

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

ANA CAROLINA AZEVEDO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO EM VERTEDOUROS
LOCALIZADOS NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE CIDREIRA E TRAMANDAÍ
(RS-BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *Allium cepa***

**IMBÉ
2015**

ANA CAROLINA AZEVEDO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO EM VERTEDEOUROS
LOCALIZADOS NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE CIDREIRA E TRAMANDAÍ
(RS-BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *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

Azevedo Rocha, Ana Carolina
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO EM VERTEDEOUROS
LOCALIZADOS NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE CIDREIRA E
TRAMANDAÍ (RS-BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE
Allium cepa / Ana Carolina Azevedo Rocha. -- 2015.
49 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. Mutagênese. 2. Micronúcleos. 3. Sistema teste
em Allium cepa. 4. Região Costeira. 5. Sangradouros.
I. Casali, Emerson André, orient. II. Cardoso,
Valesca Veiga, coorient. III. Título.

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

ANA CAROLINA AZEVEDO ROCHA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO EM VERTEDEOUROS
LOCALIZADOS NAS PRAIAS DOS MUNICÍPIOS DE CIDREIRA E TRAMANDAÍ
(RS-BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA TESTE DE *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

Coorientadora: Profa. Dra. Valesca Veiga Cardoso

Aprovada em 11/12/2015

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Carmen C. R. Saavedra
Depto. De Genética, IB, UFRGS

Prof. Dr. Marcello Á. Mascarenhas
Lab. Mutagênese e Toxicologia, PPG Biociências, IPA

Prof. Dr. Ignácio Maria Benites Moreno
Coordenador da atividade de TCC 2

IMBÉ
2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos aqueles que tornaram meu objetivo realidade.

Aos meus pais, Osvaldo e Jussara, pela compreensão, preocupação e apoio financeiro, sem o qual a graduação teria sido apenas um sonho distante.

Aos meus irmãos, sobrinhos e cunhados, por demonstrarem apoio quando necessário.

Ao meu namorado, Guilherme, por todo apoio, auxílio e caronas.

Aos meus amigos e colegas de curso, por sempre me ajudarem, apoiarem e por terem feito destes quatro anos, os melhores da minha vida.

À Pousada da Manú, pelo acolhimento e ótimos vizinhos.

Ao meu grande amigo, colega e praticamente irmão, João Luiz, por todos o apoio, companheirismo e desabafos.

Aos amigos e colegas, Lou, Kênya e Maurício, por me ajudarem em análises e realização de coletas.

Aos meus amigos e orientadores de TCC, Emerson e Valesca, por toda a paciência, incentivo, auxílio, preocupação, e por terem me dado a honra de trabalhar ao lado deles.

À secretária, Marcinha, e bibliotecários do CECLIMAR, Stellinha e Ângelo, por sempre me receberem de braços abertos e com um sorriso no rosto, e me darem apoio nos momentos difíceis.

A todos os professores que me deram aula durante o curso, pelo crescimento intelectual e pessoal que me proporcionaram.

A mim mesma, por não ter desistido de tentar, mesmo quando alguns diziam que eu jamais conseguiria.

A todos vocês, o meu muito obrigada!

RESUMO

A contaminação dos vários ambientes por meio da ação antrópica pode resultar em consequências drásticas para a biota. Nas últimas décadas, os efeitos antrópicos advindos do aumento das populações humanas na região litorânea precisam ser avaliados de forma mais eficiente. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial mutagênico e genotóxico de efluentes coletados em vertedouros localizados nas praias dos municípios de Cidreira e Tramandaí, RS, Brasil, através do sistema teste em *Allium cepa* (cebola). Foram coletadas amostras de água em dois sangradouros de Cidreira e de Tramandaí, nos turnos manhã e tarde, nos meses de março e setembro de 2015, compreendendo as estações de verão e inverno, respectivamente. Posteriormente as amostras foram levadas ao laboratório onde bulbos de cebolas foram postos a germinar nas águas coletas afim de testar a seu efeito no meristema apical das cebolas através do método proposto por FISKESJÖ com a adaptação sugerida por MENEGUETTI *et al.* A análise consistiu na quantificação de micronúcleos e outras alterações nucleares, como brotos nucleares, células binucleadas, atrasos cromossômicos e pontes anafásicas e telofásicas. Foram feitas também análises físico-químicas das águas afim de correlacioná-las aos resultados obtidos com a microscopia. A citotoxicidade foi estimada pelo cálculo do índice mitótico. Os resultados apontam que todos os sangradouros de Tramandaí (P1 e P2), e um vertedouro de Cidreira (P1) apresentam potencial mutagênico na estação de verão, em comparação com o sistema controle. Constatou-se ainda, diferenciação no índice mitótico das raízes tratadas com todos os efluentes coletados no verão em relação ao controle. As análises físico-químicas demonstraram que existe grande aporte de matéria orgânica nos efluentes. Isso reforça a ideia de que o potencial citotóxico dos sangradouros é superior na estação de verão, quando a zona costeira recebe maior impacto, oriundo da ocupação humana. Sendo a zona costeira de extrema importância para diversas espécies, e tendo em vista os danos que os efeitos antrópicos podem causar a estes ambientes, sugere-se que estudos futuros de monitoramento ambiental, de mutagenicidade e citotoxicidade sejam realizados, afim de acompanhar as mudanças ambientais que ocorrem na face de praia em nosso litoral.

Palavras chave: Mutagenicidade. Micronúcleo. Sistema Teste em *Allium cepa*. Índice Mitótico. sangradouros.

ABSTRACT

Contamination of various environments by human activities can result in drastic consequences for biota. In recent decades, anthropogenic effects caused by increasing human populations in the coastal region need to be evaluated more efficiently. This study aimed to assess the mutagenic potential spillways located on the beaches of the municipalities of Cidreira and Tramandaí, RS, Brazil, through the test system in *Allium cepa* (onion). Water samples were collected in two spillways of Cidreira and Tramandaí in morning and afternoon shifts, in March and September 2015, including summer and winter samplings, respectively. Subsequently the samples were brought to the laboratory where onion bulbs were placed to germinate in water collected in order to test for mutagenicity via the method proposed by FISKESJÖ with the adjustment suggested by Meneguetti et al. The analysis consists of the quantification of micronuclei and other chromosomal abnormalities, such as nuclear buds, binucleated cells, chromosomal delays and anafásicas and telofásicas bridges. Also they were made, physico-chemical analysis of the collections, in order to correlate the results obtained. Cytotoxicity was estimated by calculating the mitotic index. The results show that all spillways Tramandaí (P1 and P2), and a spillway Cidreira (P1) have mutagenic potential in the summer season, compared to the control system. It was found further differentiation in mitotic index of the roots treated with all effluents collected in the summer compared to the control system. The physico-chemical analyzes showed that there is a high input of organic matter in the effluent. This reinforces the idea that the cytotoxic potential of spillways is higher in the summer season, when the coastal area receives greater impact, arising from human occupation. It is the coastal area of utmost importance for several species, and in view of the damage that anthropogenic effects can cause these environments, it is suggested that future studies of environmental monitoring, mutagenicity and cytotoxicity are performed in order to monitor environmental changes occurring on the beach face in our coast.

Keywords: mutagenicity. Micronucleus. Test system in *Allium* strain. Mitotic index. spillways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Municípios do Litoral Norte do RS.....	16
Figura 2 -	[Localização dos municípios de Cidreira e Tramandaí, RS].....	25
Figura 3 -	[Localização dos sangradouros amostrados no município de Cidreira.....	26
Figura 4 -	Primeiro sangradouro amostrado em Cidreira (Ponto 1).....	26
Figura 5 -	Segundo sangradouro amostrado em Cidreira (Ponto 2).....	27
Figura 6 -	[Localização dos sangradouros amostrados no município de Tramandaí].....	28
Figura 7 -	Primeiro sangradouro amostrado no município de Tramandaí (Ponto1).....	28
Figura 8 -	Segundo sangradouro amostrado no município de Tramandaí (Ponto 2).....	29
Figura 9 -	Realização de análises físico-químicas.....	31
Figura 10 -	Cultivo de <i>A. cepa</i> e preparação de lâminas.....	32
Figura 11 -	Alterações interfásicas.....	33
Figura 12 -	Alterações mitóticas.....	34
Figura 13 -	Gráfico do número de células alteradas na estação de verão.....	39
Figura 14 -	Comparação entre o n° de células alteradas, nos turnos de manhã e tarde, na estação de inverno.....	40
Figura 15 -	Comparação entre o n° de células com alterações, em todos os pontos amostrados e sistema controle.....	40
Figura 16 -	Comparação entre o IM no sistema controle e nas amostragens de verão e inverno.....	42
Figura 17 -	Comparação do IM nas amostras de verão, em turnos de manhã e tarde.....	42
Figura 18 -	Comparação do IM nas amostras de inverno, nos turnos manhã e tarde.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado das análises físico-químicas dos efluentes, referentes às coletas de verão e inverno.....36

Tabela 2: Resultados obtidos na análise de lâminas, referentes às coletas de verão e inverno de 2015.....38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVO GERAL.....	12
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
2	A ZONA COSTEIRA DO RIO GRANDE DO SUL	14
2.1	SANGRADOUROS E SANEAMENTO BÁSICO.....	16
2.2	QUALIDADE AMBIENTAL SEGUNDO A LEGISLAÇÃO.....	18
2.3	BIOINDICADORES E A QUALIDADE AMBIENTAL.....	19
2.4	<i>ALLIUM CEPA</i> COMO BIOINDICADOR.....	20
2.5	2.6 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA EM ESTUDOS AMBIENTAIS	22
2.5.1	Teste de micronúcleo (MN)	22
2.5.2	Índice de aberrações cromossômicas	23
2.5.3	Índice mitótico (IM)	24
3	ÁREA DE ESTUDO	25
3.1	AMOSTRAGENS NO MUNICÍPIO DE CIDREIRA.....	25
3.2	AMOSTRAGENS NO MUNICÍPIO DE TRAMANDAÍ.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	29
4.2	AMOSTRAGENS.....	29
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	30
4.4	CULTIVO E PREPARAÇÃO DE LÂMINAS.....	31
4.5	AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS.....	33
4.5.1	Alterações Interfásicas (AI)	33
4.5.2	Alterações Mitóticas (AM)	34
4.6	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	34
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

A zona costeira apresenta uma grande diversidade de nichos ecológicos, por tratar-se de uma região de interface entre os ecossistemas marinhos e terrestres. Segundo Vooren e Brusque (1999) a zona costeira é responsável pela provisão de habitats para uma grande variedade de espécies que fazem usos de recursos nesses locais.

Nas últimas décadas, os efeitos antrópicos advindos do aumento das populações humanas permanentes ou sazonais na região litorânea precisam ser avaliados de forma mais eficiente. Muitas mudanças ambientais ocorreram devido à utilização de nossas tecnologias e urbanização. A contaminação dos vários ambientes por meio da ação antrópica pode resultar em consequências muitas vezes irreversíveis para a biota. Dessa forma, todos os organismos que interagem com esse ambiente estão sujeitos a modificações genômicas decorrentes da poluição (PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009).

Apesar das mutações serem processos naturais que atuam na evolução das espécies, quando aumentadas por influência de elementos naturais ou artificiais, à curto prazo, tornam-se prejudiciais, já que perturbam o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos dos organismos (ALBERTS *et al.* 2002). Dessa forma, alterações nos índices de divisão celular e/ou na estrutura do DNA podem ser extremamente prejudiciais às células, podendo dificultar processos indispensáveis à vida, como replicação e transcrição do DNA, assim como causar aberrações cromossômicas e mudanças no material genético. A detecção da presença de elementos mutagênicos e seus efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal e vegetal (COSTA; MENK, 2000).

Organismos testes são empregados em metodologias de laboratório altamente padronizadas, cujos resultados são também altamente reprodutíveis. Estas metodologias têm sido amplamente utilizadas no monitoramento da qualidade da água (MACHADO, 2013). *Allium cepa* possui alta sensibilidade à contaminação que passa despercebida por testes físico-químicos, mesmo quando misturas complexas, como esgotos, são testadas. É recomendado para uma avaliação rápida de genotoxicidade de efluentes, podendo ser usada como padrão em monitoramentos ambientais, a fim

de buscar a localização da fonte contaminadora, identificando também influências de baixa concentração de substâncias genotóxicas e citotóxicas (DE OLIVEIRA; VOLTOLINI; BARBÉRIO, 2011). Uma substância pode ser considerada mutagênica quando esta possui efeito tóxico que danifica, especificamente, o material genético da célula, ocasionando mudanças no DNA ou nos cromossomos. A mutagenicidade química de uma substância pode ser avaliada por diversos modos de ação, tais como: reação direta com o DNA do núcleo; incorporação do DNA durante a replicação celular; interferência na divisão celular mitótica ou meiótica, decorrendo em divisão incorreta e presença de anormalidades e micronúcleos nas células. Já a avaliação da citotoxicidade de uma substância permite observar os efeitos tóxicos ou anti-proliferativos da amostra teste em culturas celulares (MATSUMOTO, 2006).

A formação de fragmentos de material genético, denominados de micronúcleos, é um dos parâmetros mais utilizados na bioindicação de substâncias mutagênicas. Micronúcleos surgem em decorrência da atividade de agentes clastogênicos, que causam quebras cromossômicas. A genotoxicidade estuda esses agentes, que induzem à lesão a nível célula e molecular (BERCES *et al.*, 1993).

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho buscou avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos em células meristemáticas de *Allium cepa* cultivadas em efluentes coletados em vertedouros localizados nas praias dos municípios de Cidreira e Tramandaí, nas estações de verão e inverno.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

- a) determinar a quantidade de alterações nucleares em 1000 células meristemáticas de *Allium cepa* germinadas nas amostras dos vertedouros;
- b) verificar se há significância estatística na quantidade de anormalidades entre as amostras de uma coleta e o sistema controle e entre as coletas de verão e inverno;

- c) avaliar se ocorre diferenças na quantidade de alterações nucleares e cromossômicas nos diferentes turnos amostrados (manhã e tarde);
- d) avaliar a qualidade da água com a utilização de dados físico-químicos;
- e) comparar os dados físico-químicos entre os diferentes sangradouros, nos diferentes turnos (manhã e tarde) e diferentes estações (inverno e verão);
- f) correlacionar os resultados físico-químicos com as avaliações mutagênicas

2. A ZONA COSTEIRA DO RIO GRANDE DO SUL

Zona Costeira pode ser definida como o espaço delimitado pela interface entre o oceano e o continente, ou seja, é a faixa terrestre que sofre influência marítima, bem como a faixa marítima que recebe influencia terrestre (RODRIGUEZ; WINDEVOXHEL, 1998). Já para a Comissão Interministerial para os Recursos do Mar, a Zona Costeira é definida como espaço geográfico de interação entre mar, terra e ar, incluindo seus recursos renováveis ou não, abrangendo uma faixa marítima e outra terrestre (CIRM, 2001)

A zona costeira do Rio Grande do Sul é caracterizada por uma linha de costa retilínea, com orientação Nordeste-Sudoeste, tendo à frente sucessões de cordões litorâneos regionalmente conhecidos como barreiras. Esses cordões são ainda recorbertos por extensos campos dunares em muitos pontos, que programam sobre banhados e conjuntos de lagoas e lagunas costeiras (VILLWOCK; TOMAZELLI, 1995). Com cerca de 640 km de costa, a associação entre a morfologia da plataforma continental, o regime de micromaré e a altura significativa de ondas (em torno de 1,5 m), faz com que o litoral gaúcho seja um exemplo de barreira dominada por ondas. Com exceção de Torres, que possui formação rochosa composta por arenitos, basaltos e sequencias Vulcano-clásticas, que conferem proteção à dinâmica costeira, as praias ao longo da costa do RS são totalmente expostas e desprotegidas dessa dinâmica, sendo predominantemente compostas de areia fina de quartzo, apresentando baixa declividade, com poucos cúspides praias (CALLIARI; TOLDO JR; NICOLODI, 2006). A presença de poucas desembocaduras fluviais e lagunares fixadas pela antropização introduzem alterações locais nos padrões morfodinâmicos, tornando as praias mais dissipativas, em decorrência do aposte de sedimentos mais finos em suas adjacências (VILLWOCK; TOMAZELLI, 1995).

Outra feição muito comum em praias dissipativas dominadas por ondas são as dunas frontais, que são definidas como cordões paralelos à linha de praia, formadas logo após o pós-praia. São formadas quando sedimentos, quase sempre de granulometria fina, são transportados pelo vento e ficam depositados no local, quando estes encontram alguma barreira, geralmente representada pela vegetação. Outra feição característica na costa do RS são os sangradouros, que são cursos d'água de

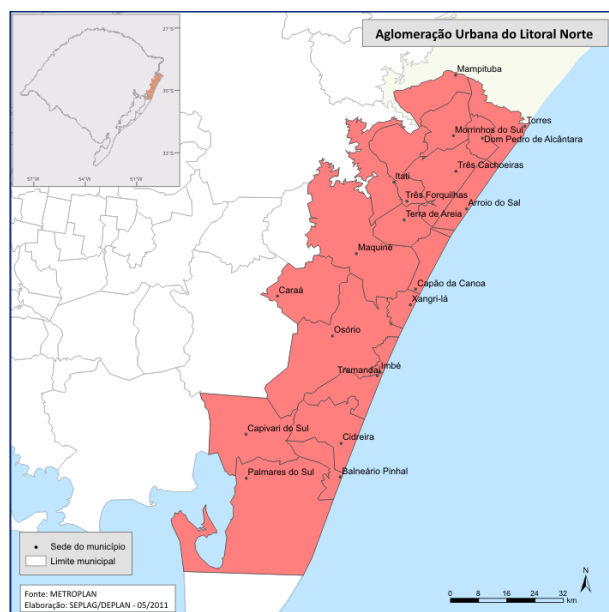
pequena escala, que desempenham papel fundamental na drenagem da região costeira e remobilização de sedimentos da área das dunas e zona de estirâncio (CALLIARI et al., 2005).

Praia pode ser considerada como uma acumulação de sedimentos inconsolidados, que se estendem entre a zona mais próxima de quebra de ondas com o limite de espraiamento de ondas de tempestades e de marés sobre o continente, sendo a última de importância secundária, se estendendo até feições que alteram a fisiografia, como campos de dunas frontais ou falésias (HOEFFEL, 1998). Uma praia pode ser definida de diversas formas, mas sob qualquer conceituação, um fato inegável é a sua crescente importância ambiental, seja como lazer ou ainda, como reconexão do ser humano com o planeta terra. As praias podem ser consideradas elementos chave no planejamento turístico de uma região, uma vez que são o principal destino turístico (NICOLODI, 2002). Nos últimos anos, tem crescido o investimento do Brasil nas regiões costeiras, e com isso, vem aumentando a população residente nessas regiões.

A ocupação da costa do RS esteve restrita ao acesso portuário até o final do século XIX. Antes deste período a ocupação no estado foi mais desenvolvida no extremo sul, devido ao canal da Laguna dos Patos, local onde atualmente encontra-se o Porto de Rio Grande. Isso ocorreu devido às peculiaridades morfológicas da costa, por ser desabrigada da ação das ondas e possuir uma plataforma continental rasa. O processo de ocupação da Planície Costeira do RS é recente, porém acelerado e basicamente focado na região definida como Litoral Norte, pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental-FEPAM (KUERTEN, 2008).

O Litoral Norte (Figura 1) abrange 19 municípios (de Balneário Pinhal até Torres), com economia predominantemente associada a atividades turísticas de veraneio. Isso confere à região características de grande variação sazonal da população e intensa urbanização (FEPAM, 2002).

Figura 1: Municípios do Litoral Norte do RS



Fonte: FEPAM, 2002.

A aceleração na ocupação do litoral norte começou a ocorrer em 1960, devido à construção das principais vias de acesso, como RS-040 (ligando Porto Alegre e região metropolitana à Cidreira e regiões vizinhas) e BR-116, também conhecida como Freeway (ligando Porto Alegre às demais praias do litoral Norte). Essa facilidade de acesso causou uma ocupação desenfreada na Zona Costeira, causando impactos diretos na orla. Alguns dos efeitos de impactos ocorridos pelo processo de ocupação desenfreado podem ser vistos atualmente, como remoção de dunas frontais, urbanização da orla, impermeabilização do solo, construções irregulares e contaminação de balneários e lençol freático (KUERTEN, 2008).

2.1 SANGRADOUROS E O SANEAMENTO BÁSICO

Ao longo da costa do RS existem poucas descargas fluvio-lagunares importantes (DE FIGUEIREDO; CALLIARI, 2005). Porém observa-se grande quantidade de sangradouros que realizam parte da drenagem da planície costeira propiciando escoamento às águas pluviais e que são coletadas nas depressões e banhados localizados entre cordões litorâneos, assim como em locais de pouco relevo, geralmente localizados após dunas frontais (PEREIRA DA SILVA; CALLIARI, 1997). Acredita-se que esses pequenos cursos d'água podem afetar a região entre o campo de dunas mais interiores e a face de praia, levando em consideração seus

processos relativos à erosão, transporte e deposição de sedimentos, de forma a causar desestabilização de dunas frontais, levando esses sedimentos para a zona de surfe e deriva litorânea (PEREIRA DA SILVA, 1998).

Apesar de sangradouros serem cursos d'água naturais, que resultam da drenagem pluvial acumulada no campo de dunas, o estado poluidor destes, ocorrerá em caso de interferência antrópica, pela liberação de esgoto e demais efluentes na drenagem pluvial, que é direcionada ao oceano (DE FIGUEIREDO & CALLIARI, 2005). Ligações clandestinas de esgotos domésticos a sangradouros são comumente encontrados no Litoral Norte, em praias cuja a concentração de sangradouros é elevada.

A qualidade dos ecossistemas aquáticos tem sido a mais prejudicada, em âmbito mundial, devido à grande variedade de resíduos que são produzidos e lançados no meio ambiente, dentre os quais, muitos possuem grande potencial tóxico (MARQUES; MORAES; MAURAT–1985). Uma das principais características dos ecossistemas aquáticos, é a interação entre os fatores químicos, físicos e biológicos. A poluição orgânica nesses ecossistemas é comum, seja ela advinda de atividades agropecuárias, industriais ou domésticas. A matéria orgânica é naturalmente degradada pela ação de microrganismos. Porém, se a quantidade de matéria orgânica presente no efluente exceder a capacidade de gradação do sistema, ela tende a se acumular no ambiente (MARQUES; MORAES; MAURAT,–1985).

A presença de esgotos vinculado a sangradouros nas praias dos municípios de Cidreira e Tramandaí se dá por inúmeros fatores, como inexistência de sistema de coleta e disposição de efluentes domésticos gerados nessas regiões, a presença de córregos afluindo ao mar, o aumento da população durante os períodos de veraneio, a fisiografia das praias, a ocorrência de chuvas e as condições de micromaré (ARNAIZ, 1997). A coleta de esgoto cloacal por rede pública nesses municípios ocorre em pequena proporção, ainda predominando nas habitações as instalações sanitárias conectadas a fossas sépticas. O sistema de fossa, filtro e sumidouro é visto como econômico e eficiente na eliminação de efluentes domésticos, desde que apresente manutenção e limpeza periódicas, além de solos compatíveis ao processo de esgotamento cloacal (STROHARCKER, 2007).

De acordo com a Companhia Riograndense de Saneamento (CORSAN) será feita a ampliação do sistema de esgotamento sanitário no município de Tramandaí, com implantação de redes coletoras e de estações de bombeamento, além de

ligações prediais. Planejam também realizar a implantação e ampliação da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), pretendendo que o índice de tratamento de esgoto passe a ser 50% no município. O município de Cidreira também terá sua rede de esgotos substituída pela CORSAN, além de realizar uma ampliação na estação de bombeamento e de tratamento de esgotos. Porém, até que essas mudanças ocorram, a descarga de efluentes continuará sendo motivo de preocupação para os ambientalistas, uma vez que pode vir a causar um desequilíbrio ambiental por meio da contaminação da linha de praia e bioacumulação em organismos que ali habitam.

2.2 QUALIDADE AMBIENTAL SEGUNDO A LEGISLAÇÃO

Um padrão de qualidade ambiental é um limite (definido por leis, normas ou resoluções) para perturbações ambientais, em particular, da concentração de resíduos e poluentes, que determina a máxima degradação que pode ser permitida ao meio ambiente. A normativa brasileira, sobretudo as Resoluções do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), fornece marcos legais para subsidiar o controle e monitoramento de padrões referentes aos temas ambientais, como ar, água, solo, biodiversidade, entre outros.

A legislação ambiental no Brasil ainda é muito ampla. Isso pode ser comprovado ao compararmos os limites de poluentes ambientais, principalmente aquáticos, que são permitidos em países da Europa e EUA, com as quantidades permitidas em nosso país (que são superiores, permitindo índices maiores de poluentes). Além de terem uma fiscalização pouco efetiva e mínima efetividade de medidas mitigadoras em questões de degradação ambiental (GOULART; CALLISTO, 2003).

Nas últimas décadas, todos os ecossistemas - principalmente os aquáticos - têm sofrido alterações significativas em função de múltiplos impactos advindos de atividades antrópicas, como mineração, construção de represas e barragens, retilinização e desvio de cursos naturais de rios, lançamento de efluentes domésticos e industriais não tratados, uso inadequado do solo e desmatamento, superexploração de recursos pesqueiros, introdução de espécies exóticas, entre outros. Em consequência de tais atividades, observa-se uma grande diminuição na qualidade da água, além da perda de biodiversidade aquática. Isso ocorre devido a destruição do

ambiente físico, químico e alteração da dinâmica natural da comunidade biológica (GOULART; CALLISTO, 2003).

Segundo a Resolução n.01 do CONAMA (BRASIL, 1986) impacto ambiental pode ser definido como qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, resultante de atividades antrópicas que, direta ou indiretamente, afetem a saúde, a segurança e o bem-estar da população, as atividades sociais e econômicas, a biota, as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais. A qualidade da água passou a ser regulamentada a partir da Resolução n.357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA (BRASIL, 2005). Essa Regulamentação classifica as águas e determina seus parâmetros físicos e químicos toleráveis, buscando controlar a disposição de poluentes no meio em níveis que não tragam riscos aos organismos (BARBÉRIO *et al.*, 2009). Contudo, existe a preocupação de que mesmo em níveis de tolerância estabelecidos, ocorra efeitos genotóxicos significativos em organismos que habitam esses ambientes aquáticos (MATSUMOTO *et al.*, 2006).

A avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos tem sido realizada através de medições em alterações nas concentrações de variáveis químicas, físicas e microbiológicas (geralmente investigando a presença de coliformes totais e fecais). Porém, as comunidades biológicas refletem a integridade ecológica total do ecossistema (integridade química, física e biológica), unindo todos os diferentes efeitos causados nos seres vivos, pelos agentes impactantes, propiciando um medida agregada dos impactos (BARBOUR *et al.*, 1999).

2.3 BIOINDICADORES E A QUALIDADE AMBIENTAL

As comunidades biológicas- principalmente as aquáticas- são formadas por organismos que possuem adaptações evolutivas de acordo com determinadas condições ambientais do meio que habitam, bem como apresentam limites de tolerância a diferentes alterações dessas condições (ALBA-TERCEDOR, 1996). Assim, o monitoramento biológico torna-se uma importante ferramenta na avaliação de respostas destas comunidades biológicas a modificações nas condições originais do ambiente.

O biomonitoramento é principalmente realizado através da aplicação de diferentes protocolos de avaliação, índices multimétricos e biológicos, tendo como

base a o uso de indicadores biológicos de qualidade da água e do hábitat. Os métodos mais utilizados envolvem o levantamento e avaliação de modificações na riqueza de espécies e índices de diversidade, abundância de organismos resistentes, perda de espécies sensíveis, medidas de produtividade, sensibilidade a concentração de toxinas (ensaios ecotoxicológicos), entre outros (BARBOUR et al., 1999).

Geralmente, a avaliação de impactos ambientais tem se concentrado nos efeitos de toxinas emitidas por fontes pontuais sobre a saúde humana (KARR; CHU, 1997). A avaliação preliminar de riscos ecológicos, é realizada através do monitoramento ambiental de ecossistemas em risco. Porém, em função da grande diversidade de impactos sobre esses ecossistemas, o controle ambiental deveria envolver uma abordagem integrada, envolvendo todas as diferentes áreas de indicação de qualidade ambiental, como análises químicas, físicas, microbiológicas, comunidades biológicas naturais, bem como ensaios de ecotoxicidade.

2.4 ALLIUM CEPA COMO BIOINDICADOR

A antropização tem ocasionado a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como efluentes domésticos, industriais e agrotóxicos, que possuem alta carga de matéria orgânica, bem como substancias eutrofizantes e carcinogênicas (ARAÚJO et al., 2001). A contaminação dos vários ambientes por meio dessa contaminação pode ocasionar efeitos muitas vezes irreversíveis nos ecossistemas.

Todos os organismos que estão em interação com o meio ambiente, estão sujeitos a sofrerem influencia desse meio e, essa influência, por sua vez, pode vir a ocasionar mudanças genômicas nesses seres (MINISSI; LOMBI, 1997). Modificações no índice mitótico ou na estrutura do DNA são algumas das alterações que podem ser ocasionadas por poluentes, e que são extremamente prejudiciais as células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, como duplicação do DNA e transcrição gênica. Também podem ocasionar mutações genéticas e aberrações cromossômicas, podendo levar ao desenvolvimento de processos cancerosos ou morte celular (COSTA; MENK, 2000).

Impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e saúde humana, por vezes, não são observados e medidos diretamente, e, por este motivo, precisam ser analisados através de metodologias de detecção eficientes (SILVA; FONSECA, 2003). Os bioensaios feitos com

plantas são considerados bastante eficientes, por conta da grande sensibilidade das plantas, e da simplicidade na preparação dos testes (PERON; CANESIN; CARDOSO, 2009).

Estes testes têm sido avaliados por instituições internacionais, como a United Nations Environmental Program (UNEP), World Health Organization (WHO) e US Environmental Protection Agency (USEPA), pela sua eficiência no monitoramento dos efeitos genotóxicos e mutagênicos induzidos por poluentes (GRANT, 1999).

Allium cepa (cebola) é vista como um importante organismos- teste de mutagenicidade (MORAIS; QUINZANI-JORDAO, 2002). Este sistema tem sido muito utilizado na avaliação do potencial citotóxico e mutagênico de efluentes, e considerado bastante eficiente na detecção de alterações no índice de divisão celular (índice mitótico) e presença de aberrações cromossômicas, em resposta a agentes presentes nos poluentes. A eficiência desse sistema é devida as características do organismos, como a cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de raízes, ao grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante todo o ano, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em menor número ($2n- 16$) (FISKEJÓ, 1994).

O sistema de *Allium cepa* fornece dois tipos de informações sobre toxicidade. Em escala macroscópica, pode-se observar a formação de tumores, avaliar o crescimento de raízes e a presença de raízes torcidas. A nível microscópico, a análise da taxa de divisão celular pode ser definida pelo índice mitótico. Também é possível observar e avaliar alterações cromossômicas, que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase, além da formação de micronúcleos, como indicadores de anormalidades no DNA (MORARCA *et al.*, 2000).

2.5 AVALIAÇÃO DA AÇÃO MUTAGÊNICA EM ESTUDOS AMBIENTAIS

Os seres vivos estão frequentemente expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas no DNA. Estas modificações na estrutura do DNA são prejudiciais às células, pois podem prejudicar processos vitais, como duplicação do DNA e a transcrição gênica. Também podem causar mutações e aberrações cromossômicas, alterações estas que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos e morte celular (COSTA; MENK, 2000). Por causarem lesões no material genético e serem potencialmente geradores de tumores em seres humanos, esses agentes são conhecidos como genotóxicos ou carcinogênicos. A presença destes agentes no ambiente vem sofrendo um crescente aumento devido as atividades humanas, seja a rural, industrial ou urbana (COSTA; MENK, 2000). Todos os organismos possuem mecanismos que reparam, revertem, ou ao menos toleram a persistência da lesão. O reparo por excisão de nucleotídeos (NER-nucleotideexcisionrepair) é uma forma de reparo geral, que reconhece e remove lesões que distorcem a dupla hélice em processo multi-enzimático (PETIT; SANCAR, 1999). Depois do reconhecimento, o segmento de DNA ao redor da lesão é removido, formando uma lacuna, que posteriormente é reenchida por meio da polimerização de uma nova fita, usando como molde a fita não danificada e sua posterior ligação (COSTA; MENK, 2000).

2.5.1 Teste de micronúcleo (MN)

Um parâmetro muito utilizado na bioindicação é a formação de micronúcleos, que nada mais são, do que fragmentos de material genético. Estes fragmentos ocorrem devido a atividade de agentes clastogênicos. Agentes clastogênicos são aqueles que induzem quebras cromossômicas (BERCES et al., 1993). O sistema de reparo do DNA é bastante afetado por íons metálicos que promovem danos na estrutura genômica, formando micronúcleos e “blebs” celulares, estes últimos característicos de apoptose (STOHS et al., 2000).

O teste de micronúcleos em raízes de *Allium cepa* (cebola), é considerado um dos melhores métodos utilizados para estudos de biomonitoramento relacionado aos efeitos mutagênicos (GAVRONSKI, 2008). Este ensaio avalia, pela presença de porções de cromatina intracitoplasmática, a possibilidade de indução de quebras ou

de perda de cromossomos inteiros, caracterizando, dessa forma, o potencial mutagênico do agente estudado (MACHADO, 2013).

O micronúcleo consiste em uma pequena porção citoplasmática de cromatina, que possui forma oval ou redonda, localizada perto do núcleo. Sua formação resulta de uma lise (quebra) na molécula de DNA, dias ou semanas após a ação de agentes mutagênicos, quando as células da camada basal da raiz estão em divisão (STICH; ROSIN, VALLEJERA, 1984). Portanto, são constituídos de fragmentos de cromátides ou cromossomos acêntricos ou aberrantes que não foram incluídos no núcleo principal após a finalização da divisão mitótica (STICH; ROSIN, 1983). Assim, micronúcleos refletem a incidência de eventos genotóxicos sobre organismos vivos (BELIËN *et al.*, 1995).

2.5.2 Índice de aberrações cromossômicas

Uma ferramenta muito utilizada em estudos de avaliação mutagênica é o teste de aberrações cromossômicas (MACHADO, 2013). Esse teste é baseado na citogenética clássica, sendo um dos poucos métodos diretos utilizados para mensurar mutações em sistemas expostos a mutágenos ou carcinógenos potenciais (RANK *et al.*, 2002).

Aberrações interfásicas (como micronúcleos, brotos celulares e células binucleadas) e mitóticas (como atrasos cromossômicos e pontes anafásicas e telofásicas) são exemplos de alterações cromossômicas que podem ser consideradas evidências de efeitos mutagênicos, promovidos por agentes clastogênicos (que promovem quebras no DNA) ou aneugênicos (que induzem aneuploidias ou segregação cromossômica anormal) (VIDAKOVIĆ-CIFREK *et al.*, 2002).

2.5.3 Índice mitótico (IM)

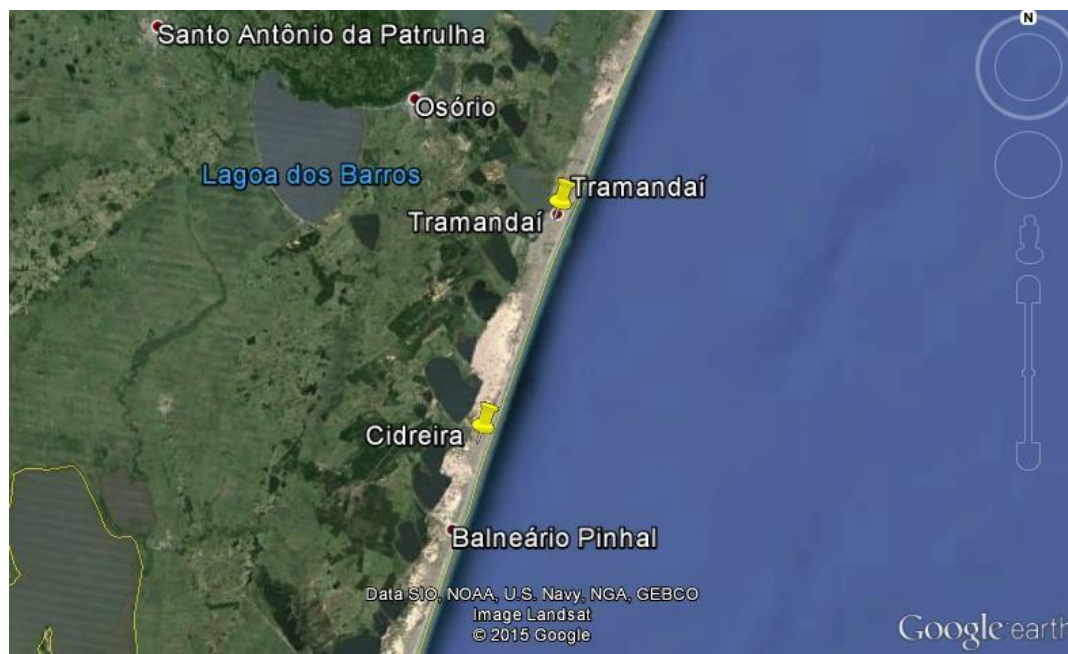
Para análises cromossômicas mitóticas o meristema radicular de plantas é o mais utilizado, por apresentar maior volume celular e crescimento rápido. Além disso, as pontas das raízes possuem a capacidade de absorver mais rápida e facilmente as soluções onde são mergulhadas, deixando mais sensíveis aos constituintes das soluções (GUERRA; SOUZA, 2002).

Modificações no índice mitótico de culturas celulares podem indicar diferentes causas e danos, de acordo com as diversas substâncias as quais as raízes estão submetidas. Índices mitóticos significativamente menores em relação ao controle negativo indicam alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento das raízes expostas. Já índices maiores, resultantes do aumento da divisão celular, podem indicar prejuízos às células, levando a proliferação desordenada e, podendo ocasionar a formação de tumores (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

3 ÁREA DE ESTUDO

As amostras foram coletadas em sangradouros, localizados nas praias dos municípios de Cidreira e Tramandaí (Figura 2), RS, Brasil.

Figura 2: [Localização dos municípios de Cidreira e Tramandaí, RS]



Fonte: Google (2015)

3.1 AMOSTRAGENS NO MUNICÍPIO DE CIDREIRA

As coletas foram realizadas em dois sangradouros, localizados no município de Cidreira, RS, Brasil. O primeiro sangradouro amostrado (Ponto 1) (Figura 3) está localizado nas coordenadas $30^{\circ} 10' 33,8''$ Sul e $50^{\circ} 12' 7,4''$ Oeste. Já o segundo sangradouro amostrado (Ponto2) está localizado nas coordenadas $30^{\circ} 10' 23,3''$ Sul e $50^{\circ} 12' 4,1''$ Oeste (Figura 4).

Figura 3- [Localização dos sangradouros amostrados no município de Cidreira



Fonte: Google (2015)

O primeiro sangradouro (Ponto 1) está localizado próximo a guarita de salvavidas 181. É formado por um canal artificial que liga corpos d'água costeiros e efluentes domésticos à beira da praia. No seu entorno, encontram-se residências e bares á beira-mar. O vertedouro é bem desenvolvido, provocando determinada erosão na costa, chegando até o mar. O local é utilizado indevidamente como depósito de resíduos de materiais de construção. No local, além dos resíduos de construção, havia também resíduos urbanos em geral, como sacos plásticos, garrafas, latas de refrigerante, entre outros.

Figura 3- Primeiro sangradouro amostrado em Cidreira (Ponto 1)



Fonte: O autor, 2015

O segundo sangradouro amostrado em Cidreira (Ponto 2) era bastante similar ao primeiro, porém, era mais bem desenvolvido. Formado por dois canais artificiais, que eram abastecidos com água de corpos d'água costeiros e efluentes domésticos dos arredores. Na localidade eram observadas residências. O vertedouro também era utilizado irregularmente como depósito de resíduos de construção. A região onde o canal artificial se encontra ocupa um espaço originalmente ocupado por dunas frontais. É possível ainda, observar uma camada mais escura no sedimento, indicando que o corpo hídrico recebe altas cargas de matéria orgânica.

Figura 4 –Segundo sangradouro amostrado em Cidreira (Ponto 2)



Fonte: O autor, 2015

3.2 AMOSTRAGENS NO MUNICÍPIO DE TRAMANDAÍ

Foram realizadas amostragens em dois sangradouros localizados na praia do município de Tramandaí (Figura 5), RS, Brasil. O primeiro vertedouro amostrado (Ponto 1) localiza-se nas coordenadas 29° 59' 33" Sul e 50° 7' 35" Oeste. O segundo vertedouro amostrado (Ponto 2) localiza-se nas coordenadas 29° 59' 42,7" Sul e 50° 0,7' 39,2" Oeste.

Figura 5- [Localização dos sangradouros amostrados no município de Tramandaí



Fonte: Google (2015)

O primeiro vertedouro amostrado em Tramandaí (Ponto 1), localiza-se próximo à guarita de salva-vidas 146. O sangradouro se formava por meio de quatro canais artificiais, que partiam da parte inferior do calçadão, à beira-mar. Era observável que o efluente possuía mau cheiro e coloração escurecida. Em seu entorno encontra-se bares e o calçadão. No momento da coleta, pequenos peixes foram observados no vertedouro.

Figura 6: Primeiro sangradouro amostrado em Tramandaí (Ponto 1)



Fonte: O autor, 2015

O segundo vertedouro amostrado localizava-se próximo à guarita de salvavidas 148 de Tramandaí. Este era menos desenvolvido, e partia de um canal artificial, construído na parte inferior do calçadão. Em seu entorno localizavam-se bares, ao passo que não havia a presença de dunas frontais, pois estas foram removidas para a construção do calçadão. No vertedouro foi possível observar a presença de lodo se formando no solo, junto à ocorrência de limo. O sangradouro apresentava alterações de coloração (esverdeado e escuro) e de odor.

Figura 7- Segundo sangradouro amostrado em Tramandaí (Ponto 2)



Fonte: O autor, 2015

4 MATERIAL E MÉTODOS

A avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade foi realizada através do método de *Allium cepa*, proposto por FISKESJÖ, com adaptação sugerida por MENEGUETTI *et al.* Foram ainda realizadas análises físico-químicas, a fim de dar suporte às investigações biológicas.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Para a avaliação da ação mutagênica dos sangradores de Cidreira e Tramandaí, foram utilizados 36 bulbos de *Allium cepa* (cebola)

4.2 AMOSTRAGENS

As amostras foram coletadas em março e setembro de 2015, compreendendo as coletas de verão e inverno, respectivamente. As amostragens seguiram os padrões

estabelecidos pela NBR 9897¹ e NBR 9898². Portanto, seguindo as normas, as coletas foram realizadas em 2 turnos diferentes, com intervalo de 8h entre cada amostragem, compondo um total de 2 amostras por vertedouro, por estação do ano.

As amostras de água foram coletadas na desembocadura dos canais, pretendendo-se obter o efluente “*in natura*”, evitando-se alterações que pudessem ocorrer devido as interações com o meio (como contato com a areia da praia, resíduos ou rochas). As coletas foram realizadas utilizando-se frascos plásticos esterilizados. Após a coleta, os frascos eram mantidos em refrigeração até o momento de serem analisadas e utilizadas no teste. No momento da coleta, eram coletados os dados de pH e temperatura da água.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Para as análises químicas foram utilizados kits comerciais para água doce e salgada (Sera™). Foram realizadas análises de oxigênio dissolvido (OD), nitrito (NO₂-), nitrato (NO₃-), amônia tóxica (NH₃), fosfato (PO₄³⁻), ferro (Fe) e cobre (Cu). No momento da coleta foram coletados os dados físicos de pH e temperatura da água, com a utilização de pHmetro e termômetro, respectivamente.

Os testes foram realizados no 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 conforme as instruções do fabricante. A leitura dos resultados era feita com base em tabelas de cores, também parte integrante dos testes.

¹ASSOCIAÇÃO 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 8- Realização de análises físico-químicas

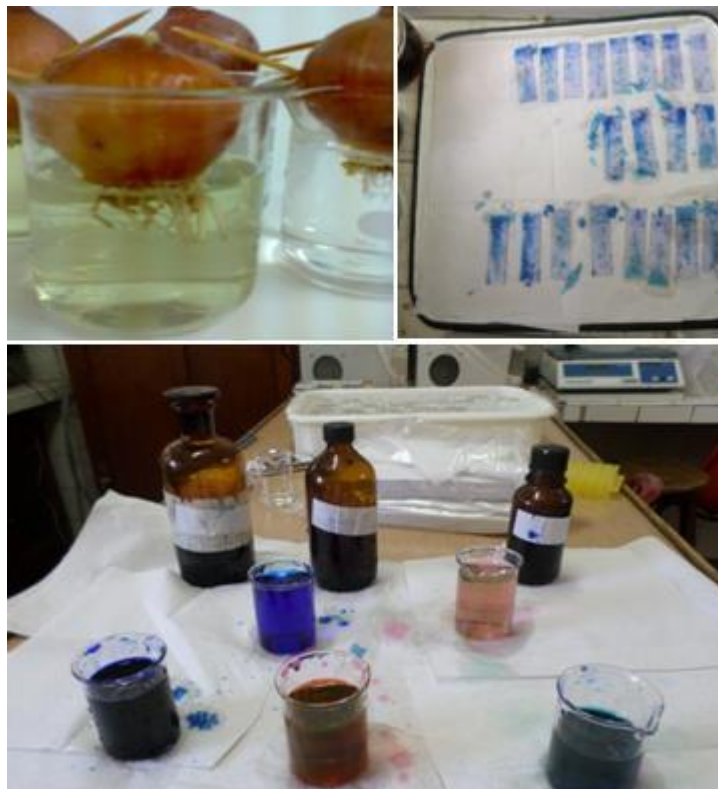


Fonte: O autor, 2015

4.4 CULTIVO E PREPARAÇÃO DE LÂMINAS

Para avaliar a ação mutagênica, foram utilizados 36 exemplares de *Allium cepa* (18 por estação do ano), pequenos, uniformes, não germinados, saudáveis, de mesma origem, adquiridos em um mercado no município de Porto Alegre. As raízes secas foram removidas, e 16 bulbos foram postos a germinar nas águas coletadas, sobre béqueres de 50 ml, com suas partes inferiores mergulhadas nas águas coletadas. O sistema teste foi reservado para germinação das raízes, protegidos de luz solar direta. Para cada amostra de efluente (4 vertedouros, manhã e tarde, totalizando 8 amostras de água) foram utilizadas 2 réplicas. O sistema controle foi constituído por 2 bulbos germinando em água destilada. Dessa forma, totalizando 18 bulbos por estação.

Figura 9- Cultivo de *A. cepa* e preparação de lâminas



Fonte: O autor, 2015

As raízes eram coletadas quando atingiam um comprimento de 0,5 a 3 cm, e logo após, eram lavadas com água destilada. Após a coleta de raízes, utilizando-se lupa, a ponta das raízes, correspondente ao meristema apical, era retirada e colocada em tubos plásticos contendo HCl a 1 mol/L. Logo após, os tubos eram submetidos à banho-maria, por 10 min, a 60°C, para que a hidrólise fosse realizada. Após o banho-maria, as raízes eram resfriadas em água corrente. Por fim, era realizado o esfregaço das raízes em lâminas histológicas. Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, estas eram coradas, utilizando-se o Kit Panótico Rápido LB. Este kit é composto por três diferentes corantes (triarilmetano a 0,1%, xatenos a 0,1% e tiazinhas a 0,1%). As lâminas eram mergulhadas 2 vezes em cada um dos corantes, seguindo a sequência descrita anteriormente, e, ao fim da coloração, eram lavadas com água deionizada (pH 7,0). Por fim, as lâminas eram secas à temperatura ambiente para posterior análise.

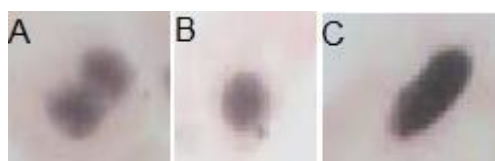
4.5 AVALIAÇÃO DAS LÂMINAS

A avaliação das aberrações cromossômicas constitui na observação de alterações interfásicas e mitóticas. A contagem foi realizada em microscopia ótica, pelo método de varredura, com objetiva de 40x e ocular de 10x, tendo um aumento de 400x. Foram avaliadas 1000 células por amostra, totalizando a contagem de 18.000 células, sendo dois sangradouros por município, com amostras de manhã e tarde, nas duas estações do ano, mais as lâminas controle.

4.5.1 ALTERAÇÕES INTERFÁSICAS (AI)

Intérfase é chamado o período em que a célula não está em divisão. As alterações interfásicas observadas foram micronúcleos (MN), células binucleadas (BN) e brotos nucleares (BR). Era reconhecido como micronúcleo as células que possuíssem um pequeno corpúsculo, que deveria obedecer aos seguintes critérios: (a) o corpúsculo deveria ter contorno regular, oval ou redondo e estar dentro do citoplasma da célula; (b) sua coloração deveria ser semelhante a do núcleo principal; (c) seu diâmetro deveria ser menor que 1/3 do diâmetro do núcleo principal; (d) deveria estar no mesmo plano de foco do núcleo principal; (e) estar separado ou marginalmente justaposto ao núcleo principal, de modo que haja identificação clara do limite nuclear de ambos os núcleos (MACHADO, 2013). Brotamentos foram identificados quando haviam anormalidades no núcleo principal da célula, como núcleos alongados ou com protuberâncias. Células binucleadas foram contabilizadas quando eram observadas células possuindo dois núcleos de tamanhos similares, ao invés de um.

Figura 10- Alterações interfásicas



Fonte: O autor, 2015

Nota: A- célula binucleada, B- micronúcleo; C- broto nuclear

4.5.2 ALTERAÇÕES MITÓTICAS (AM)

Alterações mitóticas são anormalidades que ocorrem em diversas fases da mitose (MI) (quando os cromossomos estão condensados e realizando a divisão celular). Foram consideradas alterações como pontes anafásicas (PA), pontes telofásicas (PT) e atrasos cromossômicos (AC). Pontes anafásicas e telofásicas ocorrem nas fases de anáfase e telófase, respectivamente, em virtude da não separação de cromátides. Atrasos cromossômicos podem ocorrer em virtude de alterações nos microtúbulos, e formam um emaranhado de cromátides (FERNANDES, 2005).

Figura 11- Alterações mitóticas



Fonte: O autor, 2015

Nota: A- ponte anafásica; B- ponte telofásica; C- atraso cromossômico

4.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Para determinar o efeito citotóxico, utilizou-se o cálculo de índice mitótico (IM), que foi estabelecido pela relação entre o número de células em divisão e o número total de células analisadas. Para avaliar o IM foi realizada a seguinte equação: **IM=NCM/NTC X 100**, onde **NCM** corresponde ao número de células em mitose e **NTC** ao número total de células contabilizadas.

A partir dos valores obtidos na equação acima, é possível avaliar o potencial citotóxico das amostras, em inibir ou aumentar a proliferação celular.

4.7 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 e entre os turnos de coleta 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

Os resultados observados nas análises físico-químicas dos efluentes, e na leitura de lâminas referentes às coletas realizadas em março e setembro de 2015, estão representadas nas tabelas 1 e 2, respectivamente, como média \pm erro padrão médio.

Tabela 1 – Resultado das análises físico-químicas dos efluentes, referentes às coletas de verão e inverno.

PONTOS	ESTAÇÃO	OD	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NH ₃	PO ₄₃ ⁻	Fe	Cu	pH	T		
		(ppm)	(mg/L)	(ppm)	(ppm)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)		(°C)		
Tramandai	P1 Manhã	V	11± 0,577	6± 0,058	0,5± 0,058	3,5± 0,058	1± 0,058	0,18± 0,006	0,1± 0,035	7,1± 0,058	27± 0,577	
		I	7± 0,577	25± 0,577	0,3± 0,058	0,4± 0,058	0,75± 0,006	0,25± 0,006	0,1± 0,058	7,6± 0,058	17,9± 0,058	
	P1 tarde	V	6± 0,058	6± 0,058	0,5± 0,058	3± 0,058	0,35± 0,006	0,4± 0,058	0,05± 0,006	7,1± 0,058	26,6± 0,058	
		I	8± 0,577	25± 0,577	0,3± 0,058	2± 0,577	0,6± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	7,7± 0,058	19± 0,577	
	P2 manhã	V	11± 0,058	6± 0,058	ND	6,5± 0,058	4± 0,577	0,4± 0,058	0,05± 0,006	7,4± 0,058	28,4± 0,058	
		I	1,5± 0,058	35± 0,577	1,5± 0,058	4,75± 0,006	2± 0,577	0,1± 0,058	0,2± 0,058	6,9± 0,058	19,2± 0,058	
	P2 tarde	V	3± 0,577	ND	ND	1± 0,577	4± 0,577	0,5± 0,058	0,05± 0,006	7,2± 0,058	27,9± 0,058	
		I	3,5± 0,058	35± 0,577	1,2± 0,058	3,5± 0,058	2± 0,577	0,1± 0,058	0,1± 0,058	7± 0,577	18,7± 0,058	
	Cidreira	P1 manhã	V	8± 0,577	6± 0,577	0,75± 0,0006	2± 0,577	1± 0,577	0,25± 0,006	0,1± 0,058	7,4± 0,058	26,8± 0,058
			I	6± 0,577	100± 0,577	2,8± 0,058	1,5± 0,058	2± 0,577	1± 0,577	0,2± 0,058	6,7± 0,058	19,7± 0,058
		P1 tarde	V	8± 0,577	6± 0,577	0,25± 0,006	3,5± 0,058	0,5± 0,058	0,5± 0,058	0,05± 0,006	8,2± 0,058	27,1± 0,058
			I	8± 0,577	70± 0,577	1,75± 0,006	5± 0,577	1,5± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	6,9± 0,058	19± 0,577
P2 manhã		V	8± 0,577	6± 0,577	1± 0,577	3,5± 0,058	0,35± 0,006	0,18± 0,006	0,1± 0,058	7,5± 0,058	28,3± 0,058	
		I	6± 0,577	100± 0,577	2,8± 0,058	1,5± 0,058	2± 0,577	1± 0,577	0,1± 0,058	6,7± 0,058	19,2± 0,058	
P2 tarde	V	8± 0,577	6± 0,577	0,75± 0,006	3,5± 0,058	2± 0,577	0,18± 0,006	0,1± 0,058	7,4± 0,058	25,2± 0,058		
	I	8± 0,577	25± 0,577	1,2± 0,058	5± 0,577	1,5± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	6,9± 0,058	18,7± 0,058		

Fonte: O autor, 2015.

Nota: Quantidades expressas em: ppm (parte por milhão) e mg/L (miligrama por litro). Onde,

V (verão);I (inverno). OD (oxigênio dissolvido); NO₃⁻ (nitrato); NO₂⁻ (nitrito); NH₃ (amônia); PO₄³⁻ (Fosfato); Fe (Ferro); Cu (Cobre); T (temperatura).

Na leitura dos resultados, é possível notar que as quantidades de OD foram inferiores nas amostras do efluente Tramandaí P2. Isso provavelmente se deve ao grande aporte de matéria orgânica que o sangradouro recebe, fazendo com que sua demanda de oxigênio aumente, para sua decomposição (BIRUNGI et al., 2007).

O nitrogênio pode ser encontrado em efluentes, sob diversas formas, como amônia, nitrito e nitrato, sendo cada uma das dessas formas, indicativa de características poluidoras. Quando uma amostra de água apresenta valores de nitrogênio amoniacal acima dos limites estabelecidos pela legislação, significa que o foco de poluição encontra-se próximo ao local de coleta. Porém, valores altos de nitrito e nitrato, podem indicar que as descargas de poluição se encontram distantes do local amostrado (CETESB, 2010). Com base nos valores apresentados na tabela anterior, é possível perceber que durante a estação de inverno, as quantidades de nitrito e nitrato são superiores em relação às de verão, dessa forma, inferindo que durante o inverno, a poluição se origina em um ponto distante do local de coleta. Já no verão, as quantidades de amônia foram superiores à de inverno, demonstrando que durante esse período, a geração de poluentes se dá próxima ao local de coleta, provavelmente originada nos prédios e residências que cercam a orla. As quantidades de fosfato foram superiores em Tramandaí em relação à Cidreira.

O fósforo ocorre em efluentes devido às descargas de esgoto sanitários, industriais e agrícolas (CETESB, 2010). As grandes concentrações de fosfato podem estar associadas com a eutrofização, podendo acarretar no desenvolvimento de algas e outras plantas (CARITÁ, 2010). O ferro presente na água, pode indicar a presença de decomposição de esgotos sanitários e industriais. Metais como ferro e cobre podem gerar toxicidade, uma vez que causam distúrbio na divisão celular, podendo inibir o crescimento de *A. cepa* (FISKESJÖ, 1998). Observando a tabela, é notável que o aporte dessas três substâncias é, na maioria dos pontos amostrados, superior na estação de verão, em comparação com a de inverno.

Na análise das lâminas, as alterações na morfologia nuclear foram caracterizadas pela presença de anomalias interfásicas (pontes anafásicas, pontes telofásicas e atrasos cromossômicos) e mitóticas (micronúcleos, brotos nucleares e binucleação). O resultado das análises é apresentado na tabela 2, como média (M) ± erro padrão médio (EPM).

Tabela 2: Resultados obtidos na análise de lâminas, referentes às coletas de verão e inverno.

	PONTOS	ESTAÇÃO	OD	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NH ₃	PO ₄₃ ⁻	Fe	Cu	pH	T
			(ppm)	(mg/L)	(ppm)	(ppm)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)		(°C)
Tramandai	P1 Manhã	V	11± 0,577	6± 0,058	0,5 ± 0,058	3,5± 0,058	1± 0,058	0,18± 0,006	0,1± 0,035	7,1± 0,058	27± 0,577
		I	7± 0,577	25± 0,577	0,3± 0,058	0,4± 0,058	0,75± 0,006	0,25± 0,006	0,1± 0,058	7,6± 0,058	17,9± 0,058
	P1 tarde	V	6± 0,058	6± 0,058	0,5± 0,058	3± 0,058	0,35± 0,006	0,4± 0,058	0,05± 0,006	7,1± 0,058	26,6± 0,058
		I	8± 0,577	25± 0,577	0,3± 0,058	2± 0,577	0,6± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	7,7± 0,058	19± 0,577
	P2 manhã	V	11± 0,058	6± 0,058	ND	6,5± 0,058	4± 0,577	0,4± 0,058	0,05± 0,006	7,4± 0,058	28,4± 0,058
		I	1,5± 0,058	35± 0,577	1,5± 0,058	4,75± 0,006	2± 0,577	0,1± 0,058	0,2± 0,058	6,9± 0,058	19,2± 0,058
	P2 tarde	V	3± 0,577	ND	ND	1± 0,577	4± 0,577	0,5± 0,058	0,05± 0,006	7,2± 0,058	27,9 ± 0,058
		I	3,5± 0,058	35± 0,577	1,2± 0,058	3,5± 0,058	2± 0,577	0,1± 0,058	0,1± 0,058	7± 0,577	18,7± 0,058
P1 manhã	V	8± 0,577	6± 0,577	0,75± 0,0006	2± 0,577	1± 0,577	0,25± 0,006	0,1± 0,058	7,4± 0,058	26,8± 0,058	
	I	6± 0,577	100± 0,577	2,8± 0,058	1,5± 0,058	2± 0,577	1± 0,577	0,2± 0,058	6,7± 0,058	19,7± 0,058	
Cidreira	P1 tarde	V	8± 0,577	6± 0,577	0,25± 0,006	3,5± 0,058	0,5± 0,058	0,5± 0,058	0,05± 0,006	8,2± 0,058	27,1± 0,058
		I	8± 0,577	70± 0,577	1,75± 0,006	5± 0,577	1,5± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	6,9± 0,058	19± 0,577
	P2 manhã	V	8± 0,577	6± 0,577	1± 0,577	3,5± 0,058	0,35± 0,006	0,18± 0,006	0,1± 0,058	7,5± 0,058	28,3± 0,058
		I	6± 0,577	100± 0,577	2,8± 0,058	1,5± 0,058	2± 0,577	1± 0,577	0,1± 0,058	6,7± 0,058	19,2± 0,058
	P2 tarde	V	8± 0,577	6± 0,577	0,75± 0,006	3,5± 0,058	2± 0,577	0,18± 0,006	0,1± 0,058	7,4± 0,058	25,2± 0,058
		I	8± 0,577	25± 0,577	1,2± 0,058	5± 0,577	1,5± 0,058	0,35± 0,006	0,1± 0,058	6,9± 0,058	18,7± 0,058

Fonte: o Autor, 2015.

Nota: Número de ocorrência em 1000 células observadas, onde: V (verão); I (inverno) e normalidades apresentadas como MI (mitose); MN (micronúcleo); BR (brotamento); BN (binucleação); PA (ponte

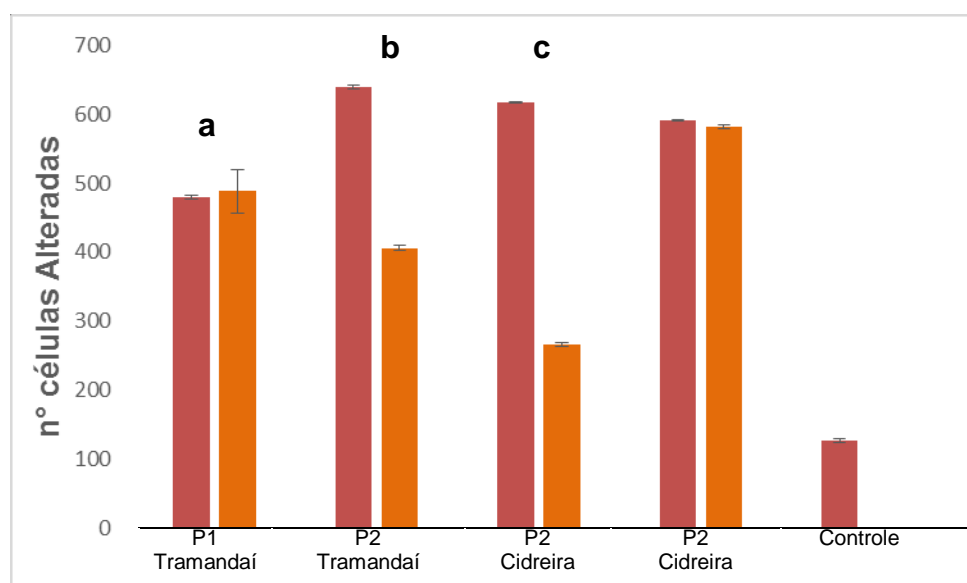
anafásica); PT (ponte telofásica); AT (atraso cromossômico) e Outros (Outros tipos de alteração não especificados).

Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de efeito genotóxico nos efluentes sobre as células de *A. cepa*, uma vez que houve indução de micronúcleos. A ocorrência de micronúcleos é comumente interpretada como evidencia de danos genéticos em decorrência de mutagenicidade, podendo ainda, ser indicativo de efeitos clastogênicos e aneugênicos (MACHADO, 2013).

Danos genéticos detectados neste estudo, como pontes anafásicas e telofásicas, podem ser indicativos da presença de substâncias clastogênicas, que são indutoras de quebras. Outras alterações, como atrasos cromossômicos podem indicar problemas no fuso mitótico (VIDAKOVIC *et al*, 1993).

A figura 13 apresenta a média de célula alteradas (somando-se todos os tipos de alterações interfásicas e mitóticas) em um total de 1000 células observadas nos turnos de manhã e tarde, na estação de verão.

Figura 13- Gráfico do número de células alteradas na estação de verão

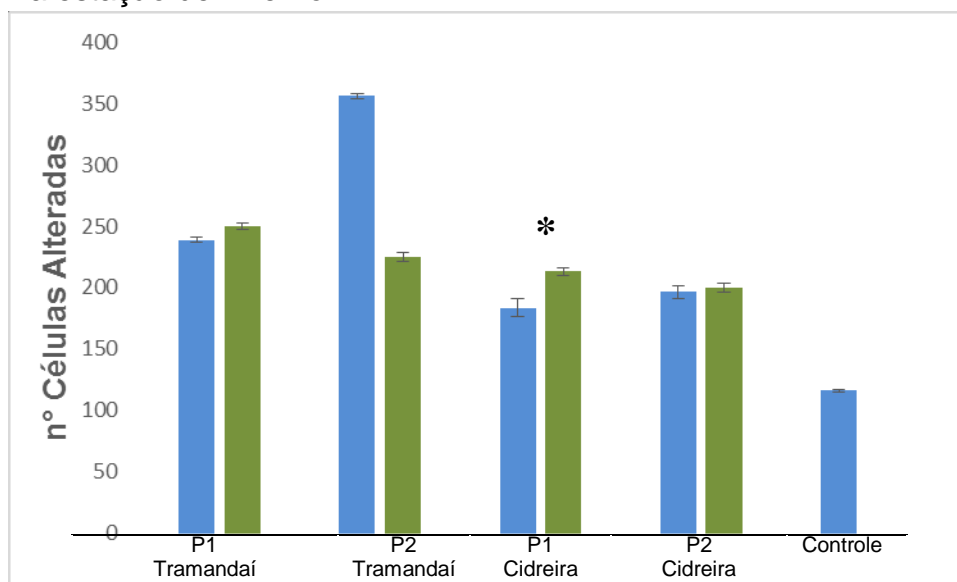


Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação entre o número de células com alterações (em um total de 1000 células), nos turnos de manhã (barra vinho) e tarde (barra laranja), na estação de verão. P2 não diferiu do controle, $p=0,05$. "a" diferiu, com $p=0,022$; "b" diferiu, com $p=0,044$; "c" diferiu, com $p=0,0422$.

A figura 14 é feita a comparação entre o n° de células com alterações, nos turnos de manhã e tarde, na estação de inverno, em relação ao controle negativo.

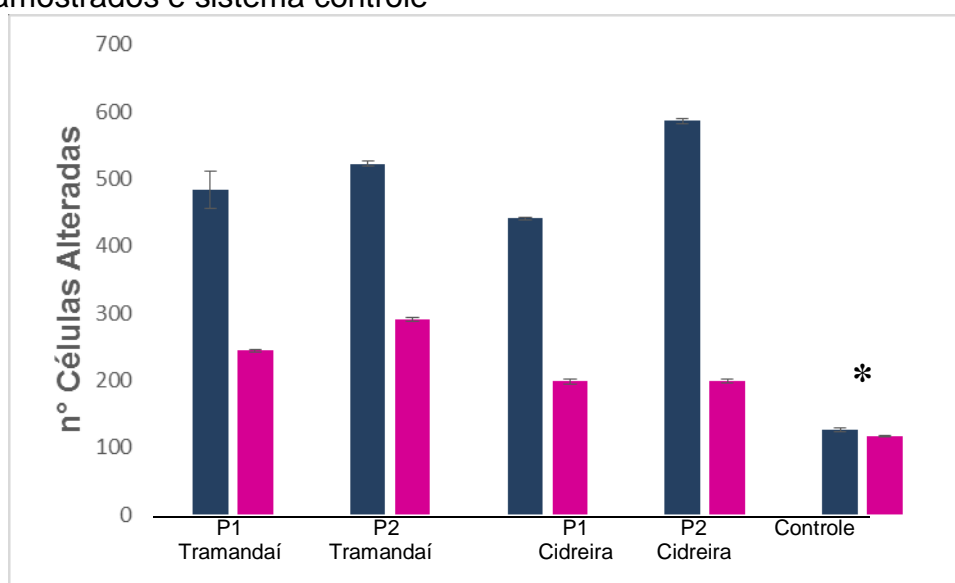
Figura 14- Comparação entre o n° de células alteradas, nos turnos de manhã e tarde, na estação de inverno.



Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação entre o número de células com alterações (em um total de 1000 células), nos turnos de manhã (barra azul) e tarde (barra verde), na estação de inverno. * Diferiu do controle, com $p=0,048$.

Figura 15-Comparação entre o n° de células com alterações, em todos os pontos amostrados e sistema controle



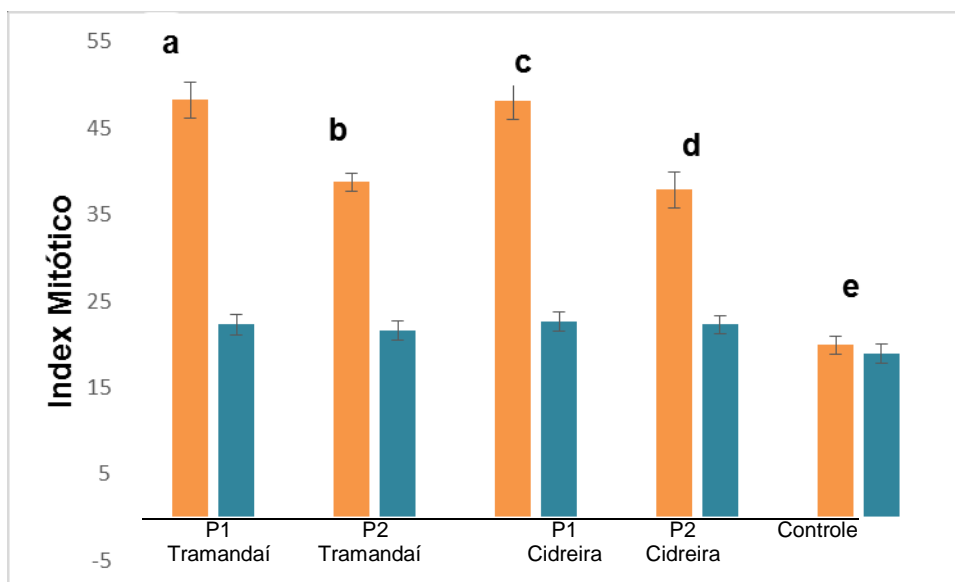
Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação entre o número de células com alterações (em um total de 1000 células), nas estações de verão (barra azul) e inverno (barra rosa), em todos os pontos amostrados e sistema controle. * Os controles de verão e inverno não diferiram entre si. Todos os outros pontos diferiram entre si e dos controles.

Observando-se os gráficos, é possível perceber que a ocorrência de alterações celulares foi superior nas amostras de verão, em comparação com as de inverno. Todas as coletas realizadas no verão (exceto Cidreira P2) tiveram diferença significativa em relação ao controle. Já as de inverno, não diferiram do controle, porém, diferiram das amostragens de verão, como demonstrado no último gráfico. Isso reforça a ideia de que a poluição que induz a esse tipo de alteração, é encontrada em maior escala na estação de verão. Isso provavelmente se deve à maior utilização do ambiente costeiro no veraneio e a falta de estrutura das cidades, em relação ao suporte necessário para o acolhimento da população sazonal.

A citotoxicidade de um composto pode ser determinada pelo aumento ou diminuição do índice mitótico (IM) de células expostas (FERNANDES *et al.*, 2007). IM inferiores ao controle negativo podem indicar a presença de agentes tóxicos, que comprometem o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos. Já IM superiores ao sistema controle são resultantes de indução de divisão celular, podendo levar à proliferação celular descontrolada até a formação de tumores. Assim, a alteração no IM, seja aumento ou diminuição, pode ser um importante indicador da ação de compostos, e pode ser utilizado para indicar níveis de poluição ambiental (HOSHIMA, 2002). Na figura 16, é feita a comparação entre o IM em cada ponto amostrado, nas estações de verão e inverno.

Figura 16- Comparação entre o IM no sistema controle e nas amostragens de verão e inverno.

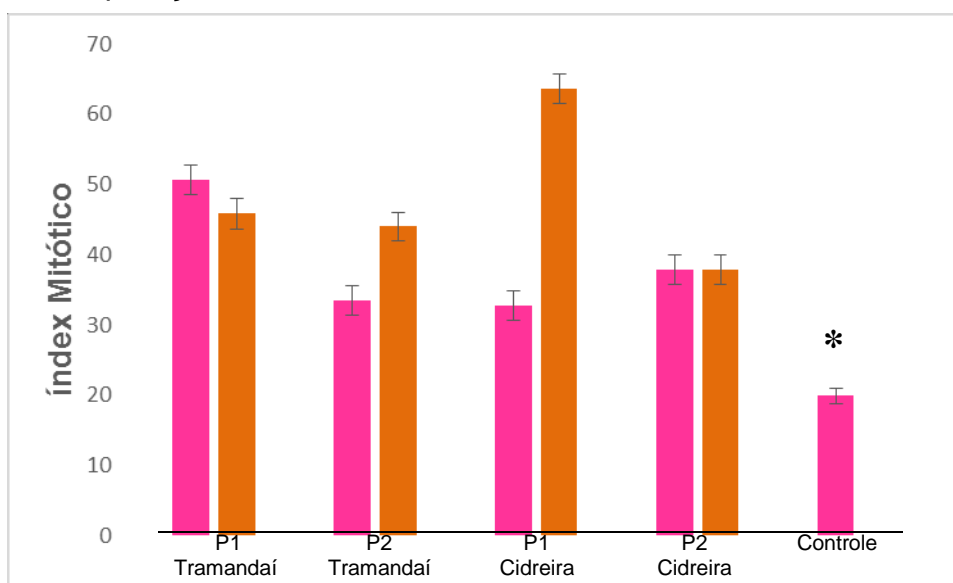


Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação entre o índice mitótico (IM) encontrado nas raízes de *A. cepa*, tratadas com os efluentes e sistema controle, nas amostragens de verão (barras laranjas) e inverno (barras azuis), em cada ponto amostrado, onde “a” diferiu, com $p=0,007$; “b” diferiu, com $p=0,0001$; “c” diferiu, com $p=0,0001$; “d” diferiu, com $p=0,0001$; “e” não diferiu, com $p=1$. As barras indicam o EPM (Erro Padrão Médio) de cada amostra.

Na figura 17 é realizada a comparação do IM em todos os pontos, referentes à estação de verão, nos turnos manhã e tarde.

Figura 17- Comparação do IM nas amostras de verão, em turnos de manhã e tarde

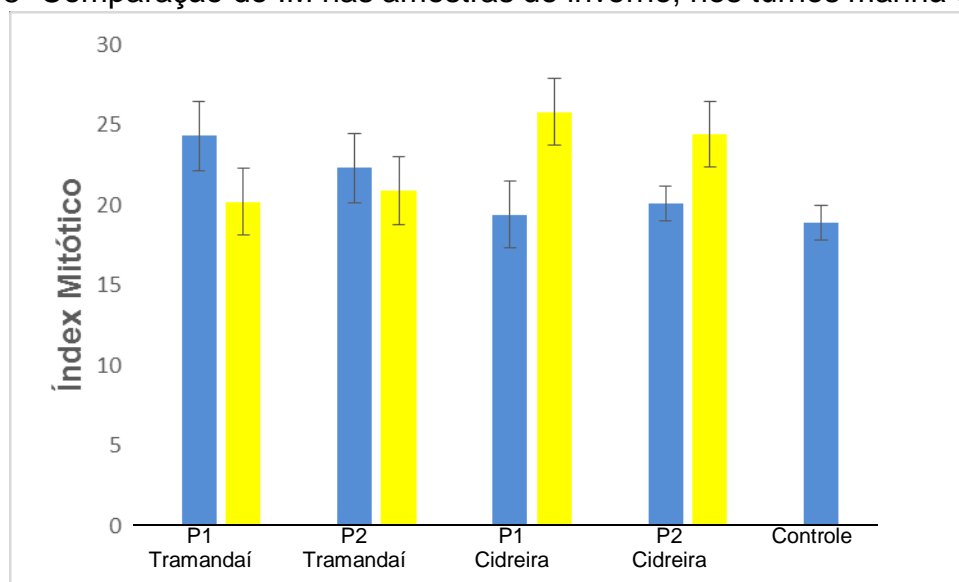


Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação do IM entre as amostras de verão, nas amostragens dos turnos da manhã (barra rosa) e tarde (barra laranja) e controle. * Todos os pontos diferiram do controle, mas não entre si.

Na figura 18 é retratado o IM em todos os pontos, nos turnos de manhã e tarde, referentes às amostragens realizadas no inverno, em comparação com o sistema controle.

Figura 18- Comparação do IM nas amostras de inverno, nos turnos manhã e tarde



Fonte: O autor, 2015

Nota: Comparação do IM entre as amostras de inverno, nas amostragens dos turnos manhã (barra azul) e tarde (barra amarela). Os pontos não diferiram entre si, ou do controle.

Como observado nos gráficos, ocorreu aumento do IM das raízes tratadas com os efluentes coletados no verão, em relação ao controle negativo. Já as raízes tratadas com os efluentes coletados na estação de inverno, não demonstraram diferenciação significativa em relação ao controle.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicaram que todos os vertedouros de Tramandaí (P1 E P2) e um vertedouro de Cidreira (P1) são potencialmente mutagênicos na estação de verão. Na estação de inverno, apenas um sangradouro de Cidreira (P1) apresentou mutagenicidade significativa em relação ao controle. Isso se deve a capacidade dos efluentes em promoverem alterações interfásicas (como atrasos cromossômicos, pontes anafásicas e telofásicas) e mitóticas (como micronúcleos, brotos nucleares e células binucleadas) em células meristemáticas de *Allium cepa*. Constatou-se ainda, diferenciação no índice mitótico das raízes tratadas com todos os efluentes coletados no verão em relação ao sistema controle. Já as amostras coletadas no inverno, não demonstraram diferença significativa do índice mitótico. Todos os pontos apresentaram diferença significativa em relação ao índice mitótico, quando comparado o mesmo ponto nas duas estações, com exceção do sistema controle, que não diferiu entre verão e inverno, como esperado. As análises físico-químicas demonstraram que existe grande aporte de matéria orgânica nos efluentes. Demonstraram ainda, que as quantidades de nitrato e fosfato foram superiores nas amostragens de inverno, enquanto que as quantidades de oxigênio dissolvido, nitrito, amônia, ferro e cobre foram superiores no verão. Isso reforça a ideia de que o potencial citotóxico dos vertedouros é superior na estação de verão, quando a zona costeira recebe maior impacto, oriundo da ocupação humana.

Sendo a zona costeira de extrema importância para diversas espécies, e tendo em vista os danos que os efeitos antrópicos podem causar a estes ambientes, sugere-se que estudos futuros de monitoramento ambiental, de mutagenicidade e citotoxicidade sejam realizados, não apenas nestes, mas em outros sangradouros, afim de acompanhar as mudanças ambientais que ocorrem na face de praia em nosso litoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBA-TERCEDOR, J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. In: SIMPÓSIO DEL AGUA EM ANDALUCIA, 4., 1996, Almeria. **[Anais]**. Almeria: Instituto Tecnológico Geominero de España, 1996. v. 2, p. 203-213. 1996. Disponível em: <<http://ocw.atca.um.es/ciencias/ecologia/lectura-obligatoria-1/pubal baj1996p203.pdf>>. Acessado em 10/10/2015.

ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897** - Preservação e técnicas de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, jun. 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 9897** – Planejamento de amostragem de efluentes líquidos e corpos receptores. Rio de Janeiro, jun. 1987.

ARAÚJO, E. J. A. *et al.* Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivípara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n.2, p. 391-399. 2001.

ARNAIZ, R.A. **Lastoxinas ambientales y sus efectos genéticos**. 2. ed. México: Fondo de Cultura Económica, 1997. 95p. (La Ciencia para Todos, 124)

BARBOUR, M.T. *et al.* **Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers**: periphyton, benthic macroinvertebrates and fish, 2nd. ed. Washington, U.S.: EPA, 1999.

BARBÉRIO, A. *et al.* 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.

BELIËN, J. A. M. *et al.* Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. **Carcinogenesis**, Oxford, Inglaterra, v.16, n.10, p. 2395-2400, 1995.

BERCES, J., *et al.* Using the micronucleus assay to detect genotoxic effects of metal ions. **Environ Health Perspect**, v. 101, Suppl 3, p. 11-13, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1521140/pdf/envhper00380-0020.pdf>>. Acessado em: 20/10/2015

BIRUNGI, Z.; MASOLA, B.; ZARANYIKA, M.F.; NAIGAGA, I.; MARSHALL, B. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case of Nakivubo wetland along Lake Victoria. **Physics and Chemistry**

of the Earth, Oxford, v.32, p.1350-1358, 2007.

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 de nov. 2012.

CALLIARI, L.; TOLDO JR, E. E.; NICOLODI, J. L. Rio Grande do Sul : classificação geomorfológica. In: MUEHE, D. (org.) **Erosão e progradação do litoral brasileiro**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. p. 437-445.

CALLIARI, L.R., et al. Variabilidade das Dunas Frontais no Litoral Norte e Médio do Rio Grande do Sul, Brasil. **Gravel**. Porto Alegre, n. 3, p. 15-30, 2005.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>> Acesso: 16.nov.2015.

COSTA, R.M., MENK, C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 12, p. 24-26, 2000.

DE FIGUEIREDO, S.A.; CALLIARI, L. J. Sangradouros: distribuição espacial, variação sazonal, padrões morfológicos e implicações no gerenciamento costeiro. **Gravel**. Porto Alegre, n. 3, p. 47-58, 2005.

DE OLIVEIRA, L. M; VOLTOLINI, J. C; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, Taubaté, v.6, n. 1, p. 90-103, 2011. <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92817183008>>. Data de acesso: 11/09/2014

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.

FISKEJO, G. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberration in Root Tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, USA, v. 9, p. 235-241, 1994.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – An alternative in environmental studies – the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, Amsterdam, v.197, p.243-260, 1988.

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

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

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, Porto Alegre, v. 2, n. 1, p.1-9, 2003.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1999.

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

HOEFFEL, F. **Morfodinâmica de praias**. Itajaí, Ed. UNIVALI, 1998. 140p.

HOSHINA, M.M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente à bacia do Rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***. 2002. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP.

KUERTEN, I. S. **Conflitos de uso e ocupação na Praia de Cidreira, Litoral Norte-RS: o Caso Pesca e Surf**. Porto Alegre, [s.n.], 2008.

KARR, J.; CHU, E.W. Biological monitoring: essential foundation for ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**, Amherst, Mass., US, v. 3, p. 993-1004, 1997.

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

MACHADO, A.T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa***. 2013. 45f. Trabalho de conclusão (Bacharelado em Ciências Biológicas. Ênfase em gestão Ambiental Marinha e Costeira) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul em Convênio com a Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Imbé, 2013.

MARQUES JR., A.N.; MORAES, R.B.C. de; MAURAT, M. C. Poluição Marinha. In: PEREIRA, WENDT, G.E.; MCLACHLAN, A. Zonation and biomass of the intertidal

macrofauna along a South African sandy beach. **Cahiers de Biologie Marine**, Paris, v. 26, p. 1-14, 1985.

MATSUMOTO, S.T. *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MINISSI, S., LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Viciafaba micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 39,p. 317-321. 1997.

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

MORAES, D.D.L., QUINZANI-JORDÃO,B. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36,n. 3, p. 370-374. 2002.

NICOLODI, J. L. A. **Morfodinâmica praial como subsídio ao gerenciamento costeiro:o caso da Praia de Fora, Parque Estadual de Itapuã, RS.** 2002. 138f. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

PEREIRA DA SILVA, R.; CALLIARI, L. J. Erosão Costeira Causada por Sangradouros ao longo do Litoral Sul- Riograndense: Trecho Rio Grande Chuí. In: CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ESTUDOS DO QUATERNÁRIO, 6., 1997, Curitiba; REUNIÃO SOBRE O QUATERNÁRIO DA AMÉRICA DO SUL, 6., 1997, Curitiba. **Resumos expandidos**. Curitiba, ABEQUA, 1997. p.420-423.

PEREIRA DA SILVA, R. Ocorrência, Distribuição e Características Morfodinâmicas dos Sangradouros na Zona Costeira do Rio Grande do Sul: trecho Rio Grande- Chuí, RS. 1998. 146 f. Dissertação (Mestrado em Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

PERON, A.P., CANESIN, E.A., CARDOSO, C.M.V. Potencial Mutagênico das Águas do Rio Pirapó(Apucarana, Paraná, Brasil) em Células Meristemáticas de Raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre. v. 7.n. 2, p. 155-159.abr/jun. 2009.

PETIT, C., SANCAR A. Nucleotide excision repair: from E. coli to man. **Biochimie**, Paris, v. 81, p. 15-25. 1999.

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

RODRIGUEZ, J. J.; WINDEVOXHEL, N. J. **Análisis Regional de La situación de La zona marina costeraCentroamericana.** Washington: BID, 1998. (No.ENV 121).

SILVA, J. da; FONSECA, M.B. da. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A.P. (org). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. p. 70-84.

STICH, H.F.; ROSIN, M. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. **International Journal of Cancer**, New York, US, v.31, n.3, p. 305-309. 1983.

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

STOHS, S.J., BAGCHI, D. HASSOUN, E., BAGCHI, M. Oxigative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. **J Environ Pathol Toxicol Oncol.**;v. 19, n. 3, p. 201-13. 2000.

STROHAECKER, T.M. **A urbanização no Litoral Norte do Estado o Rio Grande do Sul: contribuição para a gestão urbana ambiental do Município de Capão da Canoa**. Tese (Doutorado em Geociências) - Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<http://www.corsan.com.br/node/544>> Acesso em: 10 nov. 15. Algo errado aqui

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

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

VILLWOCK, J.A., TOMAZELLI, L.J. Geologia costeira do Rio Grande do Sul. **Notas Técnicas**, CECO/UFRGS, Porto Alegre, n. 8, 1995. p. 1-45.

VOOREN, C. M; BRUSQUE, L. F. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação**. Rio Grande: Fundação Universidade Federal de Rio Grande, 1999