



Scientific Research and Reviews (DOI:10.28933/SRR)



Efeitos Citotóxicos, Genotóxicos E Mutagênicos Do Xilol Utilizando O Teste Allium Cepa

Lucena, R.L.M1; Costa, P.S.A2; Silva, J.C3; Messias, I.M.O4; Beltrão, G.T.A5; Messias, J.B6
1Estudante do Curso de Medicina –UPE Campus Santo Amaro-FCM; 2Biomédica - FACIPE;
3Biologia – UPE Campus Santo Amaro-ICB; 4Docente – UPE Campus Petrolina; 5,6Docente UPE
Campus Santo Amaro-ICB

ABSTRACT

O xilol é um líquido incolor, praticamente insolúvel em água e miscível em etanol, éter e outros solventes orgânicos¹, é muito utilizado na prática citológica, histológica e anatomo patológica, seja com fins de diagnóstico, pesquisa ou ensino. A aspiração do líquido para o interior dos pulmões pode resultar em pneumonia química, que pode ser fatal². Intoxicações agudas por xileno podem acarretar em alterações renais transitórias com elevação da quantidade de uréia no sangue e diminuição da creatina urinária³.

Foram observados resultados negativos em ensaios de mutagenicidade com Salmonella, com linfoma de camundongo L5179Y e em ensaios de danos cromossômicos com células da medula óssea expostas a dosagens de xileno⁴. No entanto, o xileno frequentemente ocorre associado a outros compostos aromáticos, sendo essa mistura, possivelmente, mais genotóxica do que quando ele aparece isolado⁵. Em ratos, a exposição ao xileno resultou em efeitos embriotóxicos e teratogênicos, afetando o cérebro, o fígado, os pulmões e o coração dos organismos (NLM, 1988). Segundo Dean (1985)⁶, o xileno pode ser considerado como não mutagênico, pois testes realizados com bactéria, cultura de células de mamíferos e com animais in vivo, apresentaram resultados negativos para a mutagenicidade. Estudos de toxicidade com Daphnia magna mostram que o etilbenzeno e o m-xileno são os mais tóxicos dentre os derivados do petróleo como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX), quando se avalia suas concentrações em massa/volume, enquanto que o benzeno é potencialmente mais tóxico, por ter a mais baixa CL50 dentre os compostos do BTEX⁶. De acordo com a Organização Mundial da Saúde⁷, tanto o tolueno como o xileno não apresentaram efeitos genotóxicos nem carcinogênicos para humanos e animais de laboratórios.

Vegetais superiores constituem um importante material para teste das alterações genéticas provocadas por poluentes ambientais e são, atualmente, reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes com presença de substâncias químicas⁷. Segundo Grant (1994)⁷, os vegetais superiores, quando utilizados como organismos-teste, são excelentes indicadores de efeitos tóxicos, pois respondem com uma alta sensibilidade e produzem poucos resultados falsos positivos.

*Correspondence to Author:

Lucena, R.L.M

Estudante do Curso de Medicina –
UPE Campus Santo Amaro-FCM

How to cite this article:

Lucena, R.L.M; Costa, P.S.A; Silva, J.C; Messias, I.M.O; Beltrão, G.T.A; Messias, J.B. Efeitos Citotóxicos, Genotóxicos E Mutagênicos Do Xilol Utilizando O Teste Allium Cepa. Scientific Research and Reviews, 2018, 5:44

 eSciPub
eSciPub LLC, Houston, TX USA.
Website: <http://escipub.com/>

Dentre os vegetais superiores, *Allium cepa* tem sido indicado como um eficiente organismo-teste para estudos dos mecanismos básicos de ação e de determinação dos efeitos de alguns químicos⁸, devido as características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de grande tamanho⁸, além de serem facilmente corados e observados (KURAS et al., 2006). A espécie *A. cepa* tem sido considerada pelo “Royal Swedish Academy of Science”⁶ e pelo “Gene-Tox Program”⁷ como um material-teste padrão para detectar de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais, tornando-se então imprescindível para o manejo e realização do presente trabalho.

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Química⁵ e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais⁹. O conhecimento do potencial tóxico do xilol é fato em nossa literatura, contudo dados sobre como o sistema *Allium cepa* se comporta em relação aos níveis considerados aceitáveis são escassos o que motivou o presente estudo.

O objetivo deste artigo foi avaliar de forma preliminar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do xilol através do teste *Allium cepa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Solubilidade em água:

Foram preparadas três concentrações diferentes de xilol a partir dos índices de solubilidade em água (xilol= 135mg/L). Dose estabelecida pelo órgão de fiscalização

ambiental do Estado de São Paulo/Brasil – CETESB;

- 1ª Concentração: corresponde à própria solubilidade citada (= 135mg/L);
- 2ª Concentração: corresponde a décima parte da 1ª concentração (= 13,5mg/L);
- 3ª Concentração: corresponde a centésima parte da 1ª concentração (= 1,35mg/L).

As três diluições citadas foram preparadas com água destilada, sendo utilizadas nos testes com *Allium cepa* de acordo com a metodologia proposta por Mazzeo (2009), com adaptação.

Sistema teste *Allium Cepa*

O material biológico utilizado neste estudo, como sistema-teste vegetal para avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do xilol, para as três concentrações determinadas, constituiu-se de sementes de *Allium cepa* de um mesmo lote e mesma variedade, cebola baia periforme.

As sementes foram colocadas para germinar em placas de petri contendo papel de filtro umedecido com cada uma das concentrações. Para garantir a constante concentração do Xilol, durante todo o ensaio, as placas foram envolvidas com filme de PVC para impedir a volatilização das diluições para a atmosfera.

Após atingirem cerca de 2 cm de comprimento, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24h após sendo transferidas para álcool 70% e mantidos conservadas em refrigeração, até sua utilização.

Duas repetições foram realizadas para os tratamentos com as três concentrações para o Xilol, além do controle negativo (água destilada). O horário de coleta dos meristemas foi realizado entre 12h e 13h.

Para a confecção das lâminas, as raízes previamente fixadas, passaram por três banhos em água destilada seguindo a metodologia de Mello e Vidal (1978)¹⁰ com as modificações: Hidrólise em HCL a 5N por 20 min temperatura ambiente, esmagamento entre lâmina e

lamínula com uma gota de ácido acético 45%, logo após foram congeladas em gelo seco para a retirada das lamínulas.

Depois de secas foram coradas com Giemsa 2%. As lâminas secaram a temperatura ambiente, e com uma gota de entelan e lamínula, levadas para secarem a temperatura ambiente (37°C) e utilizadas para observações em microscópio de luz¹⁰. As lâminas foram analisadas em ampliação de 40x.

Análise das irregularidades celulares

Foram confeccionadas 10 lâminas para cada ensaio realizado. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 150 células, totalizando 1500 para cada tratamento.

Análise dos efeitos citotóxicos

Foram analisados os índices mitóticos e os de fase de cada tratamento, utilizando-se as seguintes relações:

- I.M (Índice Mitótico) = No de células em divisão x 100 / No total de células observadas
- I.F (Índice de Fases) = No de células da fase investigada x 100 / No de células mitóticas

Análise dos efeitos genotóxicos

Foram observados e quantificados todos os possíveis tipos de aberrações cromossômicas encontradas nas células de todas as lâminas de cada tratamento em relação às pontes, perdas e quebras cromossômicas.

Análise dos efeitos mutagênicos

Foram analisados e quantificados todos os possíveis tipos de anormalidades nucleares

encontradas nas células de todas as lâminas de cada tratamento em relação a presença de micronúcleos e de brotos.

Delineamento estatístico

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m.). A análise das alterações cromossômicas foi realizada por meio da observação e contagem com auxílio de microscópio e registradas em todas as lâminas de cada tratamento.

As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – one way), seguida, quando detectada diferença, pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05. Para os testes utilizou-se o programa estatístico Past. Exe (executable), ver. 2.17c.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verifica-se na Tabela 1 o índice mitótico (IM) e o índice de fase (IF) para as diferentes concentrações testadas. Em relação ao IM verifica-se que as diferenças foram percebidas em todas as concentrações adotadas, sugerindo que é necessário estudo com diluições mais baixas para averiguar em quais níveis o xilol interfere no ritmo de divisão celular. O IM é utilizado para avaliar a taxa de divisão celular e tem se mostrado um parâmetro importante para avaliar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular¹¹. A concentração mais alta reduziu o IM enquanto as demais concentrações aumentaram o índice quando comparado com o controle. Para os índices de fase, observou-se ainda um aumento significativo de células em prófase e uma diminuição de células em telófase.

Tabela 1. Efeito citotóxico, avaliado através dos índices mitóticos e de fases observados em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de xilol

Concentração	IM		IF		
			Prófase	Metáfase	Anáfase
135 mg/L	26,67 ± 0,31*	17,00 ± 1,33*	10,00 ± 1,49	9,00 ± 0,82*	4,00 ± 1,05*
13,5 mg/L	56,00 ± 0,42*	27,00 ± 1,63*	23,00 ± 1,56*	14,00 ± 1,33	20,00 ± 1,76*
1,35 mg/L	59,47 ± 0,43*	20,00 ± 2,11*	11,20 ± 1,32	15,00 ± 1,49	43,00 ± 1,56*

CN	39,40 ± 1,22	39,20 ± 2,53	10,20 ± 2,15	13,50 ± 2,07	28,70 ± 1,16
----	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------

CN: Controle negativo (água). *Estatisticamente diferente ($p < 0,00013$).

O sistema *A. cepa* é rotineiramente utilizado para avaliar o potencial genotóxico de químicos no ambiente, devido a sua alta sensibilidade e boa correlação com sistemas-teste de mamíferos⁷.

Neste estudo foram observadas e quantificadas as aberrações cromossômicas (pontes, perdas e quebras) em diferentes concentrações.

Verifica-se existir diferenças significativas para as quebras cromossômicas para todos os grupos testados, e na de maior concentração de xilol (135 mg/L) para as perdas e as pontes cromossômicas. Percebe-se, contudo, que nas demais concentrações testadas, algum tipo de aberração cromossômica foi registrada (Tabela 2).

Tabela 2. Frequência das aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de xilol

EM	135 mg/L	13,5 mg/L	1,35 mg/L	CN
Perda	14,0 ± 1,4**	1,0 ± 0,1	1,0 ± 4,2	1,0 ± 0,10
Ponte	9,0 ± 0,74**	10,0 ± 1,0	1,0 ± 0,10	1,0 ± 0,10
Quebra	2,0 ± 4,2*	4,0 ± 5,2**	2,0 ± 4,2*	1,0 ± 0,10

EM: Efeito mutagênico; CN: Controle negativo (água). *Estatisticamente diferente ($p < 0,0051$); Estatisticamente diferente ($p < 0,00013$).

Ao avaliar a ação mutagênica do xilol nas diluições utilizadas neste estudo, verifica-se (Tabela 3) que existe diferença significativa para quase todas as concentrações utilizadas em comparação ao grupo controle.

O teste do micronúcleo permite uma rápida detecção dos danos causados no material genético de organismos expostos a produtos químicos. Os micronúcleos são estruturas compostas de cromatina que possuem a aparência de um pequeno núcleo, que se formam a partir de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros perdidos na fase de anáfase, estando presentes nas células filhas, após a divisão celular¹². De acordo com Fagundes et al. (2005) os micronúcleos originam-se de fragmentos cromossômicos acêntricos (efeito clastogênico) produzidos por

quebras cromossômicas ou de cromossomos inteiros que sofrem retardo em relação aos demais, durante a migração para os pólos da célula em anáfase (efeito aneugênico). Fenech et al. (2005)¹³ explicam que a presença de micronúcleo nas células é uma evidência da presença de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas ocorridas durante a mitose.

Acreditamos que a indução das quebras cromossômicas em todas as concentrações utilizadas neste estudo (Tabela 2), seja a responsável pela quantidade expressiva de micronúcleos (Tabela 3). A presença significativa de micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* indica que o xilol é capaz de causar efeitos mutagênicos sobre esse organismo-teste.

Tabela 3. Frequência das anormalidades nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de xilol

EG	135 mg/L	13,5 mg/L	1,35 mg/L	CN
Micronúcleo	61,0 ± 12,59*	71,0 ± 18,5*	60,0 ± 8,2*	1,0 ± 0,10
Broto	3,0 ± 4,8*	7,0 ± 6,7*	7,0 ± 6,7*	1,0 ± 0,10

EG: Efeito genotóxico; CN: Controle negativo (água). *Estatisticamente diferente ($p < 0,0001$).

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos com o organismo teste *A. cepa*, o xilol mostrou-se potencialmente citotóxico, genotóxico e mutagênico para células meristemáticas, inclusive quando testado em concentrações abaixo daquilo considerado solúvel.

A espécie *A. cepa* caracteriza-se em um eficiente organismo-teste para detecção de efeitos tóxicos induzidos por hidrocarbonetos do petróleo, como o xilol. Ensaios de aberrações cromossômicas e celulares com estes organismos constituíram ferramentas bastante sensíveis na detecção de danos ao DNA induzidos pelo xilol.

Ensaios com doses menores ao estabelecidos pela CETESB em relação ao índice de solubilidade devem ser revestidos, uma vez que neste estudo esta concentração provocou danos ao DNA.

REFERÊNCIAS

- (MEDITEXT) MEDICAL MANAGEMENT. Xylene (mixed isomers). In: TOMES CPS tm SYSTEM. Toxicology, occupational medicine and environmental series. Englewood: Micromedex, 2000.
- IRWIN, R.J.; VANMOUWERIK, M.; STEVENS, L.; SEESE, M.D.; BASHAM, W. Environmental Contaminants Encyclopedia, Fort Collins: Water Resources Division, 1997.
- DEAN, B. J. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research*, v.154, p.153-181, 1985.
- GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. *Mutation Research*, Amsterdam, v.281, p.89-92, 1982.
- GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-85, 1994.
- FISKEJO, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. *Hereditas*, Lund, v.102, p.99-112, 1985.
- BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 514, p. 105-113, 2002.
- MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, 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*, Ribeirao Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C. (1978). A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.* 30: 665-676.
- Mello MLS, Junqueira AC, Maria CCJ, Ribeiro DM, Ferreira RC, Veríssimo RV, Schildknecht PHPA, Monteiro G, Coltri PP, Ogusucu R, Faria VG, Santos AB, Borges
- BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. *Rev. Ambient. Água*, v. 10 n. 1, 2015.
- MAZZEO, Dânia Elisa Christofolletti Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do BTEX, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero /Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo. – Rio Claro: [s.n.], 2009.
- KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by barck water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Chemosphere*, Oxford, v. 107, p. 211-221, 2006.
- IG, Silva EA. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do parque ecológico Hermóneges Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso de Meio Ambiente Paulínia e Região.