

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIAS EM GESTÃO AMBIENTAL

CARLA REGINA FIGUEIREDO DA SILVA
LEONARDO TOFOLO

**AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO RIO
ALEGRIA, MEDIANEIRA – PR UTILIZANDO BIOENSAIOS COM
*Allium cepa***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MEDIANEIRA
2017

CARLA REGINA FIGUEIREDO DA SILVA

LEONARDO TOFOLO

**AVALIAÇÃO DO POTÊN-CIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO RIO
ALEGRIA, MEDIANEIRA – PR UTILIZANDO BIOENSAIOS COM
*Allium cepa***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial à
obtenção do título de Tecnólogo em
Gestão Ambiental, da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Ismael L. Costa Jr
Co-orientadora: Profa. Marcia A. B.
Agustini
Co-orientador: Thiago Andrade Marques

MEDIANEIRA

2017



TERMO DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO RIO ALEGRIA, MEDIANEIRA – PR UTILIZANDO BIOENSAIOS COM *Allium cepa*

por

CARLA REGINA FIGUEIREDO DA SILVA

LEONARDO TOFOLO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 27 de novembro de 2017 às 14:30 h como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo em Gestão Ambiental. Os candidatos foram arguidos pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Prof. Dr. Ismael L. Costa Junior
Orientador

Profa. Dra. Larissa de B. C. Sabbi
Membro titular

Profa. Dra. Marcia A. B. Agustini
Co-orientadora

Prof. Leandro Finger
Membro titular

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso -

Dedico este trabalho à minha
família, pelos momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de nossas vidas. Portanto, desde já pedimos desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do nosso pensamento e de nossa gratidão.

Agradecemos ao nosso orientador Prof. Dr. Ismael L. Costa Junior, a co-orientadora Profa. Marcia A. B. Agustini e ao Co-orientador Thiago Andrade Marques pela sabedoria com que nos guiaram nesta trajetória.

Aos nossos colegas de turma.

A UTFPR-MD pelo apoio e oportunidade.

Gostaríamos de deixar registrado também, o reconhecimento à nossas famílias, pois acreditamos que sem o apoio deles seria muito difícil vencer esse desafio.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização desta pesquisa.

Quem ama preserva.
Preservar o meio ambiente,
é preservar a VIDA.
(Andrea Taiyoo)

RESUMO

DA SILVA, Carla Regina Figueiredo; TOFOLO, Leonardo. **AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DO RIO ALEGRIA, MEDIANEIRA – PR UTILIZANDO BIOENSAIOS COM *Allium cepa*** 2017. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Gestão Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

A água é considerada um recurso renovável que flui entre compartimentos, marinho e continental, formando o ciclo hidrológico. É no continente que a água possui o seu menor volume, sendo fundamental para a manutenção da vida e para o desenvolvimento econômico. Mesmo assim, a água é continuamente poluída e, concomitantemente, mecanismos de recuperação de sua qualidade e de reuso estão sendo criados para o benefício humano. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do Rio Alegria localizado no município de Medianeira-PR utilizando bioensaios com *Allium cepa*. Durante a realização dos bioensaios foram utilizadas amostras de água de quatro diferentes pontos de coleta distribuídos da nascente até a foz do manancial. Para a realização da coleta foram analisados quatro pontos do rio Alegria denominados de P1 para a nascente, P2 para a barragem de captação, P3 para o ponto localizado na vila alegria e P4 para a foz no rio Ocoy. Realizaram-se então as coletas seguindo os padrões da ABNT NBR 9898 e em seguida as análises físico-químicas dando sequência para o uso da espécie vegetal *Allium cepa* conhecida popularmente como cebola para os bioensaios e preparo das lâminas onde se observou o índice mitótico para avaliação do número de células em divisão. Os resultados indicaram crescimento normal e regular das raízes do bioindicador (cebola) quando comparadas a um controle positivo e negativo. Observou-se que não houve necrose nem má formação nas raízes do *Allium cepa* para os pontos amostrados do rio, não se verificando evidências macroscópicas de toxicidade. A análise de variância não inferiu diferenças estatisticamente significativas ao nível de 95% para o ganho de massa. Contudo, para as amostras dos pontos 3 e 4 o mesmo teste indicou diferenças em relação ao controle, para o comprimento das raízes, sugerindo efeitos sobre o desenvolvimento da espécie-alvo. A genotoxicidade foi avaliada de modo qualitativo mediante a observação de eventuais alterações nucleares. Com o cultivo em uma solução de sulfato de cobre a $0,0006 \text{ mg mL}^{-1}$ denominado controle positivo efetivamente tóxico para a cebola apresentou anomalias do tipo células binucleadas e pontes anafásicas. Os estudos e análises realizadas com o bioindicador *Allium cepa* mostraram a importância do monitoramento da qualidade ambiental, sobretudo do Rio Alegria, indicando que as alterações decorrentes dos impactos ambientais ao longo do seu curso exercem um incremento dos parâmetros físico-químicos, conforme observado na caracterização das amostras usadas nos testes e no efeito de aumento do índice mitótico observado. Contudo, como observados nos testes de toxicidade empregando a cebola como bioindicador tais alterações na concentração da água do rio Alegria possivelmente não causem dano à nível citotóxico e genotóxico pois não ocorrem anomalias cromossômicas nas amostras testadas. Com a realização do estudo com o bioindicadores observou-se que o uso dos mesmos são de extrema importância pois é possível se verificar a qualidade do meio ambiente, indicando assim o seu nível de alteração nas suas características originais, o uso da cebola como bioindicador se deu pois é de fácil cultivo, preço baixo, o número de cromossomos ser de fácil observação, número alto de células

em divisão e deixa uma abertura para que mais testes possam ser realizados possivelmente utilizando outros organismos bioindicadores.

Palavras-chave: Bioindicador. Qualidade da Água. Ecotoxicidade

ABSTRACT

D ASILVA, Carla Regina Figueiredo; TOFOLO, Leonardo. **EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL OF RIO ALEGRIA, MEDIANEIRA - PR USING BIOENESSES WITH *Allium cepa*** 2017. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Gestão Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2017.

Water is considered a renewable resource that flows between compartments, marine and continental, forming the hydrological cycle. It is in the continent that water has its lowest volume, being fundamental for the maintenance of life and for economic development. Even so, water is continually polluted and, at the same time, its quality and reuse recovery mechanisms are being created for human benefit. This work aimed to evaluate the cytotoxic and genotoxic potential of Rio Alegria located in the municipality of Medianeira-PR using bioassays with *Allium cepa*. During the bioassays, water samples were collected from four different collection points distributed from the source to the mouth of the source. For the collection, four points of the Alegria River were denominated from P1 to the source, P2 to the capture dam, P3 to the point located in Alegria village and P4 to the mouth of the Ocoy River. The samples were then collected following the standards of ABNT NBR 9898 and then the physicochemical analyzes were done sequencing the use of the plant species *Allium cepa* popularly known as onion for the bioassays and preparation of the slides where the mitotic index was observed for evaluation of the number of cells in division. The results indicated normal and regular growth of the bioindicator (onion) roots when compared to a positive and negative control. It was observed that there was no necrosis or malformation in the roots of the *Allium cepa* for the sampled points of the river, and there was no macroscopic evidence of toxicity. The analysis of variance did not infer statistically significant differences at the 95% level for the mass gain. However, for the samples of points 3 and 4 the same test indicated differences in relation to the control for the length of the roots, suggesting effects on the development of the target species. Genotoxicity was assessed qualitatively by observing possible nuclear alterations. With cultivation in a solution of $0,0006 \text{ mg mL}^{-1}$ copper sulphate called the positively toxic positive control for the onion, it presented anomalies of binucleate cells and anaphasic bridges. The studies and analyzes carried out with the bioindicator *Allium cepa* showed the importance of monitoring the environmental quality, especially of the Alegria River, indicating that the changes due to the environmental impacts along its course exert an increase in the physical and chemical parameters, as observed in the characterization of the samples used in the tests and in the observed mitotic index increase effect. However, as observed in the toxicity tests using the onion as bioindicator such changes in the water concentration of the Alegria river possibly do not cause damage to the cytotoxic and genotoxic level because no chromosomal abnormalities occur in the samples tested. With the study of the bioindicators, it was observed that their use is extremely important because it is possible to verify the quality of the environment, thus indicating its level of change in its original characteristics, the use of the onion as a bioindicator if given as it is easy to cultivate, low price, the number of chromosomes to be easy to observe, high number of dividing cells and leaves an opening so that more tests can be performed possibly using other organisms bioindicators.

Keywords: Bioindicator. Water quality. Ecotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto aérea do Rio Alegria	24
Figura 2. Mapa dos locais de coleta.....	25
Figura 3. Procedimento de confecção de lâminas.....	28
Figura 4. Primeiro ponto amostral em uma das Nascentes do Rio Alegria no município de Medianeira-PR.	30
Figura 5. Segundo ponto amostral próximo a barragem de captação de água junto ao Rio Alegria no município de Medianeira-PR.....	31
Figura 6. Terceiro ponto amostral localizado Vila Alegria no município de Medianeira-PR.	31
Figura . Quarto ponto amostral localizado na Foz do Rio Alegria	32
Figura 7. a) Comprimento das raízes b) Ganho de massa após 72 horas de contato (CN: controle negativo, CP: Controle positivo, P1: Ponto 1, P2: Ponto 2, P3: Ponto 3, P4: Ponto 4)	35
Figura 9. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação do meristema radicular dos controles negativo a) e positivo b)	37
Figura 10. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação do meristema radicular das amostras de água P1 a), P2 b), P3 c) e P4 d).....	37
Figura 11. Índice mitótico (IM) após 72 horas de contato (CN: controle negativo, CP: Controle positivo, P1: Ponto 1, P2: Ponto 2, P3: Ponto 3, P4: Ponto 4)	38
Figura 12. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação de anomalias cromossômicas a) células binucleadas e b) Ponte anafásica do controle positivo(CP)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos utilizando Allium cepa como bioindicador	22
Tabela 2. Localização dos pontos de coleta	25
Tabela 3. Parâmetros a serem analisados e metodologia de ensaio	26
Tabela 4. Caracterização Físico-químicas das amostras de água do Rio Alegria.....	33
Tabela 5. Comprimento radicular e ganho de massa após 72 horas de exposição ..	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	16
3.1	QUALIDADE DA ÁGUA	16
3.2	POLUIÇÃO DAS ÁGUAS.....	17
3.3	MONITORAMENTO AMBIENTAL	18
3.4	BIOINDICADORES	19
3.4.1	Ecotoxicidade	20
3.4.2	Bioensaios de toxicidade	20
3.4.3	<i>Allium cepa</i> como bioindicador	22
4	METODOLOGIA.....	24
4.1	ÁREA DE ESTUDO	24
4.2	COLETA E AMOSTRAGEM	25
4.3	ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS	26
4.4	BIOENSAIO CITOTOXICIDADE EMPREGANDO <i>Allium cepa</i>	27
4.2.1	Avaliação dos resultados.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA.....	30
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADAS.....	33
5.3	BIOENSAIO EMPREGANDO <i>Allium cepa</i>	35
6	CONCLUSÃO.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A água é considerada um recurso renovável que flui entre compartimentos, marinho e continental, formando o ciclo hidrológico. É no continente que a água possui o seu menor volume, com cerca de 3% do volume do planeta, sendo fundamental para a manutenção da vida e para o desenvolvimento econômico. Mesmo assim essa água vem sendo poluída e, concomitantemente, mecanismos de recuperação de sua qualidade e de reuso estão sendo criados para o benefício humano (BRAGA et al., 2004).

A manutenção da qualidade da água é uma necessidade universal, que exige atenção por parte das autoridades e consumidores em geral, particularmente no que se refere à água dos mananciais, destinados ao consumo humano (D'AGUILA et al. 2000).

A água é um recurso natural fundamental à vida, desenvolvimento econômico e ao bem-estar social, possuindo uma infinidade de usos, dos mais simples aos mais complexos. Apesar de ser um bem público, vem se tornando pouco a pouco um recurso escasso que precisa de atenção especial (NETO, 2006).

Além da disponibilidade em quantidade suficiente, a água precisa atender a requisitos de qualidade em termos de parâmetros físicos, químicos e biológicos necessários aos seus múltiplos usos (BRASIL, 2005). Para a manutenção sustentável dos recursos hídricos é necessário o desenvolvimento de instrumentos gerenciais de proteção, planejamento e utilização que busquem adequar o planejamento urbano à vocação natural do sistema hídrico. Os sistemas de abastecimento que estiverem situados a jusante ou depois de locais de descarga de resíduos líquidos estarão sujeitos a uma série de danos.

Neste sentido, os testes de toxicidade devem ser considerados como uma ferramenta indispensável no controle da poluição hídrica, pois fundamentam-se na utilização dos organismos vivos que são diretamente afetados pelos desequilíbrios que eventualmente ocorrem nos ecossistemas aquáticos onde vivem, uma vez que as análises químicas apenas identificam e quantificam as substâncias presentes na água ou sedimento, mas não detectam os efeitos sobre a biota (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

A realização de bioensaios com plantas superiores têm tido diversas aplicações como ferramenta auxiliar na avaliação, monitoramento e detecção de contaminantes no ambiente. O teste utilizando a espécie vegetal *Allium cepa* desenvolvido por Levan (1938) é considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais e, principalmente, águas contaminadas. Com isso coloca-se como uma ferramenta valiosa quanto à determinação da contaminação ambiental.

Apesar da simplicidade, é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) (CABRERA; RODRIGUEZ, 1999).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos e mutagênicos das águas do Rio Alegria, Medianeira-PR do Paraná, sob diferentes impactos ao longo de seu curso, a partir do uso de *Allium cepa* como bioindicador.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar os parâmetros físico-químicos pH, oxigênio dissolvido, demanda química de oxigênio, nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, fosforo total e cloretos em amostras de água do rio Alegria;
- b) Calcular o índice mitótico e analisar as anormalidades mitóticas em células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* em quatro pontos do Rio Alegria;
- c) Comparar as taxas de danos encontradas no bioindicador, entre os pontos amostrais e com as variáveis físico-químicas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 QUALIDADE DA ÁGUA

Qualidade da água segundo Derisio (2012, p. 41), “é representada por características intrínsecas, geralmente mensuráveis, de natureza física química e biológica. Essas características, se mantidas dentro de certos limites, viabilizam determinado uso”.

Dentro desses parâmetros se inclui a qualidade da água para o abastecimento urbano, como ressalta Telles e Costa (2010, p. 30), “A qualidade da água doce para o abastecimento urbano está vinculada aos padrões de potabilidade. No Brasil, esses padrões são estabelecidos pelo Ministério da Saúde, através da Portaria n. 518/04, de 25 de março de 2004”.

A utilização da água para determinado propósito não deve prejudicar os diversos usos possíveis, entre os quais figuram as atividades de consumo humano, produção agropecuária recreativas e a preservação da diversidade biológica. Em consequência, é necessário monitorar os cursos hídricos, a fim de disponibilizar informações que permitam propor medidas de manejo para manter os ambientes aquáticos com qualidade ecológica. Assim para assegurar o gerenciamento sustentado de recursos hídricos e seus múltiplos usos, a avaliação da qualidade da água numa bacia hidrográfica é de fundamental importância (STRIEDER et al., 2003)

No Brasil, embora a água seja considerada recurso abundante, existem áreas muito carentes a ponto de transformá-la em um bem limitado às necessidades do homem. Normalmente, a sua escassez é muito mais grave em regiões onde o desenvolvimento ocorreu de forma desordenada, provocando a deterioração das águas disponíveis, devido ao lançamento indiscriminado de esgotos domésticos despejos industriais, agrotóxicos e outros poluentes (MOITA; CUDO, 1991).

As interações entre as diversas variáveis mensuradas numa amostra de água constituem no ponto de partida para avaliação de sua qualidade, desde que essas interações sejam obtidas de uma distribuição amostral no espaço e no tempo das variáveis do sistema a ser estudado (DONADIO et al., 2005).

Segundo Arcova et al. (1998), os vários processos que controlam a qualidade da água de determinado manancial fazem parte de um frágil equilíbrio, motivo pelo qual alterações de ordem física, química ou climática, na bacia hidrográfica, podem modificar a sua qualidade.

A variação da qualidade da água depende do regime hidrológico do rio, como a variação da vazão da água, o número de cheias por ano e sua importância. Durante o período de enchente, a qualidade da água geralmente mostra variações notáveis, devido as diferenças na origem da água: água oriunda de escoamento superficial, água de escoamento subsuperficial e água do lençol freático. As águas de escoamento superficial geralmente são altamente turvas e carregam grandes quantidades de sólidos suspensos. Águas subsuperficiais carregam carbono orgânico dissolvido e nutrientes, como nitrogênio e fósforo (ALVES, 2006).

A qualidade da água resulta não só dos fenômenos naturais, mas na atuação do homem. É certo que a precipitação pluviométrica pode afetar o escoamento superficial e a infiltração no solo, mas a interferência do homem quer de uma forma concentrada, como na geração de despejos domésticos ou industriais, quer de uma forma dispersa, como na aplicação de defensivos agrícolas no solo, contribui para a introdução de compostos na água, provocando sua contaminação e colocando em risco a qualidade da água que abastece a população (OLIVEIRA, 2004)

3.2 POLUIÇÃO DAS ÁGUAS

Segundo Von Sperling (2005), poluição das águas, é a adição de substâncias ou de formas de energia que, diretamente ou indiretamente, alteram a natureza do corpo d'água de uma maneira que prejudiquem os legítimos usos que dele são feitos.

As variedades de poluentes lançados nos corpos d'água podem ser agrupadas em duas grandes classes: pontual e difusa. Fontes pontuais de poluição são caracterizadas por uma descarga concentrada, em um ponto bem definido, como na saída de uma tubulação. As principais contribuições desta natureza se devem a sistemas de esgoto sanitário urbano não tratado ou parcialmente tratado e descargas industriais (NOVOTNY, 2003).

Cada corpo d'água possui, até certo ponto, capacidade natural de receber poluentes, e essa capacidade de neutralização da matéria poluidora através dos processos de diluição, sedimentação e estabilização química é denominada autodepuração. Nos cursos d'água poluídos, ocorre transformação gradual dos componentes orgânicos em sais minerais e gás carbônico. O equilíbrio está diretamente relacionado à capacidade de o corpo d'água assimilar os lançamentos, não conflitando com sua utilização (COSTA et al., 2003).

“Poluição é toda alteração das propriedades naturais do meio ambiente que seja prejudicial à a saúde, segurança ou ao bem-estar da população sujeita aos seus efeitos, causada por agente de qualquer espécie” (MANO; PACHECO. BONELLI, 2005, p. 41).

De acordo com Ferllenberg (1980, p. 70) “A poluição das águas se processa num ritmo mais intenso que a poluição da atmosfera. O número de compostos nocivos lançados nas águas é muito maior que o número de poluentes encontrados no ar.”.

Derisio (2012, p. 27) aponta que existem quatro fontes das quais se origina a poluição das águas:

“poluição natural, industrial, urbana e poluição agropastoril. A poluição natural, trata-se de um tipo de poluição não associada à atividade humana, então causadas por: Chuvas e escoamento superficial, salinização, decomposição de vegetais e animais mortos. Já a poluição industrial, é quase sempre o fator mais significativo em termos de poluição com algumas fontes que se incluem: Refinarias de petróleo, papel e celulose, siderúrgicas, químicas e farmacêuticas. A Poluição urbana, é proveniente de habitantes de uma cidade, que geram esgotos domésticos lançados direta ou indiretamente nos corpos d'água. É um tipo de fonte que dispõe de tecnologia de controle. E por fim a poluição agropastoril que se decorre das atividades ligadas a agricultura e a pecuária por meio dos fertilizantes químicos e defensivos agrícolas. Sendo esse tipo de fonte difícil de controlar pois necessita de um esquema de conscientização elevado para se obter resultados positivos”.

3.3 MONITORAMENTO AMBIENTAL

“O ato de conhecer e acompanhar sistematicamente a situações dos recursos ambientais dos meios físico e biótico visando melhorar ou recuperar a manutenção da qualidade ambiental é entendido como monitoramento ambiental” (BRASIL, 2009).

Segundo Almeida; Gomes; Panno (2000, p. 71) “Existem dois tipos de monitoramento o passivo e o ativo onde o monitoramento primeiro é a denominação dada à metodologia de avaliação de qualidade de um parâmetro ambiental através da análise e características físico-químicas ou de indicadores das comunidades presentes, ou seja, estas comunidades possibilitam a constatação de condicionantes ecológicas atuantes no presente ou no passado”.

Almeida, Gomes e Panno (2000, p. 71) ainda relatam que o “monitoramento ativo se compõe de métodos físico-químicos complementares que viabilizam uma avaliação ecológica do parâmetro ambiental. O grau de sobrevivência de um organismo exposto a substâncias tóxicas é um critério preliminar considerado”.

3.4 BIOINDICADORES

Os bioindicadores podem ser definidos como “um determinado organismo biológico (micro-organismos, plantas, animais) que, por meio das alterações físicas, químicas ou biológicas causadas no ambiente em que vivem, indicam a variação que ocorreu em seu meio, de forma que na sua normalidade não ocorreria. É possível através dos bioindicadores avaliar o comportamento entre as interações do ambiente em que estão alocados, permitem também a capacidade de se mensurar os danos e a possível reversão dos impactos causados naquele meio” (ARIAS et al., 2007).

De acordo com Zamoner (2017) “Bioindicadores são fatores bióticos empregados para o reconhecimento de condições de ecossistemas, ou seja, as espécies que vivem em determinado local e são adaptadas as condições naturais do meio, quando exposta a alterações do seu habitat indicam de forma a não realizarem atividades que antes normalmente realizava; como por exemplo: não se reproduzindo ou até mesmo morrendo. Pode se definir bioindicadores para vários tipos de ambiente sendo eles, água, ar e solo”.

Algumas espécies podem ser aplicadas em substituição de equipamentos de detecção. Entre os organismos mais conhecidos como indicadores destacam-se as plantas vasculares, as briófitas, as algas, os invertebrados e os vertebrados (LIJTEROFF; LIMA; PRIERI, 2008).

Neste cenário, alguns organismos vegetais têm tido preferência na avaliação de impactos ambientais por suas características nutritivas e fisiológicas, como as raízes, que estão sujeitas a grandes variedades de estresse e tendem a diminuir suas chances de sobrevivência. Outro aspecto favorável aos vegetais refere-se aos maiores níveis fenotípicos do que os animais, significando que os efeitos são mais aparentes e potencialmente mais fáceis e quantitativos de serem mensuráveis. Órgãos como as folhas e as raízes absorvem compostos tóxicos que entram em seus tecidos fazendo alterações em sua morfologia e fisiologia mostrando os efeitos dos impactos ambientais em seu organismo (BAGLIANO, 2012).

3.4.1 Ecotoxicidade

O estudo da ecotoxicidade aquática têm tido recorrente uso para a determinação de efeitos deletérios em organismos vivos, em virtude, principalmente, do potencial risco da transferência de poluentes do ambiente para a biota, bem como na avaliação da qualidade da água sobre eles (FERREIRA, 2002).

As abordagens envolvendo a seleção dos organismos alvo podem ser conduzidas através de testes experimentais com metodologias distintas, estabelecidas de acordo com os objetivos que se procuram alcançar nessas avaliações (LOMBARDI, 1999).

A avaliação do potencial tóxico de misturas complexas, tais como as provenientes de águas poluídas por dejetos orgânicos não é um processo fácil. Em águas de rios e represas deve-se sempre levar em consideração a diluição pontual dos xenobióticos oriunda das águas de contribuição, as relações antagonistas entre as substâncias, a rápida associação que ocorre entre a maioria das partículas e a matéria húmica e a sedimentação de sólidos em suspensão (BAGLIANO, 2012).

3.4.2 Bioensaios de toxicidade

Teste de toxicidade aquática segundo Cesar (1997):

“É o procedimento o qual as respostas dos organismos aquáticos são usadas para detectar e medir os efeitos de uma ou mais substâncias, resíduos, ou fatores ambientais, sozinhos ou em combinação, durante um determinado tempo.

Através dessas respostas pode-se verificar e estimar as concentrações de substâncias que estão causando toxicidade aos organismos que vivem naquele local.

Os estudos ecotoxicológicos são de fundamental importância pois através deles é que são fornecidos os dados e elementos que representam a base para o desenvolvimento dos testes de toxicidade, sendo que nem todos os efeitos que são observados nos organismos podem ser utilizados com um objetivo prático, para que isso ocorra é necessário que os efeitos observados tenham um significado ecológico bem definido”.

Os bioensaios se diferem principalmente pelo tempo em que um organismo fica exposto à substância ou ao agente que é testado. Sendo assim podem ser agudos ou crônicos. Quando são realizados testes de toxicidade e se relata que houve algum efeito adverso nos organismos testados em um período curto de tempo trata-se de teste de toxicidade aguda. Já a toxicidade crônica relata os efeitos que persistem por um período longo quando, quando os organismos ficam expostos ao agente que está causando alteração no sistema, sendo eles monitorados nesses longos períodos em que ficam expostos (COSTA et al., 2008).

Por fim podemos dizer que os bioensaios são de extrema importância para a avaliação da qualidade ambiental, sobre tudo da qualidade da água que é tema do estudo a ser realizado, os bioensaios não relatam apenas a alteração dos organismos naturais que vivem no ambiente, mas também mostram os efeitos a curto e longo prazo que elas causam.

Segundo Smaka-kincl et al. (1996), um meio confiável para a determinação rápida da presença de substâncias tóxicas no meio ambiente, para o monitoramento dos níveis de poluição em ambientes naturais e para avaliação dos níveis de poluição da água, é quantificar a redução da divisão celular em meristema de raízes de espécies vegetais como *Allium cepa* e *Lactuca sativa*.

Resultados do teste com estes organismos podem indicar a presença de substâncias tóxicas, citotóxicas e até mutagênicas no ambiente, e que colocam em risco a sobrevivência dos organismos (FERREIRA et al., 2012). Neste sentido, é importante estudar a qualidade dos ambientes aquáticos, em especial dos rios e ribeirões que cortam e abastecem as cidades.

3.4.3 *Allium cepa* como bioindicador

A realização de ensaios biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação dos efeitos da poluição ambiental sobre os organismos vivos, bem como para a indicação de efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes, enquanto as análises físicas e químicas apenas determinam a presença e concentração de diferentes poluentes (SMAKA-KINCL et al., 1996).

Alguns testes, como àqueles onde são usados animais, de maneira geral são onerosos, tornando a utilização em rotinas de monitoramento inviável. Bioensaios com vegetais como *A. cepa*, são consideravelmente mais acessíveis, sendo comumente propostos para o monitoramento de poluição ambiental (GROVER; KAUR, 1999; SMAKA-KINCL et al., 1996).

As primeiras aplicações deste organismo-teste foram destinadas ao estudo de efeitos mutagênicos da radiação ionizante e substâncias químicas. Posteriormente nas últimas décadas vêm sendo aplicados e se mostrado eficientes na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de poluentes ambientais (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

Na tabela 01 são apresentados estudos ambientais que utilizaram *Allium cepa* como bioindicador.

Tabela 1. Estudos utilizando *Allium cepa* como bioindicador

Matriz Ambiental	Tipo de avaliação	Referência
Água de Rio	Crescimento radicular, índice mitótico e observação de anomalias cromossômicas	Zimmermann et al, 2016.
Águas de Rio	Índice mitótico, formação de micro nucléolos e anomalias cromossômicas.	Athanásio et al., 2014.
Lodo de esgoto	Crescimento radicular e observação de anomalias cromossômicas	Rank; Nielsin, 1998
Águas superficiais	Crescimento radicular, índice mitótico e observação de anomalias cromossômicas	Radić et al., 2010
Esgotos, águas superficiais e águas subterrâneas	Índice mitótico e índice de anomalias cromossômicas	Smaka-Kincl et al., 1996
Água de rio	Índice mitótico e índice de anomalias cromossômicas	Hemachandra e Pathiratne, 2017

A grande utilização do bioindicador *Allium cepa* associa-se às características de sua rápida taxa de proliferação celular, ao rápido crescimento de suas raízes,

grande número de células em divisão, tolerância às diversas condições de cultivo, disponibilidade, fácil manuseio e por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) (QUINZANI-JORDÃO, 1987; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Os primeiros testes empregando *Allium cepa* como organismo alvo datam dos anos 1930. Os meristemas radiculares são comumente utilizados já que são usualmente os primeiros a serem expostos aos químicos espalhados na natureza, no solo e na água (FISKESJÖ, 1985).

Os testes com aplicação da espécie *Allium cepa* podem fornecer duas informações principais sobre a toxicidade. Na escala macroscópica podem ser avaliadas a formações de tumores que afetam o crescimento ou causam deformações nas raízes. À nível celular, podem ser verificadas a taxa de divisão celular por meio do índice mitótico e ainda alterações cromossômicas, observadas nas fases de metáfase, anáfase e formação de micro nucléolos, indicando anomalias no material genético (MONARCA et al., 2000).

4 METODOLOGIA

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O local de estudo é o Rio Alegria, cujas nascentes são localizadas na área rural do município de Medianeira- PR e recebem seus afluentes a Sangra Magnólia, a Sanga Manduri e a Sanga Maguari. Até a captação para o abastecimento a população, são aproximadamente 3 km, passando por pontes e plantações. Na área urbana recebe contribuições de esgotos domésticos lançados diretamente, efluentes agroindustriais pós-tratados e esgoto final procedente da ETE da Cidade (Figura1).



Figura 1. Foto aérea do Rio Alegria

O Rio Alegria apresenta uma vazão média de aproximadamente 350 litros por segundo antes das instalações da estação de tratamento de água, é um rio de classe II segundo a Resolução 357/05 do CONAMA. No decorrer do rio a vazão aumenta devido à ocorrência de nascentes, para a média de aproximadamente 370 litros por segundo até desaguar no Rio Ocoy e posteriormente no lago Itaipu (LAZZEREIS, 2013).

4.2 COLETA E AMOSTRAGEM

Os pontos de coleta estão situados nos perímetros rural e urbano do município de Medianeira-PR (Figura 2). Foram realizadas duas campanhas, no inverno e primavera de 2017, sendo a primeira de reconhecimento e demarcação dos locais e a segunda para recolha de amostras. As técnicas de coleta e amostragem seguiram a NBR 9898 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1987). As amostras foram coletadas aproximadamente a 10 cm da superfície, em frascos de polietileno de 5 L, previamente ambientados com a água do local por três vezes. Em seguida, preservadas sob refrigeração até a chegada ao laboratório.

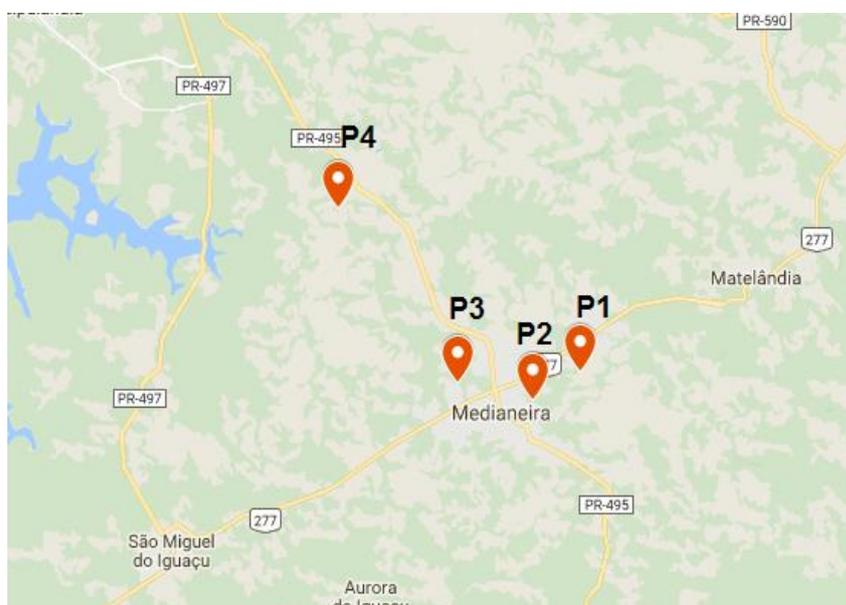


Figura 2: Mapa dos locais de coleta

Os pontos amostrados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Localização dos pontos de coleta

Ponto	Coordenadas	Local
P1	S-25.27927, O-54.05812	Nascente
P2	S-25.2909, O-54.07962	Barragem de captação
P3	S-25.28403, O-54.11309	Vila Alegria
P4	S-25.21661, O-54.16679	Foz

4.3 ANÁLISES FÍSICO QUÍMICAS

Os parâmetros analisados e a metodologia de ensaio estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros a serem analisados e metodologia de ensaio

Parâmetros	Metodologia
Oxigênio Dissolvido	<i>in loco</i> no dia da coleta através de oxímetro portátil DO-5519.
Potencial Hidrogeniônico	Potenciômetro de bancada HI 1110B – Modelo pH 21.
Demanda Química de Oxigênio	Método SMWW 5212 B baseado no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21 ed., 2012.
Nitrogênio Amoniacal, Nitrito, Nitrato Cloretos e Fósforo Total	Métodos 4500 B, 4-150 e 4-118 adaptados do Standard Methods 21 ^a ed. 2012.

4.4 BIOENSAIO CITOTOXICIDADE EMPREGANDO *Allium cepa*

Foi usada a espécie vegetal *Allium cepa* (cebola) em bioensaios com água do Rio Alegria. Esta espécie foi escolhida devido a sua ampla aceitação na comunidade científica, sendo inclusive validado pelo Programa Internacional das Nações Unidas (UNEP), pelo seu baixo custo, alta confiabilidade, facilidade e concordância com outros testes.

Os espécimes foram previamente selecionados considerando uniformidade de tamanho, higienizados com água destilada e pesadas. Foi realizado um estímulo prévio para desenvolvimento radicular, onde os bulbos de *A. cepa*, após limpos e retiradas das raízes e cascas mortas foram imersos pela sua base em água destilada por 24 horas, até que as novas raízes atingissem 0,5 cm. Depois deste período, 5 exemplares foram alocados aleatoriamente nos seus respectivos tratamentos, onde permaneceram por 72h em frascos contendo 50 mL de cada amostra dos quatro pontos de coleta ao longo do Rio Alegria. Além destes, foram realizados tratamentos controles: negativo em água destilada, e positivo em solução com 0,0006 mg mL⁻¹ de sulfato de cobre (CuSO₄).

Para análise de fitotoxicidade, após o período de exposição, os bulbos foram pesados em uma balança de precisão e as três maiores raízes foram mediadas com o auxílio de uma régua para a observação de possível inibição do crescimento por contaminantes (FISKESJO, 1995).

As pontas meristemáticas das raízes dos bulbos foram cortadas, fixadas com Carnoy em tubos eppendorfe (3álcool etílico: 1 ácido acético) por um período de 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, transferidas para álcool 70% por 24 horas, banhadas novamente em álcool 70% para a remoção do fixador (Carnoy) e alocadas na geladeira.

Para elaboração das lâminas foram efetuadas as seguintes etapas (Figura 3):

1. Lavagem das raízes em água destilada para remoção do álcool 70%;
2. Hidrólise com HCl 1N por 10 minutos;
3. Nova lavagem das raízes com água destilada;
4. Coloração com orceína acética 2% por 40 min;
5. Banho com água destilada, por gotejamento;
6. Seleção das regiões meristemáticas em lâmina a olho nu, utilizando-se pinça, bisturi e agulha;

7. Recoloração comorceína acética 2%;
8. Inserção da lamínula sobre o material;
9. Leve esmagamento dos meristemas;

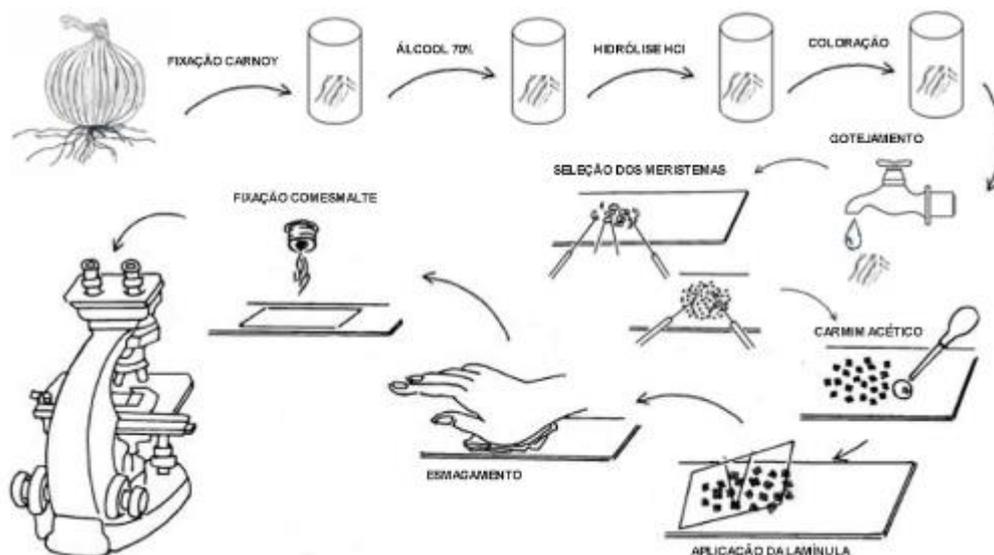


Figura 3. Procedimento de confecção de lâminas

Fonte: Adaptado de Barbério, 2013

Foram confeccionadas cerca de 30 lâminas microscópicas para possível avaliação do índice mitótico, sendo que em cada uma das lâminas foram dispostas três raízes da cebola totalizando 90 amostras as quais foram cortadas apenas as pontas para esmagamento em lâmina. Deu-se as análises em triplicata para que a taxa de erros nas análises fossem menor considerando os dados estatísticos.

Para avaliar os efeitos dos parâmetros físico-químicos investigados sobre a biota, o indicador *Allium cepa* foi aplicado nas amostras, com vistas a observar possíveis alterações à nível macroscópico e celular.

Após a confecção das lâminas, foi feita a análise das células por meio de microscopia de luz, para a contagem das células em divisão e identificação de possíveis anormalidades do tipo cromossomos em anel, pontes anafásicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos, micronúcleos e alterações morfológicas nucleares.

4.2.1 Avaliação dos resultados

A avaliação estatística para comparação dos resultados obtidos na verificação de citotoxicidade em *Allium cepa* com o controle negativo foi efetuada através da Análise de Variância (ANOVA) admitindo-se um nível de significância de 95%, usando o *Software Minitab* 16.1.1. Foram testadas o comprimento radicular médio, o ganho de massa e o índice mitótico.

A genotoxicidade foi avaliada de modo qualitativo mediante a observação de eventuais alterações nucleares como cromossomos em anel, pontes anafásicas, cromossomos pegajosos, retardos cromossômicos, micronúcleos e alterações morfológicas nucleares.

O índice mitótico é a avaliação do número de células em processo de divisão, ou seja células que estão em fase de mitose, em uma certa quantidade de células totais observadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

A primeira estação amostral P1 localiza-se em uma das nascentes da área rural, na microbacia do Rio Alegria, no município de Medianeira (Tabela 02 e Figura 01).

A atividade predominante em seu entorno é a agrícola e agropecuária em especial a atividade avícola e bovinocultura leiteira a montante, 500 metros do ponto de coleta. Há presença de mata ciliar as suas margens, evidência de erosão mínima ou ausente, leito formado por cascalhos e pedras, com pequena lâmina de água (Figura 4).



Figura 4. Primeiro ponto amostral em uma das Nascentes do Rio Alegria no município de Medianeira-PR.

O ponto de coleta P2 está localizado a jusante do ponto 1 na barragem de captação de água da cidade. Este local apresenta um volume maior de água devido aos afluentes incorporados durante o curso, e também pelo represamento da água é mais lântico que o primeiro ponto.

O uso do solo em seu entorno é composto predominantemente pela transição entre a agricultura e o perímetro urbano, as suas margens apresentam

mata ciliar precária, com evidências de erosão e carreamento de detritos possíveis causas do aumento da turbidez e coloração das águas como pode ser observado na Figura 5.



Figura 5. Segundo ponto amostral próximo a barragem de captação de água junto ao Rio Alegria no município de Medianeira-PR.

O ponto de coleta P3 está localizado na região onde o Rio Alegria deixa a área urbana. O local amostrado foi uma porção do manancial que atravessa a área de moradias precárias conhecida como Vila Alegria (Figura 6).



Figura 6. Terceiro ponto amostral localizado Vila Alegria no município de Medianeira-PR.

O local é caracterizado pela ausência de coleta e tratamento de esgoto, com diversas ligações visíveis despejando diretamente no rio, onde também há o acúmulo de resíduos sólidos abandonados pela população (Figura 5). Outro aspecto relevante, refere-se ao fato deste ponto de amostragem estar a jusante do despejo das estações de tratamento de uma agroindústria e da concessionária de água e esgoto responsável pelo município.

O ponto de coleta P4 foi delimitado próximo a foz do Rio Alegria junto ao Rio Ocoí, na comunidade São Bernardo na área rural (Figura 7). O local apresenta mata ciliar estreita sucedida de pastagens.



Figura 7. Quarto ponto amostral localizado na Foz do Rio Alegria

A área é basicamente agrícola com extensões de monocultura e pecuária leiteira. O processo de autodepuração espacial e temporal contribui para a melhoria do aspecto visual das águas que, apesar de pouco turvas, aparentam ausência de detritos.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADAS

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a caracterização físico-química pela determinação do valor médio de cada parâmetro e seus respectivos desvios padrão.

Tabela 4. Caracterização Físico-químicas das amostras de água do Rio Alegria.

Parâmetro	Pontos de Coleta			
	P1	P2	P3	P4
OD (mg O ₂ L ⁻¹)	8,4±0,1	7,3±0,2	9,2±0,2	7,5±0,1
pH	6,6±0,2	6,3±0,3	6,1±0,1	6,8±0,2
DQO (mg O ₂ L ⁻¹)	20,8±2,7	37,4±4,0	100,1±2,5	61,4±5,1
Nitr. Amoniacal (mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹)	0,1±0,02	0,1±0,04	4,7±0,05	0,5±0,04
Nitrato (mg N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹)	<0,05*	<0,05*	0,2±0,001	0,3±0,002
Nitrito (mg N-NO ₂ ⁻ L ⁻¹)	<0,005*	<0,005*	0,2±0,001	0,2±0,003
Cloretos (mg Cl ⁻ L ⁻¹)	1,1±0,2	6,2±0,9	71,2±2,9	30,4±1,9
Fosforo total (mg P L ⁻¹)	0,01±0,03	0,03±0,08	1,4±0,01	1,1±0,02

* Menor concentração da curva de calibração do método

Segundo a Resolução CONAMA N^o357/05, as medidas de OD, em águas de classe 2, não devem ser inferiores a 5 mgO₂ L⁻¹, estando os valores obtidos dentro dos padrões. O parâmetro oxigênio dissolvido é um importante indicador de qualidade das águas pela sua relação direta com o teor de matéria orgânica. Foram observadas variações entre os pontos amostrados com tendência de decréscimo da nascente em relação a foz, exceto no P3, principalmente ocasionado por reoxigenação influenciado por corredeiras e quedas d'água no local.

Mosca et al. (2003), afirma que oscilações no pH entre 6,5 e 8,5 podem estar relacionadas com poluição difusa, tais como poluição urbana e atividade agropecuária. Os padrões de qualidade de água definidos pela Resolução CONAMA 357/05 estabelecem que o pH para águas de classe 1, 2 e 3 devem estar na faixa de 6 a 9. Isto foi observado nas medidas realizadas, que também concordam com outros estudos já realizados no corpo hídrico onde foram verificados valores na faixa de 6,26 a 7,04 (MENEGOL *et al*, 2002; SOUZA et al., 2011, FLECK et al., 2012).

As determinações de matéria orgânica por meio da DQO foram coerentes com os valores de oxigênio dissolvido, variando espacialmente de acordo com as fontes de poluição observadas no entorno na faixa de 20,8 a 100,1 mg O₂ L⁻¹. O Ponto 3 foi o que apresentou o maior valor de DQO.

Com relação ao parâmetro nitrogênio amoniacal, pode-se perceber que com exceção do ponto de P3, os resultados se mostraram satisfatórios quando comparados aos valores máximos estipulados pela Resolução CONAMA 357/05 que considera o limite de $3,7 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ para $\text{pH} < 7,5$. O ponto 3 apresentou pH médio de 6,1 e nitrogênio amoniacal de $4,7 \text{ mg N-NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$, como pode ser observado na Tabela 3, o que não atende o padrão de qualidade e sugere a presença de esgoto doméstico. Estes dados corroboram com os valores de nitrogênio amoniacal reportado por outros estudos na região realizados por (FLECK et al., 2012)

A presença excessiva de nitrogênio amoniacal indica poluição recente e a predominância de nitratos a possibilidade de uma descarga mais antiga ou mais distante. Os teores de nitrato e nitrito foram menores que o limite de detecção do método nos pontos P1 e P2. Mesmo quando quantificados nos pontos P3 e P4 estiveram menores que os estipulados pela Resolução CONAMA 357/05 sendo $10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ e $1,0 \text{ mg N-NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ para nitrato e nitrito respectivamente.

Quanto aos teores de cloretos observou-se a elevação à medida que se avança das nascentes para a foz, com destaque para o P3 onde registrou-se $71,2 \text{ mg Cl}^- \text{ L}^{-1}$. Apesar de expressivo, quando comparado aos demais pontos, atende a Resolução CONAMA Nº 357/05, que determina até $250 \text{ mg Cl}^- \text{ L}^{-1}$ para águas superficiais.

Para ao fósforo total, observou-se a mesma dinâmica do nitrato e nitrito com valores que variaram de $0,01 \text{ mg P L}^{-1}$ a $1,4 \text{ mg P L}^{-1}$. As maiores concentrações foram reportadas nos pontos P3 e P4 (Tabela 03). Pela Resolução CONAMA Nº 357/05, considerando-se ambientes lóticos e tributários de ambientes intermediários, o limite é de $0,025 \text{ mg P L}^{-1}$, portanto, apenas o P1 atendeu esta determinação.

A avaliação dos parâmetros físico-químicos estudados sugere a interferência antrópica sobre a qualidade das águas do Rio Alegria, particularmente no ponto 3 onde todas as variáveis tiveram valores distintos dos demais locais amostrados.

5.3 BIOENSAIO EMPREGANDO *Allium cepa*

Na tabela 5 são apresentados os valores médios para o comprimento das raízes, o ganho de massa dos bulbos e o índice mitótico (IM) em cada um dos tratamentos.

Tabela 5. Comprimento radicular e ganho de massa após 72 horas de exposição

Tratamento	Raízes (cm)	ganho de massa (g)	Índice Mitótico (%)
CN	0,93±0,27	0,97±0,57	5,85±1,88
CP	0,13±0,06*	3,40±0,61	2,39±1,44*
P1	3,15±0,11	2,53±0,46	7,66±1,09
P2	2,99±0,64	2,75±0,26	7,32±2,21
P3	1,41±0,24*	1,73±0,31	8,99±1,72
P4	3,56±0,40*	2,64±1,02	7,37±,52

CN: Controle Negativo

CP: Controle Positivo

P1, P2, P3, P4: Pontos de coleta do Rio

* diferença significativa em relação ao Controle Negativo ($p < 0,05$)

5.3.1 Avaliação do crescimento radicular e ganho de massa

Foram observados os maiores comprimentos radiculares e ganho de massa em todos os pontos amostrados quando comparado com os controles positivo e negativo (Figura 8). Entre as amostras de água do Rio Alegria, foram verificados maiores comprimentos e aumentos de massa em P1, seguidos por P4, P2 e P3.

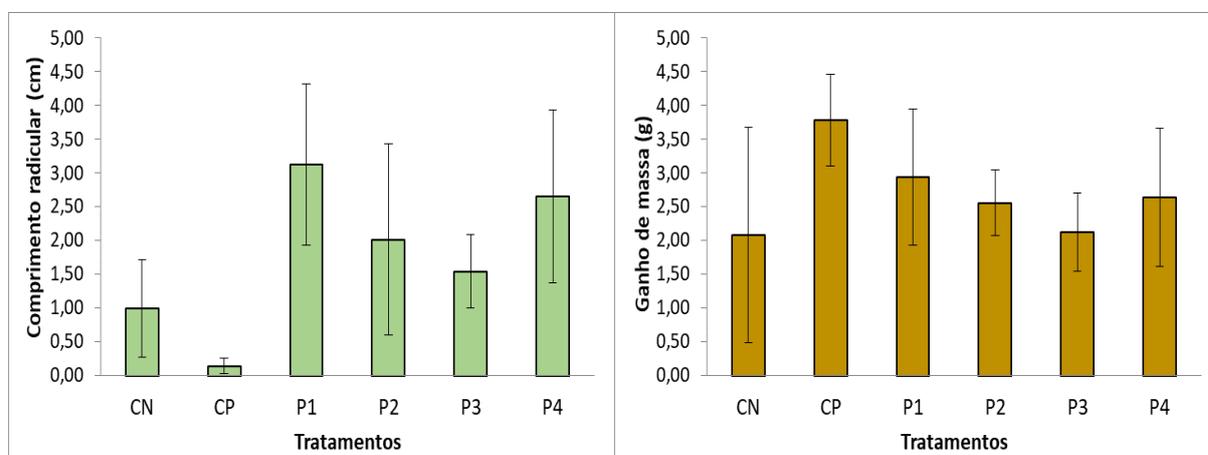


Figura 8. a) Comprimento das raízes b) Ganho de massa após 72 horas de contato (CN: controle negativo, CP: Controle positivo, P1: Ponto 1, P2: Ponto 2, P3: Ponto 3, P4: Ponto 4)

Esta distribuição dos dados é coerente com as características antrópicas e percurso do corpo hídrico, onde o P3 representa a região de maior impacto ambiental decorrente ausência de condições de saneamento da comunidade local e posterior ao ponto de despejo da ETE da cidade e de uma agroindústria.

Para avaliação de fitotoxicidade com o organismo *A. cepa* em águas superficiais é comum a verificação de promoção do crescimento em detrimento à inibição. Isto deve-se a baixa concentração de agentes tóxicos como metais pesado e orgânicos persistentes em relação a poluente convencionais como nitratos e fosfatos. Estes por sua vez característicos de despejos domésticos e considerados nutrientes de fácil absorção.

A análise de variância (ANOVA) aplicada ao nível de significância de 95% inferiu que, para o ganho de massa, não houveram diferenças significativas entre os tratamentos com água do rio e em comparação aos controles. Para o comprimento das raízes, foram indicadas diferenças no nível de confiança avaliado entre CN e CP, CN e P3 e CN e P4. Os resultados sugerem que as qualidades das águas nos pontos amostrados exercem efeitos sobre o desenvolvimento radicular dos organismos-alvo.

5.3.2 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade.

Durante a realização do ensaio, as cebolas utilizadas nos biotestes com amostras de água dos diferentes pontos de coleta e do controle negativo em observação macroscópica apresentaram crescimento normal e regular de suas raízes, não havendo necrose nem má formação, não se verificando evidências macroscópicas de toxicidade nas amostras de água.

Entretanto, como esperado, no controle positivo houve baixo crescimento radicular. A Figura 9 ilustra um exemplar de meristema radicular do controle negativo (CN) e controle positivo (CP)

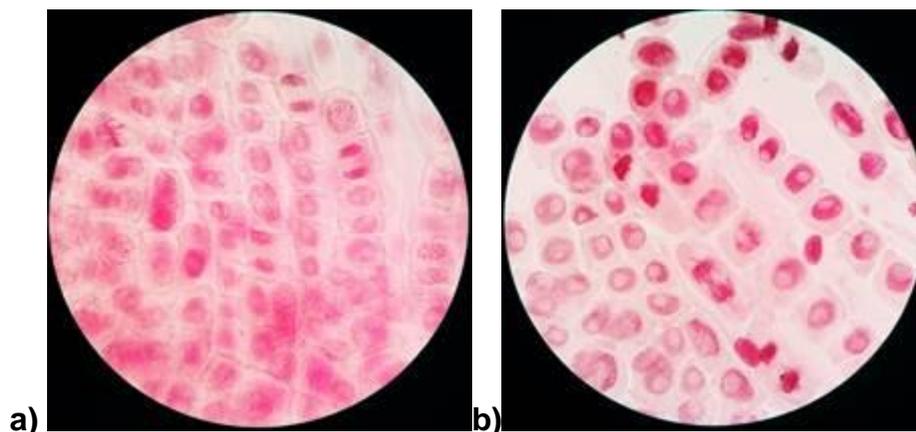


Figura 9. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação do meristema radicular dos controles negativo a) e positivo b)

Para as amostras coletadas ao longo dos quatro pontos amostrado no Rio Alegria os exemplares de meristema radicular são apresentados na Figura 10.

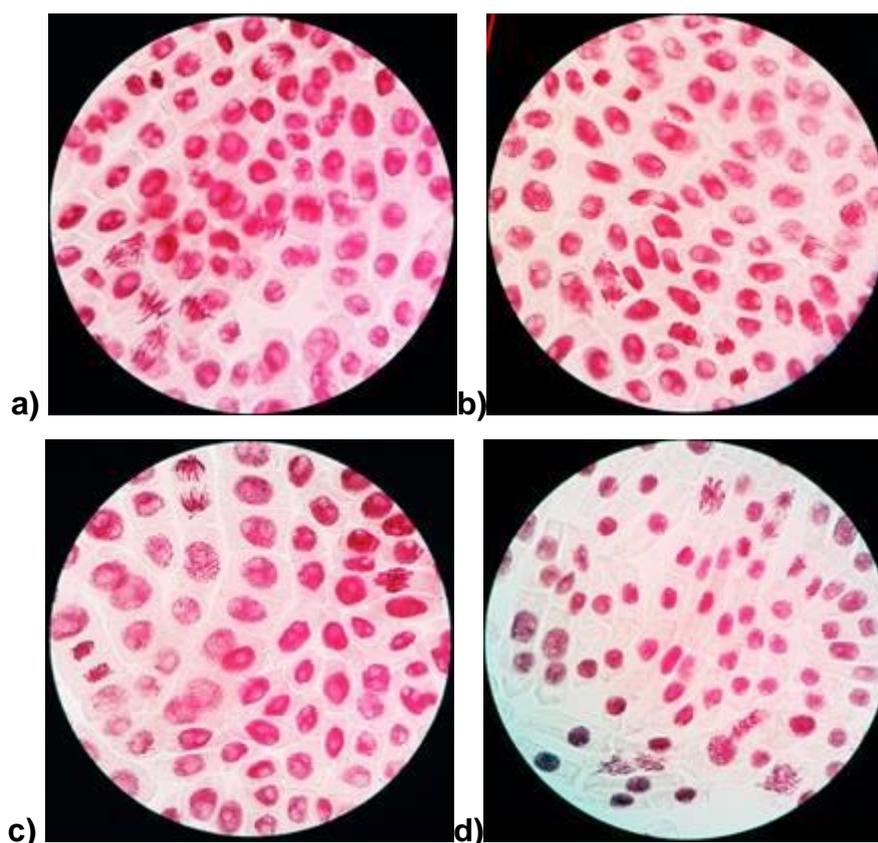


Figura 10. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação do meristema radicular das amostras de água P1 a), P2 b), P3 c) e P4 d)

Os valores para o índice mitótico (IM) apresentados na Tabela 5 foram representados graficamente por meio da Figura 11.

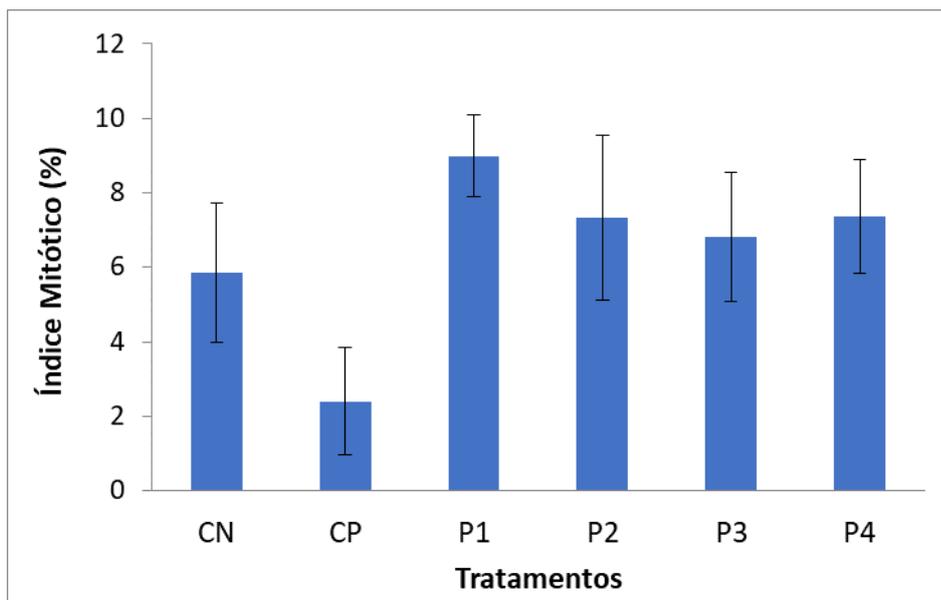


Figura 11. Índice mitótico (IM) após 72 horas de contato (CN: controle negativo, CP: Controle positivo, P1: Ponto 1, P2: Ponto 2, P3: Ponto 3, P4: Ponto 4)

A inspeção da Figura 10 permite considerar que houve baixa variação do índice mitótico das amostras de água quando comparadas entre si e com o controle negativo. Isto se confirma pela análise de variância (ANOVA) aplicada ao nível de significância de 95% onde inferiu-se que, para o IM, não houveram diferenças significativas entre os tratamentos com água do rio e em comparação ao CN. Contudo foram evidências diferenças em relação ao controle CP.

Nos tratamentos, exceto para o CP, observou-se aumento do IM em relação ao CN, sugerindo que houve favorecimento para o desenvolvimento dos organismos, o que concorda com as observações obtidas para o tamanho radicular. Este comportamento não é comum quando se busca avaliar a interferências ecotoxicológicas por agentes do ambiente e indicou que as substâncias contidas nos efluentes industriais e domésticos despejadas no Rio Alegria possivelmente não influenciaram na avaliação toxicologia na estação do ano estudada.

No entanto, a literatura sugere que o aumento do índice mitótico pode ser tão prejudicial quanto à diminuição (MARCANO et al. 2004; CHANDRA et al. 2005), inclusive podendo gerar uma proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tumores (LEME E MARIN- MORALES 2009).

Quanto a genotoxicidade, segundo Leme e Marin-Morales (2009), as anormalidades cromossômicas em células de *Allium cepa* são parâmetros eficientes para a investigação do potencial genotóxico em águas contaminadas, pois fornecem

informações importantes que devem ser consideradas no biomonitoramento ambiental.

Foram identificadas anomalias genéticas do tipo ponte anafásica e células binucleadas apenas no controle positivo (CP) conforme observado na Figura 12.

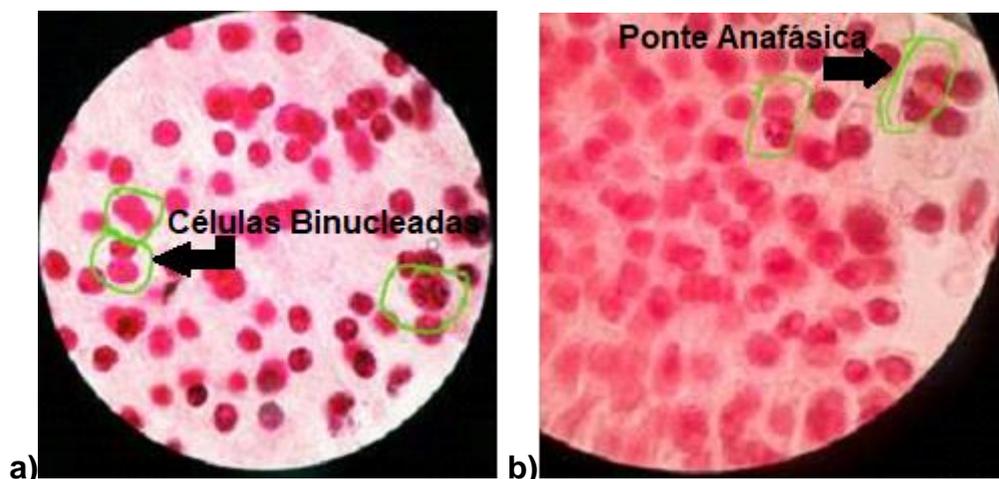


Figura 12. Microscopia de luz com aumento de 1000x para observação de anomalias cromossômicas a) células binucleadas e b) Ponte anafásica do controle positivo(CP)

As evidências microscópicas indicam a presença de mutações genéticas nas amostras do controle positivo, sendo que as pontes anafásicas são as junções dos cromossomos em processo de anáfase sendo que após esse processo deverias formar um novo núcleo dando assim sequência para uma nova célula, já as células binucleadas se formam quando os núcleos continuam em uma mesma célula não havendo assim a divisão da parede celular.

Nas amostras colhidas em diferentes pontos do Rio Alegria não foram identificadas anomalias. Esta observação é semelhante a outros estudos quanto à ausência de aberrações cromossômicas destacadas por Barbério et al. (2009) quando analisaram amostras de água do Rio Paraíba do Sul (São Paulo), Amaral et al. (2007) em amostras do Rio Tapanhon (São Paulo) e Junior et al. (2007) em avaliação fitotoxicológica em amostras de um arroio de Estância Velha, RS.

A ocorrência dessas anomalias, quando presentes em águas superficiais, têm sido reportadas em corpos hídricos altamente impactados ou poluídos como o Rio Tietê, SP e Rio dos Sinos, RS. (SILVA; NASCIMENTO (2013); OLIVEIRA et al. (2012)).

6 CONCLUSÃO

Os estudos e análises realizadas com o bioindicador *Allium Cepa* mostraram a importância do monitoramento da qualidade ambiental, sobretudo do Rio Alegria o qual foi o foco de estudo. Não foram constatadas anomalias ou mutações genéticas nas amostras de raízes cultivadas com a água dos pontos de coleta do rio, significando assim que, para o período amostrado, o mesmo não apresenta potencial genotóxico quando comparado com as amostras do controle positivo (CP) as quais apresentaram mutações do tipo ponte anafásica e células binucleadas.

O uso da cebola como bioindicador é de extrema importância, pois com ele foi possível investigar quatro pontos do Rio Alegria e observar os efeitos da alteração da concentração de parâmetros físico-químicos durante o curso do rio, sendo que em alguns pontos foram notadas alterações em parâmetros como fósforo e nitrogênio amoniacal.

As análises com o bioindicador apontaram a necessidade de estudos complementares na área, pois não foi possível uma avaliação detalhada contemplando mais pontos e mais campanhas amostrais levando em conta o clima e a pluviometria. Além disso, o efeito de promoção do crescimento das raízes em relação aos controles também pode ser considerado um indicador para a qualidade das águas do Rio Alegria, possivelmente ocasionado pela poluição na área de estudo, contudo sem efeito direto de cito e genotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J. R.; GOMES, S.; PANNON, M. **Perícia Ambiental**. Rio de Janeiro: Thex Ed., 2000.
- ALVES, E. C. **Monitoramento da qualidade da água da bacia do rio Pirapó**. Dissertação (Mestrado) – UEM, Maringá, PR, 2006.
- AMARAL A.M., BARBÉRIO A., VOLTOLINI J.C., BARROS L. Avaliação Preliminar da Citotoxicidade e Genotoxicidade da Água da Bacia do Rio Tapanhon (SP – Brasil) através do teste *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**. São Paulo, 2007; 20(1):65-72.
- ARCOVA, F.C.S.; CESAR, S.F.; CICCIO, V. Qualidade da água em microbacias recobertas por floresta de Mata Atlântica, Cunha, São Paulo. **Revista do Instituto Florestal de São Paulo**, São Paulo, v.10, n.2, p.185-96, 1998.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. D.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 61-72, 2007.
- ATHANÁSIO, C. G.; PRÁ, D.; RIEGER, A. Water Quality of Urban Streams: The *Allium cepa* Seeds/Seedlings Test as a Tool for Surface Water Monitoring. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-7, 2014.
- BAGLIANO, R. V. Principais organismos utilizados como bioindicadores relatados com uso de avaliadores de danos ambientais. **Revista meio Ambiente e sustentabilidade**, v. 2, n. 1, 2012.
- BARBÉRIO, AGNES; BARROS, LAYRA; VOLTOLINI, Julio C.; MELLO, Maria 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. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, n. 3, p. 837-842, 2009.
- BRAGA, Benedito; HESPANHOL, Ivanildo; CONEJO, João G. Lotufo; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à Engenharia Ambiental**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005**. Diário Oficial da União. Brasília.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **PROGRAMA NACIONAL DO MEIO AMBIENTE II – PNMA II**, Fase 2, 2009 – 2014 disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/pnma/_arquivos/04_02_manual_monitor_amb_jul09_6.pdf Acesso em 24 de agosto de 2017.
- BRASIL. Ministério Do Meio Ambiente. Secretaria de Mudanças Climáticas e Qualidade Ambiental, **Estratégia do Programa Nacional de Monitoramento Ambiental dos Biomas Brasileiros** /. Departamento de Políticas de Combate ao Desmatamento. Brasília: MMA, 2016. Disponível em:

Programa-de-Monitoramento-Ambiental-do-Biomas.pdf Acesso em 27 de agosto de 2017.

BUZELLI, Giovanna Moreti and CUNHA- SANTINO, Marcela Bianchessi da. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita, SP. **Rev. Ambiente. Água [online]**. 2013, vol.8, n.1, pp.186-205.

CABRERA, Guillermo L., RODRIGUES, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research**, n° 426, p. 211-214, 1999.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p.722-725, 2008.

CHANDRA S., CHAUHAN L.K.S., MURTHY R.C., SAXENA P.N. Pand from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **Total Environ**. 2005. 346: 56-9.

COSTA, L.L.; CEBALLOS, B.S.O.; CELEIDE, M.B.S.; CAVALCANTI, M.L.F. Eficiência de wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colífagos e bacteriófagos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v.3, Paraíba, n.1, 2003.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quím. Nova [online]**. 2008, vol.31, n.7.

D'AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cadernos de Saúde Pública**, Nova Iguaçu, p. 791-798.

DERISIO, J. C. **Introdução ao Controle de Poluição Ambiental**. 4ª. ed. atual São Paulo: Oficina de Textos, 2012.

DIAS N.S, SILVA T.C., FILHO G.P.B., BADREDDINE J.F., MATOZINHO H.H.S., Resende, M.R., Gomes, F.O. Estudo dos efeitos mutagênicos e citotóxicos do confrei (*Symphytum officinale*) no ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**. 2013;10(3):20-9.

DONADIO, N. M. M.; GALBIATTI, JOÃO A.; PAULA, R. C. de. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do córrego rico, São Paulo, Brasil. **Eng. Agríc. [online]**. 2005, vol.25, n.1.

FELLENBERG, G. **Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental** / São Paulo. EPU: Springer: Ed. Da Universidade de São Paulo, 1980.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.88, p.252-259, 2007.

FERREIRA, C. M. **Avaliação da toxicidade do cobre e do uso de girinos de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802) como animais sentinelas**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Univ. São Paulo. São Paulo: 2002.

FERREIRA, C. F.; FRUEH, A. B.; DÜSMAN, E.; HECK, M. c.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação da Citotoxicidade das Águas dos Ribeirões Varginha (Califórnia-PR) E

Tabatinga (Mandaguari-PR), EM *Allium cepa* L. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.l.], v. 7, n. 2, ago. 2012.

FISKESJÖ G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**. 1985;102(1):99-112.

FLECK, L.; QUEIROZ, C. B.; EYNG, E.; SHUTZ, F. C. A. Análise físico-química da qualidade da água do Rio Alegria localizado no município de Medianeira-PR. **Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia**. Vol. 1 nº5. 2012

FRACÁCIO, R. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para avaliação ambiental dos reservatórios do Médio e Baixo rio Tietê (SP)**. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil.2001.

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

HELEN L, H.T Zanini, Luiz A do AMARAL, José R. Zanini, Lucia H. S. TAVARES. Caracterização da água na microbacia do córrego rico avaliada pelo índice de qualidade de água e de estado trófico. **Eng Agric** Vol 30 n 4 Jaboticabal July/Aug 2010.

HEMACHANDRA, C. K.; PATHIRATNE, A. Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: *Allium cepa* root based and Nile tilapia erythrocyte based tests. **Water Research**, v. 108, p. 320-329, 2017.

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. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.2090-2095, 2009.

KATIA. H. M. **Monitoramento e diagnóstico da qualidade da água do Ribeirão Morangueiro**. 2009 153 f. Dissertação Universidade Estadual de Maringá 2009.

LAZZEREIS, Sheila Aparecida Fritsch. **Avaliação e monitoramento da qualidade do rio Alegria**. 2013. 35 f. Monografia (Pós-Graduação em Gestão Ambiental em Municípios) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2013.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, p. 214-219, 2008.

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

LIJTEROFF, R., LIMA, L., PRIERI, B. Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica em la ciudad de San Luis, Argentina. **San Luis**, v.3. n.1, p.3-6, octubre. 2008.

LOMBARDI, J.V. **Toxicidade aguda de agrotóxicos para o camarão de água doce *Macrobrachium rosenbergii* De Man (Decapoda, Palaemonidae)**. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista Rio Claro: 1999.

MACÊDO, JORGE A. B. **Métodos Laboratoriais de Análise Físico-Químicas e Microbiológicas**. 3ª. ed. – Belo Horizonte-MG, p. 160, Macêdo 2005.

MANO, E. B.; PACHECO, E. B. A. V. P.; BONELLI, C.M.C. **Meio Ambiente, Poluição e Reciclagem**. 1ª ed. São Paulo: Edgard Bluncher, 2005.

MARCANO L., CARRUYO I., Del Campo A., Montiel X. **Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L.** Environmental Research. 2004;94(2):221-6.

MENEGOL, S.; MUCELIN, C.A.; JUCHEN, C.R. **Avaliação de Características Físico-químicas do Leito do Rio Alegria**. Revista Sanare, vol.18, nº 8, Julho-Dezembro, Curitiba, 2002.

MOITA, R.; CUDO, K. **Aspectos gerais da qualidade da água no Brasil**. In: **REUNIÃO TÉCNICA SOBRE QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO E SAÚDE NO BRASIL, 1991, Brasília**. Anais... Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria do Meio Ambiente, 1991. p.1-6.

MONARCA S, FERETTI D, COLLIVIGNARELLI C, GUZZELLA L, ZERBINI I, BERTANZA G. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Res** 2000.

MOSCA, A. A; **Caracterização Hidrológica de duas Microbacias visando a identificação de indicadores hidrológicos para o monitoramento ambiental do manejo de florestas plantadas**. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura. São Paulo, 2003.

NETO, V. P. **Avaliação da qualidade da água de represas destinadas ao abastecimento do rebanho na Embrapa pecuária sudeste**. 2006. 40p. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Centro de recursos hídricos e ecologia aplicada, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2006.

NICOLE, M. M.; DONADO, J. A.; GALBIATTI, R. C. de P. **Qualidade da Água de Nascentes com Diferentes Usos do Solo na Bacia Hidrográfica Do Corrego Rico, São Paulo, Brasil**. **Eng, Agric** vol 25 n 1 Jaboticabal Jan/Apr 2005

NOVOTNY, V. **Water quality: diffuse pollution and watershed management**. New York: J. Wiley, 2003.

OLIVEIRA J. P. W., SANTOS R. N., PIBERNAT C. C., BOEIRA J. M. Genotoxicity and physical chemistry analysis of Waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**. 2012;1(1):15-22.

OLIVEIRA, T. M. **Diagnóstico da qualidade físico-química e biológica dos afluentes da bacia do alto rio Pirapó**. Dissertação (Mestrado) - UEM, Maringá, PR, 2004.

PINTO, F.B.D, SILVA, MA, MELLO, RC, COELHO, G **Qualidade da água do ribeirão Lavrinha da região alta Rio Grande –MG, Brasil**. **Cien. Agrotec**. Vol33 n 4 Lavras July/Aug 2009

PIAIA. A. A. **Perfil dos consumidores de água de poço artesiano na cidade de medianeira**. 2015 65 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2015.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemas. La formación de intercâmbios entre cromátidas hermanas**. 1987. 276f. Tese (Doutorado) - Universidade de Complutense, Madrid, 1987.

- RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v. 418, n. 2-3, p. 113-119, 1998.
- SILVA C.C., NASCIMENTO F.M. Citogenotoxicidade de amostras de água do Rio Tietê em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*. **Atas de saúde ambiental**. 2013;1(1):26-35.
- SILVA L.P., BOSSO A.A., CARDOSO S.C. Avaliação da Citotoxicidade da Própolis em Células Meristemáticas de *Allium cepa*. **UNOPAR Científica Ciências Exatas e Tecnológicas**. 2010;9(1):67-70.
- SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The Evaluation of Waste, Surface and Ground Water Quality Using *Allium* Test Procedure. **Mutation Research, Amsterdam**, 368(3-4): 171-179, jul. 1996.
- STRIEDER, M.N.; RONCHI, L.H.; NEISS, U.G. e OLIVEIRA, M.Z. 2003. **Avaliação dos efeitos de fontes de poluição pontual sobre os macroinvertebrados bentônicos no arroio Peão, RS**. In: L. H. RONCHI e O. G. W. COELHO (eds.), Tecnologia, diagnóstico e planejamento ambiental. São Leopoldo: Editora Unisinos, p. 61-85.
- SOUZA, M.; BACH, R. C.; CHIARELLO, A. S.; RAUBER, R.; ZINE, C; LINARTEVICH, V. F.; CARVALHO, I. Qualidade da água do Rio Alegria, Medianeira, Paraná. **Anais do III ENDICT – Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR Outubro de 2011.
- TELLES, D. D. A.; COSTA, R. H. G. P. **Reuso da Água: conceitos, teorias e práticas**. 2ª edição – São Paulo: Blucher, 2010
- TOLEDO, Luiz Gonzaga de and NICOLELLA, Gilberto. Índice de qualidade da água em microbacia sob uso do solo e urbano. **Sci. Agric (Piracicaba, Braz)**. 2002 vol 59 n1 pp 181-186
- VON SPERLING, M. **Princípios do Tratamento Biológico de Águas residuárias**. 3 ed. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/UFMG, Belo Horizonte, MG, 2005.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. 2ª Ed. São Carlos: RiMa, 117p. 2008.
- ZAMONER, M. **Bioindicadores, Relatores Ambientais** / Divulgação científica, disponível em: http://www.protexto.com.br/texto.php?cod_texto=371 Acesso em 24 de agosto de 2017.
- ZIMMERMANN, G. P. R. DALZUCHIO, T., GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta toxicol. argent.**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires , v. 24, n. 2, p. 97-104, sept. 2016