

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO RIO GRANDE DO SUL**

ANDRÉ SANTOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DE RETORNO DAS
LAVOURAS DE ARROZ DE CAPIVARI DO SUL (RIO CAPIVARI, RS),
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE *Allium cepa***

**IMBÉ
2015**

ANDRÉ SANTOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DE RETORNO DAS
LAVOURAS DE ARROZ DE CAPIVARI DO SUL (RIO CAPIVARI, RS),
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE *Allium cepa***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira na Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Emerson André Casali
Co-orientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

IMBÉ
2015

ANDRÉ SANTOS PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DA ÁGUA DE RETORNO DAS
LAVOURAS DE ARROZ DE CAPIVARI DO SUL (RIO CAPIVARI, RS),
ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE *Allium cepa***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira na Universidade Federal do RioGrande do Sul em parceria com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul.

Aprovado em:/...../.....

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Tatiana Luft
Departamento de Ciências Morfológicas,
ICBS, UFRGS

Prof. Dr. Marcello Ávilla Mascarenhas
Laboratório de Mutagênese e Toxicologia,
PPG Biociência e Reabilitação e PPG
Reabilitação e Inclusão, Centro Universitário
Metodista, IPA

Prof. Dr. Ignácio Benitz Moreno
Coordenador da Atividade de TCC 2

RESUMO

A utilização de agrotóxicos vem sendo cada vez mais frequente e intensa nas últimas décadas para a contenção de pragas em lavouras de cultivo de praticamente todos os alimentos que utilizamos no nosso dia a dia, tanto de forma direta ou indireta, tendo possíveis potenciais de ação sobre as células de toda a biota circundante e consumidora, desde produtos in loco na plantação, até os manufaturados e subprodutos, podendo vir a gerar alterações genômicas em integrantes tanto da fauna como da flora. Este estudo visou avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos das águas coletadas em pontos de retorno das lavouras de arroz e no Rio Capivari (Rio da Galinha) através do sistema teste de micronúcleos em *Allium cepa* através do método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI *et al.* em *Allium cepa* cultivadas nas amostras coletadas. Foram coletadas amostras de água de pontos de retorno das lavouras ao percorrer de determinada distância entre os pontos a montante e jusante do rio, e posteriormente, foram colocadas cebolas para germinar nas amostras. O potencial genotóxico foi avaliado pela quantificação de micronúcleos e outras aberrações cromossômicas. O potencial citotóxico foi estimado pelo cálculo do índice mitótico. Esse monitoramento aponta que as águas coletadas de retorno das lavouras têm alto poder mutagênico e que causam um efeito sinérgico com o aumento da temperatura durante o dia e que quando utilizados em pontos iniciais do rio tendem a se concentrar na água de retorno da lavoura seguinte ao mesmo sentido do rio, criando assim, devido a todas as lavouras anteriores, um potencial cada vez mais poluidor, dando à(s) última(s) lavoura(s) um enorme potencial genotóxico, que será refletido no alimento ali produzido que posteriormente servirá como fonte alimentar para a população até mesmo a nível mundial.

Palavras chave: Aberrações Cromossômicas. Agrotóxicos. Lavoura de Arroz. Micronúcleo. Potencial Citotóxico. Micronúcleos em *Allium cepa*.

ABSTRACT

The use of pesticides is becoming more frequent and intense in recent decades to contain pests in growing crops of nearly all foods that we use in our daily lives, either directly or indirectly, with possible action potentials on the cells of the surrounding biota and consumer from products on-site at the plantation until manufactured and by-products, and may generate genomic alterations in members of both fauna and flora. This study aims to evaluate the mutagenic and genotoxic water collected at turning points of the rice fields and Rio Capivari (Rio Hen) by micronucleus test system in *Allium Cepa* through the method proposed by FISKESJÖ with the adaptation suggested by Meneguetti et al. in *Allium* strain grown in the samples collected. They were collecting water samples from turning points of crops to go a certain distance between the points upstream and downstream of the river, and subsequently onions were germinated in the samples. The genotoxic potential was assessed by quantification of micronuclei and other chromosomal aberrations. The cytotoxic potential was estimated by calculating the mitotic index. Such monitoring indicates that the water collected return of crops have a high capacity mutagenic and cause a synergistic effect with the increase of temperature during the day and when used in initial river points tend to concentrate in the return water of the next crop to Similarly the river, creating, due to all the previous crops, a potential increasingly polluter to give (s) last (s) crop (s) a huge genotoxic potential, which will be reflected in the food produced there which later serve as a food source for the population even worldwide.

Keywords: Chromosome Aberrations. Pesticides. Crop rice. Micronucleus. Cytotoxic potential. Micronuclei in *Allium* strain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Mapa 1 - [Localização da Área de estudo do Rio Capivari] Fonte: Google, 2015	22
Fotografia 1- Alterações mitóticas encontradas em células do meristema radicular de Allium cepa em sistema controle e amostragens: 1, célula binucleada; 2 e 5, brotamento nuclear; 3, micronúcleo; 4 atraso.	32
Gráfico 1 – Número de células alteradas por 1000 analisadas nas diferentes coletas. Os dados são média \pm EPM.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	27
Tabela 2	28
Tabela 3	30
Tabela 4	30

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS GERAIS:	11
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1 SISTEMA LAGUNAR BARROS-PATOS.....	11
2.2 Agrotóxicos como mutagênicos	13
2.3 Bioindicação de qualidade ambiental.....	15
2.4 <i>Allium cepa</i> como organismo teste	16
2.5 Avaliação da mutagenicidade em testes ambientais.....	18
2.5.1 Teste de Micronúcleo.....	19
2.5.2 Índice de aberrações cromossômicas.....	19
2.5.3 Índice mitótico	20
3 ÁREA DE ESTUDO	20
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	23
4.2 AMOSTRAGENS	23
4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA: TESTE DE MICRONÚCLEOS	23
4.3.1 Alterações Interfásicas (AI)	24
4.3.2 Alterações Mitóticas (AM)	25
4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE	25
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

O arroz é um alimento de fundamental importância para a humanidade, sendo considerado essencial para os países em desenvolvimento, alimentando, segundo a EMBRAPA, mais de um terço de toda a população mundial e ocupando o segundo lugar em áreas cultivadas entre todas as culturas cerealistas. Possui um cultivo de larga adaptação a diversos climas, se destacando pela produção e área de cultivo, vindo a desempenhar um papel importantíssimo tanto a nível econômico quanto a nível social.

A cultura do arroz irrigado no Estado do Rio Grande do Sul, através do uso de agrotóxicos, vem aumentando sua produtividade e rentabilidade nos últimos anos. Esses são utilizados para coibir reproduções ou até mesmo eliminar algumas espécies que vivem na lavoura (MARCHEZAN *et al.*, 2010), a qual, desse modo, acabará por produzir mais quando não estiver sofrendo com a interferência destas espécies prejudiciais. Portanto, para esse tipo de cultivo, há uma elevada demanda de herbicidas, inseticidas e nutrientes, bem como o uso elevado de água para irrigação (MACHADO *et al.*, 2006).

Determinou-se o volume total de água extravasada e a taxa de dissipação e transporte desses agrotóxicos. Devido ao maior armazenamento de água da chuva, quando comparadas com a irrigação contínua, as irrigações intermitentes e por banhos proporcionaram diminuição de 53 e 95% do volume de água perdida, resultando, respectivamente, em redução de 49 e 64% na massa total de agrotóxicos transportados para o ambiente, em relação ao total aplicado na lavoura. Com base nesses resultados, salienta-se que os manejos de irrigação intermitente e por banhos minimizam o transporte de agrotóxicos para o ambiente. Parte dos agrotóxicos aplicados não atinge o alvo biológico, estando sujeita a diferentes destinos no ambiente, como degradação química, fotólise, degradação microbiológica, transporte por volatilização, lixiviação e escoamento superficial (HARPER, 1994).

Quando utilizados no ambiente, mais da metade dos agrotóxicos acabam por não atingir o seu alvo, e vão parar na água, solo e atmosfera (GAVRILESCU, 2005). Depois de atingirem o solo, o comportamento dos agrotóxicos vai depender de diversos fatores físicos, químicos e biológicos. O principal efeito dos agrotóxicos é a adsorção, o qual é responsável pela ligação dos

agrotóxicos às partículas do solo, influenciando na disponibilidade para os outros processos como transformação, degradação e transporte, seja sendo lixiviado, escoando superficialmente ou sofrendo volatilização. (HARPER, 1994). Quando o agrotóxico vem a sofrer lixiviação ele tende a se espalhar e poluir outros corpos hídricos, podendo entrar na cadeia trófica através do consumo direto de água potável (Stone, 2005) e/ou bioacumulação em peixes (Bretaudet *al.*,2000).

A umidade e a temperatura do solo afetam muito a decomposição dos agrotóxicos. A decomposição química do agrotóxico ocorre mais lentamente em solos secos e temperaturas mais baixas porque tanto as reações químicas como as biológicas ocorrem mais lentamente nessas condições. Os agrotóxicos variam muito quanto à sua persistência no ambiente. Alguns se decompõem imediatamente após a sua aplicação e outros podem persistir por muito tempo no ambiente. Desta forma, os compostos que persistem por muito mais tempo no solo são mais prováveis de atingirem o reservatório subterrâneo do que os que se degradam mais rapidamente (BARRIGOSI, J.A. F, LANNA A.C., FERREIRA E., 2004).

O que leva os agrotóxicos a estarem presentes em águas subterrâneas é a sua acumulação, pois neste ambiente não existem condições favoráveis para degradar moléculas, devido às baixas temperaturas, pouco oxigênio dissolvido, conseqüente baixa atividade dos micro-organismos e ausência de luminosidade direta ou indireta. Como um dos fatores destaques do problemas de contaminação das águas subterrâneas por agrotóxicos, destaca-se o fato destes locais serem frequentemente utilizados para retirada de água, através de poços artesianos, para consumo humano, o que poderá acarretar sérios problemas de saúde pública, como reações alérgicas, intoxicações e até mesmo mutações.

A mutação é definida como sendo qualquer alteração do DNA, são mudanças repentinas que ocorrem nos genes, sendo o processo pelo qual um gene sofre uma mudança estrutural. Ela tem um efeito dualístico, é destrutiva, desagregadora, mas sem a mutação a vida não poderia variar e evoluir, adaptando-se a uma gama extremamente ampla de ambientes e condições.

1.1 OBJETIVOS GERAIS:

- Analisar o potencial mutagênico e genotóxico das águas de retorno das fazendas de arroz através do sistema teste *Allium cepa*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a quantidade de micronúcleos em 1000 células por lâmina dos meristemas radiculares de *Allium cepa* germinados nas amostras dos pontos de retorno da água das lavouras de arroz;
- Avaliar possíveis variações no índice mitótico em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Identificar e quantificar alterações mitóticas em células meristemáticas de *Allium cepa*;
- Verificar se há significância estatística entre as amostras analisadas e o sistema controle;
- Avaliar se ocorre modificação do potencial mutagênico no decorrer do curso natural do Rio Capivari.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Os tópicos que seguem apresentam o embasamento bibliográfico necessário ao entendimento e execução deste trabalho.

2.1 SISTEMA LAGUNAR BARROS-PATOS

No Litoral Médio, somente a Lagoa dos Barros foi transformada em balneário para a população local que a utiliza, principalmente, para banhos e passeios de barco, causando impactos classificados no nível C. Alterações graves observadas nessa lagoa foram a remoção da vegetação aquática e de mata nativa para acampar, bem como construções de casas dentro da Área de

Preservação Permanente, legalmente estabelecida. O maior problema nessa área é a falta de planejamento e atenção às normas ambientais. Sabe-se que o alto número de visitantes podem influenciar na qualidade ecológica dos sistemas naturais por meio de alterações nas propriedades químicas, físicas e / ou biológicas dos locais que eles visitam e principalmente passam temporadas (HADWEN *et al.*, 2007).

A comparação com estudos ecológicos realizados há 30 anos (SCHÄFER, 1992; SCHÄFER *et al.*, 2009) mostra que a qualidade da água da Lagoa dos Barros apresentou pouca alteração, apesar do alto impacto. Provavelmente, a presença do balneário e do camping no entorno, que de certa forma regram os usos recreativos, sejam responsáveis pela atual qualidade da água.

O rio Capivari se comunica com a lagoa dos Barros, e está localizado no litoral médio do Rio Grande do Sul, nas proximidades do município de Capivari do Sul, de coordenada de latitude (-30° 07' 53.1915") e longitude (-50° 29' 32.7624"), com área de 417,609 km² e altitude de 12 m; o corpo d'água está inserido na Bacia Hidrográfica do Litoral Médio e o monitoramento deste recurso hídrico está sob responsabilidade da FEPAM - Fundação Estadual de Proteção Ambiental (RS), gerenciado através de uma central de monitoramento da qualidade da água superficial (FEPAM, 2014), é classificado como pertencente à mesorregião metropolitana de Porto Alegre e microrregião de Osório, com seus limites nos municípios: Balneário Pinhal, à leste; Viamão, ao oeste; Santo Antônio da Patrulha, ao norte; Osório, à nordeste; Palmares do Sul, ao sul;. Ficando a uma distância de 63 km da capital, Porto Alegre. A região tem clima classificado por subtropical úmido, não tendo estações de seca, e com temperatura média anual de 16,5° C. Nos meses de setembro a março temos a época com as maiores temperaturas (ECO VIAGEM, 2014).

Ao final do curso do Rio Capivari temos a Lagoa do Casamento.

Segundo Tomazelli *et al.*, 2000, a Lagoa do Casamento situa-se na Planície Costeira do Rio Grande do Sul, uma província fisiográfica com cerca de 620 km de extensão e que, em certos pontos, chega a aproximadamente 100 km de largura (Tomazelli *et al.*, 2000). Os eventos mais recentes de evolução paleogeográfica desta região, representados por sucessivas transgressões e regressões marinhas, ocorreram entre 400 mil e cinco mil anos atrás, de modo que a maior parte da província situa-se sobre substrato sedimentar. O processo

de formação da Planície Costeira está relacionado com uma importante peculiaridade: a sequência de ambientes no sentido da costa oceânica para o interior, que inclui complexos mosaicos de dunas, banhados, campos, matas, além de um sistema de lagoas costeiras, que inclui inúmeros corpos d'água de diferentes tamanhos, desde a Laguna dos Patos (cerca de 10.000km²) até pequenas lagoas com menos de 1ha.

Devido à baixa altitude e relativa uniformidade do terreno, as condições naturais dos habitats, da fauna e da flora, são bastante influenciadas pelas diferenças sazonais de temperatura e, especialmente, pela dinâmica natural de inundação determinada pelas variações de nível da Laguna dos Patos que estão associadas aos ventos fortes, característicos de toda região costeira do Rio Grande do Sul.

“Embora exista uma tendência de que períodos mais úmidos ocorram no inverno e menos úmidos no verão, inversões destas condições podem ocorrer mesmo no espaço de poucos dias, determinando acentuada mudança nos ambientes em qualquer época do ano (BECKER, F. G., 2006)”.

A Lagoa do Casamento se comunica ao sudoeste com a Laguna dos Patos, vindo a desaguar águas vindas desde as encostas dos morros de Santo Antônio da Patrulha e Osório, que tendem a escoar para a Lagoa dos Barros.

2.2 AGROTÓXICOS COMO MUTAGÊNICOS

Dentre as diversas substâncias passíveis de serem encontradas no meio ambiente, os agrotóxicos se destacam pelo seu grande uso. Os agrotóxicos são utilizados para controlar o aparecimento de espécies animais e vegetais indesejadas. Porém, esses agentes químicos não têm ação exclusiva sobre os organismos alvos, mas também sobre outros organismos eventualmente expostos a eles. Assim sendo, a preocupação quanto ao mau uso ou uso indiscriminado de agrotóxicos faz com que muitos estudos venham sendo realizados, para se estimar os reais efeitos que estes agroquímicos podem causar aos organismos e, assim, poder orientar a população em geral, sobre o perigo ao qual estão expostos. Além da via direta de contaminação, pela própria exposição dos organismos aos agrotóxicos, temos ainda as vias indiretas, onde os organismos se expõem aos agrotóxicos por meio de ingestão

de água e de alimentos contaminados. Quando os agrotóxicos ultrapassam a barreira celular e atingem o material genético dos organismos, eles podem levar ao aparecimento de lesões irreparáveis no DNA, como os eventos de mutação e câncer. Desta forma, o estudo e o conhecimento das lesões induzidas pelos agrotóxicos no DNA dos organismos, são peças fundamentais para que doenças genéticas resultantes da exposição aos agrotóxicos sejam tratadas e evitadas. Além das células somáticas, algumas classes de agrotóxicos podem também afetar as células germinativas e causar lesões que são transmitidas ao longo das gerações. Os agrotóxicos podem contaminar os solos agrícolas por meio de três principais vias (volatilização, lixiviação e escoamento superficial), e quando são aplicados em uma cultura, cerca de 50 % da dose utilizada pode ficar adsorvida no solo. A contaminação do solo por meio da lixiviação tem sido apontada como a principal forma de impacto das águas subterrâneas. Um único evento de chuva pode gerar perdas de até 2% da dose de agrotóxicos aplicada (SIGRH, 2005). Esses resíduos alcançam o meio ambiente e podem ser responsáveis por inúmeros efeitos nocivos para o homem como, por exemplo, alterações no DNA (EVANS, 1985). Os agrotóxicos, de maneira geral, são considerados químicos potencialmente mutagênicos pela capacidade que possuem de induzirem mutação no material genético. Apesar de terem ação tóxica e seletiva contra certos organismos, uma seletividade absoluta é difícil de ser alcançada e, assim, a maioria dos agrotóxicos acaba também atingindo organismos não alvos (BOLOGNESI; MORASSO, 2000). O conhecimento sobre a genotoxicidade dos agrotóxicos utilizados nas culturas brasileiras é de extrema importância, visto que muitas destas substâncias acarretam danos ao DNA, os quais podem desencadear processos de carcinogênese e anormalidades morfológicas, ou alterações nos gametas, influenciando na sobrevivência e na fertilidade das populações (BOLOGNESI, 2003). Estima-se que dois terços da população do Brasil estão expostos, em diferentes níveis, aos efeitos nocivos destes agentes químicos. Tal exposição pode ocorrer por meio ocupacional (PERES; ROZEMBERG; LUCCA, 2005), pela ingestão de água e comida contaminados (FENSKE, 1997), bem como pelo ar e poeira que alcançam suas residências (HOPPIN *et al.*, 2006).

2.3 BIOINDICAÇÃO DE QUALIDADE AMBIENTAL

Há muito, a avaliação de impacto ambiental tem se limitado nos efeitos de grandes e esporádicas poluições que podem vir a causar problemas na população humana (Karr & Chu, 1997). Entretanto, existem outras fontes de risco que podem afetar direta e/ou indiretamente as populações. Os riscos ecológicos, definidos como a hipótese de que algum agente genotóxico venha a causar um efeito ecológico adverso em organismos que vivem em ambientes naturais (USEPA, 1996), podem causar sérios danos à saúde humana e dos demais organismos vivos. A avaliação preliminar de riscos ecológicos, é realizada através do monitoramento ambiental preventivo dos ecossistemas em risco. Em função da grande diversidade de impactos ambientais sobre os ecossistemas aquáticos, o controle ambiental de riscos ecológicos deve envolver uma abordagem integrada, através do monitoramento da qualidade física, química e biológica da água.

O monitoramento de variáveis físicas e químicas traz algumas vantagens na avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, tais como: identificação imediata de modificações nas propriedades físicas e químicas da água; detecção precisa da variável modificada, e determinação destas concentrações alteradas. Porém, este sistema apresenta algumas desvantagens, tais como a descontinuidade temporal e espacial das amostragens. “A amostragem de variáveis físicas e químicas fornece somente uma fotografia momentânea do que pode ser uma situação altamente dinâmica (Whitfield, 2001)”. Em função da capacidade de autodepuração e do fluxo unidirecional de ecossistemas lóticos, os efluentes sólidos carregados por drenagens pluviais para dentro de ecossistemas aquáticos podem ser diluídos (dependendo das concentrações e tamanho do rio) antes do momento da coleta pontual ser realizada, não evidenciando assim o problema. Além disso, o monitoramento físico e químico da água é pouco eficiente na detecção de alterações na diversidade de habitats e micro habitats e insuficiente na determinação das consequências da alteração da qualidade de água sobre as comunidades biológicas. Já as comunidades biológicas refletem na prática a integridade ecológica total dos ecossistemas (p. ex., integridade física, química e biológica), refletindo o efeito sinérgico de todos os possíveis mutagênicos e

demonstrando índices relativos ao dano causado por todas as variáveis (Barbour *et al.*, 1999). Ecossistemas aquático possuem diversas comunidades adaptadas a diferentes condições evolutivas, com diferentes limites de tolerância para inúmeros fatores (Alba-Tercedor, 1996). Sendo assim, o monitoramento biológico constitui-se como uma ferramenta na avaliação das respostas destas comunidades biológicas a modificações nas condições ambientais originais. O monitoramento biológico é realizado principalmente através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, índices biológicos e multimétricos, tendo como base a utilização de bioindicadores de qualidade de água e habitat. Os principais métodos de análise envolvidos englobam o levantamento e avaliação de alterações na riqueza de espécies e índices de diversidade; grande número de organismos resistentes; perda de espécies sensíveis a alterações do meio em que se inserem; cálculos de produtividade primária e secundária; sensibilidade a diferentes concentrações de substâncias tóxicas (Barbour *et al.*, 1999).

2.4 *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE

“As plantas superiores são excelentes modelos genéticos para detectar mutagênicos ambientais e são usados em estudos de monitoramento (FERNANDES, 2005)”. Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo. O estudo dos mutagênicos em núcleos eucarióticos vem sendo observado através de métodos citológicos. A mutação pode ser resultado de modificações ambientais, sendo elas físicas ou químicas, alterando a estabilidade intrínseca dos ácidos nucléicos. Os agentes mutagênicos podem ser detectados por interrupção em mitoses, indução de alterações cromossômicas numéricas e estruturais e de trocas entre cromátides irmãs, inibição do ciclo celular, entre outros (Vieira; Vicentini, 1997).

As características que tornam *A. cepa* um excelente organismo-teste incluem o conhecimento da duração de seu ciclo celular, a sua resposta a inúmeros mutagênicos conhecidos, cromossomos em número reduzido ($2n=16$), a disponibilidade ano todo e o fácil manuseio. Dentre os vegetais superiores utilizados como modelos-

teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando como um eficiente modelo genético de monitoramento ambiental. A espécie é indicada pela sua elevada sensibilidade e excelente correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Estes fatores são relevantes para avaliação mais minuciosa de riscos ambientais, bem como para análise de outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem (FISKESJÖ, 1985).

Para FISKESJÖ (1985), o sistema teste com *Allium cepa* é altamente indicado como um teste padrão para a toxicidade, por ser de fácil execução e os resultados obtidos poderem ser reproduzidos novamente em pouco tempo. Quando se tem um valor de toxicidade significativo pode-se facilmente observar variações no índices de crescimento das raízes (FISKESJÖ, 1995).

El Shahabyet *al.* (2003), consideraram o sistema teste de *Allium cepa* mais adequado para detecção de toxicidade/genotoxicidade para avaliação de níveis de poluição ambiental, os quais representam riscos diretos ou indiretos para a população humana. A utilização do teste de *Allium cepa* também é uma alternativa interessante devido ao baixo custo, não exigência de equipamentos elaborados para sua realização e dispensar a aprovação em Comitê de Ética e Pesquisa (CEP).

O sistema-teste *Allium cepa* pode nos apresentar dois efeitos da toxicidade dos compostos presentes na amostras: em escala macroscópica, pode ser observada a formação de aglomerados celulares (tumores) e também diferenças no crescimento das raízes, seja esta por alteração de tamanho ou por crescerem em direções disformes; ao nível microscópico, demonstrando a taxa de divisão celular através da análise do Índice Mitótico. Aberrações cromossômicas, que ocorrem principalmente durante as mitoses e durante a formação de micronúcleos, como indicadores de anormalidades no DNA, também são utilizados como parâmetros microscópicos. (MONARCA *et al.*, 2000).

Fiskesjo (1993, 1994) ressaltou o quão útil pode ser utilizar vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e enfatizou que por mais que os metabolismos de plantas e animais sejam diferentes, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas que sofreram ação de agentes químicos.

2.5 AVALIAÇÃO DA MUTAGENICIDADE EM TESTES AMBIENTAIS

Os organismos vivos estão frequentemente expostos à substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares. Os danos podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, alterações cromossômicas necessárias à manutenção da vida, levando processos corriqueiros a se tornarem complexos processos cancerosos e levando até mesmo à morte celular. Devido ao fato de serem lesivos ao gene, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (Costa; Menk, 2000).

De acordo com a ANVISA, testes de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo*, específicos para determinar o potencial mutagênico de substâncias sob suspeita. “Pelas normas estabelecidas, além de testes *in vitro*, recomenda-se a realização de testes *in vivo* com dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo usando células hematopoiéticas de rato e um segundo ensaio de genotoxicidade *in vivo* (ANVISA, 2010)”. Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental, também determina a realização de testes que tragam à tona índices de possíveis causadores de câncer (PRESTON, 2007). “Os testes biológicos de mutagenicidade com plantas consistem em verificar a frequência de micronúcleos, aberrações cromossômicas e alterações no índice mitótico nas células do meristema radicular (FISKESJÖ, 1985; MELLO *et al.*, 2004)”. Esses testes fornecem parâmetros significantes para avaliar a toxicidade de misturas quando não se pode determinar a composição química da amostra (CHANDRA *et al.*, 2005), podendo servir como indicador de dano e poluição ambiental na água, ar, solo (CABRERA *et al.*, 1999).

A análise de alterações cromossômicas serve como teste de mutagenicidade e nos dá valores diretos em relação a sistemas expostos a amostras com mutagênicos ou carcinogênicos potenciais. Para que tal análise possa ser feita, é necessário que as células estejam em constante divisão mitótica, utilizando-se os resultados de um ciclo celular para se analisar os efeitos tóxicos, e o teste de *Allium cepa* tem sido frequentemente utilizado com este objetivo (Silva *et al.*, 2003). O índice mitótico e índice de replicação são usados como indicadores de proliferação adequada das células (Gadano *et al.*, 2002), o que

pode ser medido, através do sistema teste vegetal de *Allium cepa* em um sistema controle, tanto para mais quanto para menos.

2.5.1 TESTE DE MICRONÚCLEO

Micronúcleos são pequenas estruturas, que contém DNA, e que estão localizados no citoplasma, sendo estes vistos como mutações nucleares. São formados por fragmentos de cromossomos, formando estruturas acêntricas (MILLER, 1973). Tal fragmento não volta a fazer parte novamente de núcleos principais (COSTA e MENK, 2000; FENECH, 1993)

Para termos possíveis micronúcleos em nosso experimento, precisamos de células em constante divisão celular, sendo as células de raízes de *Allium cepa* excelentes para tal (VILLELA e LAU, 2003).

O sistema de teste de micronúcleo em raízes da espécie *Allium cepa* (cebola), é definido como sendo um dos melhores para estudos de monitoramento ambiental e mutagênicidade de plantas medicinais, por sua sensibilidade e exatidão, e, porque as raízes da *A. cepa* possuem processo de divisão celular similar aos do homem (GAVRONSKI, 2008).

A utilização do teste de micronúcleo em *A. cepa*, é indicada devido ao baixo custo, disponibilidade da matéria prima, não exigência de equipamentos elaborados e de aprovação em comitê de ética e pesquisa (CEP). Neste estudo optamos por uma adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, recomendada por Fiskejö (1985), vindo a utilizar o kit panótico rápido LB no lugar do metanol e giemsa.

2.5.2 ÍNDICE DE ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

Alterações cromossômicas em *Allium cepa* podem ser observadas em qualquer fase do ciclo celular e são consideradas evidências de efeitos mutagênicos promovidos por agentes clastogênicos (quebras no DNA) ou aneugênico (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), classificados de acordo com o tipo de alteração induzida (VIDAKOVIĆ-CIFREK *et al.*, 2002).

“Este teste tem sido amplamente utilizado, principalmente, para se monitorar os impactos derivados de emissão de efluentes em rios (FISKEJÖ, 1993; RANK; NIELSEN, 1993; SMAKA-KINCL *et al.*, 1996)”.

2.5.3 ÍNDEX MITÓTICO

Segundo SMAKAKINCL *et al.*, 1996; FERNANDES *et al.*, 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008 a alteração de índices mitóticos e os índices morte celular na espécie *Allium cepa* podem ser refletir parâmetros no qual se encontra tal amostra utilizada, servindo assim para a avaliação de químicos ambientais. A cito toxicidade de um composto pode ser mensurada através da variação do IM de células a ele expostas (FERNANDES *et al.*, 2007).

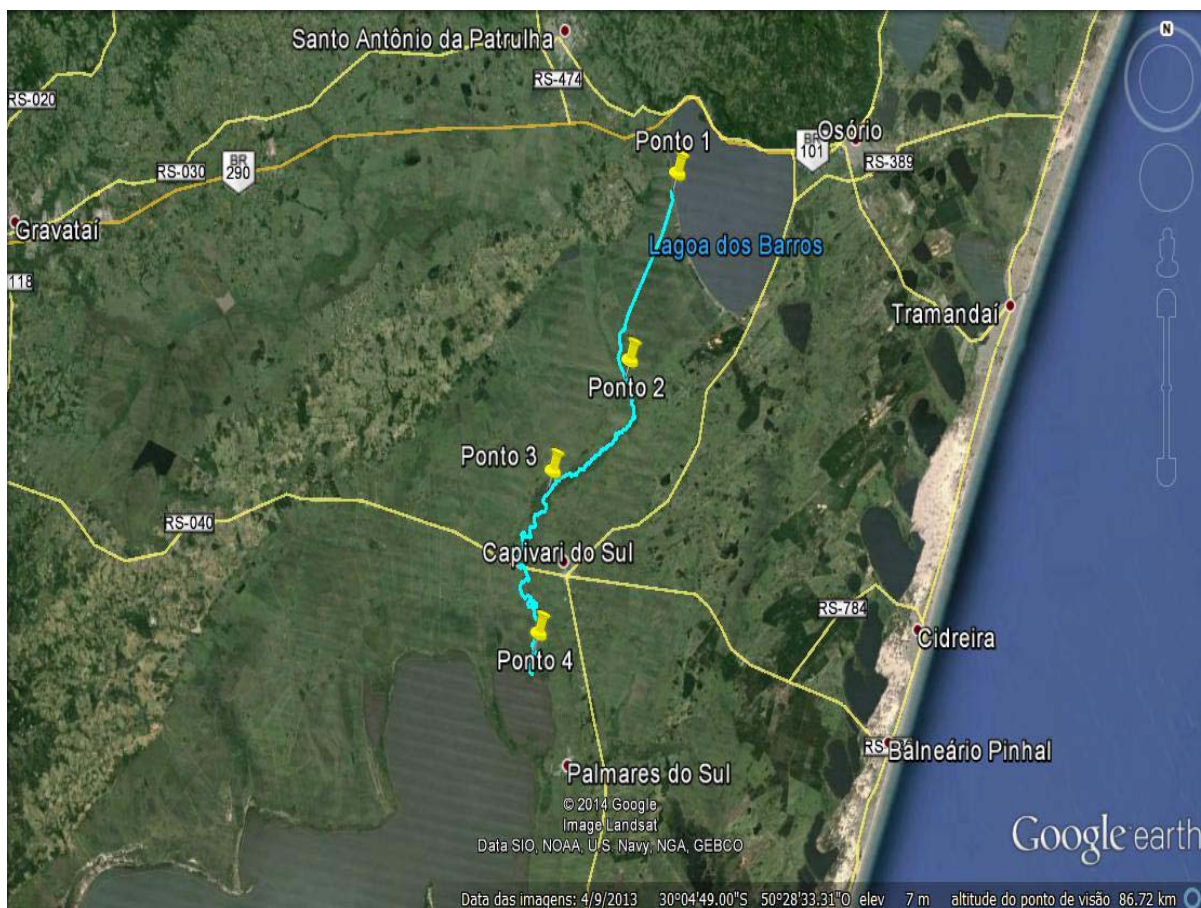
Índices mitóticos inferiores ao controle negativo podem indicar a presença de agentes, cuja ação tóxica compromete o crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos. IMs superiores aos observados nos testes controle são resultados de indução de divisão celular e pode levar à proliferação celular descontrolada e até a tumorização (HOSHINA, 2002).

Desta forma, a variação nos IM pode ser um importante indicador da qualidade das amostras, e pode ser utilizado para quantificar os níveis de poluição em diferentes ambientes, especialmente por compostos tóxicos e citotóxicos (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996; HOSHINA, 2002).

3 ÁREA DE ESTUDO

Situado entre a Lagoa dos Barros e a Lagoa do Casamento, o Rio Capivari serve para movimentar a economia do Estado disponibilizando água para a principal região produtora de arroz no Rio Grande do Sul. Além deste uso, a água também é utilizada por moradores da região para dar de beber aos animais e também para consumo próprio. A água que cai da chuva desce as encostas da Região de Santo Antônio e Osório e tem como destino a Lagoa dos Barros, da qual através de bombeamento artificial passa a alimentar o Rio

Capivari nos meses de verão (quanto se utiliza água em abundância no plantio do arroz), o qual terá sua vazão aumentada e passará a despejar mais água na Lagoa do Casamento. O Rio Capivari se estende por cerca de 45 km, desde seu início na região bombeamento artificial, cujo braço inicial também sofreu uma alteração no posicionamento, vindo a ser desviado mais para norte, aumentando assim a quantidade de proprietários beneficiados, e segue até a Lagoa do Casamento com uma largura média de cerca de 10 metros, tendo porém, uma região onde se alarga e chega a quase 500 metros de largura, passando então a dispersar suas águas em um banhado que mais a frente volta a afunilar e recolher as águas para um ponto só, tornando a largura média novamente. Toda água que é bombeada artificialmente para dentro das lavouras acaba tendo um ponto de retorno para o Rio Capivari, porém esta água não passa por nenhum tratamento prévio antes de seu retorno, sendo assim entrando pura no sistema e saindo contaminada com os agrotóxicos que acabam sendo lixiviados e transportados pelo movimento natural da água dentro dos campos. Essa água que retorna contaminada vai sofrendo esse processo repetidas vezes até chegar ao seu destino, quando acaba por acumular diversos mutagênicos de outras fazendas anteriores, poluindo assim não só o local onde o veneno está sendo despejado, mas toda uma região.



Mapa 1 - [Localização da Área de estudo do Rio Capivari]
 Fonte: Google, 2015

A região dos Pontos 1 e 1.2 é uma área de uso esporádico, vindo a ter movimentação de carros e pessoas mais em finais de semana e/ou feriados em época de verão, ficando totalmente inabitada durante o resto do ano.

A região dos pontos 2 e 2.2 é uma área de lavoura rodeada por diversas moradias, tendo fluxo de pessoas e animais de criação durante a semana toda.

A região dos pontos 3 e 3.2 é uma região de lavouras com uma passagem de rua utilizada frequentemente por carros e motos de moradores da região e entorno.

Já a região dos pontos 4 e 4.2 fica bem mais afastada dos núcleos populacionais, vindo a ter algum contato com pessoas somente na beira da estrada BR-101, sendo mesmo assim de uma distância bem maior que qualquer outro dos pontos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da ação mutagênica foi realizada pelo método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI e colaboradores.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a avaliação do potencial citotóxico e genotóxico das amostras serão utilizados bulbos de cebola (*Allium cepa*).

4.2 AMOSTRAGENS

As amostras serão coletadas em pontos onde ocorre o retorno da água de retorno das lavouras de arroz que se encontram ao longo do Rio Capivari (municípios de Capivari do Sul e Osório) no mês de Janeiro de 2015, época em que se utiliza o sistema de irrigação artificial com maior frequência. Será coletada água de um ponto de retorno a, aproximadamente, cada 15 quilômetros percorridos do curso do rio. As coletas serão feitas durante três turnos (manhã, tarde e noite), com intervalo de 8h entre cada amostragem, compondo um total de 12 amostras.

4.3 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA: TESTE DE MICRONÚCLEOS

A avaliação da ação mutagênica foi realizada pelo método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI e colaboradores. Foram utilizados 27 exemplares de *A. cepa*, de tamanho pequeno, uniforme e de mesma origem, não germinados e saudáveis, adquiridos em um mercado no município de Imbé. As raízes secas foram extraídas. 8 bulbos de cebola foram postos a germinar nas águas coletadas, em frascos de 100 ml, protegidos da incidência direta da luz do sol, com a parte inferior mergulhada na amostra coletada em cada ponto. Outros 3 bulbos foram postos a germinar em água destilada. Para cada tratamento (amostras manhã e tarde) foram utilizadas 3 réplicas, totalizando 24 bulbos, sendo que nem todos vieram a ter suas raízes com o desenvolvimento necessário. Outros 3 bulbos serviram como controle negativo.

As raízes foram coletadas para análise quando atingiram o comprimento de 0,5 a 3 cm, sendo lavadas com água destilada, hidrolisadas com HCl a 1 mol/L por 10 min em banho-maria a 60°C e após, os frascos resfriados em água corrente. Após a lavagem dos meristemas foram feitos esfregaços em duas lâminas por *Allium cepa* (totalizando 54 lâminas) e aguardados 30 min em temperatura ambiente para secagem. Logo após, as lâminas foram coradas com Kit Panótico Rápido LB, sendo este composto por três recipientes (o primeiro com triarilmetano a 0,1%, o segundo com xatenos a 0,1% e o terceiro com tiazinas a 0,1%), sendo as lâminas mergulhadas 10 vezes em cada recipiente, exceto no último, onde serão mergulhadas apenas 3 vezes com submersão de 1 s de duração. Por fim, as lâminas foram lavadas em água deionizada com pH 7,0 e secas à temperatura ambiente.

A avaliação das anormalidades cromossômicas constituiu na observação de alterações interfásicas e mitóticas observadas em 1.000 células. Serão contabilizadas 1.000 células por amostra, em um total de 9 amostragens distribuídas em 54 lâminas. A contagem foi feita em microscopia óptica, com objetiva de 40x e ocular de 10x, tendo um aumento de 400x.

A análise estatística foi realizada com a utilização do Teste não-paramétrico TUKEY, Variância (ANOVA), utilizando-se o *Software* SPSS. Os grupos foram considerados diferentes para um $p < 0,05$ e os dados estão apresentados como médias \pm erro padrão médio (EPM).

4.3.1 ALTERAÇÕES INTERFÁSICAS (AI)

Observaram-se alterações interfásicas do tipo micronúcleo, células binucleadas e brotamentos nucleares. A identificação dos micronúcleos se deu a partir dos seguintes critérios: (a) formato redondo ou oval e estar circundado por citoplasma de mesma célula que o núcleo principal; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) deveria estar no mesmo plano de foco do núcleo principal; (d) deveria estar próximo ao núcleo principal, de modo que se pudesse observar uma não ligação entre eles.

4.3.2 ALTERAÇÕES MITÓTICAS (AM)

Em tal análise foram consideradas as aberrações dos tipos pontes cromossômicas e atrasos cromossômicos, observados nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase).

4.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para análise do efeito citotóxico, calculou-se o índice mitótico (IM) pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para determinar o IM foi utilizada a equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, em que **NCM** corresponde ao número de células em divisão mitótica e **NTC** ao número total de células analisadas, sendo esta simplificada, devido aos valores utilizados para análises durante o trabalho, pela equação $IM = NCM \times 0,1$.

A partir de valores obtidos de índices mitóticos, é possível se fazer uma avaliação do potencial que uma determinada substância tem de inibir ou aumentar a proliferação celular.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos entre os pontos de amostragem foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de DUNCAN utilizando o Software SPSS. A análise dos dados obtidos entre as coletas foi realizada através de teste-T para amostras independentes utilizando-se o teste de Levene para calcular a significância. O nível de significância exigido foi de $p < 0,05$. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão médio (EPM).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos horários das coletas, temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD%), turbidez e localização (GPS) são apresentados na Tabela 1. Durante o período de tempo utilizado para as coletas, obtivemos significativas variações de temperatura, tendo observado valores bem condizentes com o esperado. O período escolhido para a coleta, o momento em que se água o arroz, se insere no verão, onde se observam altas temperaturas, principalmente, nos meses entre novembro e março. A temperatura superficial da água ficou entre 26 °C (Ponto 3) e 34,1 (Ponto 4.2), sendo que a média dos valores acabaram não variando muito entre si devido ao período em que as coletas foram feitas, que foi entre as 10 horas (Ponto 1) da manhã e as 16 horas (1.2). Para encontrar tais valores foi utilizado um termômetro digital devidamente calibrado no Laboratório de Análises de Águas do CECLIMAR.

Um parâmetro analisado e que estabeleceu uma relação direta com os índices de toxicidade encontrados nas lâminas observadas foi o de pH, sendo que ele variou entre 4,7 (Ponto 3) e 8,9 (Pontos 1 e 1.2). O valor de pH de 8,9 encontrado está de acordo com o local onde foi feita a coleta: região de pouca energia, onde chuvas escorrem através de encostas de morros e não há despejos industriais, sendo impactada, em maior parte, pela atividade turística da região, que acontece predominantemente nessa época do ano e tem como principal agente o esgoto doméstico. O local com o pH mais baixo encontrado, de 4,7, também está de acordo com o local onde foi feita a coleta, o Ponto 3. O Ponto 3 é um local de pouco fluxo de água e de onde se teve acesso direto de onde a água retorna para o Rio Capivari, sem sofrer nenhuma diluição. Ele pode ser considerado como uma resposta direta da água que recebe agrotóxicos e que retorna para o Rio, ainda tendo valores de oxigênio dissolvido entre 2 (25%) e 2,6 (34%) no Ponto 3, e 1,6 (19,6%) e 1,75 (23%) no Ponto 3.2, mostrando assim valores baixíssimos de um elemento essencial, em níveis maiores, à vida. Apesar de tais valores encontrados nestes pontos, em ambas as amostragens foram avistados diversos peixes vivendo no local, o que talvez reflita animais adaptados àquele local com uma tolerância a menores valores de pH e oxigênio dissolvido. Para encontrar tais valores foram utilizados um pHmetro digital e um oxímetro digital, ambos devidamente

calibrados no Laboratório de Análises de Águas do CECLIMAR, para valores de pH e oxigênio dissolvido, respectivamente.

Valores de turbidez ficaram em 30 cm nos pontos mais rasos (1, 1.2, 3 e 3.2), 52 cm (2 e 2.2), e 70 cm (4 e 4.2), sendo os locais 2, 2.2, 4 e 4.2 os mais profundos analisados, sendo que quando mais profundo o local maiores era os valores encontrados no Disco de Secchi.

Devido às logísticas de equipamentos, transportes e pessoal, os intervalos entre as coletas não foram similares, variando de 2 horas e 30 minutos entre os pontos 4 e 4.2, e 6 horas entre os pontos 1 e 1.2, o que pode ter interferido nos resultados obtidos quando comparados valores de diferentes pontos.

TABELA 1	Ponto 1	Ponto 12	Ponto 2	Ponto 22	Ponto 3	Ponto 32	Ponto 4	Ponto 42
Horário	10 horas	16 horas	10:40	15:30	11:45	14:15	12:30	15 horas
Temperatura (°C)	31,1	33	30	31,5	27,5	29,3	33,7	33,6
pH	8,4	8	6,3	5,8	5,4	5,5	6,2	6
Oxigênio Dissolvido (%)	113	115	68,7	72	31	21,7	74	74
Turbidez (cm)	30	30	52	52	30	30	70	70
GPS	S 29° 55,221' W 050° 25,410'		S 30° 01,837' W 050° 27,840'		S 30° 05,820' W 050° 32,483'		S 30° 11,545' W 050° 31,859'	

Tabela 1: Dados Físicos das coletas. Fonte autor.

Os dados químicos das amostras são apresentados na Tabela 2. Em relação aos pontos diferirem em mesmo turno, o Ponto 1.2 diferiu de todos outros pontos de coleta da parte da tarde, vindo a conter menos Ferro que os outros respectivos pontos possivelmente por estar em uma zona onde estes tendem a se diluir na grande quantidade de água onde este se encontra inserido (margem Sudoeste da Lagoa dos Barros), enquanto que os outros pontos estão sujeitos a rejeitos em pequenos córregos e também à passagem da água por dentro do motor (composto por, principalmente, ferro sujeito a oxidações) e recirculação nas lavouras.

O nitrito, que é uma forma química do nitrogênio normalmente encontrada em quantidades diminutas nas águas superficiais, pois o nitrito é instável na presença do oxigênio, ocorrendo como uma forma intermediária no processo de nitrificação, no qual a amônia é transformada (oxidada) por bactérias para nitrito, e logo para nitrato, em sistemas aquáticos. O íon nitrito pode ser utilizado pelas plantas como uma fonte de nitrogênio, e sua presença na água indica processos biológicos ativos influenciados por poluição orgânica (GORSEL & JENSEN, 1999)

Quanto aos Nitratos encontrados, temos que o ponto 1.2 diferiu de todos os outros pontos onde se obteve resultados do teste (pontos P2, P2.2, P4 e P4.2).

TABELA 2	FOSFATO	NO3	FERRO	COBRE
Ponto 1	0,180 ± 0,017*	ND	0,247 ± 0,026	0,102 ± 0,010
Ponto 1.2	0,257 ± 0,029 ^{a,h}	0,247 ± 0,015 ⁱ	0,243 ± 0,018 ^j	0,197 ± 0,009 ^{e,m}
Ponto 2	0,099 ± 0,007	0,131 ± 0,011	0,763 ± 0,047	0,100 ± 0,012
Ponto 2.2	0,106 ± 0,123	0,070 ± 0,012	0,747 ± 0,032 ^k	0,100 ± 0,012
Ponto 3	0,180 ± 0,040 [#]	ND	0,980 ± 0,081	0,200 ± 0,006 ^l
Ponto 3.2	0,110 ± 0,015 ^b	ND	0,967 ± 0,882	0,103 ± 0,009 ^f
Ponto 4	0,097 ± 0,009	0,700 ± 0,011	0,180 ± 0,018	0,050 ± 0,0115 ^l
Ponto 4.2	0,183 ± 0,043 ^c	0,069 ± 0,004	0,753 ± 0,032 ^d	0,097 ± 0,009 ^g

Tabela 2: Dados químicos das amostras. Os resultados são média ± EPM.

^a indica diferença entre 1 e o 1.2 para um p=0,042;

^b indica diferença entre 3 e 3.2 para um p=0,032;

^c indica diferença entre 4 e 4.2 para um p=0,043;

^d indica diferença entre 4 e 4.2 para um p=0,016;

^e indica diferença entre 1 e 1.2 para um p=0,048;

^f indica diferença entre 3 e 3.2 para um p=0,044;

^g indica diferença entre 4 e 4.2 para um p=0,050;

^h indica diferença entre 1.2 e os grupos 2.2 e 3.2 para um p=0,050;

ⁱ indica diferença entre 1.2 e os grupos 2.2 e 4.2 para um p=0,050;

^j indica diferença entre 1.2 e todos os grupos 2 para um p=0,050;

^k indica diferença entre 2.2 e todos os grupos 2 para um p=0,050;

^l indica diferença de 3 e 4 em relação a si todos os grupos para um p=0,050;

^m indica diferença entre 1.2 e todos os grupos 2 para um p=0,050.

O contaminante inorgânico de maior preocupação em águas subterrâneas é o íon nitrato, NO₃⁻, que normalmente ocorre em aquíferos de zonas rurais e suburbanas. O nitrato em águas subterrâneas origina-se principalmente de quatro fontes: aplicação de fertilizantes com nitrogênio, bem como inorgânicos e de esterco animal, em plantações; cultivo do solo; esgoto humano depositado em sistemas sépticos e deposição atmosférica (BAIRD; CANN, 2011).

“O excesso de íon nitrato em água potável em adultos, conforme pesquisas, pode ser responsável por causar câncer de estômago, e aumentar a probabilidade de câncer de mama em mulheres (BAIRD; CANN, 2011)”. Os níveis de nitrato em água tida como não potável são muito inferiores do que em

produtos de carne defumada ou queijos, aos quais, se acrescenta nitrato para que não se corra o risco de desenvolver botulismo devido à presença nestes alimentos da bactéria causadora da doença (SPIRO; STIGLIANI, 2009).

Grandes quantidades de nitrato são utilizadas no manufaturamento de suínos, como bacon e salsichas. Nestes alimentos parte de nitrato é bioquimicamente reduzido para nitrito, que impede o crescimento da bactéria e, deste modo acaba por evitar uma possível contaminação por tal doença.

Calculando-se o índice mitótico (IM) (relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas) determinou-se o IM utilizando a equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, em que **NCM** corresponde ao número de células em divisão mitótica e **NTC** ao número total de células analisadas, sendo esta simplificada, devido aos valores utilizados para análises durante o trabalho, pela equação $IM = NCM \times 0,1$. A partir de valores obtidos de índices mitóticos, foi possível se fazer uma avaliação do potencial que uma determinada substância tem de inibir ou aumentar a proliferação celular, sendo que alguns pontos tiveram um aumento na proliferação celular em relação ao sistema controle, alguns mantiveram valores semelhantes ao sistema controle, e outros obtiveram valores bem inferiores de proliferação, evidenciando uma potencial diminuição do poder de divisão celular (Tabela 3).

Observaram-se alterações interfásicas do tipo micronúcleo, células binucleadas e brotamentos nucleares. A identificação dos micronúcleos se deu a partir dos seguintes critérios: (a) formato redondo ou oval e estar circundado por citoplasma de mesma célula que o núcleo principal; (b) apresentar coloração semelhante ao núcleo principal; (c) deveria estar no mesmo plano de foco do núcleo principal; (d) deveria estar próximo ao núcleo principal, de modo que se pudesse observar uma não ligação entre eles.

Como alterações mitóticas foram consideradas as aberrações dos tipos pontes cromossômicas e atrasos cromossômicos, observados nas diferentes fases de divisão celular (metáfase, anáfase e telófase).

	IM	AI	AM
TABELA 3			
CONTROLE	5,20±0,30	12,3±1,00	1,10±0,50
1	4,30±2,40	4,80±1,83	2,60±1,00
2	3,30±1,58	4,80±1,45	2,34±0,50
3	2,10±1,62	12,7±1,33	1,00±0,30
4	2,30±0,30	9,20±2,10	1,20±0,60
1.2	1,50±1,02	6,10±1,45	1,50±1,08
2.2	1,00±1,20	5,10±1,28	1,70±0,80
3.2	4,60±0,00	34,0±0,00	3,20±0,00
4.2	1,50±0,00	24,4±0,00	2,44±0,00

Tabela 3 - Relação de amostras com Índice Mitótico (IM), Alterações Interfásicas (AI) e Alterações Mitóticas (AM), com desvio padrão amostral.

Alterações nos índices de crescimento da raiz e alterações dos valores Índice Mitótico encontrados nas amostras controle são indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações como anomalias cromossômicas (micronúcleos, pontes cromossômicas), indicam genotoxicidade (FISKESJÖ, 1985).

Quanto às anomalias cromossômicas, os testes apontaram a presença tanto de alterações interfásicas como mitóticas (Tabela 4).

TABELA 4	controle	Ponto 1	Ponto 1.2	Ponto 2	Ponto 2.2	Ponto 3	Ponto 3.2	Ponto 4	Ponto 4.2
Normais	0	7	1	2	0	10	60	4	18
Micronúcleo	75	19	51	23	41	108	216	45	180
Brotamento	14	11	4	6	5	0	60	25	51
Ponte Anafásica	9	3	10	0	0	0	0	3	1
Atrasos	0	8	0	4	0	0	0	0	0
Outros	9	17	5	10	0	0	2	1	1
Células Binucleadas	34	18	6	19	5	19	44	22	13

Os resultados observados, após análise das células meristemáticas expostas às amostras de efluente coletadas em janeiro de 2015 estão apresentados no Gráfico 1.

O resultado obtido através das análises das lâminas mostrou que, nas coletas da manhã, o ponto 4 diferiu dos valores encontrados nos pontos 1, 2, 3, e controle, sendo que todos os pontos diferiram do controle.

Já nas análises dos pontos da tarde, o ponto 2.2 diferiu de todos os outros valores, vindo a ter valores acima dos encontrados no ponto 1.1 e bem abaixo

dos valores encontrados nos pontos 3.2 e 4.2. O ponto 2.2 não diferiu do sistema controle.

Quando utilizamos o Teste T para comparar as coletas feitas entre os períodos de manhã e tarde, observamos que a amostragem 2 difere da amostragem 2.2, que a amostragem 3 difere da amostragem 3.2, e que a amostragem 4 difere da amostragem 4.2, sendo os valores de p iguais a 0,003, 0,042 e 0,00001, respectivamente (Gráfico 1).

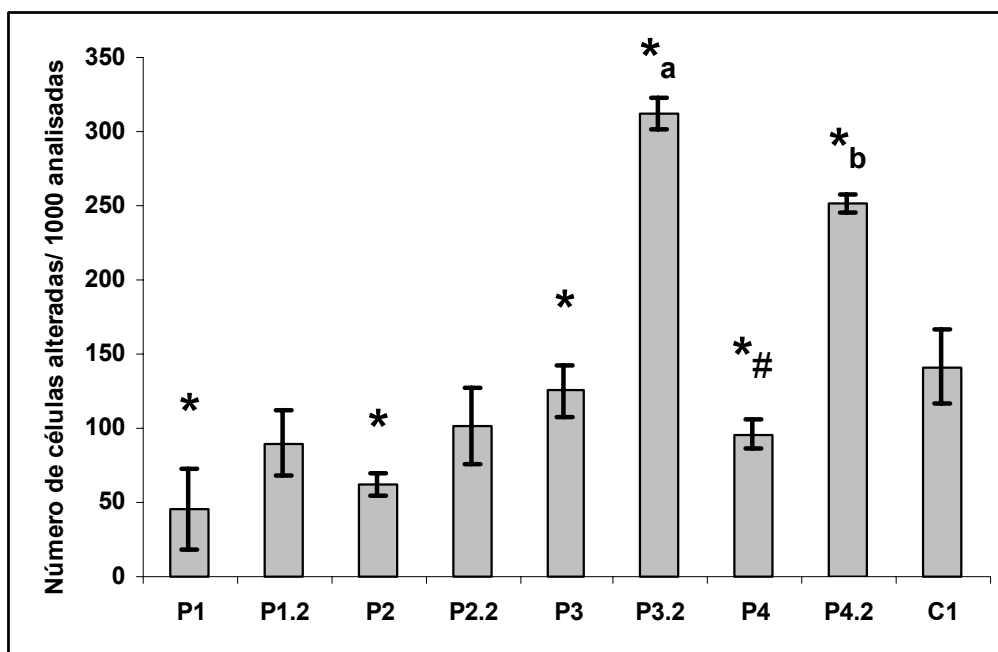


Gráfico 1 – Número de células alteradas por 1000 analisadas nas diferentes coletas. Os dados são média \pm EPM.

*indica diferença entre os grupos P1, P2, P3, P3.2, P4 e P4.2 em relação ao controle para um $p < 0,05$;

#indica diferença entre P4 e P1, P2 e P3 para um $p < 0,05$;

^a indica diferença entre P3.2 e os demais grupos para um $p < 0,05$;

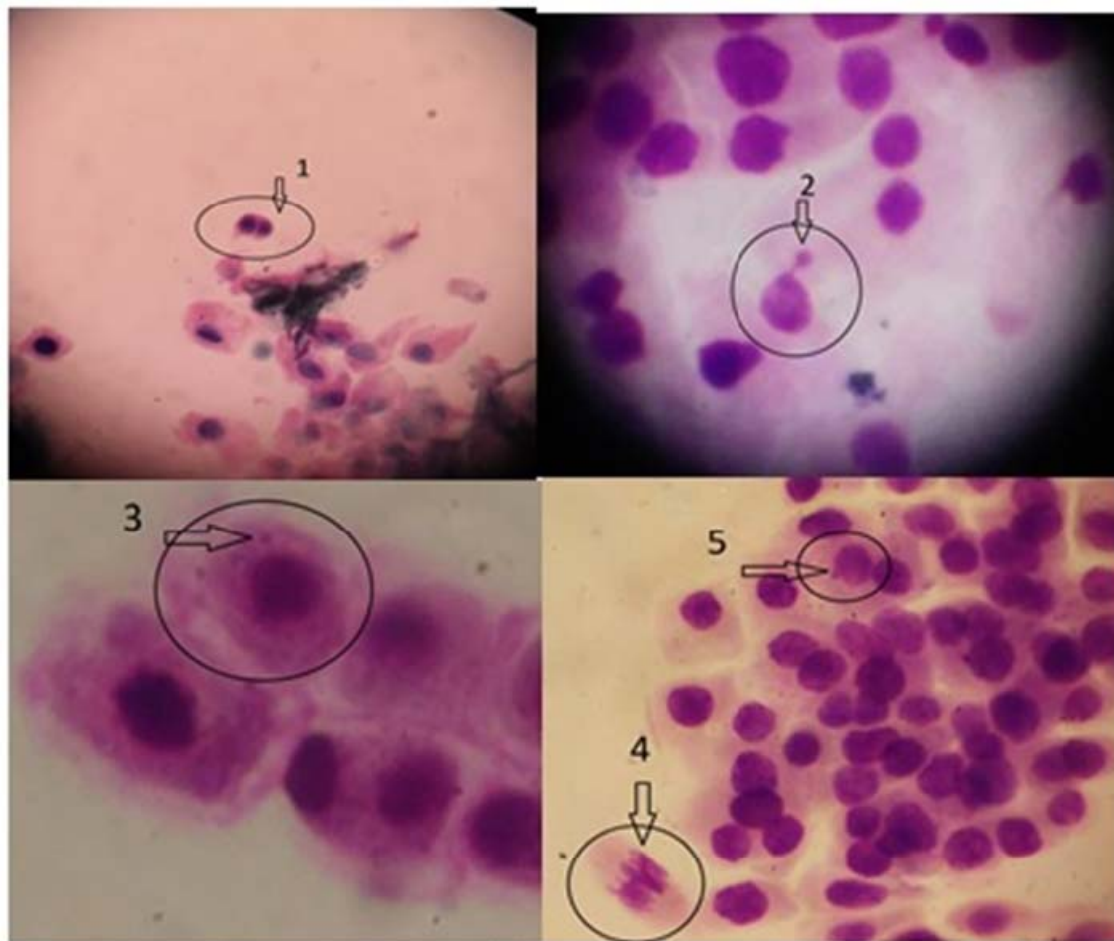
^b indica diferença entre P4.2 e os demais grupos para um $p < 0,05$.

Foram encontradas alterações na morfologia nuclear em todas as amostras coletadas, sendo caracterizadas por micronúcleos, atrasos, brotamentos nucleares, pontes cromossômicas e células binucleadas (Fotografia 1).

Tais resultados obtidos neste estudo sugerem um efeito mutagênico das águas de retorno das lavouras em grande parte das amostragens sobre os exemplares de *Allium cepa*, sendo a indução de micronúcleos utilizada frequentemente como indicadora de exposição a agentes mutagênicos.

Para estas análises se utilizou o $p < 0,05$ para comparar as amostras com o sistema controle.

Foram observadas como alterações mitóticas atrasos e pontes cromossômicas (Fotografia 1), sendo verificados em quantidade bem menos significativa quando comparados com alterações interfásicas.



Fotografia 1- Alterações mitóticas encontradas em células do meristema radicular de *Allium cepa* em sistema controle e amostragens: 1, célula binucleada; 2 e 5, brotamento nuclear; 3, micronúcleo; 4 atraso.

Fonte: O autor, 2015

Nos bioensaios com *A. cepa*, após a exposição dos bulbos de cebola à solução teste por um determinado período, é possível avaliar tanto efeitos citotóxicos, através da redução do crescimento das raízes ou da diminuição do índice mitótico, como efeitos genotóxicos, geralmente através da análise de micronúcleos ou de anormalidades da anáfase-telófase (FISKEJÖ & LEVAN, 1994).

Segundo dados obtidos através do software SPSS, o resultado obtido através das análise das lâminas mostrou que, nas coletas da manhã, o ponto 4 diferiu

dos valores encontrados nos pontos 1, 2, 3, e controle, sendo que todos os pontos diferiram do controle.

Já nas análises dos pontos da tarde, o ponto 2.2 diferiu de todos os outros valores, vindo a ter valores acima dos encontrados no ponto 1.1 e bem abaixo dos valores encontrados nos pontos 3.2 e 4.2. O ponto 2.2 não diferiu do sistema controle.

Quando utilizamos o Teste T para comparar as coletas feitas entre os períodos de manhã e tarde, observamos que a amostragem 2 difere da amostragem 2.2, que a amostragem 3 difere da amostragem 3.2, e que a amostragem 3 4 difere da amostragem 4.2, sendo os valores de p iguais a 0,003, 0,042 e 0,00001, respectivamente.

Todas lâminas pertencentes às coletas feitas no turno da manhã mostraram diferença significativa, tendo o valor de $p < 0,05$, perante o sistema utilizado como controle amostral. Obtivemos ainda significância nos valores da amostra 4 ($p < 0,05$) em relação às amostra 1, 2 e 3, onde podemos julgar como um possível resultado de todos os lixiviados de lavouras adjacentes que acabam por influenciar o ponto de coleta número 4.

Os resultados obtidos nas coletas da tarde diferiram em relação aos da manhã, sendo que apenas a amostra 2.2 não diferiu do sistema controle. Em alguns casos tivemos diferenças aumentando valores e em outros casos diferenças provenientes da diminuição de alguns valores. O ponto 2.2 (mesmo do ponto 2, porém com a coleta feita na parte da tarde) pode ser qualificado como estando com uma boa qualidade, já que seus resultados foram semelhantes aos resultados encontrados no sistema controle.

Utilizando-se do teste T de Student verificou-se que as amostras 2 e 2.2 diferiram entre si, assim como as amostras 3 e 3.2, e 4 e 4.2, sendo que somente onde não houve variação índices fenotípicos/genotípicos foram entre os ponto 1 e 1.2, região de input de água doce, que, quando chove, escoo através de uma região de encostas e morros que tendem a se unir e desembocar na Lagoa dos Barros, indo após isso em direção ao Rio Capivari (Rio da Galinha), que vai desembocar na Lagoa do Casamento e na Lagoa dos Patos, sucessivamente.

As alterações mais observadas durante o processo de análise das lâminas foram pontes cromossômicas (PT), micronúcleos (MN), brotamentos nucleares (BN), células binucleadas (CB), atrasos nucleares (AT).

Segundo Gömürgen (2005), pontes cromossômicas podem ocorrer como consequência de alguma falha na separação dos cromossomos durante a anáfase. Essas pontes podem resultar em perda de material gênico quando quebram, uma vez que decorrem da falha do fuso mitótico durante o ciclo de divisão celular, e a uma consequente não separação como deveria, devido a um efeito aneugênico (UHL *et al.*, 2003).

Micronúcleos (MN) podem ser formados através de brotamento nuclear na intérfase, sendo que brotos nucleares acabam se formando quando esta separação é parcial ou incompleta, permanecendo assim presos ao núcleo original (FENECH *et al.*, 2011).

Broto nucleares podem ser formados durante a fase S por DNA amplificado localizado em sítios específicos na periferia do núcleo em células tumorais humanas. Pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares são indicadores promissores no monitoramento do dano genético (FENECH, 2000; SAMPAIO *et al.*, 2012).

“Os brotos podem representar DNA amplificado eliminado do núcleo por um processo ativo, durante a fase S do ciclo celular (COLUZZI *et al.*, 2014).”

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho, observamos que devemos aumentar cada vez mais nossa preocupação em relação ao meio ambiente, pois ele está agindo sempre direta ou indiretamente em organismos humanos. Resultados provenientes de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana, já que o alvo toxicológico é a célula, e apesar dos metabolismos de plantas e animais serem diferentes, há também similaridades. Em geral, perturbações no índice de divisão celular e no material genético podem ser deletérias para o organismo, podendo levar a consequências severas e, muitas vezes, irreversíveis à saúde tanto de um vegetal como de animal. Portanto, há necessidade de estudos adicionais mais aprofundados e buscando, talvez, uma relação com alguma espécie animal e não só trabalhando com espécies vegetais. De um todo o trabalho foi muito importante para a formação de um

futuro profissional da área, tendo assim que lidar de uma maneira prática tudo que foi desenvolvido durante a graduação e tendo que englobar de maneira satisfatória todo o conhecimento adquirido, podendo assim já ter um contato com o aguarda no futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AINA, R.; PALIN, L.; CITTERIO, S. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. **Chemosphere**, Oxford, Inglaterra, v. 65, n. 4, p. 666-673, 2006.
- ALZIEU, C. Environmental impact of TBT: the French experience. **Science of the Total Environment**, France, v. 258, n. 1-2, p. 99-102, aug. 2000..
- BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. 8 p. (Circular Técnica, 67).
- BELIËN, J. A. M. et al. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, Oxford, Inglaterra, v.16, n.10, p. 2395-2400, 1995.
- BELIËN, J. A. M. *et al.* Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, Oxford, Inglaterra, v.16, n.10, p. 2395-2400, 1995.
- CABRERA, G.L.; RODRÍGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of leachates from a landfill using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 426, n. 2, p. 207-210, May 1999.
- CABRERA, G.L.; RODRÍGUEZ, D.M.G.; MARURI, A.B. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.426, n. 2, p. 201-206, May 1999.
- CHANDRA, S. *et al.* Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium test*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, NL, v. 347, n. 1-3, p. 46-52, July 2005.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, EMBRAPA Arroz e Feijão: Árvore do Conhecimento. Brasília: EMBRAPA, 2011.

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, Calif., v. 88, n. 3, p. 252-259, July 2007.

FISKEJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to laboratory animals**, Nottingham, v. 21, n. 2, p. 139-149, Apr. 1993

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, v.5, n.6, p.497-526, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.200520098/pdf>> Acessado em: 11 out. 2014. doi:10.1002/elsc.200520098

GAVRONSKI, L. **Avaliação da mutagenicidade de amostras de água do Rio dos Sinos através do Teste *Allium cepa***. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Aplicada) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

GODWIN, A. H. The biological chemistry of lead. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, GB, v. 5, n. 2, p. 223-227, Apr. 2001.

GOOGLE. [Rio Capivari, Capivari do Sul, RS]. 2015. Disponível através de: <<https://maps.google.com.br/>>. Acessado em: 20 de novembro de 2015.

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

HARPER, S. Sorption-desorption and herbicide behavior in soil. *Weed Science*, v.6, p.207-225, 1994.

- HENNER, P. *et al.* Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) occurrence and remediation methods. **Analisis Magazine**, Paris, v. 25, n. 9 – 10, p. 56 – 59, Nov. 1997.
- HIGASHI, K. Metabolic activation of environmental chemicals by microsomal enzymes of higher plants. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.197, n. 2, p.273-288, Feb. 1988.
- INCARDONA, J. P.; COLLIER, T. K.; SCHOLZ, N. L. Defects in cardiac function hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, Calif., v. 196, n. 2, p. 191–205, Apr. 2004.
- 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, NL, v. 650, n.1, p.80–86, Jan. 2008.
- MACHADO, A. Avaliação do Potencial Mutagênico do Efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra, (Osório-RS-Brasil) através do Teste de Micronúcleo em *Allium cepa*.2012.44P. Monografia- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2012.
- MACHADO, S.L.O. *et al.* Consumo de água e perdas de nutrientes e de sedimentos na água de drenagem inicial de arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.65-71, 2006. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v36n1/a10v36n1.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782006000100010.
- MARCANO, L. *et al.* Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, San Diego, Calif., v. 94, n. 2, p. 221 – 226, Feb. 2004.
- MARCHEZAN, E. *et al.* Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.40, p.1053-1059, 2010. Disponível em:

<<http://www.scielo.br/pdf/cr/v40n5/a574cr2775.pdf>>. Acesso em: 23 out. 2014.
doi: 10.1590/S0103-84782010005000078.

MARQUES, M.S. e DE VICARI, M. **Transporte de agrotóxicos em lavoura de arroz irrigado sob três manejos de irrigação**, Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 30, n. 4, p. 799-808, 2012

MATSUMOTO, S.T. *et al.* 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**, São Paulo, v.29, n. 1, p.148-158, 2006.

MATSUURA, K. **Bioindicadores em Ecossistemas**. Unesco, 2000.

MONARCA, S. *et al.* The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, New York, US, v. 34, n.17, p. 4261-4269, Dec. 2000.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90- 103, Abr. 2011.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, US, v. 49, n. 1, p. 64–75, May 2001.

PLEWA, M.J. *et al.* Plant activation and its role in environmental mutagenesis and antimutagenesis. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v.350, n. 1, p.163-171, Feb. 1996.

precede morphological anomalies in fish exposed to polycyclic aromatic

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em merístemos: la formación de intercambios entre cromátidas hermanas**. 1987. 276 f. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

RANK, J. *et al.* Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v.136, n. 1, p. 13-18. 2002.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Lund, 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**, Amsterdam, NL, v.418, n. 2-3, p.113-119, Oct. 1998.

SARKAR, A. *et al.* Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 4, p. 333-340, May 2006.

SILVA, D. C. **Efeitos tóxicos e genéticos ocasionados por agrotóxicos**. 2005. 57 f. Monografia de pós-graduação em Gestão de Recursos Naturais (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC), Criciúma. 2005.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. D. C. **Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado**, Quim. Nova, Vol. 34, No. 5, 748-752, 2011

SILVA, F. C. *et al.* Avaliação de mutagenese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, Rondônia, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2011.

SMAKA-KINCL, V. *et al.* The evaluation of waste, surface and ground water quality using then *Allium* test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, NL, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, July 1996.

STICH, H. F.; ROSIN, M. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, New York, US, v. 31, n. 3, p. 305-308. 1983

STICH, H. F.; ROSIN, M. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, New York, US, v. 31, n. 3, p. 305-308. 1983.

STICH, H. F.; ROSIN, M.; VALLEJERA, M.O. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosa cells in Asian betel nut and tobacco chewers. **Lancet**, London, GB, n. 8388, p. 1204-1206, 1984.

TABAJARA, L. L.; DILLENBURG, S. Batimetria e sedimentos de fundo da Laguna de Tramandaí – RS. **Notas Técnicas**, Porto Alegre, n. 10, p. 21-33, 1997.

TIMBRELL, J.A. **Introduction to Toxicology**. 2nd ed. London, GB : Taylor & Francis Ltd. 1999.

UHL, M. *et al.* Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: a course manual**. Poland : Katowice, 2003. p.11-30.

VIDAKOVIC, Z; PAES, D; TOMIC, M. Toxicity of waste drilling fluids in modified *Allium* test. **Water, Air and Soil Pollution**, Berlin, v. 69, n. 3-4, p. 413-423, 1993.

VIDAKOVIĆ-CIFREK, Z. *et al.* Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry “high-density brines”. **Environmental Contamination and Toxicology**, New York, US, v.43, n. 3, p. 284-291, Oct. 2002.

VILLELA, V. I; LAU, A. Bioensaios para o Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: SILVA, J; EDRTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 158-159.