

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E
GENOTÓXICO DAS ÁGUAS DO RIO GUANDU

Elaborado por
JENNIFER VIEIRA GOMES

Orientadora
Prof^a Dr^a VIVIANE MOREIRA DE LIMA

SEROPÉDICA - 2013

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.2 Rio Guandu	1
1.3 Avaliação dos Efeitos citotóxicos e genotóxicos	3
1.4 Sistema Teste <i>Allium cepa</i>	4
2. OBJETIVO	5
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 Pontos de coleta	6
3.2 Coleta das amostras	6
3.3 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade	8
3.4 Análise do potencial de indução de morte celular	9
3.5 Análise estatística	10
4 RESULTADOS	10
4.1 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade	10
4.2 Teste de indução de morte celular	13
5 DISCUSSÃO	14
6 CONCLUSÃO	16
7 REFERÊNCIAS	17

Lista de Ilustrações

Figura 1. Ponto 12 – Rio Ipiranga no ponto que o mesmo faz confluência com a Lagoa do Guandu (-22°48'10.13'', -43°37'24.16'') 6

Figura 2. Ponto 15 – Lagoa do Guandu, após confluência com os rios dos Poços e Ipiranga (-22° 48'21.37'', -43°37'38.48'') 7

Figura 3. Ponto 127 – Ribeirão das Lages após a transposição com o Rio Paraíba do Sul (-22°38'28.10'', -43°42'47.09'') 7

Figura 4. Bulbos de *Allium cepa* expostos aos diferentes tratamentos 9

Figura 5. Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao EMS (m) e as amostras de água coletadas nos diferentes pontos (a-l); (a) C-metáfases (seta); (b-c) aderência cromossômica; (d-e) anormalidades no fuso (seta); (f-g) cromossomo fora do grupo; (h) ponte cromossômica; (i) células com micronúcleos; (j) célula em necrose; (l-m) alterações nucleolares 11

Figura 6. Células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas aos diferentes tratamentos: (a) controle negativo; (b) células fixadas (controle positivo); (c) células expostas à água do ponto 15 coletada no período da seca 13

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alterações em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante período de estiagem 12

Tabela 2. Índice mitótico em raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante o período de estiagem 12

Tabela 3. Alterações em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante estação chuvosa 12

Tabela 4. Índice mitótico em raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante estação chuvosa 13

RESUMO

O Rio Guandu é a principal fonte de água para abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro, entretanto, apesar de sua importância, o rio Guandu atravessa graves problemas ambientais devido a crescente poluição do rio Paraíba do Sul, ao crescimento desordenado, tanto populacional quanto industrial, nos municípios pertencentes à bacia hidrográfica do Guandu, ao lançamento de efluentes sanitários e industriais, ao depósito clandestino de resíduos sólidos e a extração ilegal de areia entre outros aspectos. Esta poluição ainda é potencializada pelo encontro do rio Guandu com os rios Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga, cujas águas são bastante poluídas. Este trabalho teve por objetivo analisar as águas do Rio Guandu quanto à presença de substâncias químicas com potencial citotóxico e genotóxico, utilizando para isto o sistema teste de *Allium cepa*. Foram escolhidos pontos de coleta nos quais ocorrem as maiores confluências de fontes poluidoras, sendo estes: Ponto 127– Ribeirão das Lages após a transposição com o Rio Paraíba do Sul; Ponto 12 – Rio Ipiranga no ponto que o mesmo faz confluência com a Lagoa do Guandu e Ponto 15 – Lagoa do Guandu, após confluência com os rios dos Poços e Ipiranga. As coletas foram realizadas em duas épocas distintas: na estação chuvosa (Janeiro e Fevereiro) e na estação de estiagem (Junho e Julho). As análises realizadas em 5000 células por tratamento demonstraram que todos os pontos estudados apresentaram algum nível de citotoxicidade e ou genotoxicidade. Os pontos 12 e 15 foram os que mais se destacaram com relação à presença de alterações e pode-se observar a presença de micronúcleos, perdas de fragmentos cromossômicos, formação de pontes, aderência cromossômica, anormalidades no fuso mitótico, células em necrose e alterações nucleolares. Foram observadas variações no número de alterações citotóxicas e genotóxicas entre os períodos de estiagem e seca, indicando que o potencial citotóxico e ou genotóxico dos poluentes na água varia em função do tempo, dependendo das descargas vindas dos efluentes e do aumento na emissão de efluentes contaminados. Estes resultados ressaltam a importância de estudos de biomonitoramento que auxiliem as ações de manejo e regulamentação das descargas de substâncias potencialmente perigosas no ambiente.

INTRODUÇÃO

O progresso industrial, aliado ao desenvolvimento tecnológico e ao crescimento populacional, alterou drasticamente as condições naturais e do meio ambiente, de forma que a população humana dos países em desenvolvimento tem sofrido os efeitos da poluição gerada pelo aumento da urbanização e industrialização. Resíduos industriais, urbanos e agrícolas são lançados indiscriminadamente nos cursos d'água acrescentando vários contaminantes às águas superficiais e sedimentos (Barbério, A. et al., 2009; Oliveira, L. M. et al., 2011).

No Brasil, a qualidade da água é regulamentada desde 2005 pelo CONAMA (Conselho Nacional de Meio ambiente) que classifica às águas e determina seus parâmetros físicos e químicos. Segundo o CONAMA, a poluição aquática se constitui em qualquer modificação das propriedades físicas, químicas ou biológicas da água, que possa afetar direta ou indiretamente a saúde, a segurança e o bem estar das populações. Inclui-se ainda neste conceito, qualquer interferência que ponha em risco a utilização das águas para atividades agrícolas, industriais, comerciais e até com fins recreativos e que venha a comprometer, principalmente a sobrevivência da fauna aquática local.

Os resíduos industriais, urbanos e agrícolas, são caracterizados como misturas complexas contendo numerosos compostos orgânicos e inorgânicos que muitas vezes não sofrem degradação durante o processo de tratamento da água devido a um alto grau de persistência (Barbério, A. et al., 2009). Além dos efeitos diretos à saúde, o perigo dos poluentes está no fato de poderem ter efeitos citotóxicos e genotóxicos e, ao longo do tempo, causar várias doenças como: câncer, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, e envelhecimento precoce (Grover e Kaur, 1999).

RIO GUANDU

O Rio Guandu é a principal fonte de água para abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro. A bacia hidrográfica do rio Guandu possui 1.395 Km² e o rio Guandu 48 Km de extensão. Ele é formado pelo encontro dos rios Santana e Ribeirão das Lages, e deságua na Baía de Sepetiba, sendo o trecho final do rio, com 15 Km de extensão, denominado Canal de São Francisco. O rio Guandu apresenta como afluentes pela margem esquerda, os rios São Pedro e Poços, entretanto, grande parte do volume de água do rio Guandu é oriunda do rio Paraíba do Sul, através de uma

transposição que ocorre no reservatório de Santa Cecília, estação da LIGHT no município de Barra do Pirai (Salamene, 2007).

Apesar de sua importância, o rio Guandu atravessa graves problemas ambientais devido a crescente poluição do rio Paraíba do Sul, ao crescimento desordenado, tanto populacional quanto industrial, nos municípios pertencentes à bacia hidrográfica do Guandu, ao lançamento de efluentes sanitários e industriais, ao depósito clandestino de resíduos sólidos e a extração ilegal de areia entre outros aspectos. Esta poluição ainda é potencializada pelo encontro do rio Guandu com os rios Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga, cujas águas são bastante poluídas. Este encontro ocorre na Lagoa do Guandu, formada pelas barragens da CEDAE, que é conectada ao rio Guandu e que devido a sua configuração possui baixa taxa de renovação hídrica (Serber, 2005; Salamene 2007).

O rio Queimados atravessa a área urbana e o Pólo Industrial do Município de Queimados, desembocando no rio dos Poços. A qualidade de suas águas é comprometida desde sua nascente, uma vez que recebe todo o esgoto sanitário da área urbana, sem qualquer tipo de tratamento, além de receber os efluentes gerados pelas atividades industriais (Serber, 2005; Salamene, 2007).

O rio dos Poços, afluente da margem esquerda do rio Guandu, tem como tributários rios que drenam a área urbana de Queimados, e que também apresentam água de péssima qualidade (Salamene, 2007).

O rio Ipiranga tem como principal afluente o rio Cabuçu, recebendo parcela significativa dos despejos provenientes das áreas urbanas de Nova Iguaçu e Queimados (Salamene, 2007).

O rio Paraíba do Sul, principal contribuinte do rio Guandu em volume de água, forma-se no estado paulista pela união dos rios Paraibuna e Paraitinga e cruza todo o território do Rio de Janeiro, apresentando em toda a sua extensão, calculada a partir de sua nascente, mais de 1.100 km. Durante o seu percurso, o rio Paraíba do Sul recebe efluentes domésticos e industriais não tratados junto com resíduos de origem agrícolas (Oliveira et al., 2011).

O rio Guandu, além de efluentes domésticos e industriais, recebe também efluentes de atividades agrícolas. A oleicultura e a fruticultura são as principais atividades agrícolas da região, predominando basicamente a cultura de banana e coco. A utilização de defensivos agrícolas e carrapaticidas é intensa, podendo trazer graves

consequências, visto que muitos destes compostos são resistentes e acumulativos na cadeia biológica (Salamene, 2007)

Todos esses fatores comprometem a qualidade da água a ser tratada na Estação de Tratamento de Água do Guandu podendo afetar diretamente a qualidade de vida da população, por vários motivos. Inicialmente porque os resíduos industriais, urbanos e agrícolas contêm compostos orgânicos e inorgânicos que muitas vezes não são degradados durante o processo de tratamento de água, alguns dos quais são genotóxicos (Nielsen e Rank, 1994; Oliveira et al., 2011), e em segundo lugar, porque a crescente redução da qualidade da água pode num futuro próximo, inviabilizar a sua tratabilidade (Serber, 2005).

Vale ressaltar ainda, que a concentração de poluentes pode impedir o desenvolvimento de muitos organismos, comprometendo assim a cadeia alimentar, além do fato de que alguns dos componentes podem vir a se acumular nos níveis mais altos da cadeia trófica e desta forma atingir o homem causando muitas vezes sua intoxicação e, dependendo do caso, processos que desencadeiem algum tipo de câncer (Silva, 2008). Baseado nestes fatos é importante que se faça o monitoramento das águas de rios tais como o Guandu, que são importantes no abastecimento de água para a população, e que sabidamente recebem efluentes industriais e domésticos não tratados, dentre outras atividades, pois desta forma serão obtidos dados com bases científicas para regulamentação das descargas de substâncias potencialmente perigosas, lançadas no ambiente (Nielsen e Rank, 1994).

AValiação DOS EFEITOS CITOTÓxicOS E GENOTÓxicOS

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos dos poluentes são causados por interações destes com a célula e mais diretamente com o DNA, causando fragmentação do DNA, indução de aberrações cromossômicas, inibição ou indução da divisão celular. Estas alterações podem ser citologicamente detectadas e um grande número de sistemas teste *in vitro* e *in vivo* tem sido desenvolvidos com este objetivo. Como exemplos, podem-se citar os sistemas teste realizados em bactérias (teste de Ames), os testes realizados em células de roedores, como o teste do micronúcleo em células da medula óssea, e os testes realizados em células vegetais, como o sistema teste de *Allium cepa* (Grant, 1999; Grover and Kaur, 1999; Marques (Org) 2003). Vale ressaltar também, que a toxicidade genética, apesar de não ser uma medida de carcinogenicidade, é frequentemente usada como um indicador para o câncer, haja vista, que os testes que avaliam a

mutagenicidade, medem um evento inicial ou intermediário na tumorigênese, havendo uma alta correlação entre respostas positivas nos testes de genotoxicidade e carcinogenicidade.

Um dos maiores problemas no uso de sistemas teste que utilizam bactérias como organismo indicador de genotoxicidade, advém do fato de que muitos agentes químicos não são tóxicos ou mutagênicos por si só, necessitando serem metabolizados para que assumam uma forma mutagênica. As bactérias, entretanto, não apresentam os sistemas metabolizantes encontrados em vertebrados, especificamente a família de enzimas do citocromo P450, que se encontram associadas ao retículo endoplasmático das células eucariotas (Marques (Org), 2003).

Os sistemas teste que se utilizam de células animais, são em sua maioria dispendiosos, o que inibe a sua utilização pelas agências de monitoramento de forma rotineira. Por outro lado, os sistemas teste que se utilizam de células vegetais são consideravelmente mais baratos, de forma que sua utilização para o monitoramento e detecção de agentes genotóxicos no ambiente tem sido recomendada desde a década de 70 (Grover and Kaur, 1999). Além de apresentarem as enzimas necessárias para a metabolização dos agentes químicos, os sistemas testes em vegetais, como o que utiliza *Allium cepa*, foram validados por vários autores que realizaram de forma conjunta testes com células animais e vegetais com resultados similares (Fiskejo, 1985; Teixeira et al., 2003; Stange et al., 2008).

SISTEMA TESTE *ALLIUM CEPA*

O sistema vegetal mais utilizado como bioindicador em estudos de avaliação do potencial genotóxico ambiental, é o sistema teste de *Allium cepa* L. A *Allium cepa* se constitui num sistema conveniente para a análise de parâmetros anatômicos (crescimento da raiz, deformidade, torção) e microscópicos (anormalidades cromossômicas, alteração do índice mitótico e formação de micronúcleos) (Barbério et al., 2009), sendo validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS,OMS) e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um teste eficiente para análise e monitoramento *in situ* da citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias ambientais (Bagatini et al., 2007), de forma que o método vem sendo utilizado por vários autores no monitoramento ambiental (Rank e Nielsen, 1993; Nielsen e Rank, 1994; Grover e Kaur, 1999; Leme e Marin-Morales, 2008; Hoshina e

Marin-Morales, 2009; Barbério et al., 2009; Barbosa et al., 2010; Radic et al., 2010; Oliveira et al., 2011).

A boa aceitação deste método para estudos de efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade se deve ao fato das raízes de *Allium cepa* ficarem em contato direto com a substância a ser testada, o que permite a avaliação de diferentes concentrações da mesma, ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão e a sua resposta a inúmeros mutágenos conhecidos, dentre outros (Christofoletti, 2008). A citotoxicidade/genotoxicidade da substância é avaliada pela observação de alterações cromossômicas e de divisão celular (alterações no índice mitótico) nas células meristemáticas da raiz de cebola. Resultados positivos no teste de *Allium cepa* devem ser considerados como uma indicação de que a amostra testada pode ser um perigo biológico também para outros organismos, indicando a presença de certas substâncias citotóxicas ou genotóxicas no ambiente (Fiskejo, 1985).

A alta sensibilidade do teste de *Allium cepa*, não permite que contaminações passem despercebidas, mesmo quando o teste é realizado em misturas complexas, como é o caso da água de esgotos (Nielsen e Rank, 1994; Egito et al., 2007).

Desta forma, devido ao baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes utilizados para avaliação da citotoxicidade/genotoxicidade, este método se apresenta como um bioindicador ideal, sendo uma ferramenta valiosa que pode ser utilizada como padrão em monitoramentos ambientais, de forma que se possa traçar a localização da fonte de contaminação, identificando-se influências de baixas concentrações de substâncias citotóxicas e genotóxicas em águas naturais (rios e lagos), que sofrem com o lançamento de efluentes domésticos e industriais e que, posteriormente, têm suas águas utilizadas na agricultura e no abastecimento público (Oliveira et al., 2011).

OBJETIVO

Analisar as águas do Rio Guandu quanto à presença de substâncias químicas com potencial citotóxico e genotóxico que possam comprometer a qualidade da água e consequentemente afetar a qualidade de vida da população indiretamente, através da contaminação dos organismos aquáticos dos níveis mais altos da cadeia trófica ou, diretamente, através de processos que possam gerar algum tipo de câncer.

MATERIAL E MÉTODOS

PONTOS DE COLETA:

Os pontos de coleta escolhidos foram aqueles nos quais ocorrem as maiores confluências de fontes poluidoras, sendo estes: Ponto 127 – Ribeirão das Lages após a transposição com o Rio Paraíba do Sul ($-22^{\circ}38'28.10''$, $-43^{\circ}42'47.09''$); Ponto 12 – Rio Ipiranga no ponto que o mesmo faz confluência com a Lagoa do Guandu ($-22^{\circ}48'10.13''$, $-43^{\circ}37'24.16''$) e Ponto 15 – Lagoa do Guandu, após confluência com os rios dos Poços e Ipiranga ($-22^{\circ}48'21.37''$, $-43^{\circ}37'38.48''$) (figuras 1, 2 e 3).

As coletas foram realizadas em duas épocas distintas: na estação chuvosa (Janeiro e Fevereiro) e na estação de estiagem (Junho e Julho).

COLETA DAS AMOSTRAS:

As amostras de cada ponto foram coletadas, com auxílio de um balde de 10 litros de capacidade, e foram armazenadas em frascos de polietileno (1L), devidamente identificados e mantidos em caixas de isopor, com gelo, para transporte até o laboratório, onde foram refrigeradas a 4°C para as análises de citotoxicidade e genotoxicidade.

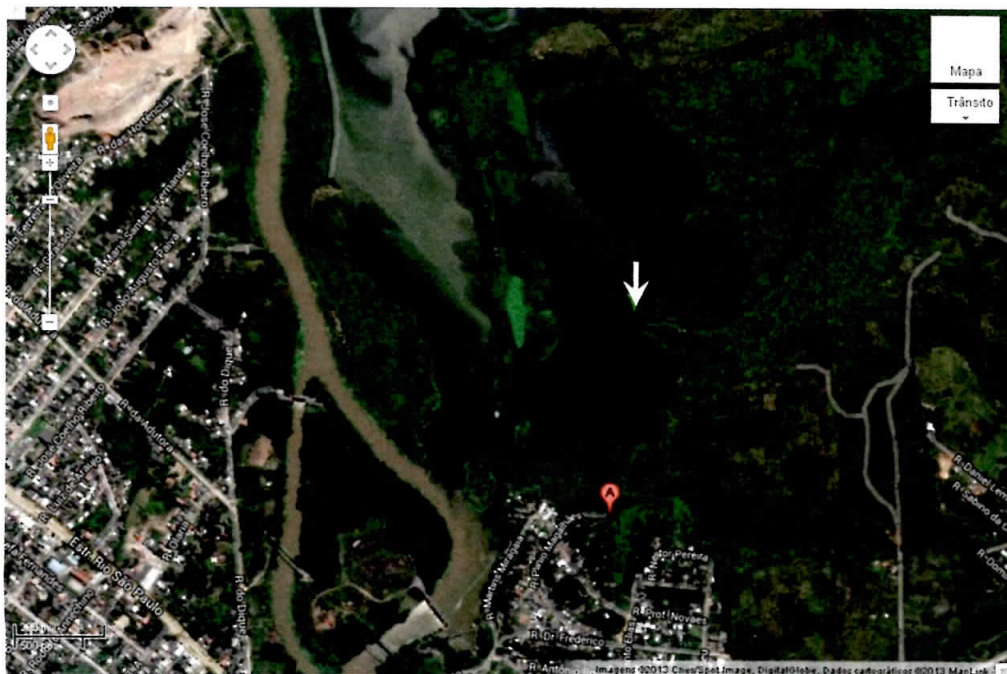


Figura 1: Ponto 12 – Rio Ipiranga no ponto que o mesmo faz confluência com a Lagoa do Guandu ($-22^{\circ}48'10.13''$, $-43^{\circ}37'24.16''$).

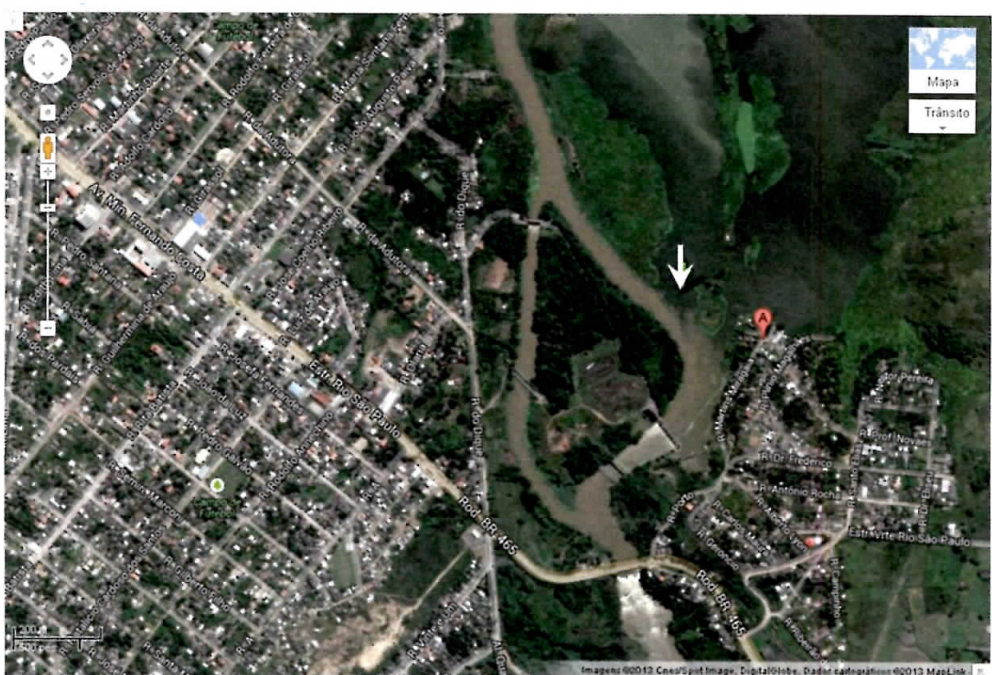


Figura 2: Ponto 15 – Lagoa do Guandu, após confluência com os rios dos Poços e Ipiranga (-22° 48'21.37'', -43°37'38.48'').



Figura 3: Ponto 127 – Ribeirão das Lages após a transposição com o Rio Paraíba do Sul (-22°38'28.10'', -43°42'47.09'').

TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE:

Para realização dos testes foram utilizados bulbos de cebola com aproximadamente 2,0 cm de diâmetro. O catafilo externo de cada bulbo foi retirado com o auxílio de um estilete, sem danificar as gemas radiculares. Para cada ponto amostral, assim como para os controles positivo e negativo, foram utilizados cinco bulbos de cebola. Inicialmente, os bulbos foram colocados em um recipiente contendo água destilada por 48 horas, com troca diária da água. Em seguida, os bulbos foram transferidos para as soluções testes, onde permaneceram por 48 horas (figura 4). Os bulbos utilizados como controle negativo permaneceram em água destilada e os que foram utilizados como controle positivo foram colocados em uma solução contendo etil metano sulfonato (EMS, 25 mM). Os bulbos controles e testes foram incubados a uma temperatura de 25°C. Para cada tratamento, os meristemas apicais de raízes apresentado entre 2 e 2,5 cm foram removidos dos bulbos após 48 horas de exposição à solução. Após a remoção, os meristemas foram fixados em solução de etanol: ácido acético glacial na proporção de 3:1 (V/V), sendo armazenadas à 4°C, onde permaneceram até o momento da preparação das lâminas. Cinco lâminas foram preparadas para cada bulbo, usando para isto cinco meristemas. Para confecção das lâminas os meristemas foram lavados em água destilada duas vezes de 5 minutos, hidrolisados em HCl 5N por 30 minutos, lavados em água destilada duas vezes de 5 minutos e coradas comorceína acética 2%. As regiões meristemáticas foram então fragmentadas com o auxílio de uma lâmina de bisturi, e a lamínula foi colocada e pressionada sobre o material. As lâminas foram observadas em microscópio óptico comum, com objetiva de 100X. A presença de alterações celulares e cromossômicas foi analisada em 1000 células por bulbo, perfazendo um total de 5000 células por tratamento.

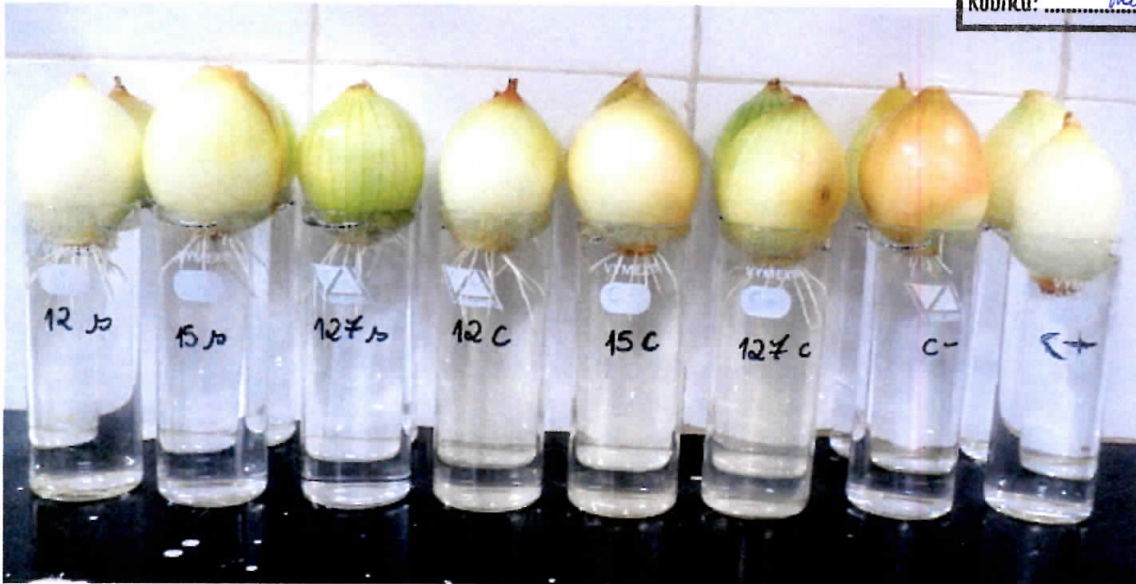


Figura 4: Bulbos de *Allium cepa* expostos aos diferentes tratamentos.

ANÁLISE DO POTENCIAL DE INDUÇÃO DE MORTE CELULAR:

Raízes de cebolas submetidas aos diferentes tratamentos, conforme descrito acima foram analisadas quanto a possibilidade de indução de morte celular através de uma técnica de coloração com os corantes Hoescht 33342 e iodeto de propídio. Para tal foram realizados cortes longitudinais na região meristemática das raízes. A coloração foi feita, em lâmina, expondo o material a uma gota do corante vital Hoescht 33342 (10 ug/mL). Após dez minutos, o material foi transferido para outra lâmina e então submetido a uma gota de iodeto de propídio (30 ug/mL). Ambas as incubações foram feitas protegidas da luz. Como controle positivo foram utilizadas raízes submetidas ao tratamento com o fixador (solução etanol: ácido acético glacial na proporção de 3:1), uma vez que a fixação promove a morte celular. Na sequência, o material foi analisado e fotografado em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Lab. A1), sob os filtros de excitação de 365 nm e de barreira de 400 nm. Segundo Locke et al., (1990), o Hoescht 33342 cora o DNA das células que tem suas membranas íntegras, enquanto que o iodeto de propídio cora apenas o DNA de células cuja integridade da membrana já está comprometida. Desta forma, as células com núcleos fluorescentes azuis foram consideradas vivas e com integridade de membranas, enquanto as células com núcleos fluorescentes vermelhos foram consideradas em processo de morte celular, portanto, sem integridade de membrana. A avaliação neste caso foi feita de modo visual.

ANÁLISE ESTATÍSTICA:

A análise estatística dos dados obtidos através do sistema teste Allium cepa para a avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade das águas dos pontos amostrados foram realizadas através do teste χ^2 , usando a correção de Yates, com o auxílio do programa Bioestat 5.0.

RESULTADOS

TESTES DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE:

Nas análises realizadas foi observada a presença das seguintes alterações: presença de micronúcleo e perdas de fragmentos cromossômicos, formação de pontes, aderência cromossômica e anormalidades no fuso mitótico, incluindo neste grupo células com metáfase C, metáfase poliploide, metáfase desigual, anáfase multipolar, anáfase com atraso, cromossomo fora do grupo cromatínico e células binucleadas. Além disso, foram observadas também células em necrose e alterações nucleolares, com a presença de células com nucléolos muito volumosos, sendo esta, uma das alterações características do controle positivo (figura 5).

No período de estiagem (junho e julho), a amostra que apresentou um maior número de alterações significativas em relação ao controle negativo, foi o Ponto 15 (tabela 1), no qual houve um maior número de células com micronúcleo e de células em necrose. O Ponto 12 apresentou um número significativo de células com alterações nucleolares, quando comparado ao controle negativo. O ponto 127 não apresentou alterações significativas (tabela 1). Não houve alterações significativas com relação ao índice mitótico, para os pontos 12 e 15, entretanto o ponto 127 apresentou um índice mitótico significativamente maior do que o controle negativo (tabela 2).

No período chuvoso (janeiro e fevereiro), o ponto que se destacou com relação às alterações significativas foi o ponto 12, que apresentou um maior número de células com anormalidades no fuso e aderência cromossômica em relação ao controle negativo. O ponto 15 não apresentou alterações significativas e o ponto 127 apresentou um maior número de alterações nucleolares (tabela 3). Com relação ao índice mitótico, os pontos 12 e 127 apresentaram um índice mitótico significativamente maior do que o controle negativo (tabela 4).

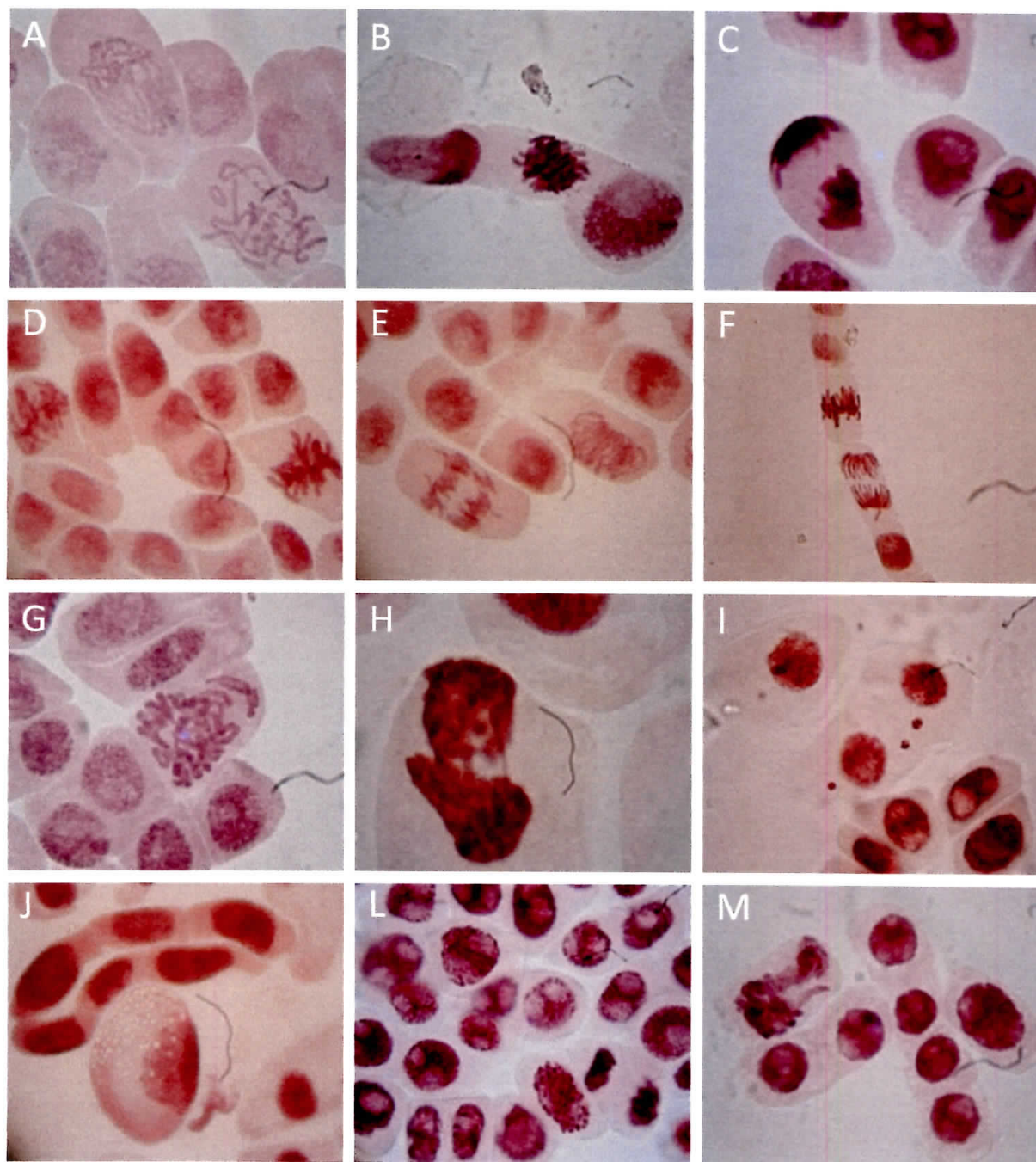


Figura 5: Células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao EMS (m) e as amostras de água coletadas nos diferentes pontos (a-l); (a) C-metáfases (seta); (b-c) aderência cromossômica; (d-e) anormalidades no fuso (seta); (f-g) cromossomo fora do grupo; (h) ponte cromossômica; (i) células com micronúcleos; (j) célula em necrose; (l-m) alterações nucleolares.

Tabela 1: Alterações em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante período de estiação

Tratamento	Concentração	VNG	VNGB	NEC	EXM	Total de células
Controle negativo	Água destilada	163 ^(b)	1 ^(b)	13	7	5000
EMS	25 mM	1224 ^(a)	169 ^(a)	58 ^(a)	7	5000
12		272 ^(a)	2	19	8	5000
15		183	9 ^(a)	30 ^(a)	20 ^{(b)(a)}	5000
127		95 ^{(a)(b)}	0 ^(b)	12	2	5000

a) Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,05$) de acordo com o teste do χ^2 ; (b) Diferença significativa em relação ao controle positivo ($P < 0,05$) de acordo com o teste do χ^2 ; VNG – um ou mais nucléolos grandes; VNGB – um ou mais nucléolos grandes e broto nuclear; NEC – células em necrose; EXM – excesso de micronúcleos.

Tabela 2: Índice mitótico em raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante o período de estiação

Tratamento	Concentração	Total de células	Células em divisão	Índice mitótico (%)
Controle negativo	Água destilada	5000	336	6.7
EMS	25 mM	5000	225	4.5
12		5000	383	7.7
15		5000	293	5.9
127		5000	518 ^(a)	10.4

(a) Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,05$), de acordo com o teste do χ^2 .

Tabela 3: Alterações em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante estação chuvosa

Tratamento	Concentração	VNG	VNGB	ANF	ADR	Total de células
Controle negativo	Água destilada	229 ^(b)	4 ^(b)	8	2	5000
EMS	25 mM	572 ^(a)	27 ^(a)	13	8	5000
12		198	13	29 ^(a)	13 ^(a)	5000
15		183	3	11	6	5000
127		300 ^(a)	9	14	8	5000

a) Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,05$) de acordo com o teste do χ^2 ; (b) Diferença significativa em relação ao controle positivo ($P < 0,05$) de acordo com o teste do χ^2 ; VNG – um ou mais nucléolos grandes; VNGB – um ou mais nucléolos grandes e broto nuclear; ANF – anormalidades no fuso; ADR – aderência cromossômica.

Tabela 4: Índice mitótico em raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos durante estação chuvosa

Tratamento	Concentração	Total de células	Células em divisão	Índice mitótico (%)
Controle negativo	Água destilada	5000	114	2.3
EMS	25 mM	5000	172	3.4
12		5000	217 ^(a)	4.3
15		5000	140	2.8
127		5000	275 ^(a)	5.5

(a) Diferença significativa em relação ao controle negativo ($P < 0,05$), de acordo com o teste do χ^2 .

TESTE DE INDUÇÃO DE MORTE CELULAR:

Tendo em vista que a água coletada do ponto 15 durante o período da seca apresentou um número significativo de células em necrose quando comparado ao controle negativo, a avaliação da indução do processo de morte celular foi realizada através da utilização dos corantes Hoescht 33342 e iodeto de propídio. Pode-se observar que o ponto 15 apresentou uma maior extensão de células em processo de morte celular quando comparado ao controle negativo (figura 6).



Figura 6: Células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas aos diferentes tratamentos: (a) controle negativo; (b) células fixadas (controle positivo); (c) células expostas à água do ponto 15 coletada no período da seca.

DISCUSSÃO

O principal uso das águas do Guandu é o tratamento para consumo de água potável. A água tratada na ETA (estação de tratamento de água) do Guandu atende a 80% da população da Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Entretanto, para que este tratamento seja eficiente, é necessário que a chamada água bruta não atinja determinados níveis de poluição. Os resultados obtidos neste trabalho através da análise de células meristemáticas de *Allium cepa* submetidas ao tratamento com as amostras de água coletadas, demonstram que todos os pontos estudados apresentam algum nível de citotoxicidade e ou genotoxicidade. Durante a estação de estiagem, o ponto 15 referente à Lagoa do Guandu, na mistura formada após a confluência com os rios dos Poços e Ipiranga, apresentou um maior número de células em necrose e de células com micronúcleos, o que é indicativo da presença de substâncias citotóxicas e ou genotóxicas. A presença de substâncias que induzem o processo de morte celular foi confirmada através da utilização dos corantes Hoescht 33342 e iodeto de propídio. Os dois corantes associados promovem uma coloração específica, claramente observada pelas cores vermelho (para células mortas) e verde/azul (para células vivas) (Collins e Donoghue, 1999). A necrose não é determinada por fatores intrínsecos da própria célula, mas por perturbações do meio ambiente, desta forma é um indicativo da presença de toxinas ou componentes químicos tóxicos que promovem a lise celular (Hoshina, 2009).

Os micronúcleos são formados em células em divisão que apresentam fragmentos de cromossomos acêntricos e/ou cromossomos inteiros que perderam a capacidade de se ligar ao fuso mitótico, desta forma o aparecimento dos mesmos indica a presença de substâncias tanto com efeitos clastogênicos quanto aneugênicos (Fenech, 2000). No período chuvoso, a amostra de água coletada no ponto 15, não apresentou alterações significativas quando comparada ao controle negativo. Provavelmente esse resultado foi influenciado pelo alto índice de chuvas no período e pela região da coleta, tendo em vista que o ponto 15 (Lagoa do Guandu) é formado pela confluência do Rio Guandu com os rios dos Poços/Queimados e Ipiranga, e dessa forma dependendo do local da coleta pode haver uma influência maior das águas do Guandu, no qual os indicadores de poluição são menores do que nos afluentes da Lagoa (Coelho et al., 2012).

O ponto 12, ponto no qual o Rio Ipiranga faz confluência com a Lagoa do Guandu, apresentou um índice significativo de alterações nucleolares durante o período

de estiagem. Alterações nucleolares são características nas células tratadas com o controle positivo EMS utilizado neste trabalho. EMS é um agente mutagênico de alta eficiência, que atua diretamente sobre a molécula do DNA através da sua atividade alquilante. Alterações deste tipo são um dos critérios mais comuns utilizados como indicativo de malignidade, através dos quais se diferenciam células normais e malignas, com o núcleo de células malignas apresentando um número variável de nucléolos com diferentes tamanhos e formas (Oshima e Forones, 2001; Filippin et al., 2006; Montanaro et al., 2008). No período chuvoso, o ponto 12 apresentou um maior número de alterações, com diferenças significativas no número de células com anormalidades no fuso mitótico e com aderência cromossômica.

A aderência cromossômica se caracteriza por uma aglomeração cromatínica, envolvendo poucos cromossomos ou todo o genoma, podendo ter como consequência a degeneração da cromatina e morte celular. Desta forma, a detecção destas anomalias indica a presença de substâncias tóxicas na água deste ponto.

O ponto 127, Ribeirão das Lajes após transposição com o Rio Paraíba do Sul, apresentou alteração apenas na estação chuvosa, onde observamos um número significativo de células com alterações nucleolares em relação ao controle negativo.

A análise do índice mitótico das células meristemáticas de cebola submetidas às diferentes amostras de água nos períodos de estiagem e chuvoso, também foi utilizada para avaliação da citotoxicidade. Neste trabalho, podemos observar que o ponto 127 apresentou um índice mitótico significativamente maior do que o observado no controle negativo, nos dois períodos analisados. Enquanto que o ponto 12 apresentou um índice mitótico significativamente maior do que o observado no controle negativo, apenas durante o período chuvoso.

O aumento ou a diminuição do índice mitótico pode ser um importante indicador no monitoramento dos níveis de poluição em ambientes afetados, especialmente aqueles contaminados com compostos potencialmente tóxicos e citotóxicos (Maschio, 2009).

Índices mitóticos maiores que os encontrados no controle negativo, como os observados neste trabalho, são provenientes da indução do aumento da divisão celular, o que pode caracterizar um evento prejudicial para as células, produzindo uma proliferação descontrolada e, eventualmente, levando a uma posterior formação de tumor, enquanto índices mitóticos menores que o controle negativo podem indicar que o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos foram afetados por componentes presentes nas amostras testadas (Maschio, 2009).

Variações no número de alterações citotóxicas e genotóxicas entre períodos de estiagem e seca, tais como as observadas em nosso trabalho, também já foram descritas por outros autores com amostras de água de rios de outras localidades do Brasil (Maschio, 2009; Da Silva et al., 2009; Oliveira et al., 2011). O potencial citotóxico e ou genotóxico dos poluentes na água varia em função do tempo, dependendo das descargas vindas dos efluentes e do aumento na emissão de efluentes contaminados (Oliveira et al., 2011). Além disso, a alta pluviosidade no período de verão pode promover um aumento significativo na matéria orgânica e em compostos tóxicos despejados nos rios, causando uma maior citotoxicidade e genotoxicidade nesse período (Da Silva et al., 2009).

Vale ressaltar que o rio Guandu é formado pelo Ribeirão das Lages, que passa a se chamar Guandu a partir da confluência com o rio Santana, e apresenta como afluentes principais os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga, todos impactados negativamente em função do lançamento de efluentes *in natura*. Toda bacia dos rios dos Poços/Queimados e Ipiranga apresenta um sistema de esgotamento sanitário irregular além de serem impactados por efluentes industriais (Coelho et al., 2012). Além disso, a vazão do rio Guandu é extremamente ampliada após a transposição com o rio Paraíba do Sul, o qual também recebe afluentes industriais e sanitários.

CONCLUSÃO

Neste trabalho, podemos detectar a existência de potencial citotóxico e genotóxico nas águas dos pontos analisados. As alterações citotóxicas e genotóxicas encontradas, refletem o estado de contaminação dos afluentes do rio Guandu e ressaltam a importância de que se façam estudos de biomonitoramento que auxiliem as redes de monitoramento e as ações de manejo e regulamentação das descargas de substâncias potencialmente perigosas no ambiente, tendo em vista que alguns destes compostos podem não ser degradados durante o processo de tratamento e desta forma, mesmo a água pós-tratada pode não oferecer a efetiva segurança para a população consumidora.

REFERÊNCIAS

- BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17(3), p 444-447, 2007.
- BARBÉRIO, A.; BARROS, L.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the River Paraíba do Sul, in Brazil, with the *Allium cepa* L. test. *Braz. J. Biol.*, vol. 69 (3), p 837-842, 2009.
- BARBOSA, J. S.; CABRAL, T. M.; FERREIRA, D. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; DE MEDEIROS, S. R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, vol. 73 (3), p 320-325, 2010.
- COELHO, F. M.; DE AZEVEDO, J. P. S.; JÚNIOR, I. V. Análise multicritério de propostas para a melhoria da qualidade da água captada para abastecimento da Região Metropolitana oeste do Rio de Janeiro. *Bacia Hidrográfica dos Rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim: Experiências para a gestão dos recursos hídricos*. Rio de Janeiro, INEA, p 61-77, 2012.
- COLLINS, A. M.; DONOGHUE, A. M. Viability assessment of honey bee *Apis mellifera*, sperm using dual fluorescent staining. *Theriogenology*, vol. 51, p 1513-1523, 1999.
- CHRISTOFOLETTI, C. A. Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 118f. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual Paulista – “Julio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências – Rio Claro, 2008.
- DA SILVA, G. H.; MESSIAS, T. G.; MONTEIRO, R. T. R. Genotoxicidade e mutagenicidade, para *Allium cepa*, de águas de rios e nascentes antes e após tratamento para abastecimento público. 17º Simpósio Internacional de Iniciação Científica, USP. 2009. Disponível em: <https://uspdigital.usp.br/cdOnlineTrabalhoVisualisarResumo>. Acesso em: setembro de 2013.
- EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 30 (2), p 435-441, 2007.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*, Amsterdam, vol.455, p.81-95, 2000.
- FILIPPIN, C.; CHISTOFOLETTI, L. D.; RIBEIRO, M. C. M.; VITURI, C. L. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. *RBAC 38(3)*: 133-139, 2006.
- FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, vol. 102, p 99-112, 1985.

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

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*, vol. 426, p 183-188, 1999.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 72(8), p 2090-2095, 2009.

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*, vol. 650 (1), p 80-86, 2008.

LOCKE, S.J.; PENG, Y.S.; CROOS, N.L. A supravital staining technique for honeybee spermatozoa. *Physiological-Entomology*, v. 146, p. 187-192, 1990.

MARQUES, E. K. (Org). Diagnóstico genético-molecular. 1ª ed. – Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

MASCHIO, L. R. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do rio Preto na Área de influência da Região de São José do Rio Preto/SP. 208f. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Genética– Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista – São José do Rio Preto, 2009.

MONTANARO, L.; TRERÉ, D.; DERENZINI, M. Nucleolus, ribosomes, and câncer. *The American Journal of Patology* 173 (2): 301-310, 2008.

NIELSEN, M. H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in waste water by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 121, p 249-254, 1994.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes da água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. *Revista Ambiente & Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, vol. 6 (1), p 90-103, 2011.

OSHIMA, C. T .F, FORONES, N. M. AgNOR em câncer gástrico. *Arq Gastroenterol* 38(2): 89-93, 2001.

RADIC, S.; STIPANICEV, D.; VUJCIC, V.; RAJCIC, M. M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Sci Total Environ.*, vol. 408 (5), p 1228-1233, 2010.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, vol. 118, p 49-53, 1993.

SALAMENE, S. Estratificação e caracterização ambiental da área de preservação permanente do Rio Guandu, Rj. 84f. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SERBER, J. B. Diagnóstico ambiental das atividades do pólo industrial de queimados como subsídio ao termo de ajustamento de conduta na gestão sustentável da bacia hidrográfica do Rio Guandu, Rj. 111f. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

SILVA, P. S. Avaliação da toxicidade e genotoxicidade das águas do Rio Criciúma (SC) utilizando como organismos bioindicadores *Artemia sp.*, *Daphnia magna* e *Allium cepa* L. 92f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas), Curso de Ciências Biológicas da Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2008.

STANGE, V. S.; GOMES, T. D. U. H.; DE ANDRADE, M. A.; BATITUCCI, M. C. Avaliação do efeito mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto, por meio de bioensaios *in vivo* e prospecção fitoquímica de *Cecropia glaziovii* Sneth (embaúba), Cecropiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 19 (2B), p 637- 642, 2009.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment to two medicinal plants, *Psidium guajaval* L. and *Achillea millefolium* L. *in vivo* assays. *Genet. Mol. Biol.* vol.26, p 551-555, 2003.