

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGIA E BIODIVERSIDADE**

BIANCA MELLO CERATO

**BIOENSAIO EM *Allium cepa* PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOGENOTÓXICO DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO DO MUNICÍPIO
DE MISSAL/PR**

Foz do Iguaçu – PR

2019

BIANCA MELLO CERATO

**BIOENSAIO EM *Allium cepa* PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
CITOGENOTÓXICO DA ÁGUA DE ABASTECIMENTO DO MUNICÍPIO
DE MISSAL/PR**

Projeto de pesquisa apresentado ao curso de Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade, da Universidade Federal de Integração Latino-americana, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Garcia Pereira

Coorientador: Profa. Dra. Marcela Boroski

FOZ DO IGUAÇU – PR

2019

SUMÁRIO

RESUMO	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	6
AGRADECIMENTOS	7
1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Município de Missal	8
1.1.1 Desenvolvimento Agrícola	9
1.1.2 Calendário Agrícola da Região.....	9
1.1.3 Saúde da População	10
1.2 Toxicologia.....	11
1.2.1 Biomarcadores.....	11
1.2.2 Genotoxicidade.....	13
1.2.3 Citotoxicidade	16
1.2.4 Bioensaio com <i>Allium cepa</i>	16
2 METODOLOGIA.....	17
2.1 Áreas de Coleta	17
2.2 Coleta de Amostras	19
2.3 Teste utilizando <i>Allium cepa</i>	20
2.3.1 Germinação.....	20
2.3.2 Exposição às amostras de água	20
2.3.3 Fixação das Raízes de <i>A. cepa</i>	21
2.3.4 Coloração e Preparo das lâminas.....	21
2.3.5 Controles	21
2.3.6 Contagem de Células.....	22
2.4 Análises Estatísticas	22
3 RESULTADOS	23
3.1 Índice Mitótico	27
3.2 Aberrações Cromossômicas Estruturais	27
4 DISCUSSÃO	29
5 CONCLUSÃO.....	34
ANEXO A - Resultado das Análises Estatísticas	36
6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	38

RESUMO

Missal é um município localizado à oeste do estado do Paraná, no Brasil. A característica principal do município é de terrenos predominantemente utilizados para agricultura, sendo esta, a principal atividade exercida pela população, contornando a região central da malha urbana até a divisa de zoneamento com outras pequenas cidades. Entre 2016 e 2017 houve um alto índice de procedimentos oncológicos realizados no município, superando a média da regional da saúde mais próxima, da cidade de Foz do Iguaçu, que possui aproximadamente 23 vezes o número de habitantes de Missal. Dentre os fatores externos que favorecem o desenvolvimento do câncer estão os hábitos de vida e a exposição a raios UV e contaminantes ambientais. O organismo vegetal *Allium cepa* é utilizado como modelo para testes de avaliação e monitoramento de poluentes ambientais. Para avaliar a possibilidade da presença de contaminantes citogenotóxicos na água da cidade, foram conduzidos bioensaios com *A. cepa*. As amostras foram coletadas em nove pontos de abastecimento de água de poço artesiano e três de água superficial: duas do Rio São Vicente (P10 e P12) e uma do lago da represa (P11) que banha a fronteira oeste da cidade. Os frascos de vidro usados para a coleta foram padronizados com procedimentos de limpeza e as amostras foram mantidas sob refrigeração. Os bulbos de *A. cepa* passaram pelo processo de enraizamento durante 72 horas através de exposição em água ultrapura tipo I reconstituída (chamada de “água dura”) e as 12 amostras junto com os controles foram postas em contato com as raízes por 24 e 48 horas. No fim de cada período de exposição, a ponta das raízes foram cortadas e fixadas em etanol: ácido acético [3:1]. As células meristemáticas foram coradas comorceína acética 2% e distribuídas em cima de uma lâmina com a metodologia *squash*. A leitura foi feita em microscópio óptico de campo claro, com aumento de 40X, sendo contabilizadas 1000 células para cada amostra. Em seguida, foram inferidos os índices mitótico de aberrações cromossômicas. As amostras da central de abastecimento do município, Sanepar (P1), apresentaram efeitos genotóxicos e potencialmente citotóxicos. Houve a presença de efeitos citogenotóxicos para as águas do lago, do rio, do ponto Vista Alegre (P8) e do ponto Portão Ocoí (P9). Efeitos citotóxicos na água do ponto Padre Rick (P3) e genotóxicos para os pontos São João, Dom Armando e da torneira ao lado do lago da represa no ponto da prainha de Vila Natal (P7, P4 e P6). Através da análise dos resultados, sugere-se haver potencial mutagênico para as águas de abastecimento da cidade, havendo necessidade de novos testes para averiguar a persistência dos efeitos mutagênicos observados em *A. cepa* e possíveis agentes causadores.

Palavras chave: genotoxicidade; índice mitótico; aberrações cromossômicas; água de abastecimento; águas superficiais; clastogênese.

RESUMEN

Missal es un municipio ubicado al oeste del estado de Paraná, en Brasil. La característica principal del municipio es la tierra utilizada principalmente para la agricultura, siendo esta la principal actividad ejercida por la población, desde la región central de la red urbana hasta el límite de zonificación con otras ciudades pequeñas. Entre 2016 y 2017 hubo una alta tasa de procedimientos oncológicos realizados en el municipio, superando el promedio del centro de salud regional más cercano, en la ciudad de Foz do Iguaçu, que tiene aproximadamente 23 veces el número de habitantes de Missal. Entre los factores externos que favorecen el desarrollo del cáncer están los hábitos de vida, y exposición a rayos UV y contaminantes ambientales. El organismo vegetal *Allium cepa* es usado como modelo para pruebas de evaluación y monitoreo de contaminantes ambientales. Para evaluar la posibilidad de la presencia de contaminantes citogenotóxicos en el agua de la ciudad, se realizaron bioensayos con *A. cepa*. Las muestras fueron recolectadas de nueve puntos de suministro de agua de pozo artesiano y tres muestras de agua superficial: dos del río São Vicente (P10 y P12) y uno del lago de la presa (P11) que baña la frontera occidental de la ciudad. Los frascos de vidrio usados para la recolección fueron estandarizados por los procedimientos de limpieza y las muestras mantenidas bajo refrigeración. Los bulbos de *A. cepa* pasaron por el proceso de enraizamiento durante 72 horas a través de la exposición en agua ultrapura tipo I reconstituida (denominada “agua dura”) y las 12 muestras junto con los controles se pusieron en contacto con las raíces durante 24 y 48 horas. Al final de cada período de exposición, las puntas de las raíces fueron cortadas y fijadas en etanol: ácido acético [3: 1]. Las células meristemáticas fueron teñidas con orceína acética al 2% y se distribuyeron en un portaobjetos utilizando la metodología *squash*. La lectura fue hecha en el microscopio óptico de campo luminoso, con aumento de 40X, contabilizadas 1000 células para cada muestra y inferidos el índice mitótico y el índice de aberraciones cromosómicas. Las muestras de la central de suministro del municipio, Sanepar (P1) presentaron efectos genotóxicos y potencialmente citotóxicos. Hubo presencia de efectos citogenotóxicos para las aguas de los lagos y ríos y del punto Vista Alegre (P8) y del punto Portão Ocoí (P9), efectos citotóxicos para el punto de Padre Rick (P3) y efectos genotóxicos para los puntos São João y Dom Armando e la llave del suministro al lado del lago de la presa en el punto de la playita de Villa Natal (P7, P4 y P6). A través del análisis de los resultados, sugierese haber potencial mutagénico para las aguas de abastecimiento de la ciudad, teniendo necesidad de nuevas pruebas para averiguar la persistencia de los efectos mutagénicos observados en *A. cepa* y posibles agentes causales.

Palabras clave: genotoxicidad; índice mitótico; aberraciones cromosómicas; suministro de agua; aguas superficiales; clastogénesis.

ABSTRACT

Missal is a county located in the west of the state of Paraná, in Brazil. The main characteristic of the municipality is the land predominantly used for agriculture, this being the main activities carried out by the population, bypassing the central region of the urban mesh until the zoning border with other small towns. . Between 2016 and 2017 there was a high rate of oncological procedures performed in the municipality, surpassing the average of the nearest regional health center, in the city of Foz do Iguaçu, which has nearly 23 times Missal's population. Among external factors that favor the development of cancer are life habits, and exposure to UV rays and environmental contaminants. The plant organism *Allium cepa* is used as a model for tests to evaluate and monitor environmental pollutants. To evaluate the possible presence of cytogenotoxic contaminants in the city's water, bioassays with *A. cepa* were conducted with water supply. Samples were collected at nine points supplied by well water and three samples from surface water: two from the São Vicente river (P10 and P12) and one from the dam lake (P11) that bathes the western border of the city. The glass bottles used to collect the water samples were standardized with cleaning procedures and samples were kept under refrigeration. *A. cepa* bulbs went through the rooting process for 72 hours through exposure in reconstituted ultrapure water type I (named "hard water") and the 12 samples together with the controls were put in contact with the roots for 24 and 48 hours. At the end of each exposure period, the root tips were cut and fixed in ethanol: acetic acid [3: 1]. The meristematic cells were stained with 2% acetic orcein and distributed on top of a slide using squash methodology. Reading was made under the bright field optical microscope, at 40X magnification. A 1000 cells were counted to each sample, from wích the mitotic index and chromosomal aberration index were inferred. Samples from the city main water supply, Sanepar (P1) showed genotoxic and potentially cytotoxic effects. There were cytogenotoxic effects for lake and the river waters and for the points of Vista Alegre (P8) and Portão Ocoí (P9), cytotoxic effects for the Padre Rick samples(P3) and genotoxic effects for the points of São João, Dom Armando and the tap water next to the beach of the dam lake at Vila Natal (P7, P4 and P6). The results analysis suggest that there is a mutagenic potential for the city's water supply, requiring further tests to ascertain the persistence of the mutagenic effects observed in *A. cepa* and possible causative agents.

Keywords: genotoxicity; mitotic index; chromosomal aberrations; supply water; surface waters; clastogenesis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de maneira especial aos mestres e professores Juana Sanchez Ana Rosa Alarcón y Rafael Quintana Valencia por haverem me acolhido e me iniciado no caminho da toxicologia. Para vocês minha eterna gratidão e carinho.

Agradeço a Arturo Muñoz pelo companherismo e parceria nas aprendizagens de laboratório na estância do intercâmbio.

A Carlos Felipe Vergara Aragón pela cumplicidade e amizade durante toda a estância do intercâmbio, tornando ela mais divertida e verdadeira.

A todos que me acolheram durante o intercâmbio, que não foram poucos.

Aos professores e mestrandos da Universidade Federal de Integração Latino-americana sem os quais nada disto teria sido possível: Luiz Henrique Garcia Pereira e Marcela Boroski, pela paciência e tenacidade e por haverem decidido me acompanhar nesta jornada, meu mais sincero “muito obrigada!”; à Ana, companheira e amiga do projeto, que me ensinou sobre química e trouxe bom humor e apoio para os momentos mais intensos de trabalho; ao professor Wagner Chiba pela disposição e apoio estatístico nos últimos minutos do segundo tempo; ao professor Samuel Adami, pelo acolhimento como supervisor de estágio; ao professor Cristian Antonio Rojas pelos ensinamentos ao longo do curso e pelo apoio para deslanchar a metodologia desta pesquisa; à toda a equipe técnica do delaben (laboratórios de ensino de biologia) onde realizei o projeto, por cuidarem deste espaço e fornecerem apoio com o qual nosso aprendizado se consolida.

Ao Diego Martins e Jean Soares pela companhia e apoio ao longo da finalização do trabalho de conclusão, com os quais tive o diálogo inicial que me inspirou a realizar o projeto de investigação e me falarem sempre com a verdade.

Às meninas da lua, aos meninos de Caaguazu, e à minha irmã, mãe, pai, irmão e duas avós mais lindas que me inspiram e motivam todo dia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Município de Missal

Missal é um município brasileiro localizado no oeste do estado do Paraná. O abastecimento de água no município é feito por delegação de serviços à Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). O abastecimento das comunidades isoladas da sede do município é feito por sistemas próprios com poços artesianos, que são monitorados pela prefeitura municipal. O sistema de abastecimento de água conta com 2.098 ligações com hidrômetro. O restante é dividido em distritos administrativos (Dom Armando e Portão do Ocoí) e comunidades rurais (30 no total), operados e mantidos diretamente pelo município com o apoio da comunidade local (PREFEITURA MUNICIPAL DE MISSAL – PR, 2014).

O contato com a margem do lago da represa de Itaipu faz com que o município seja banhado por grandes quantidades de água. O contato com o lago gera uma pequena praia artificial para banhistas, ambiente utilizado pelos moradores em feriados e dias de calor. O município possui área territorial de 323,783 km² de extensão e se encontra entre as coordenadas 25°05'31" S e 54°14'51" W, a 604,46 km de Curitiba, capital do estado (IPARDES, 2019). Missal faz fronteiras ao norte com o lago de Itaipu e município de Santa Helena; ao sul com o Rio Ocoí, Córrego Cedro, Rio São João, e reservatório de Itaipu; à oeste com o município de Itaipulândia e o reservatório de Itaipu; e municípios de Matelândia, Medianeira, Ramilândia e Diamante D'Oeste ao leste (PREFEITURA MUNICIPAL DE MISSAL – PR, 2014) (**Figura 1**). Originado pelo desmembramento de Medianeira e instalado por decreto-lei em 1983, possui uma população estimada em 10.702 habitantes (IPARDES, 2019).

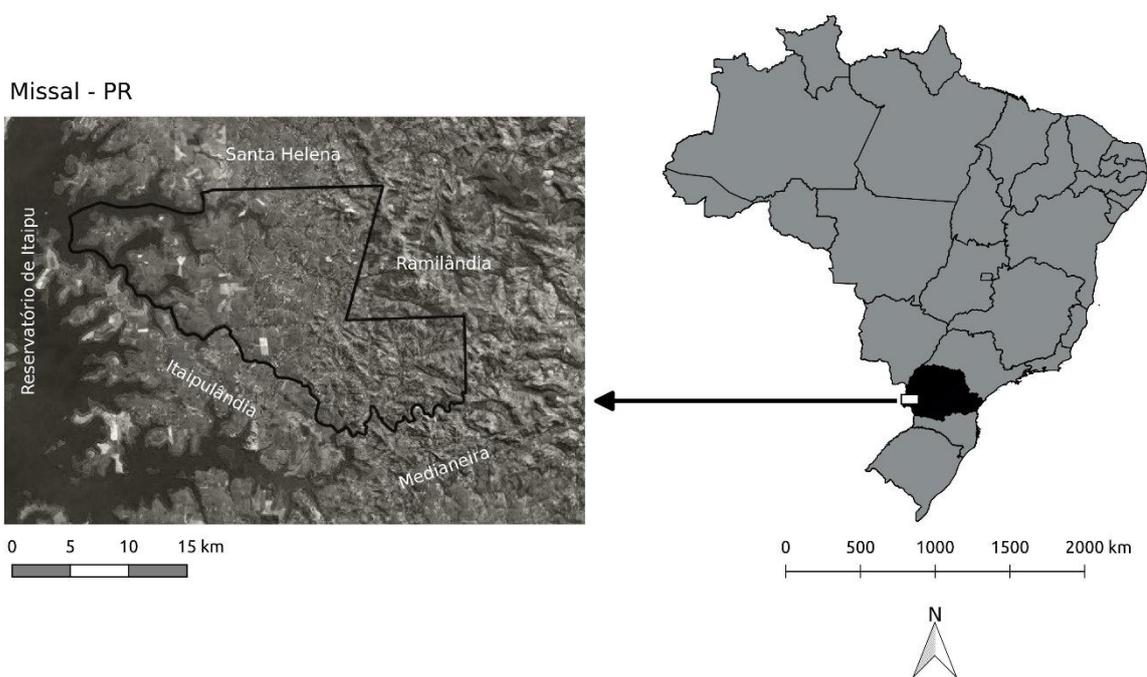


Figura 1: Localização geográfica do município de Missal, à oeste do Paraná. Mapa de própria autoria.

1.1.1 Desenvolvimento Agrícola

As atividades econômicas da população giram em torno, principalmente, da agricultura, pecuária, produção florestal, aquicultura e pesca. As atividades agropecuárias do município ocupam um total de 24.324 ha do território (IPARDES, 2018). Destas atividades, 96,65% utilizam as terras para lavouras temporárias e a pecuária. Do total de área destinada à lavoura temporária, 14.850 ha (61%) são utilizadas para cultivo de soja e milho, seguidos secundariamente pelo trigo (1,23%), mandioca (1,29%), fumo (0,80%), cana-de-açúcar (0,51%) e aveia (0,41%) (IPARDES, 2018).

1.1.2 Calendário Agrícola da Região

Missal é um dos maiores representantes da agricultura familiar no Paraná, respondendo por 40% de toda a produção agrícola no município (PREFEITURA MUNICIPAL DE MISSAL – PR, 2014). Contudo, segundo a Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), uma extensa lista de agrotóxicos permanecem legalizados para comércio e uso no estado, sendo mais de 303 toneladas comercializadas, no ano de 2018, somente no município de Missal, sendo a soja a cultura responsável por mais

de 50% da aplicação dos componentes químicos agrários desde 2016 (Dados SI-AGRO).

O cultivo de soja, após a colheita dos grãos no início do ano, é permitido apenas a partir do dia 11 de setembro de cada ano. O período entre 10 de junho a 10 de setembro compreende ao vazio sanitário vegetal para a soja no território paranaense, no qual é proibido cultivar, manter ou permitir a existência de plantas vivas de soja em qualquer estágio vegetativo (ADAPAR, 2019). Considerando que a soja é uma das principais sementes cultivadas no município (PREFEITURA MUNICIPAL DE MISSAL – PR, 2014), setembro é o melhor mês para a semeadura, pois o grão precisa absorver metade do seu peso em água (EMBRAPA, 2013). A semeadura em solo seco retarda o processo de germinação da semente de soja, por isso seu plantio ocorre apenas no início da estação chuvosa. Portanto, espera-se a entrada de novos componentes químicos no solo, advindos da aspersão de agroquímicos para preparo do terreno à nova safra a partir de setembro, fim do período estipulado para o vazio sanitário.

1.1.3 Saúde da População

A crescente descarga de produtos químicos perigosos no ambiente afeta o equilíbrio dos ecossistemas naturais e, conseqüentemente, chama a atenção de vários pesquisadores e agências governamentais para a saúde dos organismos vivos (LEME, 2009) e das pessoas. Entre 2016 e 2017, o município de Missal realizou 2.451 procedimentos ambulatoriais na área de Oncologia. Isto representa 22,56% da população total do município, ultrapassando a média de procedimentos de 10,72% da regional de Saúde de Foz do Iguaçu (SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE, 2017).

As fontes de exposição cotidianas de uma população à agentes químicos potencialmente tóxicos são o ar, a água e os alimentos (AMORIM, 2003). A avaliação da exposição aos agentes químicos é um importante aspecto para a saúde pública, possibilitando medidas que previnam o contato com micropoluentes e atuem na redução da incidência de doenças decorrentes da interação das substâncias químicas com o organismo humano (AMORIM, 2003). Segundo os Artigos 3 e 4 da portaria nº. 29.194 do Ministério da Saúde (2011), “toda água destinada ao consumo humano, distribuída coletivamente por meio de sistema ou solução alternativa coletiva de abastecimento de água, deve ser objeto de controle e vigilância da qualidade da água” e “toda água

destinada ao consumo humano proveniente de solução alternativa individual de abastecimento de água, independentemente da forma de acesso da população, está sujeita à vigilância da qualidade da água”.

Analisar os potenciais efeitos nocivos da água dos poços de abastecimento do município é uma medida preventiva que pode levar a políticas de proteção à saúde assegurando a qualidade do recurso fornecido à população. O crescente aumento populacional leva à produção de mais resíduos secundários advindos do cultivo e de outros meios de produção. Tais resíduos podem ter efeito cumulativo em meios aquáticos e nos organismos que entram em contato com os corpos hídricos em exposição a contaminantes. A verificação constante de possíveis fontes de contaminação e acumulação de poluentes é necessária para assegurar medidas de proteção necessárias a um município.

1.2 Toxicologia

A Toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias com o organismo. A natureza bioquímica de um efeito nocivo é determinada a partir das características físico-químicas e biológicas de uma substância (AZEVEDO & CHASIN, 2004). Os efeitos tóxicos variam desde aqueles considerados leves, até os mais graves, podendo gerar incapacitação permanente de um órgão, como nos casos de cirrose e câncer (OGA, CAMARGO & BATISTUZZO, 2008, p 5). Para isto, entende-se por agente tóxico ou toxicante a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição (OGA, CAMARGO & BATISTUZZO, 2008, p 5).

A *Toxicologia genética* estuda a toxicidade dos agentes que interagem com o material genético resultando em alterações dos ácidos nucleicos ou seus componentes e levando à inativação ou modificação na sua estrutura e/ou função (DHAWAN, 2013 pg vii).

1.2.1 Biomarcadores

O estudo de agentes ambientais genotóxicos dentro da toxicologia é realizado por meio de biomarcadores. De maneira geral, “biomarcador” pode ser considerado uma medição em um sistema biológico como indicador de exposição, efeito, susceptibilidade ou doença clínica (RÍOS & SOLARI, 2010). As medidas consideradas como biomarcadores podem ser um elemento químico, um gene, uma proteína, entre outras. Os biomarcadores são a base para avaliar a interação dos organismos com elementos tóxicos e podem ser indicadores de futuras doenças (VALENCIA-QUINTANA et al., 2018).

Há três categorias de biomarcadores: biomarcadores de *efeito*, biomarcadores de *exposição* e biomarcadores de *susceptibilidade*. Os de susceptibilidade indicam indivíduos com maior probabilidade de efeitos adversos devido às características de cada um. Os de efeito podem indicar uma redução dos riscos decorrentes da exposição quando ocorre a diminuição de sua expressão. Já os biomarcadores de exposição podem indicar uma mudança nas condições de exposição mas não necessariamente uma redução nos riscos em todos os indivíduos expostos (ALBERTINI et al., 2000). A distinção entre essas classes nem sempre é definitiva, no entanto, especialmente entre biomarcadores de efeito e exposição, a interpretação dos resultados dentro do contexto da análise, seja como interpretação de riscos à saúde [do organismo] ou como uma medida de exposição, determina a categoria do marcador utilizado (ALBERTINI et al., 2000).

Enquanto biomarcadores utilizados para identificação e categorização de doenças clínicas possuem uma larga história, a detecção dos efeitos adversos decorrentes da exposição a agentes químicos (biomarcadores toxicológicos) possui uma história mais recente (RÍOS & SOLARI, 2010). Os biomarcadores *toxicológicos* tem suas raízes na toxicologia forense e na saúde ocupacional, que levaram à descrição dos limites de segurança para os níveis de exposição e *índices de exposição biológica* (BEIs) (RÍOS & SOLARI, 2010).

Portanto, dentro do atual enfoque, o que mais se adequa para o que queremos observar no presente trabalho e que possui capacidade de indicação de danos causados no organismo, são os Biomarcadores de efeito. Podemos caracterizar, com análises quantitativas e qualitativas demonstradas por marcadores celulares, o *efeito* gerado no organismo. Tais efeitos indicam danos causados por agentes em contato

com o organismo modelo. Segundo Amorim (2003), um biomarcador de efeito é apropriado para utilização na documentação das alterações *pré-clínicas* ou efeitos adversos à saúde decorrentes da exposição e consequente absorção de substâncias químicas.

Biomarcadores utilizados para avaliar *efeito*, podem ser dos tipos pigmentos fotossintéticos; produtos de oxidação e marcadores *citogenéticos* (AMORIM, 2003). Dentro deste último, as *Aberrações Cromossômicas* (AC) marcam o grau de genotoxicidade e as modificações nas taxas de divisão celular, observadas pelo cálculo do *Índice Mitótico* (IM), demonstram o grau de citotoxicidade. O incremento na frequência dos biomarcadores de genotoxicidade e a alteração dos marcadores de citotoxicidade têm sido relacionados com o risco de câncer (VALENCIA-QUINTANA et al., 2018).

1.2.2 Genotoxicidade

Compreende-se por *genotoxicidade* o dano químico produzido sobre o material genético (DNA e RNA), ainda que, em algumas ocasiões, utiliza-se o termo para fazer referência à forma compacta do DNA, os cromossomos (GONZALEZ, 2009). Genotoxicidade é o efeito de agentes que interagem com o DNA, produzindo alterações de estrutura e função. Quando tais alterações se fixam, são denominadas mutações e são capazes de serem transmitidas.

As substâncias genotóxicas podem se unir diretamente ao DNA ou atuar indiretamente, afetando as enzimas envolvidas nos mecanismos fisiológicos, na replicação e na transcrição (GONZALEZ, 2009).

Os marcadores de genotoxicidade mais estudados são as Aberrações Cromossômicas (AC) *numéricas* e *estruturais*. AC numéricas se referem à mudança no total de cromossomos de uma célula, que constituem o cariótipo singular da espécie, devido à anomalias durante a divisão celular (ALBERTINI et al., 2000), tal como descrito a seguir:

AC numéricas podem ser mudanças do tipo *aneuploidia*, quando possuem mais (hiperplóidia) ou menos (hipoplóidia) cromossomos que o total normal,

ou do tipo *poliploidia* quando possui um número total de cromossomos múltiplo do normal (4n, 8n). Tais efeitos podem ocorrer por mecanismos que danificam o fuso mitótico e elementos associados, por danificações nas subestruturas cromossômicas, por alterações na fisiologia da célula ou por rupturas mecânicas. Os mecanismos pelos quais a poliploidia ocorre são menos conhecidos.

ALBERTINI et al., 2000, pg 143

AC estruturais podem ser induzidas por diversos fatores, como quebra da molécula de DNA [ação clastogênica], inibição da síntese de DNA e replicação de DNA alterado (LEME, 2009). Hagmar et al. (2004) afirmam que AC estruturais em ambas cromátides-irmãs de células de linfócitos humanos são observadas como o reflexo da quebra de ambas as fitas de DNA, geradas em sua maioria, durante a etapa G0 da célula. As quebras causadas durante as etapas G0-G1 da célula se devem majoritariamente ao mecanismo de reparação de duplas-quebras na cadeia de DNA, sendo estas duplas-quebras, provavelmente, formadas em humanos durante a fase S de linfócitos *in vitro* (HAGMAR et al. 2004) pois muitos agentes tóxicos precisam ser metabolicamente ativados pelo organismo.

Agentes clastogênicos [que provocam lesão do tipo quebra] S-dependentes, são aqueles que necessitam que a célula entre na fase S de duplicação do DNA para ocasionar mutações do tipo cromatídica, sendo este, o método mais comum pelo qual químicos clastogênicos provocam aberrações cromossômicas. Tais mutações em linfócitos humanos aparecem após a primeira mitose (ALBERTINI et al., 2000). Poucos agentes são clastógenos S-independentes, como a radiação ionizante e a bleomicina, tendo a capacidade de gerar quebras cromatídicas e cromossômicas (ambas cromátides de um cromossomo) em qualquer estágio da vida celular (ALBERTINI et al., 2000). Segundo Albertini et al. (2000), poucos agentes induzem ruptura do DNA de maneira direta. ACs podem fornecer dados qualitativos e quantitativos sobre os efeitos da exposição a um agente (GRANT, 1978). Lesões iniciais, como rupturas de cadeia única, são induzidas majoritariamente por agentes S-dependentes, gerando AC do tipo *cromatídica* (HAGMAR et al. 2004).

Em um trabalho pioneiro de Kihlman (1966), a presença de aberrações cromossômicas, após tratamento com diferentes horas de exposição, demonstrou *gaps*, rupturas e isocromossomos produzidos no estágio celular de interfase tardia, após 3 a 7 horas de tratamento e imediatamente após 24 horas de tratamento. Diversos estudos têm demonstrado que o pico de AC para muitos agentes genotóxicos não é obtido até a segunda mitose, cerca de 42 horas após o final do tratamento (HOLLANDER, 1971) existindo fases celulares mais sensíveis para diferentes mutágenos. Do tempo do início do tratamento, ao aparecimento de AC, na anáfase e metáfase, podem diferenciar a etapa celular da mitose afetada, desde que, a atividade mitótica não esteja marcadamente suprimida pelo tratamento (HOLLANDER, 1971).

Em testes de AC, assume-se que altas doses de um determinado químico induz aberrações estruturais, que, em sua maioria, são instáveis e podem levar à morte celular (BIANCHI, 2008). A alta frequência de células com AC estruturais em linfócitos humanos é o primeiro biomarcador de genotoxicidade que realmente mostrou uma associação com o risco geral de câncer (HAGMAR et al. 2004). Grant (1978) e Leme & Morales (2009) buscaram fazer uma análise das AC como biomarcadores em testes com vegetais superiores. AC como quebras são indicadoras de ação clastogênica, enquanto pontes-anafásicas, perdas cromossômicas, atrasos, aderências, multipolaridade e C-metáfases decorrem de efeitos aneugênicos. Um dos principais focos de observar cromossomos como marcadores é observar se diferentes químicos tem potencial clastogênico. Entretanto, AC também podem ser resultado de distúrbios no fuso mitótico causado por agentes turbagênicos, como a colchicina, que geram erros de segregação (GRANT, 1978). C-metáfases [também descritas como C-mitoses] são uma configuração em par devido à não-disjunção das cromátides-irmãs, em decorrência de compostos antimitóticos. C-mitoses em plantas ocorrem devido ao acúmulo de substâncias químicas C-mitóticas, que presentes em grandes quantidades, podem interromper completamente a mitose (GRANT, 1978). Cromossomos, quando da ausência dos telômeros, ficam "pegajosos" e podem se fundir com outras extremidades partidas do cromossomo resultando em fragmentos acêntricos e pontes que podem ser observadas nas células mitóticas do primeiro ciclo celular após tratamento mutagênico (Nefich H et al. 2013). Rupturas ou quebras cromossômicas são consideradas aberrações instáveis, relacionadas a molécula de DNA responsável pela linearidade contínua do cromossomo (GRANT, 1978).

AC ocorrem devido à alterações no material genético, através de perda, ganho ou rearranjo dos segmentos ou partículas associadas envolvendo mudanças na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos (JAIN et al., 2018) que podem ocorrer como resultado de exposição a agentes.

As AC em linfócitos do sangue periférico têm sido aplicadas há mais de 30 anos em ambientes ocupacionais e ambientais como um biomarcador de efeitos precoces de agentes genotóxicos cancerígenos (HAGMAR et al. 2004). Existem evidências experimentais e epidemiológicas do envolvimento de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas na carcinogênese. (ALBERTINI et al., 2000). Contudo, nem toda ação genotóxica é carcinogênea.

1.2.3 Citotoxicidade

O Índice Mitótico (IM) tem sido usado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade de diversos agentes. Os níveis de citotoxicidade podem ser determinados pelo aumento ou pela redução neste índice (LEME & MORALES, 2009). A primeira vez que o IM foi observado em correlação com a redução na fertilidade [distúrbios de meiose] foi em 1931, como resultado de tratamento com pesticidas (GRANT, 1978). Segundo Grant (1978), aberrações citológicas em plantas podem ser um excelente sistema de monitoramento para detectar químicos ambientais que podem apresentar risco ao material genético.

1.2.4 Bioensaio com *Allium cepa*

Plantas superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos para avaliar poluentes ambientais, sendo frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento (LEME & MORALES, 2009). As plantas geralmente têm cromossomos grandes e em baixo número, e o meristema da raiz possui alta proporção de células em mitose, sendo uma das mais adequadas para detecção de diferentes tipos de xenobióticos o *Allium cepa* (NEFIC et al., 2013).

Diversas plantas providenciam sistemas únicos para a detecção de agentes químicos mutagênicos e como grupo, conseguem oferecer sistemas para a análise de, praticamente, todos tipos de aberrações cromossômicas e genéticas conhecidas

(GRANT, 1978). Diversos estudos realizados sobre pesticidas indicam que existe uma excelente correlação entre anormalidades cromossômicas encontradas nos sistemas radiculares e aquelas encontradas nos sistemas celulares de mamíferos (GRANT, 1978).

O teste de *A. cepa* tem sido considerado, por diversos autores, como de baixo custo e de fácil execução, além de ser um bioensaio eficiente para análise de AC, possibilitando a avaliação de ações clastogênicas e aneugênicas (LEME & MORALES, 2009). Além disso, é um importante teste *in vivo*, onde as raízes crescem em contato direto com a substância de interesse, permitindo prever possíveis danos ao DNA de seres humanos (NEFIC et al., 2013).

A diminuição do índice mitótico (IM) nas células meristemáticas de *A. cepa* pode ser considerado um método confiável para determinar a presença de agentes citotóxicos no ambiente (NEFIC et al., 2013). Estes dados podem ser de uso dos serviços públicos na melhoria das condições locais e na prevenção ou manutenção de patologias endêmicas causadas pelo contato da população com elementos químicos tóxicos como agentes genotóxicos e citotóxicos.

2 METODOLOGIA

2.1 Áreas de Coleta

Em conjunto com a prefeitura de Missal foram selecionados 12 pontos de amostragem de água no município, sendo dois referentes ao Rio São Vicente, um referente ao Lago da prainha de Vila Natal (reservatório de Itaipu) e nove pontos de coleta de água de torneira provenientes de poços artesianos utilizados no abastecimento pela população de Missal (**Tabela 1**).

Id	Nome	Características	Profundidade do poço	Abastecimento	Vazão do poço	Coordenadas geográficas
P1	Sanepar	Sede da empresa prestadora de serviço de abastecimento de água - Sanepar. Água da torneira da caixa d'água principal.	2 poços de captação água: 135 m e 300 m	50% da população	87,5 m ³ /h ou 1.750 m ³ /dia	25°05'22.4"S 054°15'08.3"W
P2	Fazenda Formiga	Área de Pecuária.	não especificado	31 residências, aprox. 126 pessoas	50m ³ /h	25°08'10.3"S 054°06'34.7"W
P3	Padre Rick	Área urbana rodeada de agricultura	110m	31 residências com hidrômetro, aprox. 109 pessoas.	3,0m ³ /h	25°05'22.9"S 054°14'36.3"W
P4	Dom Armando	Área Urbana	2 poços: um não especificado e outro de 128m	69 residências e 168 residências, aprox. 947 pessoas.	8 m ³ /h e 10m ³ /h	25°02'04.5"S 054°14'40.8"W
P5	Boa Esperança	Área Industrial com presença de Agricultura	120m	65 residências com hidrômetro, aprox. 252 pessoas.	9,0m ³ /h	25°02'06.5"S 054°14'45.6"W
P6	Vila Natal / torneira	Torneira de abastecimento público na região da prainha da represa	100m	11 residências e a praia (espaço de lazer e turismo), atendendo aprox. 35 pessoas	11,3m ³ /h	25°02'46.1"S 054°20'38.8"W
P7	São João	Periurbano - horticul-tura	42m	39 residências com hidrômetro, aprox. 152 pessoas	3,0m ³ /h	25°07'31.6"S 054°16'54.8"W
P8	Vista Alegre	Área Urbana - Posto de Saúde	87-90m	85 residências, com hidrômetro, aprox. 341 pessoas.	14m ³ /h	25°08'17.8"S 054°13'13.8"W
P9	Portão Ocoí	Área urbana - Unidade de Saúde da Família	185m	225 residências, com hidrômetro, aprox. 894 pessoas.	7,0m ³ /h	25°10'39.6"S 054°10'55.3"W
P10	Antiga represa Rio São Vicente	Rio São Vicente, antigo ponto de coleta de água da Sanepar, desativado	-	-	-	25°04'50.7"S 054°13'21.2"W
P11	Vila Natal / prainha	Lago de itaipu	-	-	-	25°02'46.1"S 054°20'38.8"W

P12	Ponte molhada	Rio São Vicente	-	-	-	25°03'20.7"S 054°14'42.8"W
-----	---------------	-----------------	---	---	---	-------------------------------

Tabela 1. Característica dos pontos de coleta para amostragem de água do município de Missal - PR. Os pontos 10, 11 e 12 são referentes a coletas diretamente no rio ou lago.

As localidades de coleta visaram ser as mais representativas possíveis do município de Missal, porém também o mais amplas possíveis, abrangendo o máximo de suas paisagens (**Figura 2**).

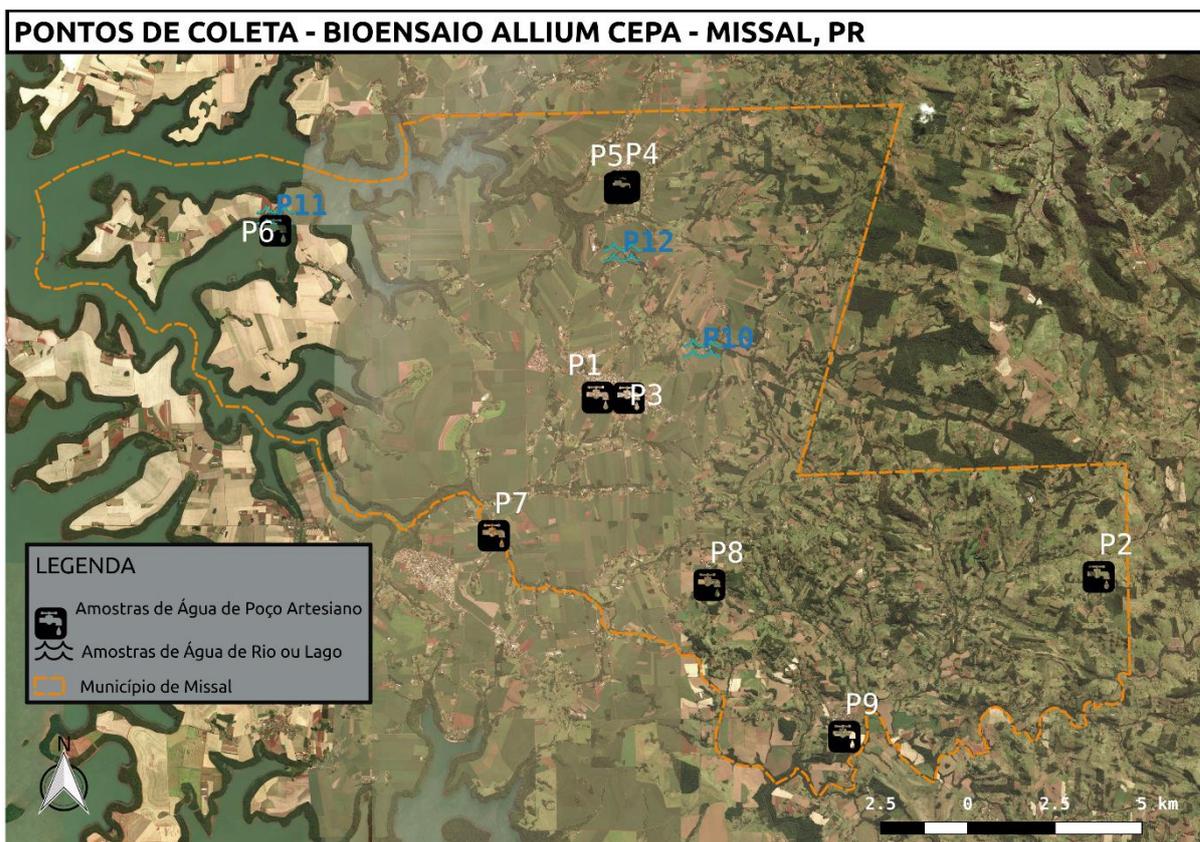


Figura 2: pontos de coleta de água representados no mapa de Missal, PR.

2.2 Coleta de Amostras

As amostras de água foram coletadas em dois períodos sendo: no final do mês de setembro e de outubro de 2019. O preparo dos frascos para armazenamento das

amostras de água e a coleta seguiram procedimento padronizado. Limpeza: os frascos e tampas foram enxaguados 1 vez com sabão e 10 vezes com água da torneira pegando todas as bordas; foram então submetidos a agitação ultrassônica no sonicador por 10 minutos contendo água da torneira até a borda do interior dos frascos; enxaguados com água destilada 10 vezes; submetidos ao sonicador por mais 10 minutos com água destilada no frasco; posteriormente foram descontaminados com ácido nítrico 10% (v/v) por duas horas e enxaguados 10 vezes com água ultrapura tipo I $18,2 \text{ M}\Omega\text{-cm}$ (ELGA LabWater PURELAB Option-Q) e postos para secar em estufa a 40°C . Para a coleta de água de poços artesianos, as torneiras foram abertas e as primeiras águas armazenadas no encanamento foram descartadas. Após os primeiros minutos, o frasco foi aberto e seu interior ambientalizado com a água da amostra. Cerca de 1 L de amostra foram coletadas em frasco de vidro âmbar, em cada ponto de coleta. As amostras foram transportadas e armazenadas a 4°C para serem analisadas em até 7 dias.

2.3 Teste utilizando *Allium cepa*

2.3.1 Germinação

Bulbos de *Allium cepa* foram selecionados pela ausência de fungos e manchas, lavados e as primeiras capas removidas. Raízes velhas foram cortadas e a parte inferior do bulbo colocada em contato com solução de água dura reconstituída, até a metade do seu corpo para a germinação, durante 72 horas, com troca diária de água. A solução de água dura é composta pela mistura de 0,12g de MgSO_4 ; 0,19g de NaHCO_3 ; 0,008g de KCl e 0,12g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 1 L de água ultrapura tipo I. A solução visa garantir a ausência de contaminantes na água pré-tratamento e isolar o efeito mutagênico das águas de amostragem do município.

2.3.2 Exposição às amostras de água

Para cada amostra de água e o controle positivo, três bulbos em bom aspecto de crescimento foram removidos da água dura e expostos à água de coleta, durante 24 horas (T1) e 48 horas (T2), com substituição diária da água. As réplicas dos bulbos visaram garantir material suficiente até o final do experimento em caso de condições

adversas dos indivíduos, como contaminação por fungos. Os tempos T1 e T2 visaram observar efeitos genotóxicos e citotóxicos em diferentes tempos do ciclo celular.

2.3.3 Fixação das Raízes de *A. cepa*

Após o término de cada tempo de exposição, a ponta de algumas raízes foram removidas e fixadas em etanol-ácido acético 3:1 (v/v) e armazenadas em congelador a temperaturas entre -20°C e -15 °C, até a sua utilização.

2.3.4 Coloração e Preparo das lâminas

Para coloração das células, os meristemas foram retirados do fixador e imersos em álcool 70% (v/v) por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram colocados em tubo de ensaio com orceína acética 2% e HCl 1N 1mol/L, em proporção de 9 gotas do corante para 1 gota de solução de ácido clorídrico, e aquecido a 5 cm da chama de uma lamparina até liberação dos primeiros vapores, sem alcançar fervura. O tubo de ensaio foi fechado com algodão imediatamente e deixado repousar por 20 minutos.

Após o período de exposição ao corante, as raízes foram removidas e postas sobre uma lâmina de microscopia, efetuando em seguida um corte para isolar o meristema da raiz e descartando o restante do corpo radicular. Uma a duas gotas da própria solução de orceína acética em HCl foram adicionadas sobre os meristemas na lâmina para facilitar o espalhamento celular. Em seguida foi apoiada uma lamínula e efetuado o *squash* com o auxílio de uma borracha rombuda. O excesso de orceína foi removido e a lâmina foi observada em microscópio óptico com aumento de 10X para verificação da qualidade, sendo, opcionalmente, selada com esmalte incolor para aumentar a durabilidade.

2.3.5 Controles

O controle negativo foi feito com a remoção de algumas raízes ao acaso dos bulbos germinados na solução de água dura, anteriormente ao primeiro tempo de exposição às amostras. O controle positivo foi feito com dicromato de potássio a 0,05%

(m/v) para inibição do crescimento radicular e observação de aberrações cromossômicas.

2.3.6 Contagem de Células

Para a leitura dos resultados foram confeccionadas uma lâmina por amostra e contabilizadas 1000 células para cada ponto e para os controles negativo e positivo. Para a elaboração do Índice Mitótico (IM) foi calculada a razão:

$$IM = (n^{\circ} \text{ total de células em divisão} / n^{\circ} \text{ total de células analisadas}) \times 100$$

Para determinar a genotoxicidade, medida pelas AC, foram consideradas todas as mutações encontradas durante as etapas da divisão celular, nos estágios da prófase, metáfase, anáfase e telófase, como: pontes anafásicas, aderência, c-mitoses, anáfase multipolar, atraso, perda cromossômica, stathmo-anáfase, entre outras, e calculado o índice:

$$AC = (n^{\circ} \text{ total de células com aberrações cromossômicas} / n^{\circ} \text{ total de células analisadas}) \times 100$$

2.4 Análises Estatísticas

Foi realizado um teste de normalidade para observar a distribuição dos dados. Aplicou-se uma análise não-paramétrica através de “ranqueamento em R” das variáveis de observação (aberrações e fases da divisão). Os dados ranqueados foram submetidos ao teste de modelos lineares mistos para análise de cada ponto dos dados de setembro e outubro de 2019 (T1 e T2), onde os valores de cada ponto foram comparados com os respectivos controles negativos. O teste de Wilcoxon foi utilizado para análise da diferença entre os tempos (T1 e T2) e comparação dos meses. Foram utilizados os softwares *R 3.6.1* e *Past 3.26*.

3 RESULTADOS

A comparação dos tempos no teste de Wilcoxon obteve valores de $p \leq 0,05$ apenas entre os diferentes meses: para o IM (Set-T1 x Out-T1: $p=0,0214$; Set-T2 x Out-T2: $p=0,0541$) e para as AC do T1 (Set-T1 x Out-T1: $p=0,0427$); e indicou diferença entre as AC de outubro (Out-T1 x Out-T2: $p=0,0141$). As tabelas contendo os resultados da contagem de células do tecido meristemático das raízes de *A. cepa* expostas às amostras e aos controles por 24 e 48h estão disponíveis a seguir. Os valores do IM se encontram nas **Tabelas 2 a 5** e as AC encontradas junto com índice de AC se encontram nas **Tabelas 6 a 9**. O resultado das análises estatísticas de setembro e outubro se encontram em **ANEXO A** nas **Tabela 11 e 12**.

IM Setembro (T1)	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Prófases	13	43	5	44	48	48	51	42	36	38	19	12	4	1
Metáfases	9	20	5	10	10	11	15	14	9	4	2	4	1	0
Anáfases	5	6	4	3	20	14	6	20	6	7	1	6	4	0
Telófases	5	22	9	17	17	15	1	13	12	10	3	6	2	0
Total de céls. Contabilizadas	1060	1014	1035	1059	1044	1041	1070	1116	1008	1055	1016	1093	1041	1061
Total de Céls. em Divisão	32	81	23	74	95	88	73	89	63	59	25	28	11	1
IM	3,0188	7,9881*	2,2222	6,9877	9,0996*	8,4534*	6,8224	7,9749*	6,25	5,5924	2,4606	2,5617	1,0566*	0,0942

IM Setembro (T2)	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Prófases	13	42	50	32	29	37	33	35	10	18	37	26	36	1
Metáfases	9	12	10	8	6	10	9	14	1	21	17	15	5	0
Anáfases	5	12	10	12	9	8	9	9	2	14	8	13	7	0
Telófases	5	28	3	7	15	17	4	12	4	27	12	14	10	0
Total de céls. Contabilizadas	1060	1023	1022	1049	1047	1032	1056	1033	1018	1033	1082	1070	1062	1061
Total de Céls. em Divisão	32	94	73	59	59	72	55	70	17	80	74	68	58	1
IM	3,0188	9,1886*	7,1428	5,6244	5,6351	6,9767*	5,2083	6,7763*	1,6699	7,7444*	6,8391*	6,3551*	5,4613	0,0942

Tabelas 2 e 3. Índice Mitótico das células do meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água por 24h (T1) e 48h (T2) para cada ponto de coleta do município de Missal – PR em SETEMBRO de 2019, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). Valores de $p < 0,05$ nas análises lineares mistas foram marcados com *. IM = $(n^\circ \text{ total de células em divisão} / n^\circ \text{ total de células analisadas}) \times 100$.

IM Outubro (T1)	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Prófases	21	6	22	7	22	23	24	26	9	5	37	8	30	1
Metáfases	5	3	8	2	5	5	2	4	2	3	16	0	7	0
Anáfases	4	1	0	0	4	2	2	2	0	0	6	0	4	0
Telófases	7	0	10	3	3	5	7	5	2	0	14	1	7	0
Total de céls. contabilizadas	1057	1016	1021	1068	1055	1016	1110	1063	1050	1038	1031	1057	1082	1061
Total de Céls. em Divisão	37	10	40	12	34	35	35	37	13	8	73	9	48	1
IM	3,5004	0,9842 *	3,9177	1,1235 *	3,2227	3,4448	3,1531	3,4807	1,2380 *	0,7707 *	7,0805 *	0,8514 *	4,4362	0,0942

IM Outubro (T2)	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Prófases	21	26	8	24	26	34	18	20	25	-	24	24	28	1
Metáfases	5	8	0	6	7	9	14	6	12	-	4	8	6	0
Anáfases	4	8	1	5	14	3	13	1	3	-	3	5	13	0
Telófases	7	15	1	9	19	7	4	3	7	-	2	10	12	0
Total de céls. contabilizadas	1057	1056	1000	1024	1025	1044	1035	1028	1006	-	1046	1048	1008	1061
Total de Céls. em Divisão	37	57	10	44	66	53	49	30	47	-	33	47	59	1
IM	3,5004	5,3977 *	0,01 *	4,2968	6,4390 *	5,0766	4,7342	2,9182	4,6719	-	3,1548	4,4847	5,8531 *	0,0942

Tabelas 4 e 5. Índice Mitótico das células do meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água por 24h (T1) e 48h (T2) para cada ponto de coleta do município de Missal – PR em OUTUBRO de 2019, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). Valores de $p < 0,05$ nas análises lineares mistas foram marcados com *. IM = (nº total de células em divisão/ nº total de células analisadas) x 100.

AC Estrutural	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Anafase Multipolar	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ana-Estrelada	1	0	0	0	0	0	0	2	1	0	1	1	0	0
Anel Cromos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
C-mitose	1	10	0	0	5	4	0	0	0	0	0	0	1	0
Fragmentos	0	2	3	0	9	15	4	6	1	2	0	2	0	0
Retardatários	2	0	0	1	1	1	1	3	4	0	0	1	2	0
Metafase-estrelada	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Nl	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Núc. Desiguais na telofase	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Perda cromos.	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0	0	0
Polarização Diagonal	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Ponte	2	4	0	1	5	4	3	9	1	4	1	2	0	0
Pulverização cromossômica	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quebras	0	10	2	1	13	9	0	1	0	0	0	0	0	0
Stathmo-anafase	0	1	0	0	2	4	0	0	1	0	1	0	1	0
Stickiness	4	10	6	4	5	8	6	2	3	0	5	3	1	0
Total AC	14	39	12	08	42	48	14	24	13	09	08	09	05	00
Índice AC(%)	1,3207	3,8461	1,1594	0,7554	4,0229	4,6109	1,3084	2,1505	1,2896	0,8530	0,7874	0,8234	0,4803	0,0

Tabela 6. Quantidade de células com anormalidades cromossômicas (AC) no meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água do município de Missal – PR em SETEMBRO de 2019 por 24h (T1) para cada ponto de coleta, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). AC = (nº total de células com aberrações cromossômicas/nº total de células analisadas) x 100.

AC Estrutural	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Anafase Multipolar	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
Ana-Estrelada	3	0	0	0	0	0	4	0	0	1	1	0	0	0
Anel Cromos.	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
C-mitose	1	2	4	4	3	4	9	4	0	7	6	4	2	0
Fragmentos	0	8	3	4	0	2	9	5	1	2	5	5	4	0
Retardatários	2	0	0	0	1	1	0	2	0	0	3	1	1	0
Metafase-estrelada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nl	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Núc. Desiguais na telofase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda cromos.	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Polarização Diagonal	1	0	1	0	0	2	1	0	1	0	1	1	0	0
Ponte	2	5	4	2	3	3	1	1	0	6	1	9	5	0
Pulverização cromossômica	0	0	0	0	0	0	0	4	1	2	0	0	1	0
Quebras	0	6	6	9	2	7	3	5	2	2	1	2	3	0
Stathmo-anafase	0	0	4	4	3	1	1	0	0	6	3	0	0	0
Stickiness	4	10	6	5	5	5	2	21	1	11	9	9	2	0
Total AC	14	31	30	29	27	26	32	42	6	38	30	32	20	00
Índice AC(%)	1,3207	3,0303	2,9354	2,7645	2,5787	2,5193	3,0303	4,0658	0,5893	3,6786	2,7726	2,9906	1,8832	0,0

Tabela 7. Quantidade de células com anormalidades cromossômicas (AC) no meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água do município de Missal – PR em SETEMBRO de 2019 por 48h (T2) para cada ponto de coleta, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). Valores de $p < 0,05$, nas análises lineares mistas, foram marcados com *. AC = (nº total de células com aberrações cromossômicas/nº total de células analisadas) x 100.

AC Estrutural	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Anáfase Multipolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Ana-Estrelada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Anel Cromos.	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2	0	0	0
C-mitose	0	0	0	1	1	3	1	1	2	1	1	0	1	0
Fragmentos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	2	0
Retardatários	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	1	0
Metafase-estrelada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0
NI	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Núc. Desiguais na telofase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perda cromos.	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Polarização Diagonal	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	0
Ponte	2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	0	1	0
Pulverização cromossômica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Quebras	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Stathmo-anáfase	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Stickiness	2	1	3	1	0	0	0	2	0	2	2	0	3	0
Total AC	4	3	4	2	4	3	2	7	2	5	21	0	16	0
Índice AC(%)	0,3784	0,2952	0,3917	0,1872	0,3980	0,2952	0,1801	0,6585	0,1904	0,4816	2,0368*	0	1,4787*	0

Tabela 8. Quantidade de células com anormalidades cromossômicas (AC) no meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água do município de Missal – PR em OUTUBRO de 2019 por 24h (T1) para cada ponto de coleta, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). Valores de $p < 0,05$, nas análises lineares mistas, foram marcados com *. AC = (nº total de células com aberrações cromossômicas/nº total de células analisadas) x 100.

AC Estrutural	(-)	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	(+)
Anáfase Multipolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
Ana-Estrelada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
Anel Cromos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	0
C-mitose	0	0	0	0	1	0	0	12	8	-	4	2	4	0
Fragmentos	0	4	0	1	8	4	8	0	3	-	1	3	8	0
Retardatários	0	3	0	1	5	0	4	0	0	-	0	1	2	0
Metafase-estrelada	0	0	0	0	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
NI	0	1	0	0	0	0	0	0	2	-	0	0	1	0
Núc. Desiguais na telofase	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-	0	0	0	0
Perda cromos.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	1	0
Polarização Diagonal	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-	0	2	0	0
Ponte	2	1	0	1	1	0	3	0	0	-	1	2	3	0
Pulverização cromossômica	0	1	0	0	1	0	0	0	0	-	0	3	0	0
Quebras	0	4	0	4	7	2	8	1	7	-	2	1	6	0
Stathmo-anáfase	0	1	0	1	0	0	1	0	1	-	0	1	3	0
Stickiness	2	3	1	3	8	6	12	1	3	-	1	4	4	0
Total AC	4	19	1	11	33	12	36	14	25	-	9	19	32	00
Índice AC(%)	0,3784	1,7992*	0,1	1,0742	3,2195*	1,1494	3,4782*	1,3618	2,4850*	-	0,8604	1,8129*	2,9629*	0,0

Tabela 9. Quantidade de células com anormalidades cromossômicas (AC) no meristema radicular de *Allium cepa* após exposição às amostras de água do município de Missal – PR em OUTUBRO de 2019 por 48h (T2) para cada ponto de coleta, e controles Negativo (Água Dura) e Positivo (dicromato de potássio 0,05%). Valores de $p < 0,05$, nas análises lineares mistas, foram marcados com *. AC = (nº total de células com aberrações cromossômicas/nº total de células analisadas) x 100.

3.1 Índice Mitótico

O IM apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) em setembro (T1 e T2), em relação ao controle negativo, para P1, P5 e P7 (ambos tempos de exposição), e nos pontos P4, P12 para o T1 (24h de exposição) (**Tabela 2**) e P8, P9, P10 e P11 para o T2 (48h de exposição) (**Tabela 3**). Contudo, apenas o P12 apresentou valor *menor* do que o controle negativo. O P8 do T2 apresentou valor menor que o negativo, porém esta diferença não foi significativa, assim como para os pontos P2, P10 e P11 do T1.

Em outubro, houve diferença significativa, no IM, do Ponto 1 em ambos os tempos de exposição, e para os pontos P3, P8, P9, P10 e P11 após o T1 (24h de exposição) (**Tabela 4**) e nos pontos P2, P4 e P12 do T2 (48h de exposição) (**Tabela 5**). De maneira geral, em outubro houveram mais pontos com uma supressão significativa do IM que em setembro. Os resultados de T1 apresentaram diferenças para *menos* em P1, P8, P9 e P11, e em P2 para o T2.

3.2 Aberrações Cromossômicas Estruturais

A solução de dicromato de potássio a 0,05% (m/v), utilizado como controle positivo, não funcionou como controle para medir o efeito de genotoxicidade como esperado, pois inibiu completamente a divisão celular de todo o tecido meristemático, demonstrando ser eficaz para efeitos de citotoxicidade. Isto gerou um distanciamento entre os controles negativo e positivo durante a comparação das aberrações cromossômicas estruturais. Salles et al. (2016) também obteve insuficiência de dados para o controle positivo.

Não houveram valores significativos de aberrações cromossômicas para o T1 de setembro (**Tabela 6**). No T2, apenas P6 obteve $p < 0,05$ nas análises, apresentando índice de genotoxicidade maior que o controle negativo (**Tabela 7**). No T1 de outubro, P10 apresentou valor de p menor do que 0,00001, e P12 $p = 0,0002$ (**Tabela 8**). No T2 de outubro, metade dos pontos apresentou frequência dos marcadores de genotoxicidade acima da média de maneira significativa ($p < 0,05$) (**Tabela 9**). Todos os 3 bulbos de *A. cepa* para amostras do Ponto 9 foram perdidos. Todos os pontos com diferenças significativas nas frequências de AC de setembro e outubro apresentaram valores maiores que o controle negativo. Algumas das AC encontradas estão demonstradas na **Figura 3**, na página a seguir.

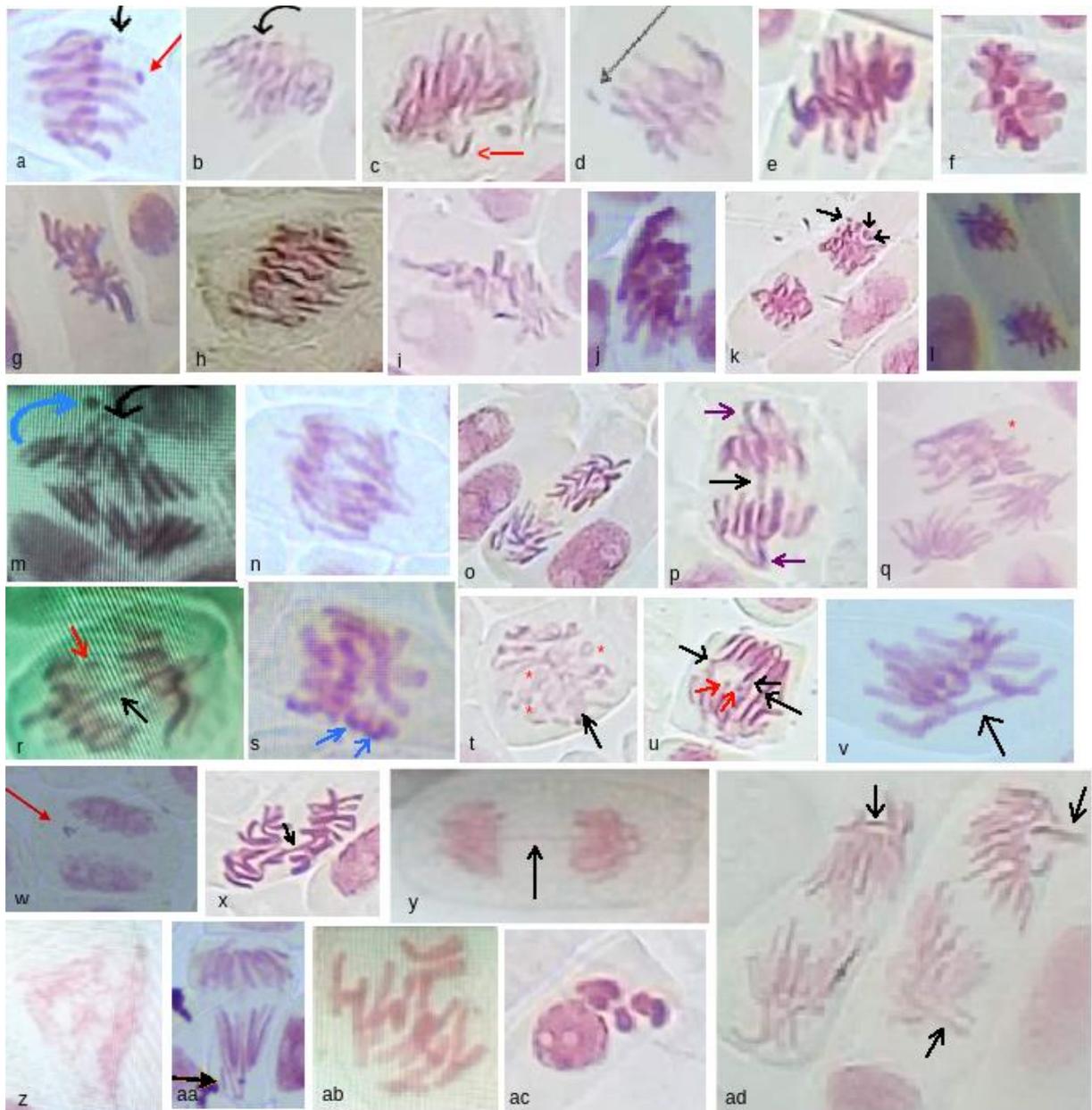


Figura 3. Aberrações cromossômicas estruturais em células do meristema radicular de *Allium cepa* após a exposição às amostras de água. a) metáfase com fragmento (seta vermelha) e quebra (seta preta); b-d) metáfases aderentes (stickiness), b) com fragmento, c) com cromossomo retardatório (atrasado), d) com fragmento; e-f) C-metáfases; g-h) metáfases aderentes (stickiness); i) espalhamento de cromossomos após o sequestro da mitose em c-metáfase; j) metáfase aderente com compactação cromossômica; k) célula com duas metáfases aderentes e fragmentos; l) telófase estrelada; m) anáfase diagonal com quebra (seta preta) e fragmento maior (seta azul); n) stathmo-anáfase; o) anáfase multipolar; p) anáfase com ponte (seta preta) e cromossomos deslocados (setas roxas); q) metáfase aderente com *perda do eixo central* (asterisco), e anáfase diagonal (abaixo); r) anáfase com ponte (seta preta) e fragmento (seta vermelha); s) metáfase aderente com dois anéis cromossômicos (setas azuis); t) metáfase com múltiplos anéis (demarcados com asteriscos) e perda do eixo organizador (seta preta); u) anáfase com múltiplas pontes (setas pretas) e fragmentos (setas vermelhas); v) metáfase com cromossomo atravessado; w) perda cromossômica; x) anáfase diagonal estrelada com ponte (demarcada por seta preta); y) ponte cromossômica na telófase; z) pulverização cromossômica em anáfase diagonal; aa) anáfase com fragmento cromossômico; ab) c-metáfase; ac) anomalia não identificada (NI); ad) duas anáfases diagonais com cromossomos atravessados (setas pretas).

4 DISCUSSÃO

Diversas formas de aberrações foram encontradas como exemplificadas na **Figura 3**. Muitas anormalidades são causadas por erro no fuso mitótico, como quando presentes substâncias aneugênicas capazes de inibir a polimerização das fibras de conexão com o cinetócoro, como exemplificado pela Colchicina em testes de laboratório. Todas as aberrações encontradas foram identificadas e agrupadas, totalizando 16 categorias na tabela de resultados. Dentre as aberrações cromossômicas encontradas, o foco foi direcionado para as de maior prevalência. As aberrações mais frequentes encontradas nos testes foram: C-mitoses, fragmentos cromossômicos, quebras cromossômicas e aderência (*stickiness*).

A configuração em pares de “C” de *Colchicine-mitosis* (C-mitose) pode ocorrer devido ao atraso da divisão dos centrômeros, levando à configuração característica na qual as cromátides-irmãs permanecem juntas presas por esta região (GRANT, 1978) mesmo após a metáfase. Grant (1978) apresenta uma lista de agentes C-mitóticos, incluindo aqueles que possuem componentes com mercúrio e pesticidas. Alguns são compostos tão ativos na formação de C-mitoses que têm sido recomendados para a geração artificial desta aberração. C-mitoses são aberrações estruturais que levam a modificações numéricas no total de cromossomos podendo levar à inativação da célula (NEFIC, et al. 2013).

Já os fragmentos cromossômicos são resultado de múltiplas quebras, levando à soltura de parte da cromátide e à perda do fragmento. O futuro deste fragmento, que dificilmente é novamente incorporado no corpo do núcleo, é a condensação e formação de um núcleo menor (micronúcleo). Fragmentos podem levar à deleção de genes primários e à morte celular. *Ferbam*, é um dos pesticidas mais conhecidos em gerar fragmentação cromossômica nas células de *A. cepa*. (GRANT, 1978).

O comprometimento da integridade do cromossomo através de pequenas alterações pode levar à diversas anomalias na estrutura do mesmo e no funcionamento da célula. Quebras do cromossomo podem gerar aderência (*stickiness*) e pontes anafásica, devido à ausência de telômeros e à exposição da fita de DNA contendo o material genético descondensado. Podemos observar eventos de ponte cromossômica como consequência de quebras anteriores na estrutura. O excesso de quebras pode

gerar pulverização cromossômica (perda total da integridade cromossômica) e morte celular (**Figura 3-z**).

A aderência cromossômica se deve às ligações inter-cromatídicas das fitas de DNA no cromossomo, com excesso de formação de núcleo-proteínas sem adequada interação (NEFIC et al., 2013). Quando ocorre uma quebra e há falha do mecanismo de reparação celular, o erro de base pode gerar futura aberração do tipo fragmento. Segundo Grant (1978), diversos pesticidas são clastógenos e tem a capacidade de produzir quebras nos cromossomos que podem se transformar em pontes e fragmentos.

O Ponto 1 de abastecimento da distribuidora da sede urbana (SANEPAR), e os pontos 7 e 8, de São João e Vista Alegre, apresentaram maiores frequências de C-mitose nas amostras de setembro após 24 horas de exposição para o ponto da Sane-par) e após 48 horas de exposição em outubro (para S. João e Vista Alegre). A alta quantidade de aberrações é contrária à alta frequência de células em divisão. O valor do IM costuma diminuir quando há grande presença de efeitos genotóxicos, e a sua supressão da divisão indica de forma segura a presença de componentes químicos tóxicos.

Contudo, o aumento de aberrações em outubro pode estar relacionado com o tempo de absorção dos elementos químicos após a sua entrada no sistema. O mês de setembro, início da primavera, consiste na entrada da estação de chuvas. Porém, o ano de 2019 foi marcado por períodos de seca e poucas ocorrências de chuva (**Figura 6**). A entrada de água, esperada para o mês de setembro, somente começou em outubro. As chuvas geram lixiviação e carregam componentes minerais e elementos tóxicos. As amostras do rio, ambientes lóticos, teriam entrado em contato com substâncias mutagênicas após maior precipitação, apresentando respostas às substâncias carregadas pela água da chuva logo após o período de aspersão de agrotóxicos para o cultivo.

**Alturas diárias de precipitação (mm)
2019**

Estação: MISSAL		Código: 02554020		Entidade: AGUASPARANÁ								
Município: Missal		Instalação: 27/02/1975		Extinção:								
Tipo: P		Bacia: Paraná 3		Sub-bacia: 2								
Altitude: 315,957 m		Latitude: 25° 04' 55"		Longitude: 54° 15' 16"								
DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
01	0,0	0,0	0,0	0,0	7,9	16,4	0,0	0,0	25,4	0,0	-	-
02	0,0	0,0	0,0	0,0	11,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
03	0,0	26,9	0,0	7,2	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	7,3	-	-
04	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
05	0,0	29,4	0,0	20,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,9	-	-
06	0,0	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	18,4	-	-
07	0,0	0,0	24,4	0,0	12,9	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2	-	-
08	70,4	0,0	25,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
09	1,7	0,0	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
10	0,9	11,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
11	0,0	1,9	0,2	0,0	12,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
12	0,5	11,2	1,4	0,0	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
13	0,0	0,0	56,4	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
14	0,4	0,0	40,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	5,7	0,0	-	-
15	0,7	3,5	5,8	0,0	0,0	0,0	17,6	0,0	0,0	0,0	-	-
16	25,4	8,6	2,9	0,0	0,0	0,0	14,9	0,0	0,0	0,0	-	-
17	2,7	0,0	45,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	-	-
18	9,4	1,7	26,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
19	60,2	6,4	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,0	-	-
20	0,0	29,5	4,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
21	0,0	5,7	1,5	19,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	16,6	-	-
22	0,0	0,0	0,0	4,9	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	-	-
23	0,0	0,0	0,0	0,0	7,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
24	9,8	0,0	0,0	0,0	25,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
25	0,0	17,1	0,0	0,0	14,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
26	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	38,5	1,7	0,0	0,0	0,0	-	-
27	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	0,0	0,3	0,0	0,0	0,0	-	-
28	0,0	0,0	0,0	36,2	69,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-
29	2,2	-	0,0	0,0	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	24,4	-	-
30	0,0	-	0,0	0,0	5,9	0,0	19,7	0,0	0,0	0,0	-	-
31	0,0	-	0,0	-	19,7	-	2,9	0,0	-	0,0	-	-
Valores mensais												
DIA	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
TOTAL	184,3	156,1	259,8	126,1	242,8	54,9	57,1	0,9	31,1	79,7	-	-
TOT. CONS.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MÁXIMA	70,4	29,5	56,4	36,2	69,7	38,5	19,7	0,7	25,4	24,4	-	-
DIAS CHUVA	12	13	14	7	15	2	6	2	2	8	-	-
Valores anuais												
304 dias observados	- dias de chuva		Máxima: -					Total: -				

Figura 4: Alturas diárias de precipitação para os meses de janeiro a outubro de 2019 segundo o Instituto das Águas do Paraná para a estação pluviométrica de Missal.

Apesar do índice mitótico não aparecer como estatisticamente significativo, nota-se uma diminuição, de maneira geral, nos pontos para o T1 de setembro para todas as amostras das águas de rios e lago (P10, P11 e P12). As águas de poços dependem da quantidade de água de chuva para infiltração de moléculas nos sistemas de captação após passarem pela filtração do terreno e se aderirem ao lençol

freático. Em outubro, após o aumento da precipitação, há maior presença de aberrações nas células-teste de *A. cepa* o que corrobora esta hipótese.

O Ponto 1 da Sanepar, localizado no centro urbano, apesar de obter valores significativos para citotoxicidade em todos os tempos de exposição, tanto de setembro quanto outubro, apenas apresenta taxa de divisão celular reduzida no teste de 24h de exposição das amostras de setembro. A frequência de genotoxicidade porém, em todos os tempos e ambos os meses de coleta, fica acima do controle *negativo*, exceto para o primeiro tempo de outubro, justamente quando ocorre uma queda relevante ($P < 0,05$) na divisão celular. Tais resultados sugerem que, quando não presentes compostos supressores do fuso mitótico nas amostras, há presença de elementos genotóxicos na água.

Algumas amostras, como da região de Dom Armando (P4), contrastam o alto índice de AC com a alta quantidade de células em mitose. Cabe a hipótese, segundo o dito por LEME & MORALES (2009), sobre IMs maiores que o controle negativo também poderem ser nocivos à célula por levá-las à proliferação desordenada e mesmo à formação de tumores. Porém, a citotoxicidade de amostras só é assegurada com a diminuição no valor do IM.

O teste de Wilcoxon apontou uma entrada significativa de compostos genotóxicos no mês de outubro, principalmente daqueles observados com maior frequência após dois ciclos mitóticos (T2) devido à rupturas de fita única que são duplicadas pelo mecanismo de reparação celular, gerando quebras do cromossomo e fragmentos. Justamente, comparações dos dois tempos em PCA (**Figura 5**) demonstram uma maior frequência de rupturas e C-mitoses após as 48h de exposição em outubro, após o aumento das precipitações.

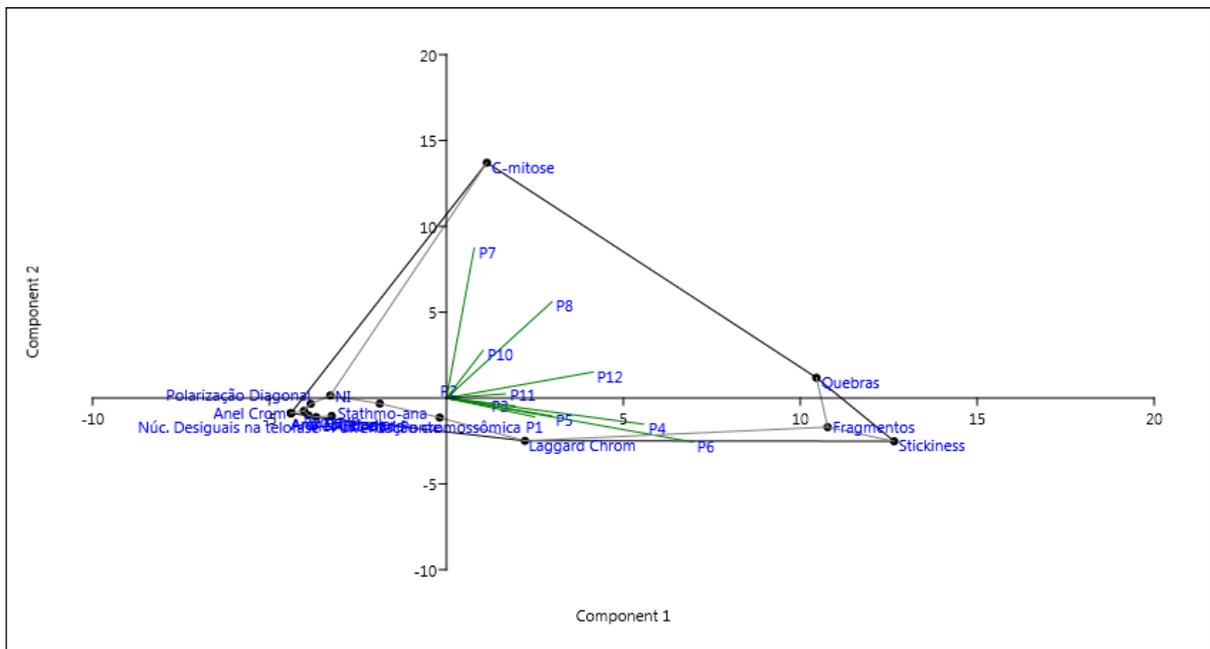


FIGURA 5: análise de componentes principais (PCA) para correlação de aberrações cromossômicas no tempo 2 (48h de exposição) de outubro com os pontos de coleta do bioensaio de *Allium cepa* para avaliação de efeitos genotóxicos potenciais da água de Missal - PR.

Tais rupturas cromossômicas poderiam ser geradas pela maquinaria de duplicação do DNA, ao replicar um *template* danificado. Diversas aberrações, apenas podem ser observadas a partir do segundo ciclo celular, mesmo que tenham sido geradas anteriormente. C-mitoses, no teste de *A. cepa*, podem estar diretamente relacionadas à presença de pesticidas como carbamatos, barban, benomil, carbaril, clorpropham, propham e diallate e os mercuriais (GRANT, 1978).

O ponto 4, referente à localidade de Dom Armando, presente em região urbana, apresentou grande quantidade de fragmentos e quebras nos bioensaios com as águas do mês de outubro, indicando genotoxicidade na amostra local. As localidades de Padre Rick (P3), Vista Alegre (P8) e Portão Ocoí (P9) também apresentaram citotoxicidade para o mês de outubro, sendo Vista Alegre corroborado pelo teste de AC para efeitos genotóxicos (**Tabela 12**).

O lago (P11) manteve efeitos citogenotóxicos para o mês de outubro. O lago possui fluxo de água mais lento em comparação com rios. A área ao redor é de pastagens, não havendo influência direta de pesticidas (**Figura 6**) em um raio de 1000m.

Contudo, diversos componentes químicos podem permanecer na água do lago de ou-

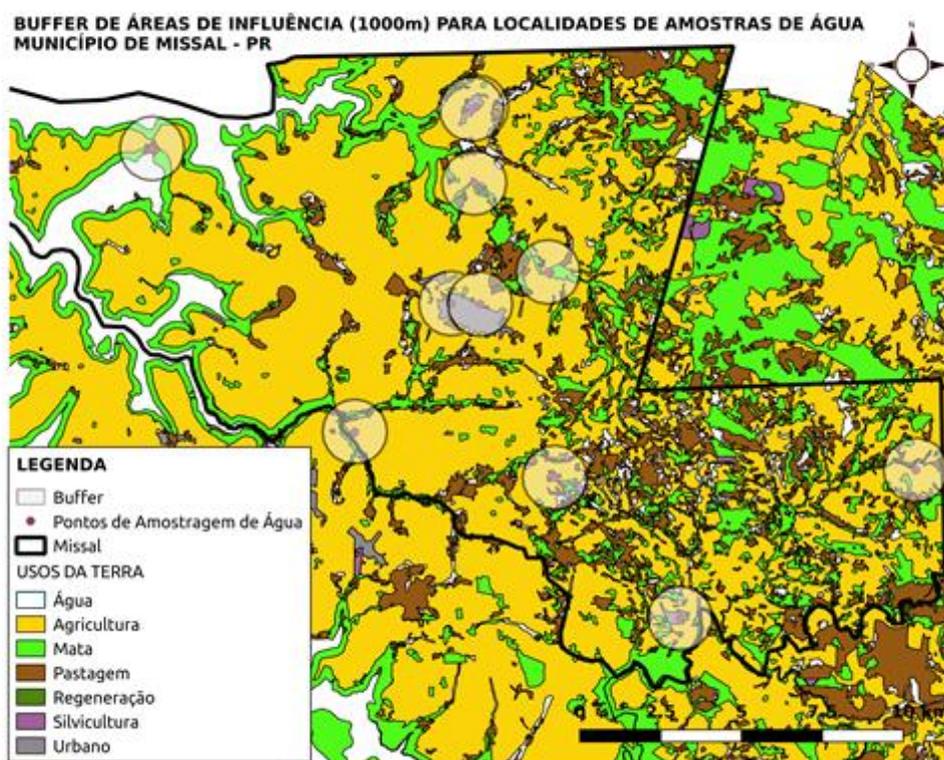


Figura 6: mapa de uso do solo apresentando buffer de áreas de influência no valor de 1000 metros.

tros meses e de outras regiões, passar por decantação, e serem acumulados no lençol freático. Por essa razão, não é assegurado que os efeitos mutagênicos encontrados na água de ambientes lânticos não sejam cumulativos de outros tempos. Haveria possibilidade de inferir uma hipótese sobre a influência do lago na amostra de Vila Natal (P6), no qual a água do lago fosse absorvida pelos poços artesianos locais e próximos à região. Contudo estes resultados não são evidenciados por meio deste bioensaio.

5 CONCLUSÃO

De maneira geral, observam-se diferenças nos resultados do teste com *A. cepa* entre as águas superficiais e as água profundas (de poço). O Ponto 1 de abastecimento foi o que apresentou efeitos citogenotóxicos com maior frequência. Concluímos haver presença de efeitos genotóxicos e potencialmente citotóxicos para a água da

distribuidora Sanepar. Também observamos efeitos mutagênicos da água para os diferentes meses, demonstrando haver mudança nos elementos mutagênicos de um mês para o outro presentes na água, coincidindo com a época de aumento de chuvas.

Concluimos haver efeitos citogenotóxicos para as águas do lago e do rio, e para as localidades de Vista Alegre (P8) e Portão Ocoí (P9). Concluimos haver efeitos citotóxicos para a localidade de Padre Rick (P3) e genotóxicos para as regiões de São João (P7), Dom Armando (P4) e Vila Natal (P6). Porém, há a necessidade de novos estudos para melhor compreensão destes efeitos em tais localidades.

O ensaio realizado buscou utilizar dos diferentes ciclos celulares para a análise da genotoxicidade. A padronização dos tempos para a análise é fundamental. Sugere-se a compreensão das AC mais evidentes em cada ciclo para o estudo de diferentes tempos no bioensaio. Recomenda-se também utilizar diferentes concentrações salinas como controle positivo para aberrações cromossômicas, como feito por Levan (1945).

Os resultados de bioensaios com vegetais superiores não devem ser descartados, considerando que um químico capaz de induzir danos cromossômicos nas plantas também pode oferecer risco a outros grupos de organismos vivos, uma vez que o material danificado é o DNA, comum a todos os organismos (LEME & MORALES, 2009).

Por fim, há riscos de que os humanos ingiram substâncias tóxicas incompletamente desativadas, mesmo em cidades com estações de tratamento de água potável e efluentes (SALLES et al., 2016), reforçando a necessidade de novas análises.

ANEXO A - RESULTADO DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

	T1 (24h)	IM			AC		
		<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>	<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>
		S	P1	16.875 / 6.518086	2.588950	0.0138*	12.37500 / 14.29016
E	P2	-5.625 / 6.518086	-0.862983	0.3939	-16.34375 / 14.29016	-1.143707	0.2543
T	P3	8.875 / 6.518086	1.361596	0.1818	-15.37500 / 14.29016	-1.075915	0.2834
E	P4	18.125 / 6.518086	2.780724	0.0086*	20.15625 / 14.29016	1.410499	0.1601
M	P5	16.250 / 6.518086	2.493063	0.0174*	25.93750 / 14.29016	1.815060	0.0712
B	P6	6.000 / 6.518086	0.920516	0.3634	-15.31250 / 14.29016	-1.071542	0.2854
R	P7	17.625 / 6.518086	2.704015	0.0104*	4.03125 / 14.29016	0.282100	0.7782
O	P8	8.250 / 6.518086	1.265709	0.2137	2.15625 / 14.29016	0.150891	0.8802
	P9	4.875 / 6.518086	0.747919	0.4594	-17.53125 / 14.29016	-1.226806	0.2215
	P10	-8.125 / 6.518086	-1.246532	0.2206	-20.12500 / 14.29016	-1.408312	0.1608
	P11	-1.750 / 6.518086	-0.268484	0.7899	-12.84375 / 14.29016	-0.898783	0.3700
	P12	-14.750 / 6.518086	-2.262934	0.0298*	-21.56250 / 14.29016	-1.508905	0.133
	T2 (48h)	IM			AC		
		<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>	<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>
/	P1	21.625 / 6.233407	3.469210	0.0014*	2.00000 / 13.01368	0.153684	0.8780
2	P2	9.375 / 6.233407	1.503993	0.1413	23.68750 / 13.01368	1.820200	0.0704
0	P3	8.500 / 6.233407	1.363620	0.1812	11.03125 / 13.01368	0.847666	0.3977
1	P4	11.000 / 6.233407	1.764685	0.0861	-0.37500 / 13.01368	-0.028816	0.9770
9	P5	15.125 / 6.233407	2.426442	0.0204*	17.15625 / 13.01368	1.318324	0.1891
	P6	5.750 / 6.233407	0.922449	0.3624	25.68750 / 13.01368	1.973885	0.0499*
	P7	15.625 / 6.233407	2.506655	0.0168*	12.06250 / 13.01368	0.926909	0.3552
	P8	-8.000 / 6.233407	-1.283407	0.2075	-15.90625 / 13.01368	-1.222272	0.2232
	P9	23.125 / 6.233407	3.709849	0.0007*	23.06250 / 13.01368	1.772174	0.0781
	P10	16.375 / 6.233407	2.626974	0.0126*	17.93750 / 13.01368	1.378357	0.1698
	P11	19.625 / 6.233407	3.148358	0.0033*	13.96875 / 13.01368	1.073390	0.2845
	P12	6.500 / 6.233407	1.042768	0.3040	8.21875 / 13.01368	0.631547	0.5285

Tabela 11. Análise de Modelos Lineares Mistos no software R 3.6.1 para valores do Índice Mitótico (IM) e de Aberrações Cromossômicas (AC) de amostras de água em 12 diferentes pontos de Missal – PR do mês de SETEMBRO, 2019. Valores de $p < 0,05$ foram marcados com *.

ANEXO A - Resultado das Análises Estatísticas

	T1 (24h)	IM			AC		
		<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>	<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>
		O U T U B R O	P1	-16.750 / 4.600463	-3.640938	0.0008*	3.31250 / 12.334276
P2	-0.125 / 4.600463		-0.027171	0.9785	-0.65625 / 12.334276	-0.053205	0.9576
P3	-14.750 / 4.600463		-3.206199	0.0028*	-2.56250 / 12.334276	-0.207754	0.8357
P4	-3.750 / 4.600463		-0.815135	0.4204	9.18750 / 12.334276	0.744875	0.4573
P5	-3.500 / 4.600463		-0.760793	0.4517	-6.53125 / 12.334276	-0.529520	0.5971
P6	-5.000 / 4.600463		-1.086847	0.2843	-2.56250 / 12.334276	-0.207754	0.8357
P7	-4.250 / 4.600463		-0.923820	0.3617	17.62500 / 12.334276	1.428945	0.1548
P8	-14.875 / 4.600463		-3.233370	0.0026*	-7.15625 / 12.334276	-0.580192	0.5625
P9	-19.000 / 4.600463		-4.130019	0.0002*	10.46875 / 12.334276	0.848753	0.3971
P10	9.625 / 4.600463		2.092181	0.0435*	66.40625 / 12.334276	5.383879	0.0000*
P11	-18.750 / 4.600463		-4.075676	0.0002*	-14.31250 / 12.334276	-1.160384	0.2474
P12	3.375 / 4.600463		0.733622	0.4679	46.21875 / 12.334276	3.747180	0.0002*
	T2 (48h)	IM			AC		
		<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>	<i>Value / Std.Error</i>	<i>t-value</i>	<i>p</i>
		2 0 1 9	P1	11.250 / 5.237298	2.148054	0.0391*	38.90625 / 11.33663
P2	-13.500 / 5.237298		-2.577665	0.0146*	-7.03125 / 11.33663	-0.620224	0.5360
P3	3.750 / 5.237298		0.716018	0.4790	20.65625 / 11.33663	1.822080	0.0703
P4	13.250 / 5.237298		2.529930	0.0164*	42.50000 / 11.33663	3.748908	0.0002*
P5	4.500 / 5.237298		0.859222	0.3964	8.65625 / 11.33663	0.763564	0.4462
P6	7.375 / 5.237298		1.408169	0.1684	30.28125 / 11.33663	2.671097	0.0083*
P7	-4.750 / 5.237298		-0.906956	0.3710	5.78125 / 11.33663	0.509962	0.6108
P8	4.250 / 5.237298		0.811487	0.4229	31.93750 / 11.33663	2.817194	0.0054*
P9	-		-	-	-	-	-
P10	-5.000 / 5.237298		-0.954691	0.3467	15.34375 / 11.33663	1.353466	0.1778
P11	6.000 / 5.237298		1.145629	0.2602	40.03125 / 11.33663	3.531141	0.0005*
P12	10.375 / 5.237298		1.980983	0.0560*	45.93750 / 11.33663	4.052129	0.0001*

Tabela 12. Análise de Modelos Lineares Mistos no software R 3.6.1 para valores do Índice Mitótico (IM) e de Aberrações Cromossômicas (AC) de amostras de água em 12 diferentes pontos de Missal – PR do mês de OUTUBRO, 2019. Valores de $p < 0,05$ foram marcados com *.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ – ADAPAR. Gerência de Sanidade Vegetal. Agrotóxicos no Paraná. Lista de Agrotóxicos aptos para comércio e uso no paraná. Disponível em <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GAT/lista.pdf>

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ – ADAPAR. Gerência de Sanidade Vegetal. Agrotóxicos no Paraná. Dados do Siagro. Disponível em <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=389>

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ - ADAPAR. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Casa Civil do Governo do Estado Do Paraná. Portaria ADAPAR 342, de 05 de Novembro de 2019. Estabelece o vazio sanitário vegetal para soja no território paranaense no período compreendido entre 10 de junho a 10 de setembro de cada ano. **Diário Oficial do Estado do Paraná**, Paraná, 6 nov. 2019.

AL-AHMADI, M. S. Cytogenetic Effects of Two Synthetic Pesticides on Mitotic Chromosome on Root Tip Cells of *Allium cepa*. **Cytologia** , v. 78, n. 1, p. 3–8, 2013.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. **Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111–172, Julho 2000.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, , vol.6, n.2, pp.158-170. 2003

ANANTHAKRISHNAN; KUMARASAMY, K.; ANTONY, A. S. Genotoxic Effects of Furadan and Endosulphan on (*Allium Cepa*) Root Tips. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, n. 1, p. 126-131, Janeiro 2013.

BADR, A. Mitodepressive and Chromotoxic Activities of Two Herbicides in *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 48, p. 451-457, 1983.

BAGATINI, M. ; SILVA, A. C. F. D.; TEDESCO, S. B. Uso do Sistema Teste de *Allium cepa* como Bioindicador de Genotoxicidade de Infusões de Plantas Medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, Setembro 2007.

BIANCHI, J. Análise dos Efeitos Citotóxicos, Genotóxicos e Mutag nicos do Inseticida Malation, Utilizando os Sistemas Teste de *Allium Cepa* e Células de Mamíferos. **UNESP**, São Paulo, Março 2008.

CABUGA, C. J. C.-A.; ET AL. *Allium cepa* Test: an evaluation of genotoxicity, v. 7, p. 12-19, Março 2017.

CHAUHAN, L. K. S.; DIKSHITH, T. S. S.; SUNDARARAMAN , V. Effect of Deltamethrin on Plant Cells I. Cytological Effects on the Root Meristems of *Allium cepa*. **Mutation Research**, v. 171, p. 25-30, 1986.

COELHO, E. J. R. Respostas Fisiológicas e Citogenéticas em Raízes de *Allium Cepa* L. Expostas às Amostras de Água e Sedimento de Três Represas da Bacia do Rio Santa Maria da Vitória (Es, Brasil), Vitória, 2017.

DOS REIS, A. C.; AL., E. Toxic, Cytogenetic and Antitumor Evaluations of [6]-gingerol in Non-Clinical in vitro Studies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Abril 2019.

DHAWAN A, M. B. Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols. **Humana Press**, 2013.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja – Região Central do Brasil 2014. Londrina: Empraba Soja, 2013 (Sistemas de Produção, SSN 2176-2902; n.16) disponível no site: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95489/1/SP-16-online.pdf>

GONZÁLEZ, E. A. Biomarcadores de Dano Genético. Un Enfoque Práctico. Biomarcadores de Toxicidad Antología 2018. Tlaxcala, México: **CA Ambiente y Genética UATLX-CA-223**, 2018.

GRANT, W. F. Chromosome Aberrations in Plants as a Monitoring System. **Environmental Health Perspectives**, v. 27, p. 37-43, Dezembro 1978.

GULZAR, A.; SIDDIQUI, M. B.; BI, S. Phenolic Acid Allelochemicals Induced Morphological, Ultrastructural, and Cytological Modification on *Cassia sophera* L. and *Allium cepa* L. **Protoplasma**, Julho 2015.

HAGMAR, et al. Impact of Types of Lymphocyte Chromosomal Aberrations on Human Cancer Risk: Results from Nordic and Italian Cohorts. **CANCER RESEARCH**, n. 64, p. 2258–2263, Março 2004.

HUANG, W.-Y. et al. Effects of Water Solutions on Extracting Green Tea Leaves. **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2013.

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Caderno Estatístico: Município de Missal. Curitiba, Cadernos Municipais 2019.

IPARDES – INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Caderno Estatístico: Município de Missal. Curitiba, Cadernos Municipais 2018.

JAIN, A. K. et al. Chromosomal Aberrations. In: KUMAR, A., et al. **Mutagenicity: Assays and Applications**. [S.l.]: Academic Press, 2018. Cap. 4, p. 350.

KIHLMAN, B. A.; ODMARK, G. Effects of Adenine Nucleosides on Chromosomes, Cell Division and Nucleic Acid Synthesis in *Vicia Faba*. **Hereditas**, v. 56, n. 5.

KIRKLAND, D. Chromosome Aberration Testing in Genetic Toxicology - Past, Present and Future. **Mutation Research** **404**, v. 404, p. 173-185, Março 1998.

LEME, D.; MORALES, M. A. M.-. Allium cepa Test in Environmental Monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.

LEVAN, A. Cytological Reactions Induced by Inorganic Salt Solutions, **Nature**, v. 156, p 751–752, 1945.

MATEUCA, R. et al. Chromosomal Changes: Induction, Detection Methods and Applicability in Human Biomonitoring. **Biochimie** , v. 88, p. 1515–1531, Agosto 2006.

MOURA, A. G. et al. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on Allium cepa L root meristems. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 76, n. 2, Março 2016.

MUSHTAQ, et al. Cytotoxic Allelochemicals Induce Ultrastructural Modifications in Cassia tora L. and Mitotic Changes in Allium cepa L.: a weed versus weed allelopathy approach. **Protoplasma**, 2019.

NEFIC, H. et al. Chromosomal and Nuclear Alterations in Root Tip Cells of Allium Cepa L. Induced by Alprazolam. **Med Arh.**, v. 67, n. 6, p. 388-392, Dezembro 2013.

OGA, S.; CAMARGO, M. A.; BATISTUZZO, J. O. Fundamentos de Toxicologia. **Editora Atheneu Rio**, 4ª Ed. 2008.

OLIVEIRA, L. M. D.; VOLTOLINI, 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** , v. 6, n. 1, 2011.

PREFEITURA MUNICIPAL DE MISSAL – PR. Plano Municipal De Saneamento Básico do Município de Missal / PR . 62 p. **Missal-PR**, 2014.

RÍOS B. J.; SOLARI G. S. Biomonitorización de plaguicidas: ¿Una necesidad del país? **Rev Med Chile**, 138, pp. 515-518. 2010

SALLES, F. J. et al. Cytotoxic and Genotoxic Assessment of Surface Water from São Paulo State, Brazil, During the Rainy and Dry Seasons. **Ecotoxicology** , v. 25, p. 633–645, Fevereiro 2016.

SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE. Prefeitura de Missal e Unila assinam convênio para identificar o perfil de adoecimento por Câncer no município. Fonte: Missal: <https://www.missal.pr.gov.br/noticias/3960-prefeitura-de-missal-e-unila-assinam-convenio-para-identificar-o-perfil-de-adoecimento-por-cancer-no-municipio>, 03, Outubro, 2017.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de Toxicidad Aguda con Semillas de Lechuga (*Lactuca sativa* L.). **En: Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas**, Ottawa, p. 71-79, 2004.

TEERARAK, M.; LAOSINWATTANA, C.; CHAROENYING ,. Evaluation of Allelopathic, Decomposition and Cytogenetic Activities of *Jasminum officinale* L. f. var. *Grandiflorum* (L.) Kob. on Bioassay Plants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5677–5684, 2010.

THOPPIL, J. E.; RENJANA, P. K. Toxicological Evaluation of Root Methanolic Extract of *Strobilanthes heyneanus* Nees Using *Allium* Test. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research** , v. 5, n. 3, p. 125-128, Janeiro 2013.

VALENCIA-QUINTANA, R.; ALARCÓN, J. S.; MÁRQUEZ, F.; ARROYO, S. G. Biomarcadores de Daño Citogenético por Exposición a Contaminantes Ambientales. Manual de Laboratorio Biomarcadores de Toxicidad 2018. Tlaxcala, México: **CA Ambiente y Genética UATLX-CA-223**. 2018

VODICKA, et al. Chromosomal Damage in Peripheral Blood Lymphocytes of Newly Diagnosed Cancer Patients and Healthy Controls. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 7, p. 1238–1241, 2010.

WEAVER, B. A. A.; SILK, A. D.; CLEVELAND, D. W. Nondisjunction, Aneuploidy and Tetraploidy. **NATURE**, v. 437, p. 1038–1042, Agosto 2005.

ZEPEDA, M. Y. ; MARTÍNEZ, A. J. ; HERRERA, M. L. *Vicia faba* L.: CAPACIDAD BIOINDICADORE DE CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS. [S.I.], p. 22. 2016.