

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

JOÃO LUIZ PEREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA LAGOA DO
ARMAZÉM, DA CÚSTÓDIA, DO GENTIL, TEDUT E DA LAGUNA TRAMANDAÍ
ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *ALLIUM CEPA***

**IMBÉ
2015**

JOÃO LUIZ PEREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA LAGOA DO
ARMAZÉM, DA CÚSTÓDIA, DO GENTIL, TEDUT E DA LAGUNA TRAMANDAÍ
ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *ALLIUM CEPA***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com Ênfase em Biologia 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**

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira Júnior, João Luiz

Avaliação do Potencial Citotóxico e Mutagênico da Lagoa do Armazém, da Custódia, do Gentil, TEDUT e da Laguna Tramandaí através do Teste de Micronúcleo em Allium cepa / João Luiz Pereira Júnior. -- 2015. 37 f.

Orientador: Emerson André Casali.
Coorientadora: Valesca Veiga Cardoso.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Curso de Ciências Biológicas: Biologia Marinha e Costeira, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Mutagenicidade. 2. Allium cepa. 3. Micronúcleo. 4. Ecotoxicologia. 5. Monitoramento Ambiental. I. Casali, Emerson André, orient. II. ~~Veiga Cardoso, Valesca, coorient. III. Título.~~

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JOÃO LUIZ PEREIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MUTAGÊNICO DA LAGOA DO
ARMAZÉM, DA CÚSTÓDIA, DO GENTIL, TEDUT E DA LAGUNA TRAMANDAÍ
ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM *ALLIUM CEPA***

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Biologia 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

Aprovada em 11 / 12 / 2015

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Carmen C. R. Saavedra
Depto. de Genética, IB, UFRGS

Prof. Dr. Fábio Klamt
Dpto. De Bioquímica, ICBS, UFRGS

Prof. Dr. Ignácio M. B. Moreno
Coordenador da atividade de TCC2

IMBÉ

2015

AGRADECIMENTOS

À Deus, principal responsável por tudo isso, por me manter sempre forte e persistente para enfrentar momentos de desânimos que acabaram surgindo;

Aos meus pais, João e Fátima, por terem me educado sempre mostrando os verdadeiros valores da vida e me incentivarem a tornar os meus sonhos realidade, e também pelo apoio financeiro ao longo de todo o curso.

Às minhas irmãs Catusia e Cassiane por sempre apoiarem minhas decisões;

Aos meus amigos de perto e de longe, que sempre torceram pela minha felicidade e meu sucesso;

Aos meus amigos/irmãos/colegas Ana e Maurício por me ajudarem nas horas que mais precisei e pela amizade sincera;

Ao Ronaldo Nobre pelo auxílio nas coletas;

Aos meus orientadores Emerson e Valesca, pela amizade, paciência, dedicação e pela sabedoria que muito ajudou para a conclusão desse trabalho;

Aos professores que tive ao longo desses quase 5 anos, mestres da sabedoria, que contribuíram muito para o meu crescimento intelectual;

Aos bibliotecários Ângelo e Stella, pelo apoio e orientação dado ao longo desse curso;

À Márcia Nogueira, Isabel e Marlene Jung, secretárias do curso de Biologia Marinha, por ao longo do curso sempre me auxiliarem;

À Prof.^a Silvia Barbosa técnica do Laboratório de Estudos de Fisiologia Comparada do ICBS, por me ceder o laboratório para o cultivo das cebolas, assim como para a preparação de lâminas e a realização de algumas análises físico-químicas;

Aos barqueiros Osvaldo e Loreci, sem vocês com certeza as coletas não seriam realizadas;

À toda estrutura fornecida pela UFRGS.

RESUMO

Devido à grande expansão urbana, cada vez mais os corpos d'água estão sofrendo com o despejo indiscriminado de substâncias provindas das mais diversas atividades, sejam elas industriais, agrícolas ou domésticas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial citotóxico e mutagênico das Lagoas das Cústodias, Gentil, do Armazém, da Laguna Tramandaí e do vertedouro de efluentes do TEDUT (Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra), localizadas no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, através do bioteste em *Allium cepa*. As amostras dos locais foram coletadas nos meses de março e setembro de 2015, onde foram realizadas medições e testes dos parâmetros físico-químicos. Foram utilizados 24 exemplares de *Allium cepa* (cebola) para o teste de mutagenicidade que foi realizado através do método proposto por FISKESSJÖ, com adaptação sugerida por MENEGUETTI *et al.* (2011). A avaliação do potencial genotóxico baseou-se na quantificação de alterações cromossômicas e micronúcleos, e através do cálculo do índice mitótico foi estimado o potencial citotóxico das amostras. Os resultados demonstraram que a maioria dos parâmetros físico-químicos analisados estava dentro dos limites tolerados pela legislação, com exceção do ferro (Fe) que na coleta de inverno apresentou valores maiores em todos os pontos coletados, o nitrato (NO₂⁻) também foi outro parâmetro que estava alterado. Nesse estudo foi tido como parâmetro de citotoxicidade somente o índice mitótico, não levando-se em consideração o tamanho das raízes. Os resultados referentes às análises das células meristemáticas que foram submetidas a exposição nas amostras dos locais mostraram que a coleta de verão mostrou uma maior média de alterações celulares em todos os pontos amostrados, principalmente nas amostras do vertedouro do TEDUT e da Lagoa do Armazém. Além disso, as amostras coletadas no verão e no inverno, ambas diferiram significativamente do controle negativo ($P < 0,05$) em relação as alterações celulares. O índice mitótico entre as duas coletas demonstrou que a Lagoa do Armazém foi a única que diferiu ($P < 0,048$) em relação as alterações celulares. Diante desses resultados, o que se pode concluir é que o bioteste com a utilização de bulbos de cebola é um eficiente ensaio de toxicidade para avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de corpos d'água, visto que as análises físico-químicas das lagoas do presente estudo estavam dentro dos limites tolerados pela legislação. Além disso, indicou que mais estudos e com uma maior frequência são necessários para que se tenha uma visão mais sazonal e um acompanhamento mais preciso da região, visto que as coletas foram pontuais. Além disso, é preciso que sejam realizados estudos com a utilização de outros organismos-teste, em razão da sensibilidade e o tipo de resposta a uma toxicidade serem diferentes em cada organismo.

Palavras chave: Mutagênese ambiental. Alterações cromossômicas. Micronúcleo. *Allium cepa*. Corpos d'água. Poluição aquática.

ABSTRACT

Due to urban expansion, more and more water bodies are suffering from the indiscriminate dumping of substances emanating from various activities, whether industrial, agricultural or domestic. This study aimed to evaluate the cytotoxic and mutagenic potential of the Ponds of Custody, Gentil, do Armazém, Lagoon Tramandaí and a scoop of Tedut effluent (Petrochemical Terminal Almirante Soares Dutra), located on the north coast of Rio Grande do Sul through bioassay *Allium cepa*. Samples of the sites were collected in March and September 2015, where measurements and tests of physical and chemical parameters were performed. 24 copies of *Allium* strain were used (onion) for mutagenicity test was performed using the method proposed by FISKESJÖ with adaptation suggested by Meneguetti et al. (2011). The genotoxic potential was based on the quantification of micronuclei and chromosomal alterations, and by calculating the mitotic index was estimated samples of the cytotoxic potential. The results showed that most of the physiochemical parameters analyzed were within the limits permitted by law, with the exception of iron (Fe) which in the winter collection showed higher values at all points collected, nitrate (NO₂⁻) was also another parameter that was changed. This study had as cytotoxicity parameter only the mitotic index, not taking into consideration the size of the roots, and the results of the analysis of meristematic cells that were subjected to exposure in samples from locations shown that summer collection showed a higher average cellular changes in all sampled points, especially in the spillway samples Tedut and warehouse Lagoon. In addition, samples collected in summer and winter, both significantly different from the negative control (P <0.05). The mitotic index between the two samples showed that the Warehouse Lagoon was the only one that differed (P <0.048). Given these results, what can be concluded is that the bioassay using onion bulbs is an efficient toxicity test for evaluation of cytotoxic and mutagenic potential of water bodies, since the physical and chemical analysis of the present ponds study were within the limits permitted by law. It also indicated that more studies and more frequently are needed in order to have a more seasonal vision and a more precise monitoring of the region, since the collections were off. In addition, it must be conducted studies with the use of other test organisms, due to the sensitivity and the type of response to a toxicity are different in each organism.

Key words: Environmental Mutagenesis. Chromosomal alterations. Micronucleus. *Allium* strain. Water bodies. Water pollution.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Figura 1. Representação da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí	13
Mapa 1 - Complexo Lagunar Armazém – Tramandaí.....	14
Figura 2- Formação de micronúcleos em células eucarióticas.....	18
Mapa 2 - Locais onde foram realizadas a coletas.....	19
Figura 3- Vertedouro TEDUT – Lagoa do Armazém.....	20
Figura 4- Coleta de amostras das Lagoas.....	21
Figura 5. Urbanização na beira da Lagoa Armazém, Tramandaí (RS)	22
Figura 6 - Utilização do oxímetro para medição de oxigênio dissolvido.....	23
Figura 7 -Testes de análises físico-químicos.....	23
Figura 8 - Exemplares de <i>Allium cepa</i> postos para germinar.....	24
Figura 9 - Processos envolvidos na preparação das lâminas.....	25
Gráfico 1: Número de células alteradas das amostras coletadas nas estações de verão e inverno de 2015.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médios e de Erro Padrão Médio dos parâmetros físico-químicos analisados para cada local de coleta e a estação do ano em que foi realizada.....	27
Tabela 2. Valores das Médias e do Erro Padrão Médio (Média \pm EPM) dos tipos de alterações celulares determinadas através das análises de células.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVO GERAL.....	11
1.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ.....	12
2.2	COMPLEXO LAGUNAR ARMAZÉM-TRAMANDAÍ.....	13
2.3	OS USOS DA ÁGUA E OS IMPACTOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ	14
2.4	BIOINDICAÇÃO COMO FERRAMENTA DE GESTÃO AMBIENTAL.....	15
2.5	BIOTESTE EM <i>ALLIUM CEPA</i>	15
2.6	ANÁLISE DE MUTAGENICIDADE COMO MONITORAMENTO AMBIENTAL.....	17
2.7	TESTE DE MICRONÚCLEO (MN)	17
3	ÁREA DE ESTUDO	19
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
4.2	AMOSTRAGEM.....	21
4.3	PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS.....	24
4.4	AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA.....	25
4.5	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	26
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A água é considerada um dos elementos indispensáveis à vida dos animais e plantas. Disposta em diversas formas como rios, lagos, lagoas e oceanos, e com diversas utilidades, dentre elas podemos citar o abastecimento público e industrial, a irrigação, a produção de energia, a recreação e lazer, bem como a manutenção da vida aquática. As lagoas costeiras podem ser definidas como corpos de água interiores, encontrados em todos os continentes, onde estão orientados paralelamente à costa podendo se encontrar separados do oceano através de uma barreira ou conectados ao mesmo através de canais. (KJERFVE, 1994).

Segundo Lemos e Terra (2003), os ecossistemas aquáticos apresentam uma complexa interação entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Faz-se necessário conhecer as relações que existem nesse sistema para compreender sua resposta a uma substância exógena.

Devido à grande expansão urbana, cada vez mais esses corpos d'água estão sofrendo com o despejo indiscriminado de substâncias provindas das mais diversas atividades, sejam elas industriais, agrícolas ou domésticas. Essas substâncias lançadas acabam poluindo a água e o sedimento, e como consequência acabam se tornando um problema sério, pois afetam a saúde tanto da biota presente nesses locais quanto o ser humano (EGITO *et al.*, 2007). Além disso, essas substâncias podem ter efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos, e também provocar efeitos teratogênicos sobre os organismos (HOSHINA, 2005).

A utilização do teste de micronúcleo em raízes de *Allium cepa* (cebola), é indicado como uma das melhores metodologias para a realização de estudos de monitoramento ambiental e também para o diagnóstico de mutagenicidade, por apresentar grande sensibilidade e porque o processo de divisão celular da cebola é semelhante ao do ser humano. Além disso, o procedimento tem baixo custo, e a preparação das lâminas é simples (GAVRONSKI, 2008).

A análise do potencial mutagênico do teste de micronúcleo em *Allium cepa* pode determinar futuras ações a serem tomadas para minimizar os impactos que podem afetar a fauna, a flora e a população no entorno desses corpos d'água. Essa técnica pode ser realizada com o uso de diversos organismos teste como bioindicadores, sejam eles roedores, peixes e plantas, onde a presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a indução de quebras ou de perdas de cromossomos inteiros,

acaba possibilitando a avaliação e a caracterização do potencial mutagênico do agente em estudo (MACHADO, 2013).

Nos últimos anos, a realização de pesquisas relacionadas à investigação da ação de agentes mutagênicos tem tido uma grande importância mundial, pois o homem acaba estando exposto a agentes físicos, químicos e biológicos que acabam induzindo a ocorrência de mutações (MATSUMOTO; MARIN- MORALES, 2004).

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como principal objetivo quantificar o potencial citotóxico e genotóxico das Lagoas do Gentil, das Custódias, do Armazém e Laguna Tramandaí, e também de um vertedouro do TEDUT (Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra), visto que existe uma real necessidade da realização de estudos sobre os impactos sofridos pelos ambientes nesses locais devido a atividades antrópicas, podendo assim fornecer subsídios que possam servir de alerta para possíveis efeitos sobre o homem e o meio ambiente.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo proposto foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Analisar os parâmetros físico-químicos do local de estudo;
- b) Identificar e quantificar alterações nucleares (por 1000 células) dos meristemas radiculares de *Allium cepa* germinados nas amostras das lagoas estudadas;
- c) Verificar se há significância estatística entre as amostras analisadas e o sistema controle (água destilada).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os tópicos a seguir apresentam uma breve fundamentação teórica para um melhor entendimento deste trabalho.

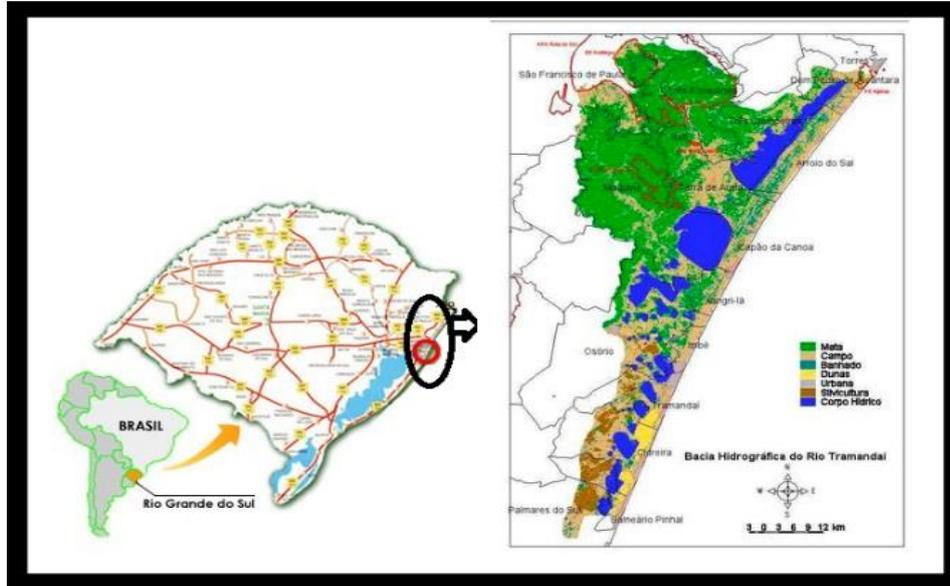
2.1 BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ

O litoral brasileiro apresenta corpos d'água dos mais variados tamanhos, sendo que sua gênese se deu por processos de transgressão e regressão do mar, que ocorreram a partir do Pleistoceno (ESTEVES, 1998). Essas lagoas costeiras estão presentes em diversos locais, e são de grande importância para diversas populações humanas em virtude de possuir recursos alimentares, e também por muitas vezes apresentarem locais que servem de área de lazer (PADILHA, 2001).

A Planície Costeira do Rio Grande do Sul é caracterizada por apresentar um significativo número de lagoas costeiras (lagoas e lagunas) (TOMAZELLI *et al.*, 2011). Além disso, essas lagoas acabam constituindo ecossistemas singulares da restinga brasileira, o que as tornam patrimônio ambiental (LANZER; RAMOS; MARCHETT, 2013).

A Bacia hidrográfica do Rio Tramandaí se encontra inserida na Região Hidrográfica Costeira do Sul, região do território brasileiro onde as águas escoam no Oceano Atlântico por meio de alguma foz entre o Sul de São Paulo e o Sul do Rio Grande do Sul (CASTRO; MELLO, 2013). Situada no Litoral Norte do Rio Grande do Sul e formada por diversos rios e lagoas, a Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí (Figura1), ocupa uma área de aproximadamente 2700 km², dos quais 115 km² estão localizados na faixa litorânea, e cerca de 450km² equivale a lagos, lagunas, rios e canais (PLANO da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, 2015).

Figura 1. Representação da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí.



Fonte: Rio Grande do Sul (2008)
Acessado em: 15/11/2015

2.2 COMPLEXO LAGUNAR ARMAZÉM-TRAMANDAÍ

O Complexo Lagunar Armazém-Tramandaí (Mapa 1), divide-se em dois subsistemas, o subsistema norte e o subsistema sul. O subsistema norte inicia na Lagoa Itapeva e após receber água de outras lagoas dirige-se ao estuário da Laguna Tramandaí. O subsistema sul origina-se da Lagoa Bacopari, e da mesma forma que o subsistema norte se dirige a Laguna Tramandaí, o mesmo despeja suas águas na Laguna do Armazém. Ao ser transportada, a água oriunda dos dois subsistemas da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí, carrega consigo nutrientes, sais e sedimentos, tornando-se o estuário do Rio Tramandaí, um fértil ambiente importante no ciclo de vida de diversas espécies de fauna e flora (CASTRO; MELLO, 2013).

Mapa 1. Complexo Lagunar Armazém-Tramandaí



Fonte: Google Earth (2015).

2.3 OS USOS DA ÁGUA E OS IMPACTOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO TRAMANDAÍ

O uso da água da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí baseia-se principalmente na captação de água para abastecimento humano e na produção agrícola (CASTRO; MELLO, 2013). Outra atividade que potencialmente afeta a qualidade da água das lagoas, é o elevado número de atividades relacionadas ao período de veraneio, onde, a população aumenta de forma considerável que acaba comprometendo a conservação desse ecossistema (LANZER; RAMOS; MARCHETT, 2013).

Outro problema que acaba agravando a situação dos recursos hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí é a falta de saneamento básico que afeta significativamente a qualidade da água em alguns locais. Além disso, algumas regiões da bacia têm a atividade agrícola como uma das principais fontes de subsistência, como por exemplo, os arrozais, o que indica que ocorra uma possível contaminação pelo uso de agrotóxicos (LEMOS; TERRA, 2003).

2.4 BIOINDICAÇÃO COMO FERRAMENTA DE GESTÃO AMBIENTAL

Nos últimos anos, houve um crescimento nos diversos impactos de origem antrópica relacionados a poluição aquática, que vem causando alterações nocivas a biota aquática, bem como à saúde humana que acaba necessitando dos corpos hídricos para sua sobrevivência (VANZETTO, 2014). Dentre eles podemos citar as diversas substâncias originadas de atividades domésticas, industriais e agrícolas que acabam contaminando lagoas, rios e mares (RASHED, 2001).

A bioindicação ou biomonitoramento é uma das ferramentas mais importantes para a detecção dos efeitos das atividades antropogênicas que acabam afetando o funcionamento de um ecossistema, possibilitando através desse acompanhamento, diferenciar as variações que ocorrem naturalmente ao longo de um determinado período (CAIRNS; McCORMICK; NIEDERLEHNER, 1993). Landson *et al.* (1999) define o biomonitoramento como sendo uma das melhores formas de avaliar as mudanças de um ambiente de acordo com as respostas biológicas de um ecossistema, que podem servir como subsídios para promover o controle da qualidade ambiental.

Os bioindicadores são definidos como organismos ou comunidades, onde através do comportamento fisiológico ou a acumulação de poluentes acabam refletindo respostas a alterações ambientais de uma determinada área (LIMA, 2001). Vários são os organismos considerados bons bioindicadores, entre eles podemos citar alguns vertebrados, invertebrados e plantas vasculares. Ottoni (2009) salienta que a utilização da bioindicação vem sendo sugerido com mais frequência, pois as amostragens físico-químicas acabam sendo ineficazes por mostrarem apenas a situação instantânea e também por alguns desses testes apresentarem alto custo.

2.5 BIOTESTE EM *ALLIUM CEPA*

Nos últimos anos, as plantas superiores têm sido recomendadas como sendo ótimos bioindicadoras na detecção de genotoxicidade e citotoxicidade em um ambiente. Devido a sua alta sensibilidade, a *Allium cepa* (popularmente conhecida como cebola) é uma das plantas que mais tem sido usada em laboratórios de estudos relacionados a análise e detecção de alterações cromossômicas provocadas pela presença de substâncias químicas (RANK; NIELSEN, 1993). Elaborado por Levan

(1938), o teste *Allium cepa* é conceituado como uma das melhores ferramentas para pesquisas relacionadas a investigação do potencial genotóxico e citotóxico de diversas substâncias.

O sistema teste *Allium cepa* também serve para investigar efeitos de citotoxicidade de infusões de plantas medicinais. Através das alterações cromossômicas e da divisão das células meristemáticas, é possível se obter uma resposta e, assim, pode advertir a população quanto ao consumo dessas infusões (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007; VICENTINI *et al.*, 2001).

Além disso, esse tipo de análise com *Allium cepa* apresenta baixo custo, agilidade na obtenção dos resultados e facilidade na preparação e manuseio, permitindo que seja realizada uma avaliação aos danos do DNA dos organismos que ficam expostos a ação, que contribuem com a diminuição do índice mitótico e o surgimento de aberrações cromossômicas. Outra vantagem é a disponibilidade desses organismos durante todo o ano e seus cromossomos apresentarem um tamanho relativamente grande (10 μ m), o que acaba facilitando na identificação das alterações cromossômicas. Esses resultados podem ser usados como um alerta para outros organismos-teste, sendo um rastreador de contaminação ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Nielsen e Rank (1994) ressaltam ainda, que os resultados dos testes com *Allium cepa* juntamente com análises químicas, acabam se tornando úteis para obter dados científicos com a finalidade de regulamentar o descarregamento de substâncias nocivas no ambiente.

O Teste *Allium cepa* proporciona dois tipos de informação sobre toxicidade. Do ponto de vista macroscópico é possível verificar através da presença de tumores, avaliação do crescimento das raízes e a presença de raízes retorcidas, entre outros parâmetros. Em nível microscópico, a observação da taxa de divisão celular pode ser definida pelo índice mitótico, e a presença de aberrações cromossômicas que ocorrem durante as fases de metáfase e anáfase (como por exemplo, cromossomos em anel, atrasos cromossômicos, entre outros), e a formação de micronúcleos, são considerados alguns dos parâmetros microscópicos que acabam apontando a presença anormalidades do DNA (MONARCA *et al.*, 2000).

2.6 ANÁLISE DE MUTAGENICIDADE COMO MONITORAMENTO AMBIENTAL

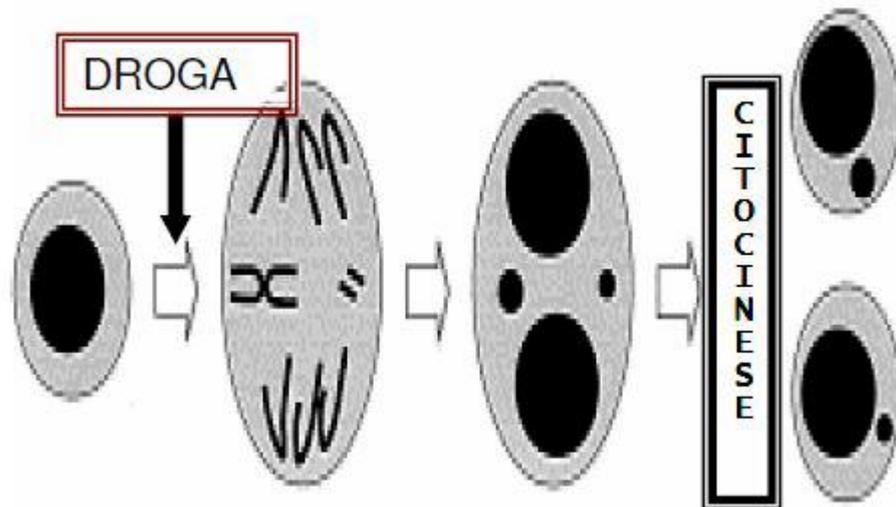
Mutagenicidade é definida como um efeito que pode provocar danos ao material genético da célula ou nos cromossomos. Diversas são as substâncias que são consideradas mutagênicas, tendo diferentes efeitos tóxicos, tais como reação direta com o DNA nuclear; erros de incorporação do DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica originado a partir de uma divisão celular incorreta; presença de anormalidades e a formação de micronúcleos (MATSUMOTO *et al.*, 2006; MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004).

Esses danos são também chamados de mutações e são definidos como qualquer alteração no DNA. Mutações podem ser classificadas em gênicas e cromossômicas. As gênicas são aquelas que afetam o funcionamento de um gene e estão relacionadas a mudanças das subunidades do DNA, seja por substituição, perda ou ganho. As mutações cromossômicas acabam afetando a organização dos polímeros presentes na molécula do DNA, por meio de translocações, inversões ou até mesmo perdas ou ganhos na estrutura do cromossomo (SILVA *et al.*, 2003).

2.7 TESTE DE MICRONÚCLEO (MN)

Os micronúcleos são definidos como sendo uma porção de cromatina do citoplasma, a qual pode apresentar uma forma arredondada ou ovalada, localizada próximo ao núcleo celular, e sua origem é o resultado de uma lise na molécula do DNA que estava exposta a uma substância exógena durante o processo de divisão celular (STICH; ROSIN, 1983). Essas estruturas podem medir de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo (Figura 2), estando arranjadas de forma homogênea ao núcleo (ROCHA, 2011).

Figura 2. Formação de micronúcleos em células eucarióticas.



Fonte: Silva *et al.* (2011, p. 15).

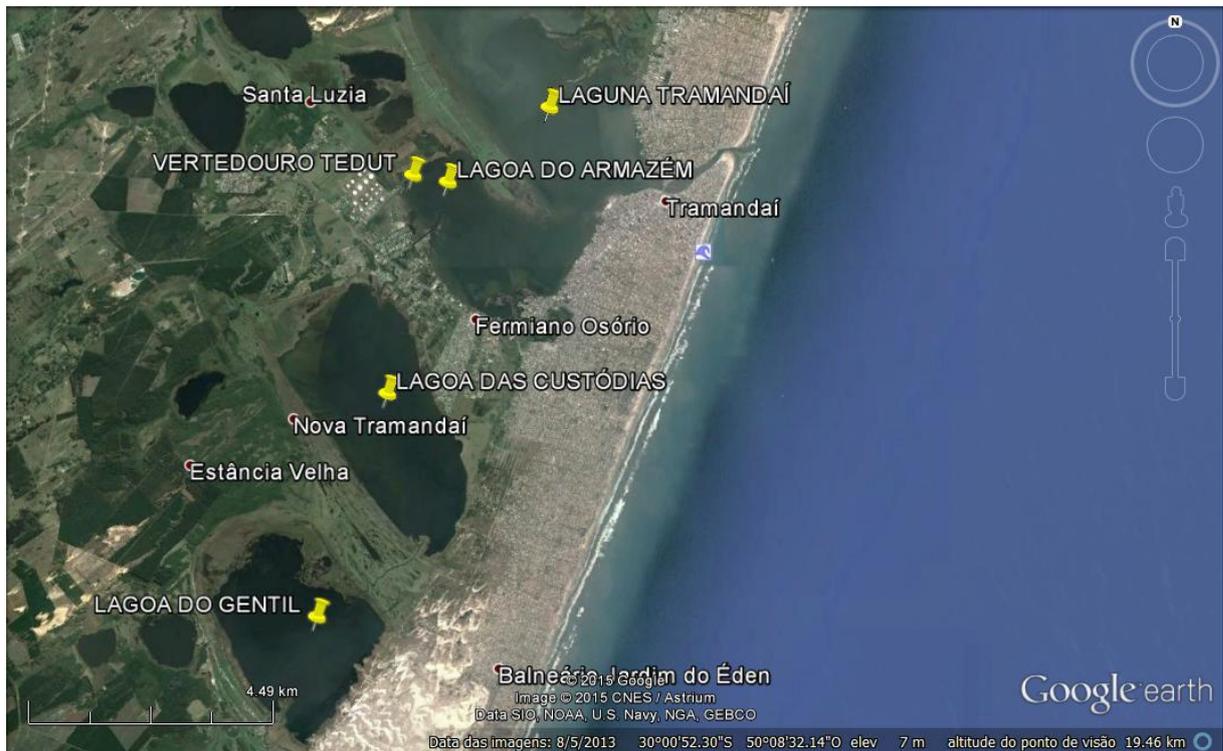
O ensaio de micronúcleos em raízes de *Allium cepa* é considerado uma das melhores metodologias para estudos relacionados à presença de mutagenicidade no meio ambiente, além de que os micronúcleos podem ser identificados em qualquer tipo de células e servem como diagnóstico para diversas doenças (GAVRONSKI, 2008; SILVA *et al.*, 2011). Através da presença de partes da cromatina, o ensaio de micronúcleos permite avaliar a indução de quebras ou de perdas cromossômicas, evidenciando o potencial mutagênico de um determinado agente. Essa técnica é muito usada na averiguação de poluição ambiental, em que pode-se usar diversos organismos testes na bioindicação (MACHADO, 2013).

Silva *et al.*(2003) salienta que a visualização de micronúcleos só é verificada quando se tem uma divisão celular logo após a ocorrência mutagênica. Dessa forma, a necessidade de cultivo celular ou o uso de células que se dividem constantemente é imprescindível para a sua observação. Assim, esse tipo de teste acaba atuando como marcador biológico de danos genéticos, podendo também ser utilizado na indicação de mutagenicidade e como um instrumento de monitoramento ambiental, visto que o organismo-teste retorna aos níveis basais quando permanece por um período sem contato com a substância que induziu o aparecimento dos micronúcleos (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

3 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo compreende as Lagoas do Gentil, das Custódias, do Armazém e a Laguna Tramandaí (Mapa 2), uma região muito procurada como locais de recreação principalmente no período de verão. Esses corpos d'água fazem parte da bacia hidrográfica do Rio Tramandaí, o qual apresenta um conjunto de lagoas que estão interligadas umas às outras através de canais naturais e artificiais.

Mapa 2 – Lagoas costeiras do Litoral Norte do Rio Grande do Sul



Fonte: Google Earth (2015).

Nota: Locais onde foram realizadas a coletas.

Além dessas lagoas, também foram coletadas amostras de um vertedouro que leva águas residuais do Terminal Almirante Soares Dutra (TEDUT) até a Laguna Armazém (Figura 3). O TEDUT está localizado no município de Osório, RS, Brasil e é uma subsidiária da Petrobras que tem como atividades principais o carregamento e o descarregamento de navios através de dutos terrestres, marítimos e monobóias, e o armazenamento de petróleo e seus derivados em tanques (MACHADO, 2013).

Figura 3. Vertedouro TEDUT – Lagoa do Armazém



Fonte: O autor (2015)

4 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação da ação mutagênica foi analisada seguindo o teste proposto por FISKEJÖ com a adaptação de MENEGUETTI *et al.* (2011), na qual substitui o Metanol e o Giemsa pelo Kit Panótipo Rápido LB por apresentar uma maior eficiência no processo de corar as células.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Foram utilizados bulbos de cebola (*Allium cepa*) para a avaliação do potencial citotóxico e mutagênico das Lagoas da Custódia e Gentil, Lagoa do Armazém e Tramandaí, e no vertedouro que leva águas residuais do TEDUT a Lagoa do Armazém.

4.2 AMOSTRAGEM

Foram realizadas duas coletas de água nos pontos de amostragem, uma no mês de março e outra em setembro de 2015 (Figura 4), representando, respectivamente, às estações de verão e inverno. Para a realização da coleta, foram utilizados: um GPS (Garminetrex vista®), umbarco a motor, auxílio de um barqueiro, oxímetro e termômetro para coleta de dados físico-químicos, ambos cedidos pela universidade.

Figura 4. Coleta de amostras das Lagoas



Fonte: O autor, 2015.

As amostragens seguiram os padrões estabelecidos pela ABNT NBR 9897¹⁴ e NBR 9898², visto que os locais estudados acabam sendo impactados devido à grande quantidade de substâncias que são despejadas diretamente nas lagoas, como, por exemplo, os agrotóxicos, e também aquelas que acabam sendo lançadas decorrentes da crescente urbanização (Figura 5). A NBR 9898 recomenda que a coleta seja realizada em regiões medianas das lagoas, evitando áreas que ocorram estagnação ou áreas localizadas próximo das margens internas.

Figura 5. Urbanização na beira da Lagoa Armazém, Tramandaí (RS).



Fonte: O autor, 2015.

Também nos locais da coleta foram realizadas medições de parâmetros físico-químicos como temperatura e quantidade de oxigênio dissolvido (OD) com o auxílio do oxímetro (figura 6).

¹⁴ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897**: Planejamento de Amostragem de Efluentes Líquidos e Receptores. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

²ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

Figura 6. Utilização do oxímetro para medição de oxigênio dissolvido.



Fonte: O autor (2015)

As amostras foram colocadas em frascos esterilizados de 1L, especialmente recomendados para esse tipo de estudo para que não ocorram alterações no material coletado. Após a coleta foram realizados testes de nitrito, nitrato, amônia total, fosfato, pH, ferro e cobre (figura 7).

Figura 7. Testes de análises físico-químicas



Fonte: O autor (2015).

Posteriormente foram colocadas em refrigeração e levadas para o Laboratório de Estudos Sobre Alterações Celulares e Teciduais do Departamento de Ciências Morfológicas (Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul), localizado em Porto Alegre, onde os exemplares de *Allium cepa* foram

colocados para germinar em frascos de 100 ml, e posteriormente também foram preparadas as lâminas.

4.3 PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

Foram utilizados 24 exemplares de *Allium cepa* (popularmente conhecida como cebola), sendo utilizadas 12 cebolas para cada estação estudada (02 réplicas cada amostra, mais 02 utilizadas no teste controle em água destilada). Os exemplares foram selecionados e deveriam apresentar as seguintes características: tamanho uniforme, ser de mesma origem, não germinados e não apresentarem marcas de deteriorização. Todos foram adquiridos em um supermercado do município de Tramandaí.

Antes de serem colocadas para germinar nas amostras, as raízes secas foram extraídas, e posteriormente os bulbos de *Allium cepa* postos em frascos de 100ml, com a parte inferior mergulhada nas amostras coletadas das lagoas (figura 8).

Figura 8. Exemplares de *Allium cepa* postos para germinar.



Fonte: O autor (2015).

Quando as raízes atingiram o comprimento entre 0,5 a 3 cm, foram coletadas para análise, 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 passaram por um processo de resfriamento em água corrente. Após a lavagem dos meristemas, foram feitos esfregaços em duas lâminas por *Allium cepa* (totalizando 24 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 xantenos a 0,1% e o terceiro com tiazinas a 0,1%), sendo as lâminas mergulhadas 10 vezes em cada recipiente, exceto no último onde foram mergulhadas apenas 3 vezes com submersão de 1s de duração (figura 9). Por fim, as lâminas passaram por um processo de lavagem em água deionizada com pH 7,0 e secas à temperatura ambiente.

Figura 9. Processos envolvidos na preparação das lâminas.



Fonte: O autor, 2015.

4.4 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA

A avaliação das aberrações cromossômicas consistiu na observação de alterações mitóticas e interfásicas (micronúcleos, células binucleadas, com brotamento ou pontes anafásicas e telofásicas) em 6000 células para cada estação do estudo (1000 por lâmina), sendo 5000 células das amostras coletadas e 1000 células do teste controle, totalizando 12000 células nas duas estações do presente estudo e a leitura de 12 lâminas. A contagem foi realizada seguindo o método de varredura, com o auxílio de microscopia óptica com objetiva de 40X e ocular de 10X, gerando um aumento de 400X.

Foram consideradas alterações interfásicas (AI), células com micronúcleos, células binucleadas e brotos celulares. O reconhecimento dessas alterações obedeceu aos seguintes critérios: deveria apresentar um contorno regular, redondo ou oval; estar localizado no interior do citoplasma celular; ter coloração semelhante ao núcleo principal; apresentar diâmetro menor que 1/3 do núcleo principal; estar localizado no mesmo plano do foco principal; e estar separado ou marginalmente

justaposto ao núcleo, de maneira que a identificação do limite nuclear de ambos fosse perceptível.

As alterações mitóticas (AM) que foram consideradas aberrações são: pontes telofásicas, pontes anafásicas e atrasos cromossômicos. Essas alterações foram observadas em todas as fases de divisão celular.

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para a avaliação da citotoxicidade, 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 seguinte equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, em que NCM corresponde ao número de células em mitose e NTC ao número total de células analisadas.

A partir de valores obtidos sobre índices mitóticos, é possível avaliar o potencial de uma determinada substância em inibir ou aumentar a proliferação celular.

4.6 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 um $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos parâmetros físico-químicos analisados das coletas realizadas no verão e inverno de 2015, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios e de Erro Padrão Médio dos parâmetros físico-químicos analisados para cada local de coleta e a estação do ano em que foi realizada.

Parâmetro	Estação	LOCAIS DE COLETA				
		TEDUT	Tramandaí	Gentil	Custódias	Armazém
OD	VERÃO	8,3 ± 0,023	9,7 ± 0,058	10,0 ± 0,578	9,9 ± 0,635	9,5 ± 0,058
	INVERNO	12,9 ± 0,058	11,7 ± 0,117	12,7 ± 0,115	12,2 ± 0,058	12,8 ± 0,083
pH	VERÃO	7,7 ± 0,049	7,7 ± 0,058	8,7 ± 0,058	8,2 ± 0,145	7,9 ± 0,033
	INVERNO	6,6 ± 0,058	6,6 ± 0,120	6,4 ± 0,058	6,6 ± 0,115	6,5 ± 0,145
T. °C	VERÃO	23,2 ± 0,115	22,2 ± 0,069	21,6 ± 0,203	22,9 ± 0,289	22,8 ± 0,296
	INVERNO	21,0 ± 0,044	20,2 ± 0,058	22,4 ± 0,115	21,4 ± 0,115	20,9 ± 0,115
PO4	VERÃO	0,10 ± 0,006	0,100 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,15 ± 0,029
	INVERNO	0,1 ± 0,006	0,15 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,006
NH3	VERÃO	12,5 ± 0,866	*0,25 ± 0,006	0,2 ± 0,006	*0,2 ± 0,006	0,5 ± 0,058
	INVERNO	0,7 ± 0,029	0,50 ± 0,058	0,3 ± 0,058	0,4 ± 0,058	0,5 ± 0,058
NO2	VERÃO	0,2 ± 0,012	**ND	**ND	**ND	**ND
	INVERNO	*0,4 ± 0,058	*0,12 ± 0,006	*0,12 ± 0,001	*0,1 ± 0,006	*0,12 ± 0,006
NO3	VERÃO	12,5 ± 0,866	18,0 ± 0,577	18,0 ± 0,577	12,5 ± 0,289	18,0 ± 0,577
	INVERNO	12,5 ± 0,289	20,3 ± 0,882	20,0 ± 1,155	12,5 ± 0,058	20,0 ± 0,577
Cu	VERÃO	0,100 ± 0,006	0,050 ± 0,006	0,05 ± 0,006	0,05 ± 0,006	0,05 ± 0,006
	INVERNO	0,1 ± 0,006	0,10 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,006	0,1 ± 0,006
Fe	VERÃO	*0,10 ± 0,006	*0,18 ± 0,006	*0,05 ± 0,006	*0,08 ± 0,006	*0,1 ± 0,006
	INVERNO	1 ± 0,058	0,5 ± 0,058	*0,4 ± 0,058	0,5 ± 0,058	0,5 ± 0,058

Fonte: O autor (2015).

Nota: Média±EPM

* Valores que foram diferentes significativamente entre as estações verão e inverno de 2015, para um $p < 0,05$, através do Teste t de Student para amostras independentes.

** ND: valores não determinados.

Abreviaturas: OD (oxigênio dissolvido), T (temperatura), PO4 (fosfato), NH3 (amônia), NO2 (nitrito), NO3 (nitrato), Cu (cobre) e Fe (ferro).

De acordo com a Resolução do CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005) que trata dos padrões de qualidade em função do uso da água, quase todos os parâmetros

apresentaram valores que estão dentro dos limites apresentados na resolução, exceto os níveis de ferro (Fe) que apresentou uma quantidade maior que o tolerado (0,3 mg/l) em todas as amostras da coleta de inverno.

Rashed (2001) realizou estudos com peixes em um rio no Egito no qual identificou grande quantidade de ferro nos tecidos de estômago de peixes, e segundo o autor esses valores podem estar relacionados ao aumento de despejo de substâncias relacionadas a atividades agrícolas. Essa pode ser uma das suposições para essa quantidade de Fe acima do tolerado pela legislação, visto que nessa região existem impactos relacionados as atividades agrícolas, principalmente nas lagoas localizadas mais ao sul da Bacia do Rio Tramandaí, e como essas lagoas estão interligadas por canais essas substâncias podem ter se dissolvido entre elas. Contudo essa diferença pode ter sido devido às condições das lagoas no dia da coleta de inverno, visto que houve um aumento no nível das lagoas em decorrência de um período chuvoso acima do previsto, e o escoamento dessas substâncias pode ter sido acentuado devido a esse fenômeno meteorológico.

Outro parâmetro que ficou acima dos níveis tolerados pela resolução é o nitrato (NO_3) que mostrou uma quantidade maior do que aquela imposta pelo CONAMA (10 mg/l), apresentando um valor que variou de 12,5 e 20 mg/l, em ambas as estações. Acredita-se que a principal fonte do NO_3 são os resíduos oxidados de animais (esterco) que são utilizados nas atividades agrícolas juntamente com a utilização de fertilizantes. No entanto, Baird (2002) ressaltou que o cultivo intenso da terra, mesmo sendo sem a utilização de fertilizantes ou esterco, pode causar a oxidação para nitrato do nitrogênio que se encontra presente na matéria orgânica do solo. Além disso, Freitas (2011) salientou em seu trabalho que esses valores podem ser maiores em águas profundas do que em águas superficiais.

Em relação aos dados obtidos de oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura ($T.C^\circ$), Fosfato (PO_4), Nitrito (NO_2) e Cobre (Cu) não apresentaram uma significância para $P < 0,05$ na comparação entre as estações do ano. Somente na Lagoa das Custódias e na Laguna Tramandaí que a amônia (NH_3) apresentou um valor significativo ($P < 0,05$) na comparação das duas estações.

A FEPAM (2015) salienta que outro problema enfrentado nessa região da Bacia Hidrográfica Tramandaí é em relação ao lançamento de esgotos urbanos e rurais sem um prévio tratamento, principalmente na época de veraneio. Essa também pode ser uma das causas desses índices apresentarem esses níveis mais elevados.

Os resultados referentes as análises das células meristemáticas que foram submetidas a exposição às amostras dos locais do presente estudo seguem na Tabela 2, onde foram representados os valores das médias e do erro padrão médio de cada parâmetro obtido de cada coleta e estação. Nesse estudo foi tido como parâmetro de citotoxicidade somente o índice mitótico, não se levando em consideração o tamanho das raízes.

As alterações celulares podem ser divididas em mitóticas que são, por exemplo, as pontes anafásicas, pontes telofásicas e atrasos; e interfásicas que são a presença de micronúcleos, brotamento e célula binucleada. Alterações estas que são abordadas nas análises. Os testes analisados acabaram apontando a presença de anomalias interfásicas e mitóticas tanto na coleta de verão quanto na de inverno.

Tabela 2 - Valores das Médias e do Erro Padrão Médio (Média \pm EPM), e tipo de alterações celulares determinadas através das análises de células.

Locais de coleta	Estação	Alterações celulares							
		MIT	MCN	BROT	BIN	P. ANA	P. TELO	ATRA	INA
TEDUT	VERÃO	635 \pm 1,73	90 \pm 2,31	43 \pm 1,73	14 \pm 1,15	12 \pm 1,15	2 \pm 0,58	23 \pm 1,15	181 \pm 1,73
	INVERNO	665 \pm 2,31	51 \pm 1,15	28 \pm 1,15	15 \pm 1,15	7 \pm 1,15	9 \pm 1,15	19 \pm 1,73	206 \pm 1,73
TRAMANDAÍ	VERÃO	601 \pm 1,73	41 \pm 1,15	24 \pm 1,15	15,67 \pm 0,88	ND	5 \pm 1,15	16 \pm 1,15	297 \pm 1,73
	INVERNO	617 \pm 1,15	36 \pm 1,73	20 \pm 1,15	13 \pm 1,15	3 \pm 0,58	1 \pm 0	9 \pm 1,15	301 \pm 1,73
GENTIL	VERÃO	569 \pm 1,15	48 \pm 1,73	14 \pm 1,15	23 \pm 1,15	ND	ND	9 \pm 1,15	337 \pm 1,15
	INVERNO	603 \pm 1,15	37 \pm 1,15	24 \pm 1,73	9 \pm 1,15	ND	ND	7 \pm 1,15	319 \pm 1,15
CUSTÓDIAS	VERÃO	591 \pm 1,15	67 \pm 1,15	18 \pm 1,73	15 \pm 1,15	ND	3 \pm 0,58	13 \pm 1,15	293 \pm 1,15
	INVERNO	611 \pm 1,15	29 \pm 1,73	23 \pm 1,15	17 \pm 1,15	ND	ND	5 \pm 1,15	315 \pm 1,73
ARMAZÉM	VERÃO	619 \pm 1,15	78 \pm 1,73	31 \pm 1,15	27 \pm 1,15	2 \pm 0,58	9 \pm 1,15	15 \pm 1,15	219 \pm 1,15
	INVERNO	672 \pm 1,73	39 \pm 1,15	26 \pm 1,15	9 \pm 1,15	ND	2 \pm 0,58	11 \pm 1,15	241 \pm 1,73
CONTROLE	VERÃO	283 \pm 1,73	29 \pm 1,15	11 \pm 1,17	9 \pm 1,15	ND	ND	ND	668 \pm 1,73
	INVERNO	337 \pm 1,15	21 \pm 1,73	17 \pm 1,15	7 \pm 1,15	ND	ND	ND	618 \pm 1,73

Fonte: O autor, 2015.

Nota: MIT (células em mitose), MCN (micronúcleo), BROT (brotamento), BIN (binucleada), P. ANA (ponte anafásica), P. TELO (ponte telofásica), ATRA (atraso) e INA (células inativas).

Quanto a mutagenicidade, a quantidade de alterações interfásicas e mitóticas foi maior nas amostras da coleta realizada no verão, sendo que a quantidade de

micronúcleos foi predominante maior nas amostras do vertedouro do TEDUT e da Lagoa do Armazém nas duas estações analisadas. Tal resultado era esperado, pois esses locais apresentam resquícios oriundos de atividades humanas, como é o caso do vertedouro do TEDUT, e também resíduos orgânicos e inorgânicos de origem urbana.

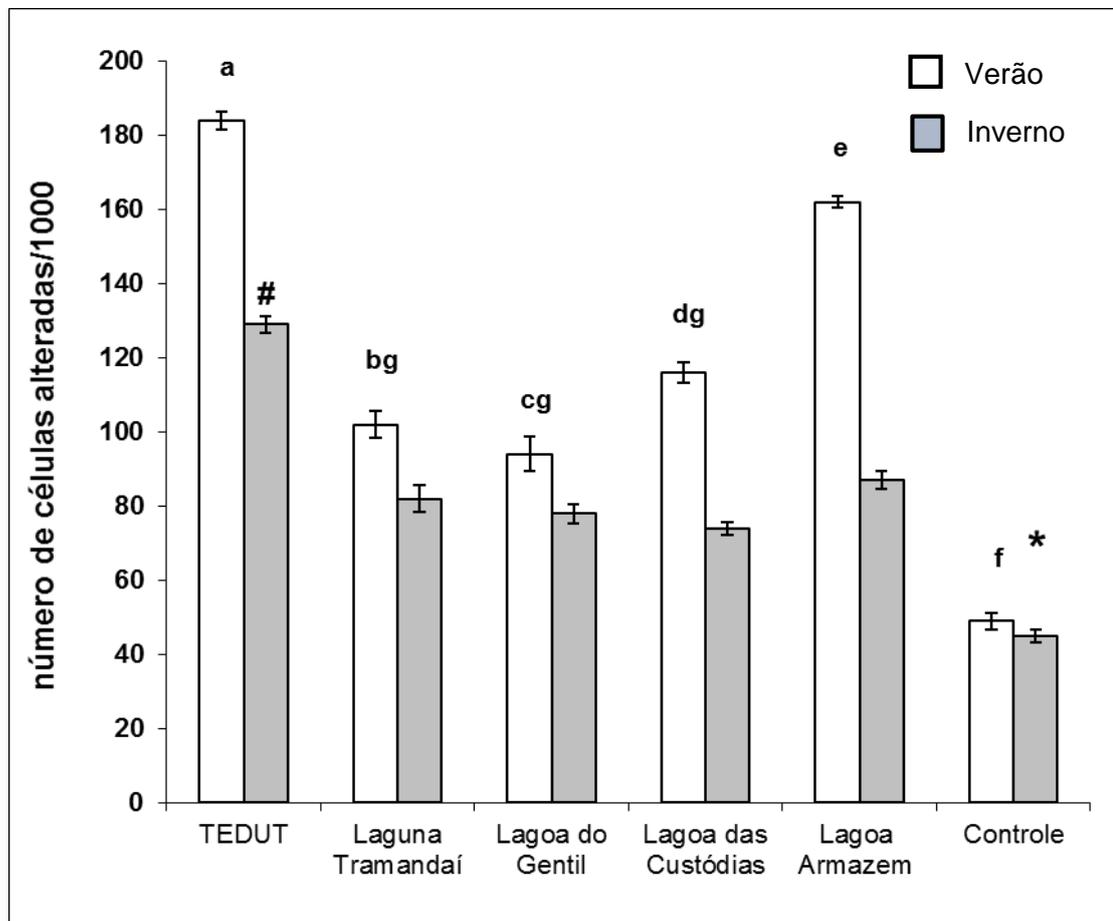
Costa *et al.* (2008) indicaram em seu estudo que a toxicidade de algumas substâncias pode não ser possível de identificar, devido a possível influência de outros componentes do meio, como por exemplo as propriedades físicas e químicas do próprio ambiente, temperatura e a pluviosidade.

Como foi observado, em nosso estudo houve a ocorrência de alterações no índice mitótico, e essas alterações são parâmetros indicativos de citotoxicidade (ODEIGAH *et al.*, 1997), enquanto as alterações nucleares, como por exemplo, micronúcleos, pontes telofásicas, atraso e outras, são caracterizados como indicadores de genotoxicidade (FISKESJÖ, 1985).

De acordo com Grant (1982) a identificação dessas anormalidades celulares acabam sendo apropriadas na investigação de possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos resultantes de substâncias exógenas decorrentes de efluentes industriais e domésticos presentes no ambiente aquático.

No gráfico 1, estão representadas as médias do número de células alteradas para as amostras coletadas no verão e no inverno. Ambas diferiram significativamente do controle negativo ($P=0,05$) de acordo com a ANOVA. Além disso, na coleta de inverno as amostras do vertedouro do TEDUT e do controle diferiram dos demais locais desta estação. Já as amostras do TEDUT, Laguna Tramandaí, Lagoa do Gentil, Lagoa das Custódias e Lagoa do Armazém apresentaram diferença significativa nas duas coletas.

Gráfico 1- Número de células alteradas das amostras coletadas nas estações de verão e inverno de 2015.



Onde **a** ($p=0,05$), **b** ($p=0,05$), **c** ($p=0,05$), **d** ($p=0,05$) **e** ($p=0,05$) diferiram nas estações verão e inverno. **f** ($p<0,05$) diferiu de todos dentro da coleta de verão, e **g** ($p<0,05$) diferiram do controle, TEDUT e Armazem na coleta de verão. Já ***** e **#** diferiram de todos dentro da coleta de inverno apresentando um $p<0,05$

Fonte: O autor, 2015.

Após esses resultados, é possível perceber que mesmo com a análise dos parâmetros físico-químicos estando a maioria de acordo com a legislação vigente, ainda é possível detectar a toxicidade presente nessas lagoas. Embora esse tipo de análise não garanta a confirmação da origem dessa toxicidade, esse tipo de dado acaba servindo como ponto de partida para que outros testes sejam realizados com mais frequência para detectar as possíveis causas e assim servir como ferramenta para diminuir esses impactos.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, o que se pode concluir é que o bioteste com a utilização de bulbos de cebola é um eficiente ensaio de toxicidade para avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de corpos d'água, visto que as análises físico-químicas das lagoas do presente estudo estavam dentro dos limites tolerados pela legislação, o que acaba permitindo supor que apenas esse tipo de teste não é suficiente. Além do mais, mostrou que embora o potencial mutagênico tenha sido maior nas amostras coletadas no verão e nas amostras do vertedouro do TEDUT e na Lagoa do Armazém, ainda se necessita mais estudos e com uma maior frequência para que se tenha uma visão mais sazonal e um acompanhamento mais preciso da região, visto que as coletas foram pontuais. Além disso, é preciso que sejam realizados estudos com a utilização de outros organismos-teste, em razão da sensibilidade e o tipo de resposta a uma toxicidade serem diferentes em cada organismo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897**: Planejamento de Amostragem de Efluentes Líquidos e Receptores. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9898**: Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro: ABNT, 1987.

BAGATINI, M. D.; 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**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300019>. Acesso em: 15/11/2015.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução n. 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n° 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília**, 16 maio 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>> Acesso em: 15/11/2015.

CAIRNS, J.; McCORMICK, P. V.; NIEDERLEHNER, B. R. A proposed framework for developing indicator of ecosystem health. **Hydrobiologia**, Belgium, v.263, p. 1-44, 1993.

CASTRO, D. de; MELLO, R. S. P. (org). **Atlas Ambiental da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí**. Porto Alegre: Via Sapiens; Maquiné/RS: ANAMA, 2013.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

EGITO, L.C. M.*et al.* Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 435-441, 2007.

ESTEVEES, F. DE A. **Fundamentos de Limnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lundskrona, v. 102, p. 99-112, 1985.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste de Micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v.1, n.3, p. 337-340, 2008. Disponível em: <<http://periodicos.unicesumar.edu.br/index.php/saudpesq/article/view/907>>. Acesso em: 10/11/2015

FREITAS, M.B; BRILHANTE, O. M.; ALMEIDA, L. M. Importância da análise de águas para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 17, nº3, p. 651-660, 2001.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PROTEÇÃO AMBIENTAL HENRIQUE LUIZ ROESSLER. Região Hidrográfica do Litoral. Disponível em: <http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/bacias_hidro.asp>. Acesso em: 22/11/2015.

GAVRONSKI, L. **Avaliação da mutagênicidade 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.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in Allium. **Mutation Research**, Orlando, v.99, n.3, p. 273 -29, 1982. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/016511108290046X/1-s2.0-016511108290046X-main.pdf?_tid=4ecec1c-932b-11e5-a2cd-00000aacb361&acdnat=1448425172_9e9e7c775b20470d8df9603cba400015>. Acesso em: 23/11/2015

HOSHINA, M. M. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de efluentes de refinaria de petróleo, por meio dos sistemas testes de Allium cepa e Oreochromis niloticus**. 160 f. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Molecular) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2005. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/handle/11449/87675>> Acesso em: 12/11/2015.

KJERFVE, B. Coastal lagoons. In: KJERFVE, B. (Ed.). **Coastal lagoon processes**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 1-8. (Elsevier Oceanographic Series, 60)

LADSON, A.R. et al. Development and testing of an index of stream condition for waterway management in Australia. **Freshwater Biology**, England, v.41, n.2, p.453-468, 1999.

LANZER, R. M.; RAMOS, B. V. C.; MARCHETT, C. A. Impactos ambientais do turismo em lagoas costeiras do Rio Grande do Sul. **Caderno Virtual de Turismo**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 1, p. 134-149, 2013. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=115426219009>>. Acesso em: 13/11/2015.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEMOS, C.T.; TERRA, N.R. Poluição: causas, efeitos e controle. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. (Org.). **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 117-144

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, Lund, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.

LIMA, J. S. **Bioindicação em ecossistemas terrestres**. 2001. Disponível em: <http://www.techoje.com.br/site/techoje/categoria/detalhe_artigo/173>. Acesso em: 03/10/2015.

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***. 2013. 44 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas ênfase em Gestão Ambiental Marinha e Costeira) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul. 2013.

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**, Ribeirão Preto, v. 29, p.148–158, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; MARN-MORALES, M. A. Mutagenic potencial evaluation of the water of river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* system. **Cytologia**, Tokyo, v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004.

MENEGUETTI, D. U. de O. *et al.* Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamarí River Valley, Western Amazon, Brazil. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 2, n. 2, 2011. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/2161-0525/2161-0525-2-127.php?aid=4500>>. Acesso em: 15/11/2015.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135400001925> >. Acesso em: 10/11/2015.

NIELSEN, M. H.; RANK, J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium test*. **Hereditas**, New Jersey, v. 121, n. 3, p. 249-254, 1994.

ODEGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, Oxford, v. 126, 161-167, 1997.

OTTONI, B. M. DE P. **Avaliação da qualidade da água do Rio Piranhas-Açu/RN utilizando a comunidade de macroinvertebrados bentônicos**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2009.

PADILHA, R. DOS. S. **Contribuição à tipologia de lagoas costeiras do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, com ênfase na comunidade fitoplanctônica**. 161 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

PLANO da Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí. Osório/RS, Comitê Tramandaí, [s.d.]. Disponível em: <http://www.comitetramandai.com.br/files/plano_bacia_hidrografica_rio_tramandai.pdf> Acesso em: 15/11/2015.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium test* as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, New Jersey, v. 118, n. 1, p. 49-53, 1993.

RASHED, N. M. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, Aswan, Egito, v. 27, n. 1, p. 27-33, 2001. Disponível em <<file:///C:/Users/5812/Downloads/ref.%20ok%20rashed%202001.pdf>>. Acesso em: 10/11/2015

RIO GRANDE DO SUL. Ministério Público. [Bacia Hidrográfica do Rio Tramandaí]. 2008. Disponível em: <http://www.mprs.mp.br/media/atuacaomp/2008/01/13181_640_480__geoproc.jpg> Acessado em: 15/11/2015

ROCHA, R. dos S. **Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana/BA, 2011. Disponível em: <http://www2.uefs.br/ppgbiotec/portugues/arquivos/corpo%20discente/mestrado/2009/rodrigo_dos_santos_rocha-dissertacao.pdf>. Acesso em: 17/11/2015.

SILVA, F. C. et al. Avaliação de mutagênese 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. Disponível em: <<http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/57>> Acesso em: 16/11/2015.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.(org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

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

TOMAZELLI, L. J. et al. Terraços lagunares holocênicos da margem da Lagoa do Gentil, Litoral Norte do Rio Grande do Sul: gênese e significado para a evolução geológica regional. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDOS DO QUATERNÁRIO, 13., 2011, Armação de Buzios, RJ; ENCONTRO DO QUATERNÁRIO SUL-AMERICANO, 3., 2011, Armação de Buzios, RJ. **Resumos**. Rio de Janeiro: ABEQUA, 2011. Disponível em: <file:///C:/Users/5812/Downloads/Ref.%20ok%20Tomazelli_et_al_2011_ABEQUA.pdf>. Acessado em: 14/11/2015

VANZETTO, G.V. **A utilização de bioindicadores para avaliar o potencial mutagênico e citotóxico das águas do Rio Pirapó, região norte do Paraná,**

Brasil. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

VICENTINI, V.E.P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/2716/2036>>. Acesso em: 14/11/2015.