quantidade de 1 Kg por dia, perfazendo 5 Kg por empresa.

O extrato aquoso da CCA foi obtido seguindo o protocolo de ZUCCONI *et al.* (1988) consistindo na pesagem de 10 g de CCA, de cada amostra, que foi diluída em 100 ml de água destilada em Erlenmeyer de 200 ml, identificado, selado com filme de PVC e mantido em repouso por 12 horas em câmara escura em triplicata. A filtragem foi realizada com papel filtro gramatura de 85 g/m²/porosidade 6 µm. O extrato aquoso da filtragem, foi acondicionado em 15 frascos de vidro de 100 ml e identificados por empresa para posterior utilização na preparação do bioensaio.

O potencial citotóxico e genotóxico foi avaliado através da análise do Índice Mitótico – IM (%) e da presença de Aberrações Cromossômicas - AC (%) utilizando-se como bioindicador sementes de cebola, *Allium cepa*, vc, ISLA, Lote 36550-S2, sem tratamento. Dez sementes foram colocadas em placa de Petri sobre papel filtro, umedecido com 5 ml dos 5 extratos aquosos de CCA originada das 5 amostras de cada empresas (tratamento) e 5 ml de água destilada, (tratamento controle), selada as placas de Petri em triplicata, foram acomodadas na câmara com temperatura de 25±1°C num período de 144 horas. Todo material germinado, 45 ensaios das empresas e 3 ensaios do controle, foi fixado em Carnoy (3:1, Etanol/Ácido acético), acondicionado em frascos de 10 ml e preservado em freezer até a realização do exame citológico.

Na realização do exame citológico, foram escolhidas ao acaso três raízes de cada do ensaio de germinação. A lâmina histológica com uma raiz foi confeccionada seguindo a técnica de Guerra & Souza, (2002) com modificações. O exame das lâminas foi feito em microscópio de luz incidente NYKON ECLIPSE-E 200 com uma magnitude de 400X e os melhores registros das imagens foram digitalizados. Aplicando-se a técnica de varredura foram contadas 500 células por raízes sendo 22.500 dos 45 ensaios do estrato aquoso e 4.500 células dos três ensaios do tratamento controle. As células em divisão e as aberrações cromossômicas-AC na prófase, metáfase, anáfase e telófase, representadas por quebra de cromossomos, C-matase, ponte de cromossomos, cromossomos aderidos, micronúcleos, bi e multipolar foram quantificadas. O Índice Mitótico – IM (%), dado em porcentagem, foi obtido dividindo-se o número de células em mitose pelo número total de células observado multiplicando-se por 100 e o percentual de Aberrações Cromossômicas – AC (%) foi calculado pelo número de aberrações e dividido pelo número de células observadas vezes 100. (LEME 2009).

O delineamento experimental utilizado foi completamente causalizado, sendo o fator tratamento as 3 empresas e 1 (um) tratamento controle seguindo arranjo unifatorial com 5 amostras por empresa, 45 ensaios de germinação, (triplicata das amostras) 135 raízes (triplicata dos ensaio de germinação) e 67.500 células (500 células por raiz) dos tratamentos empresas. Tratamento controle 3 ensaios de germinação 9 raízes (triplica dos ensaios de germinação) e 4.500 células (500 células por raiz). Os caracteres resposta índice mitótico – IM (%) na avaliação de citotoxicidade e o percentual de aberrações – AC (%)

para avaliar a genotoxicidade. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote de software Statistix 9.0. Os dados sobre os caracteres IM e AC foram comparados pelo t Student's test, ($p < 0,05$) para determinar as diferenças significativas entre os tratamentos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na apreciação dos dados de citotoxicidade os valores médios, em porcentagem, do IM submetidos a análise com t Student's test, ($p < 0,05$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas na comparação entre o tratamento controle e as empresas, exceto na comparação com o tratamento controle, IM = 3,04% e a empresa II, IM = 5,37%. (Tabela 1). Os dados demonstram indícios de potencial de citotoxicidade decorrente da presença de substâncias tóxicas no extrato aquoso da CCA da empresa II. O Índice Mitótico IM, como um parâmetro para avaliar o potencial toxicológico de diferentes agentes tem sido amplamente utilizado e a ação citotóxica de um agente pode ser determinada pelo aumento ou diminuição do IM. IMs significativamente ($p < 0,05$) maiores do que o tratamento controle indicam um aumento da divisão celular o que pode determinar a proliferação celular desordenada e a formação de tecidos tumorais. LEME (2009).

Tabela 1 – Valores das médias, em porcentagem, do IM (%) e CA (%) e Desvio Padrão - SD e Coeficiente de Variação - CV de sementes de CEBOLA - *Allium cepa*; vc_ISLA - Lote 36550-S2, submetidas à germinação num período de 144 horas, em meio aquoso das Cinzas de Casca de Arroz-CCA, de diferentes empresas analisadas.

TRATAMENTOS	N.C.	ÍNDICES							
		Í.M. (%)	SD	CV (%)	P	AC (%)	SD	CV (%)	P
Controle	4.500	3.04	0.410	13.48		0.222	0.210	94.59	
Empresa I	22.500	3.53	0.795	22.52	0,2296	0.293	0.179	61.09	0,2865
Empresa II	22.500	5.37	2.080	38.73	0,0377	0.653	0.543	83.15	0,1373
Empresa III	22.500	3.67	1.180	32.15	0,1127	0.151	0.127	84.10	0,1000

A variação dos valores médios em mesma coluna foi comparada pelo desvio padrão - SD, e o nível de significância foi determinado pelo t Student's test, ($p < 0,05$), Statistix 9.0.

N.C.: Número de células; Í.M. (%): Índice Mitótico; AC (%): Aberrações cromossômicas.

Na análise de genotoxicidade que consistiu na identificação e quantificação das AC na prófase, metáfase, anáfase e telófase, representadas por quebra de cromossomos, C-matase, ponte de cromossomos, cromossomo aderidos, micronúcleo, bi e multipolar e comparação dos valores médios resumidos na Tabela 1, em porcentagem do fator resposta AC, através do t Student's test, ($p < 0,05$), não foram estatisticamente significantes. A apreciação dos dados nos leva a depreender que não há indicativos da presença de substâncias ou compostos químicos que interfiram no fuso mitótico no fuso mitótico, na matriz protéica da célula e no material genético nos extratos aquosos CCA. O teste de aberrações cromossômicas com *Allium cepa* caracteriza-se como um instrumento que fornece um rápido exame dos efeitos genotóxicos e mutagênicos de substâncias químicas presentes no meio, (FISKESJÖ 1989). A AC pode ser considerada um indicador eficiente para o monitoramento ambiental e na investigação do potencial genotóxico. (LEME 2009).

4. CONCLUSÕES

Os resultados do trabalho da análise de citotoxicidade revelaram indícios de potencial de citotoxicidade decorrente da presença de substâncias tóxicas no extrato aquoso da CCA da empresa II. Todavia, no exame de genotoxicidade os dados apontam pela inexistência de substâncias com potencial tóxico capaz de interferir no material genético. Devido à

importância do tema tendo em vista a quantidade significativa de CCA gerada, conclui-se que a abordagem sobre o potencial toxicológico da CCA pode contribuir na compreensão dos mecanismos de interação com o meio ambiente e na tomada de decisão do destino final das CCA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, NBR 10007-2004: Amostragem de resíduos sólidos, Rio de Janeiro, www.abnt.org.br, 2004

BILO, F. et al, *Research Article Evaluation of Heavy Metals Contamination from Environment to Food Matrix by TXRF: The Case of Rice and Rice Husk*, Hindawi Publishing Corporation, Journal of Chemistry, pag. 12, 2015;

CHEN, G. et al. **Production of amorphous rice husk ash in a 500 kW fluidized bed combustor**, Fuel N°144, pag. 214–221, 2015;

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Nono levantamento - SAFRA 2015/16**, Brasília, V. 3, N. 9 – JUNHO, 2016;

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como Observar Cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana**. São Paulo: FUNPEC, 2002.131p;

GOMES, G. M. F. *et al.*, **Aspects for a cleaner production approach for coal and biomass use as a decentralized energy source in southern Brazil**, Journal of Cleaner Production, N° 47, pag. 85 – 95, 2013;

FISKEJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 197, p. 243-260, 1988;

FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, **Seguimiento del Mercado del Arroz de la FAO (SMA)**, Volume XIX, edición n° 2, Julio de 2016;

FOO, K.Y. e HAMEED B.H., **Utilization of rice husk ash as novel adsorbent: A judicious recycling of the colloidal agricultural waste**, *Advances in Colloid and Interface Science*, 152, pag. 39–47, 2009;

YANG, E. et al. **Chemical composition and potential bioactivity of volatile from fast pyrolysis of rice husk**, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, N° 112, pag. 394–400, 2015;

LEME, D. M. & MARIN-MORALES, M. A., *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application, *Mutation Research* 682 (2009) 71–81;

SOLTANI, N.; *et al.*; **Review on the physicochemical treatments of rice husk for production of advanced materials**; *Chemical Engineering Journal*, 264, pag. 899–935, 2015;

THIND, H.S. et al., **Land application of rice husk ash, bagasse ash and coal fly ash: Effects on crop productivity and nutrient uptake in rice–wheat system on an alkaline loamy sand**, *Field Crops Research* 135 (2012) 137–144;

ZUCCONI, F. et al. **Evaluating toxicity in immature compost. Biocycle**, Emmaus, v. 22, p.54-57, 1988.