

BIOENSAIO COM O SISTEMA-TESTE *Allium cepa* L. SUGERE TOXICIDADE EM AMOSTRAS DE ÁGUA COLETADAS NO RIO SÃO FRANCISCO (PETROLINA/PE)

Cynthia Silva dos Santos^{1*}; *Ilka Fernanda Mendes Pereira*²; *Laysla dos Santos Motta*¹; *Paula Teresa de Souza e Silva*³; *Ana Christina Brasileiro Vidal*⁴; *Draulio Costa Silva*⁵; *Kyria Cilene de Andrade Bortoleti*⁵

RESUMO- Classificado entre os três municípios mais populosos do Vale Submédio São Francisco, o município de Petrolina (Pernambuco) tem sido apontado como um dos maiores geradores de impacto sobre a qualidade das águas do rio São Francisco devido a descargas de efluentes industriais e resíduos urbanos, bem como da prática intensiva da agricultura irrigada, as quais podem promover o acúmulo de compostos genotóxicos neste ecossistema. Diante deste cenário, o presente trabalho investigou o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de contaminantes presentes neste recurso hídrico, receptor de efluente industrial, mediante a utilização de bioensaios genéticos com *Allium cepa* L. e sua correlação com parâmetros físicos e químicos das suas águas. Alterações nos índices de germinação e variação do comprimento médio da raiz em *A. cepa* sugerem a ocorrência de um potencial tóxico nas amostras de água, o qual pode ser associado às concentrações alteradas dos metais pesados Ni, Cu e Cr encontrados nas amostras avaliadas. Este trabalho destaca a importância dos ensaios de genotoxicidade no monitoramento ambiental do rio São Francisco, associado ao perfil físico e químico da água, avaliando os efeitos da influência antrópica e os possíveis danos ocasionados a curto e longo prazo aos organismos expostos.

Palavras-Chave- Genotoxicidade; rio São Francisco; Biomonitoramento.

¹ Estudante de Ciências Biológicas; Bolsista do CEMAFAUNA; UNIVASF, Rod. BR 407, Km 12, Lote 543, Projeto de Irrigação Senador Nilo Coelho, s/n° - C1, CEP 56.300-990; *cynthiasantosv@gmail.com

² Mestranda em Genética; Programa de Pós-Graduação em Genética; UFPE.

³ Pesquisadora; Embrapa Semiárido.

⁴ Professor; Departamento de Genética; Centro de Ciências Biológicas; UFPE

⁵ Professor; Colegiado de Ciências Biológicas; UNIVASF.

INTRODUÇÃO

A água é um recurso mineral indispensável para a manutenção das atividades vitais dos organismos. Considerando o crescimento das atividades antrópicas, o qual não tem sido acompanhado pela manutenção da infraestrutura de saneamento básico, da descarga de resíduos e da avaliação da qualidade da água lançadas pelos efluentes, pode-se afirmar que a contaminação dos ecossistemas aquáticos tem se tornado um subproduto das atividades pelas quais estes são explorados (Reza; Singh, 2010). Tal fato tem despertado o interesse de diversas vertentes da sociedade, no intuito de determinar intervenções ou prevenções que garantam a saúde dos recursos hídricos e consequente preservação da vida (Do Nascimento *et al.*, 2009).

Atualmente, um elevado grau de antropização tem sido ressaltado no rio São Francisco, cuja relevância histórica, social e econômica é incontestável para a região do Submédio São Francisco, principalmente nos municípios limítrofes de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA) cuja divisa natural é o citado recurso hídrico. Estas cidades apresentam cerca de 491.927 habitantes (IBGE, 2016), sendo classificadas entre os três municípios com maior população urbana da região. Consequentemente, são apontados como os maiores centros de geração de impacto sobre a qualidade das águas no Submédio São Francisco (Rodrigues *et al.*, 2004), concentrando aproximadamente 42% da carga potencial poluente advindos da crescente urbanização, expansão das indústrias, agricultura irrigada e pecuária (MMA, 2006). Essas atividades exercem forte pressão sobre a qualidade ambiental, uma vez que promovem descargas de efluentes urbanos, industriais e agrícolas, os quais são considerados como a principal fonte de poluição ambiental devido à diversidade de compostos químicos persistentes, gerando preocupação para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos e terrestres (Silva; Heuser; Andrade, 2003).

Entre os compostos persistentes, podem ser citados os hidrocarbonetos aromáticos, metais pesados e pesticidas que podem causar danos ao DNA dos organismos expostos, como quebras do DNA, alterações na replicação e transcrição do DNA, alterações nas fibras do fuso cromossômico e formações de micronúcleos, devido a propriedades aneugênicas e clastogênicas (Frenzilli *et al.*, 2009). Apesar dos ecossistemas apresentarem grande capacidade depurativa, os impactos são bem desastrosos (George *et al.*, 2002). O acúmulo de contaminantes pode gerar efeitos deletérios nos sistemas fisiológicos e genéticos na comunidade de organismos aquáticos exposta, alcançando diferentes níveis tróficos e, consequentemente, alterando a estrutura populacional de um determinado ecossistema (Fracácio *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2006; Ventura *et al.*, 2008).

Considerando a exploração dos bioensaios genéticos como importantes ferramentas no diagnóstico e monitoramento ambiental, o sistema-teste *Allium cepa* L. tem sido indicado como um ensaio eficiente para a avaliação em curto prazo de poluentes ambientais, e em particular, de poluentes aquáticos (Migid; Azab; Ibrahim, 2007), sendo indicado EPA (Environmental Protection Agency). Este ensaio permite avaliar o potencial tóxico da substância testada, mediante avaliação do crescimento radicular e dos danos causados ao DNA, observando-se a presença de alterações cromossômicas, micronúcleos e distúrbios no ciclo mitótico (Leme; Marin-Morales, 2009).

Dessa forma, diante da intensa exploração do rio São Francisco pela sociedade para os diversos fins, faz-se necessário avaliar a potencialidade genotóxica promovida por substâncias químicas presentes na água deste recurso hídrico, mediante a correlação entre os ensaios de genotoxicidade e o perfil físico e químico da água, fornecendo subsídios aos estudos de monitoramento e mutagênese ambiental na região em questão.

OBJETIVOS

O presente trabalho investigou o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de possíveis contaminantes presentes em amostras de águas do rio São Francisco (Petrolina/Vale Submédio do São Francisco), receptor de efluentes industriais, urbanos e agrícolas, mediante a utilização de bioensaios genéticos com o organismo teste *Allium cepa* e sua correlação com parâmetros físicos e químicos, para fins de diagnóstico e monitoramento ambiental.

METODOLOGIA

Amostragem

As amostras de água foram coletadas durante a estação seca (Agosto/2015), nas proximidades de um efluente industrial químico (S 09° 24. 339' W 040 28. 059'), resultante das atividades de um curtume. Ao longo desta área, foram determinados três pontos de amostragem distantes em 100m: à montante do efluente, no despejo industrial e à jusante do efluente; em cada ponto, as amostras de água foram coletadas superficialmente, seguindo o protocolo descrito por CETESB (1987) e em triplicata, sendo armazenadas em recipientes plásticos e transportadas até o laboratório, onde permaneceram à 4 ± 2 °C até a montagem do experimento.

Perfil físico e químico da água

Para a análise das variáveis hidroquímicas [temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD), turbidez, condutividade elétrica (CE) e totais de sólidos dissolvidos (TDS)], foi realizada a medição *in situ*, com a utilização de sonda multiparâmetro previamente calibrada. As concentrações de nutrientes (amônia, nitrito e nitrato) foram determinadas seguindo-se recomendações do *Standard Methods* (AWWA, 1998), enquanto que, para a quantificação dos metais pesados [Ni (Níquel), Mn (Manganês), Cu (Cobre), Pb (Chumbo), Cr (Cromo), Fe (Ferro) e Zn (Zinco)], as amostras foram digeridas com ácido nítrico (HNO₃) concentrado à frio e os valores determinados por espectrofotometria de absorção atômica.

Bioensaio com *Allium cepa* L.

Sementes de *A. cepa* cv. Vale Ouro IPA 11 foram submetidas a 5 mL das amostras de água coletadas e aos controles negativo (água ultrapura) e positivos [Herbicida Trifluralina (0,84 ppm de princípio ativo) e o MMS (Metilmetanosulfonato, 4×10^{-4} Mv)] para a avaliação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico.

As raízes germinadas foram medidas, coletadas, fixadas em etanol: ácido acético (3:1, v:v) e utilizadas na preparação das lâminas seguindo o método de Feulgen. Para cada réplica, foram analisadas cinco lâminas e 500 células/lâmina, totalizando assim 15 lâminas e 2.500 células por ponto amostrado (montante, efluente e jusante), além dos controles. A análise dos dados foi realizada mediante análise estatística paramétrica através do teste ANOVA (nível de significância da análise de 5%), seguindo do Teste de Tukey para comparações múltiplas, com o subsídio do STATISTICA 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das variáveis físicas e químicas (Tabela 1) demonstrou valores similares aos propostos pela resolução CONAMA (357/2005).

I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO

Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

Tabela 1. Valores das variáveis físicas e químicas obtidos nas amostras de água coletadas no Rio São Francisco (S 09° 24. 339' W 040 28. 059') durante a estação seca (Agosto/2015).

PARÂMETROS	MONTANTE	EFLUENTE	JUSANTE	CONAMA (357/2005)
Temperatura (°C)	23,2	23,3	23,5	-
OD (mg/L)	8,2	7,9	7,3	>6,0 mg/L
pH	7,88	8,26	8,26	pH: 6,0- 9,0
CE (µS/cm)	69,3	66	67,4	-
TDS (mg/L)	35	33,7	34	< 500 mg/L
Turbidez	7,69	6,13	7,71	> 5 mg/L
Nitrato (mg/L)	0	0	3,156	< 10,0 mg/L
Nitrito (mg/L)	0	0,021	0	<1,0 mg/L
Fósforo (mg/L P)	0	0	0	Até 0,1 mg/L
Nitrogênio Amoniacal (mg/L N)	0,24	0,24	0,12	2,0 mg/L 7,5<pH≤8,0

Legenda: * OD – Oxigênio dissolvido; CE – Condutividade elétrica; TDS - Totais de sólidos dissolvidos.

Por sua vez, a avaliação dos metais pesados revelou a presença de quantidades de Ni, Cu e Cr, acima do proposto por esta resolução, nos três pontos de coleta (montante, efluente e jusante) (Tabela 2). Segundo Corbi *et al.* (2006), a presença de Ni em recursos hídricos não é comum, sendo utilizado como catalisador na indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícia, o que reforça a iniciativa de preservação da mata ciliar nos recursos hídricos para evitar a lixiviação de substâncias ao longo do percurso da água que propiciem danos aos organismos expostos. De acordo com Zimbres (2002), os valores de Ni e Cu podem se apresentar alterados em amostras de água coletadas em ambientes sujeitos às práticas industriais, o que condiz com a área de estudo analisada no presente trabalho. Concomitantemente, os efluentes de curtume também foram associados à descarga de cloretos, sulfetos e cromo, cuja quantidade também se apresentou elevada no rio São Francisco (Tabela 2). Este composto tem sido utilizado para a melhoria da qualidade do couro neste tipo de prática (Jordão *et al.*, 1999).

Tabela 2. Quantificação de metais pesados nas amostras de água coletadas no rio São Francisco (S 09° 24. 339' W 040 28. 059') durante a estação seca (Agosto/2015).

PARÂMETROS (mg/L)	MONTANTE	EFLUENTE	JUSANTE	CONAMA (375/2005)
Níquel (Ni)	0,0477	0,0538	0,0419	0,025 mg/L Ni
Chumbo (Pb)	0,0036	0,0124	0,0064	0,01 mg/L Pb
Ferro (Fe)	0,1507	0,1758	0,1228	0,3 mg/L Fe
Zinco (Zn)	0,0026	0,0300	0,0081	0,18 mg/L Zn
Cobre (Cu)	0,0325	0,0347	0,0297	0,02 mg/L Cu
Manganês (Mn)	0,0663	0,0603	0,0724	0,1 mg/L Mn

Cromo (Cr) 0,0636 0,0503 0,0685 0,05 mg/L Cr

Considerando o bioensaio com *A. cepa*, os menores IGs (Índices de Germinação) foram observados nas amostras coletadas à montante (68%), no efluente (61,33%) e à jusante do efluente industrial (60,67%), em comparação aos controles negativo (89,73%) e positivos (84,52% e 70,48% para MMS e Trifluralina, respectivamente). De acordo com Ferreira e Áquila (2000), modificações nos IGs estão relacionadas a diversos fatores, incluindo alterações na transcrição e tradução do DNA, permeabilidade de membranas, entre outros. Tais dados, juntamente com os valores de VCMR (Variação do Comprimento Médio das Raízes) notados para as amostras coletadas à montante (0,66 cm) e no próprio efluente (0,53 cm), divergiram significativamente ($p < 0,05$) do controle negativo, levantando a suposição que substâncias fitotóxicas estejam influenciando na sanidade do ecossistema analisado (Grangeiro *et al.*, 2014) e interferindo no crescimento das raízes de *A. cepa*, a exemplo dos metais quantificados. Estes podem atuar isoladamente ou através de interações sinérgicas e/ou antagônicas (Dusman *et al.*, 2011; 2012; Ferreira *et al.*, 2012) propiciando os efeitos tóxicos verificados no sistema teste *A. cepa*.

Paralelamente, o IM (Índice Mitótico), IAC (Índice de Alterações Cromossômicas) e IMUT (Índice de Mutagenicidade) não revelaram indícios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade nas amostras analisadas, uma vez que não foram observadas diferenças significativas em comparação ao controle negativo (Tabela 3). Os despejos industriais apresentam diversas substâncias tóxicas que em conjunto, podem atuar inibindo o efeito tóxico uma da outra, o que pode explicar os resultados citados acima. No entanto, vale ressaltar que a toxicidade de determinada substância está relacionada ao tempo de exposição à mesma e as concentrações a qual determinado organismo é exposto (Costa *et al.*, 2008).

Tabela 3. Avaliação do teste de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade mediante o IM (Índice Mitótico), IMUT (Índice de Mutagenicidade), IAC (Índice de Alterações Cromossômicas), VCMR (Variação do Comprimento Médio das Raízes) e IG (Índice de Germinação) no sistema *Allium cepa* submetido aos tratamentos com amostras de água coletadas no rio São Francisco (S 09° 24. 339' W 040 28. 059') durante estação seca (Agosto/2015).

TRATAMENTOS	IM	IMUT	IAC	VCMR	IG
H ₂ O	22,6±7,0 ^c	0,2±0,2 ^b	0,4±0,2 ^{bc}	0,71±0,07 ^c	89,73%
MMS	15,69±7,03	1,26±1,07 ^a	1,81±1,29 ^a	0,71±0,07 ^c	84,52%
TRI	13,05±4,74 ^a	0,36±0,41 ^b	1,23±0,71 ^a	0,36±0,06 ^{ab}	70,48%
MONTANTE	22,01±12,38	0,19±0,23 ^b	0,55±0,34 ^b	0,66±0,12 ^{abc}	68%
EFLUENTE	16,10±9,55	0,36±0,50 ^b	0,55±0,55 ^b	0,53±0,15 ^{abc}	61,33%
JUSANTE	16,39±5,74	0,55±0,39 ^b	0,80±0,50 ^b	0,77±0,20 ^c	60,67%

Legenda: MMS (Metilmetanosulfonato); Tri (Trifluralina); Valores correspondem à média ± desvio padrão. a: Significativo utilizando o Anova ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo; b: Significativo utilizando o Anova ($p < 0,05$) quando comparado ao MMS; c: Significativo utilizando o Anova ($p < 0,05$) quando comparado à Tri.

CONCLUSÕES

O presente trabalho sugere a presença de potencial tóxico nas amostras de água coletadas à montante, no efluente e à jusante de um curtume cujo efluente é despejado no rio São Francisco. Tal dado ressalta a importância de estudos periódicos de monitoramento da área para assegurar as reais condições do ecossistema, bem como possibilitar medidas estratégicas de intervenções para a melhoria deste recurso hídrico.

REFERÊNCIAS

AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA). (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed. *American Public Health Association*, American Water Works Association and Water Environment Federation.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. (1987). *Guia de coleta e preservação de amostras de água*. Coord. Edmundo Garcia Agudo (*et al.*). São Paulo.

CORBI, J.J.; STRIXINO, S.T.; SANTOS, A.; DEL GRANDE, M. (2006). Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo – Brasil). *Quím. Nova*, 29 (1), pp. 61-65.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. L. (2008). A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, 31(7), pp. 1820-1830.

DO NASCIMENTO, C. A.; NAIME, R. (2009). Panorama do uso, distribuição e contaminação das águas superficiais no Arroio Pampa na bacia do Rio dos Sinos. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*, 5(1), pp. 101-120.

DÜSMAN, E; GONÇALVES, L. A., REUSING, A. F., MARTIN, P. G., MARIUCCI, R. G., & VICENTINI, V. E. P. (2012). Cytotoxic potential of waters of the streams Mandacaru, Maringá, Miosótis and Nazareth in the urban area of Maringá, Paraná State, Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences* (Online), v. 34, pp. 311-318.

DÜSMAN, E; DE FARIA, J. S.; TOLEDO, F.; MAZETI, C. M.; GONÇALVES, M. E. K.; VICENTINI, V. E. P. (2011). Vegetal test-system investigation on cytotoxicity of water from urban streams located in the northeastern region of Maringá, Paraná State, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 33, pp. 71-77.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. (2000). Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 12(1), 175-204.

FERREIRA, C.F.; FRUEH, A. B.; DÜSMAN, E.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. (2012). Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) E Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L.. *SaBios (Faculdade Integrado de Campo Mourão)*, v. 7, pp. 46-54.

FRACÁCIO, R.; RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. R. B.; LIMA, D.; NASCIMENTO, A. P.; RODRIGUES, M. H. (2000). Abordagem ecotoxicológica. *A bacia hidrográfica do Rio do Monjolinho*. Rima, São Carlos, SP. 188p, 131-144.

FRENZILLI G.; NIGRO M.; LYONS B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, v. 681, pp. 80-92.

GEORGE, I.; CROP, P.; SERVAIS, P. (2002). Fecal coliform removal in wastewater treatment plants studied by plate counts and enzymatic methods. *Water Research*, v. 36, pp. 2607-2617.

GRANGEIRO, R. V.; DE MELO, M. A. R.; SILVA, E. V.; SOUZA, A. G.; TOSCANO, I. A. (2014). Caracterização física, química e toxicológica da água de lavagem gerada na produção de biodiesel. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*, 9(1), 78-83.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2016). Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=261110>> e <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=291840>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

JORDÃO, C. P.; SILVA, A. C.; PEREIRA, J. L.; BRUNE, W. (1999). Contaminação por crômio de águas de rios proveniente de curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*, pp. 47-52.

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

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. (2006). 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*, v. 29, pp. 148-158.

MIGID, A. H. M.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. (2007). Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 66, p. 57-64.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. (2006). Caderno da Região Hidrográfica do São Francisco. *Secretaria de Recursos Hídricos*, Brasília, p. 148.

REZA, R. E.; SINGH, G. (2010) Heavy metal contamination and its indexing approach for river water *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7: 785-792.

RODRIGUES G. S.; SILVA, A. D. S.; BUSCHINELLI, C. D. A.; DE ROSSO, C. R.; CARBINATTO, M. L.; SOUZA, T. D.; PAIVA, W. F. (2004). Diagnóstico Ambiental das Fontes Pontuais de Poluição das Águas nas Bacias Hidrográficas do Norte de Minas e do Submédio São Francisco. *Embrapa Meio Ambiente*, Jaguariúna, p. 43.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. (2003). Biomonitoramento Ambiental. In: SILVA J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES J.A.P. (eds) *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, pp. 166-180.



I SIMPÓSIO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO

Integrando conhecimentos científicos em defesa do Velho Chico.

VENTURA, M. D.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 90, pp. 42-51.

ZIMBRES, E. (2002). Química da água subterrânea. *Rio de Janeiro, RJ: Universidade.*