

POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO BIODIESEL EM CÉLULAS DO BIOINDICADOR *LACTUCA SATIVA* L.

JÉSSICA EL KOURY SANTOS¹; ALLISON CARLOS ASSUNÇÃO SILVA²;
CLAUDIO MARTIN PEREIRA³; MARCO AURÉLIO ZIEMANN SANTOS⁴ ;
LUCIANO SISCONETTO BORJA⁵ ; VERA LUCIA BOBROWSKI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – jessicaeksantos@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – allison.silva@ifac.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas - claudiochemistry@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - marcziemann@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- lucianosiskonetto@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas IB-DEZG - orientadora – vera.bobrowski@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O petróleo, desde a sua descoberta no século XVIII, tem sido considerado como a principal matéria-prima energética, do qual estamos cada vez mais dependentes para a manutenção da atividade industrial. Por possuir essa grande utilização, o petróleo gera uma movimentação intensa no mercado mundial sendo um produto bastante lucrativo, cobiçado por vários países e principalmente responsável pelo desenvolvimento dessas nações (CARVALHO; RIBEIRO, 2012). A limitação das fontes de energia fóssil e seus efeitos indesejáveis ao meio ambiente têm estimulado a busca de novas fontes alternativas, desde que renováveis. Em diversos países, como no Brasil, têm sido destinados grandes incentivos ao desenvolvimento do setor de biocombustíveis, no qual se inclui o biodiesel. O futuro promissor do biodiesel está relacionado não apenas ao fato de ser um combustível renovável, mas também às suas contribuições na redução da emissão de poluentes atmosféricos e à sua maior degradabilidade, em relação aos combustíveis fósseis.

No entanto, poucos são os estudos realizados para avaliar os possíveis impactos do biodiesel, quando usado puro ou em misturas ao óleo diesel, sobre o ambiente (principalmente corpos d'água e solos) e sobre os organismos vivos, em caso de uma possível contaminação ambiental.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi identificar os efeitos citotóxicos e genotóxicos do biodiesel sobre o bioindicador vegetal *Lactuca sativa* L. (alface).

2. METODOLOGIA

Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Genética (LabGen) do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas – RS. As sementes comerciais de alface isentas de produtos químicos (Isla®), foram submetidas ao efeito de diferentes concentrações do biodiesel (B100) feito a partir do óleo de arroz, sendo este doado pela empresa IRGOVEL. O biodiesel, do óleo bruto e refinado, foi obtido por uma catálise mista, onde foram pesados 100 mL do óleo e acrescidos 40 mL de KOH metanólico (2,5 % w/v). O meio reacional foi mantido por 1 h sob agitação e refluxo a 70 °C, sendo após adicionado 60 mL de metanol e 1,5 mL de H₂SO₄, sendo mantido nestas condições por mais 1 h. Em seguida, a mistura foi filtrada a vácuo e o produto obtido foi lavado com água em funil de separação, obtendo-se o biodiesel de interesse na fase orgânica. O rendimento de conversão para

biodiesel foi de 95% e 80%, para o óleo refinado e bruto, respectivamente. E, em seguida, acondicionados em frascos escuros e mantidos em refrigerador a 5 °C.

Para a execução do experimento, cada concentração do biodiesel foi emulsionada com Tween 80 a 5 % v/v e dissolvida em água destilada para a obtenção dos tratamentos: T2 100; T3 200; T4 400; T5 600 mg/L; utilizando-se água destilada como controle negativo (T1). Empregaram-se oito repetições de 50 sementes as quais foram semeadas em placas de Petri, tendo como substrato uma folha de papel filtro, umedecidas com quantidade de água destilada equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Em seguida, as placas foram levadas para câmara de germinação a 25 ± 1 °C. Durante o período do experimento realizou-se o monitoramento da umidade do papel germiteste e para mantê-lo umedecido foi adicionando 2 mL de água quando necessário.

Os efeitos cito e genotóxico dos tratamentos foram verificados pela análise do ciclo mitótico e calculados os índices mitótico (IM), metafásico (IMet) e anafásico (IAf), e das anormalidades cromossômicas (IAC). Para tanto, as raízes foram coletadas aos quatro dias após a semeadura, fixadas em Carnoy (3:1, etanol: ácido acético glacial) e mantidas em freezer até a análise. Para proceder a análise das lâminas foi utilizada a técnica de esmagamento das raízes (GUERRA; SOUZA, 2002), hidrolisadas em HCL 5 N durante dez minutos, lavadas em água destilada e coradas com orceína acética 2%. Para cada tratamento foram analisadas dez lâminas e observadas 500 células/lâmina pela técnica de varredura, totalizando 5000 células/tratamento. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise da normalidade residual. Atendendo as pressuposições foi realizada a análise de variância e de regressão linear a 5 % de probabilidade de erro utilizando o programa Statistix 9.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A citotoxicidade de um agente pode ser determinada pelo seu efeito sobre a divisão celular, isto é, o aumento ou diminuição no IM. Este índice indica a proporção de células na fase de mitose do ciclo celular e a sua inibição pode ser interpretada como a morte celular ou um atraso na cinética de proliferação de células (PANDA; CHOUDHURY, 2005). Estes autores relatam que para uma substância ser considerada citotóxica ela deve causar um decréscimo no IM superior a 50%, sendo esse o chamado limite citotóxico. As diferentes concentrações de biodiesel testadas diferiram estatisticamente em relação ao controle negativo para o IM, assim como para o IMet e o IAa (Fig.1). As concentrações de 100, 200 e 600 tiveram um efeito mais citotóxico que a concentração de 400 mg/L, mas com relação ao controle negativo observamos uma redução efetiva.

Segundo FONSECA et al. (2016) quando as células de tecido meristemático estão em equilíbrio proliferativo, a duração de cada uma das etapas do ciclo de vida da célula permanece constante, assim, o número de células que se encontram numa fase particular é constante e proporcional ao comprimento - em tempo - do mesmo, mas na presença de substâncias tóxicas a divisão celular de meristemas da raiz pode ser inibida por retardamento da mitose ou apoptose.

Para QUISPE et al. (2009), uma das explicações para a redução do IMet seria o aumento do número de células em prófase, processo esse associado a inibição do complexo Cdk1-ciclina B, que atua no centro organizador dos microtúbulos, diminuindo a formação do fuso mitótico e por conseguinte o alinhamento dos cromossomos. A diminuição do IAa, poderia ocorrer devido ao

aumento do número de células em prófase provocando uma diminuição na metáfase e consequentemente na anáfase. Além disso, o agente genotóxico poderia atuar interferindo na atividade catalítica de coesinas e catastrofinas; proteínas envolvidas no processo de segregação das cromátides irmãs, não permitindo, então, que as células transitem normalmente para a anáfase e para a telófase.

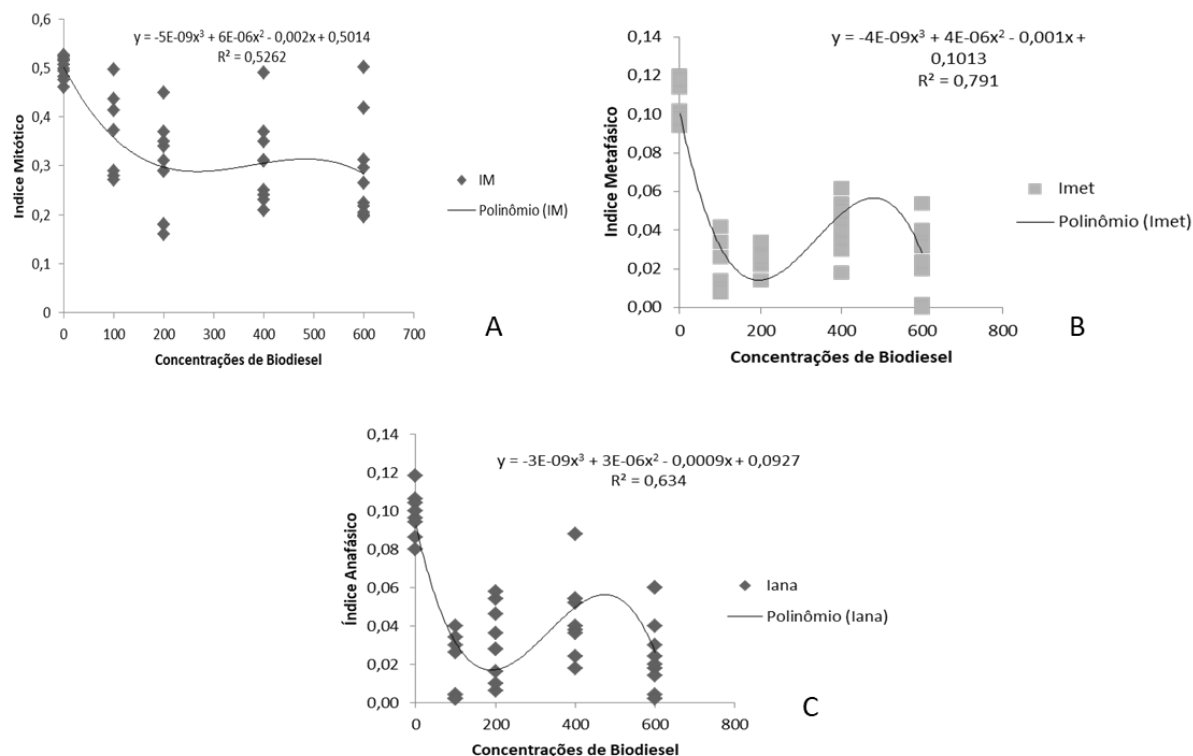


Figura 1. Efeito das concentrações de biodiesel de arroz sobre células meristemáticas radiculares de sementes de alface. A. Índice mitótico B. Índice metafásico C. Índice Anafásico

Segundo PERES et al. (2014) a citotoxicidade e a genotoxicidade de substâncias podem ser avaliadas, respectivamente, através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos. Neste trabalho não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos, para a ocorrência de alterações cromossômicas, mas podemos observar um maior número na concentração de 400 mg/mL.

As plantas são membros essenciais do ecossistema e apresentam uma grande sensibilidade ao estresse ambiental, quando comparadas com outros sistemas testes disponíveis. Desta forma, os ensaios com plantas podem servir como o primeiro alerta para a presença de contaminantes ambientais presentes na água, no ar e no solo (GOPALAN, 1999). Além disso, os cromossomos de vegetais apresentam uma similaridade morfológica com os cromossomos dos animais, bem como uma similaridade nas respostas aos mutágenos (RADIĆ et al., 2010). Tais características fazem destes organismos, excelentes modelos genéticos para detectar agentes de ação mutagênica (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

4. CONCLUSÕES

O biodiesel de arroz (B100) em diferentes concentrações testadas mostrou efeito citotóxico sobre o bioindicador *Lactuca sativa* L..

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, H.M.; RIBEIRO, A.B. Biodiesel: Vantagens e desvantagens numa comparação com o diesel convencional. **Bolsista de Valor: Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e IF Fluminense**, v.2, n.1, p. 49-53, 2012.

FONSECA, V.B., TAVARES, V.R. da S., GONÇALVES, V. de M., FREITAG, R.A., BOBROWSKI, V.L. Allelopathic potential of leaves and flowers extracts of *Schinus terebinthifolius* Raddi, **Científica**, Jaboticabal, v.44, n.1, p.35-39, 2016.

GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 426, p.99–102, 1999.

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

LEME, D.M.; MARI-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v.682, p.71–81, 2009.

PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S.. Estresse de cromo em plantas. **Braz. J. Plant Physiol.**, Londrina , v.17, n.1, p.95-102, 2005.

PERES, P.R.; MUNHOS, A.A.; UGOSKI, L.R.; FREITAG, R.A.; BOBROWSKI, V. L.. O uso de compostos antioxidantes naturais e seu efeito genotóxico/citotóxico. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPEL**, Pelotas, 2014, **Anais...** Pelotas: Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2014. Acessado em 23 ago 2018. Online. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/cic/anais/anais2014>.

QUISPE, J.; SALDAÑA, J.; VERDE, T.; VALDERRAMA, S. Efectos del sorbato de potasio a diferentes concentraciones y tiempo de exposición sobre el ciclo celular y el material genético em meristemas radiculares de *Allium cepa* L. (Cebolla). **Revista ECIPERÚ**, Lima, v.7, n.1, p.71-78, 2010.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M.M.; ŠIRAC, S.; PEVALEKKOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.408, p.1228-1233, 2010.