



ARTIGO

Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L.

Ana Paula Peron^{1*}, Edmilson Antônio Canesin¹ e Cristiano Marcelo Viana Cardoso¹

Submetido em: 29 de outubro de 2008 Recebido após revisão em: 05 de maio de 2009 Aceito em: 27 de maio de 2009
Disponível em: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1127>

RESUMO: (Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L.). Muitos estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos dos agentes tóxicos que provocam poluição dos rios. Para análise destes efeitos aplicam-se testes de mutagenicidade. Neste estudo foi utilizado como sistema teste as células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, para a investigação dos possíveis efeitos mutagênicos de seis pontos de água localizados no Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil). Foram realizadas duas coletas, uma em dezembro de 2006 (final da primavera) e outra em abril de 2007 (início do outono). Neste trabalho foram analisadas alterações no índice mitótico e o aparecimento de aberrações cromossômicas. A análise estatística foi feita pelo teste do Qui-quadrado ($\alpha=0,05$). Os resultados obtidos demonstraram que somente as águas coletadas no período de outono reduziram, de forma estatisticamente significativa, o índice de divisão celular das células das raízes de cebola. Não foram verificadas alterações cromossômicas em nenhum dos pontos de água avaliados.

Palavras-chave: mutagênese, água natural, sistema-teste vegetal.

ABSTRACT: (Mutagenic potential of the Pirapo River (Apucarana, Paraná, Brazil) water in meristematic root cells of *Allium cepa* L.). Many studies have evaluated the effects of toxic agents that cause river pollution. To analyze these effects mutagenicity tests are used. In this study the meristematic cells of *Allium cepa* roots were used as a medium for the investigation of possible mutagenic effects of water that was collected in six locations of the Pirapo River, in Apucarana, Paraná, Brazil. Collections were made during two time periods; one in December 2006 (late spring) and another in April 2007 (beginning fall). This research studied the modification on the mitotic index and the appearance of chromosomal aberrations. Statistical analysis was performed by chi-square ($\alpha=0,05$). Statistical analysis revealed that only the water collected in April 2007 showed a statistically significant reduction of the quantity of cell division in onion root cells. Chromosome modifications were not identified in any of the collection samples.

Key words: mutagenesis, natural water, plant test systems.

INTRODUÇÃO

A ação antropogênica tem permitindo a liberação indiscriminada de agentes poluidores, como agrotóxicos, efluentes industriais e domésticos, com alta carga de matéria orgânica, além de substâncias eutrofizantes (Araújo *et al.* 2001). A contaminação dos vários ambientes por meio dessa ação pode resultar em conseqüências, muitas vezes irreversíveis, para os biomas que habitam estes ambientes.

Estando todos os seres vivos em interação com o meio ambiente, os mesmos sofrem influência desse meio e esta influência pode ocasionar modificações no material genético desses organismos (Minissi & Lombi 1997, Pascalicchio 2002, Matsumoto *et al.* 2006). Estas modificações no índice de divisão celular e/ou na estrutura do DNA são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a duplicação do DNA e a transcrição gênica. Elas também podem causar mutações gênicas e aberrações cromossômicas, eventos estes que podem levar ao desenvolvimento de processos cancerosos ou morte celular. A detecção destes produtos poluentes e seus prováveis efeitos nos organismos são importantes no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal, vegetal e, principalmente, humana

(Costa & Menk 2000).

O Município de Apucarana localiza-se na região centro-norte do estado do Paraná (microrregião Norte Central do estado, a 370 km da capital), a 23°31'30" de latitude sul e 51°24'20" de longitude oeste, a uma altitude média de 983 m acima do nível do mar. O município possui uma área de 563.000 km², com população de 107.819 habitantes (Prefeitura Municipal de Apucarana 2008). O clima característico da região é o tropical semi-úmido, com uma média anual de temperatura de 20,3°C. Os recursos hídricos dessa cidade pertencem a tributários de três bacias hidrográficas: a do rio Pirapó, do rio Tibagi e do rio Ivaí, sendo as águas da bacia hidrográfica do alto rio Pirapó de grande importância com relação à captação de águas para abastecimento, desenvolvimento de atividades agropecuárias e turismo ecológico da grande maioria das cidades da região.

O rio Pirapó enquadra-se no grande sistema do rio Paranapanema (Maack 2002). As águas dessa bacia hidrográfica são de grande importância com relação à captação de águas para o abastecimento, desenvolvimento de atividades agropecuárias e turismo ecológico da grande maioria das cidades da região. Nesse ambiente, devido ao desmatamento desenfreado, conseqüência da rápida

1. Faculdade de Apucarana (FAP), Departamento de Ciências Biológicas. Rua Osvaldo de Oliveira, 600, Jardim Flamingos, CEP 86811-500, Apucarana, Paraná, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: anpapegenpes@hotmail.com

colonização e do contínuo crescimento urbano, tem-se registrado gradativas alterações climáticas, as quais são refletidas sobre o ciclo hidrológico local (Peruço 2004). Ao mesmo tempo, inúmeros fatores responsáveis por degradações ambientais encontram-se cada vez mais pronunciados na presente localidade.

Os impactos causados por agentes tóxicos no ambiente e saúde humana, muitas vezes, não podem ser observados e medidos diretamente e, portanto, devem ser analisados através de metodologias de detecção eficientes (Buss 2002, Silva & Fonseca 2003). Os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis e simples e têm sido validados 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 ambientais (Grant 1999).

Dentre as plantas superiores, *Allium cepa* L. (cebola) tem sido indicada como um importante organismo-teste de mutagenicidade (Morais *et al.* 2002, Fernandes *et al.* 2007, Leme & Marin-Morales 2008). Este sistema tem sido amplamente utilizado na avaliação do potencial citotóxico de efluentes, e considerado eficiente na detecção de alterações no índice de divisão celular e presença de aberrações cromossômicas em resposta a estes agentes. A eficiência do sistema *Allium cepa* se deve as suas características cinéticas de proliferação, ao rápido crescimento de suas raízes, ao grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, a sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) (Fiskejó 1994, Mitteregger-Júnior *et al.* 2006, Caritá & Marin-Morales 2008).

Portanto, sabendo-se da grande importância dos recursos hídricos para a manutenção da qualidade de vida biológica, torna-se indispensável o monitoramento desses recursos, avaliando-se os impactos gerados nesses ambientes. Diante disso, este estudo objetivou avaliar a ação mutagênica das águas superficiais do Rio Pirapó, localizado no Município de Apucarana, Paraná, através da utilização das células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de Coleta

As amostras de água foram coletadas em afluentes do Rio Pirapó em dezembro de 2006 (fim da primavera) e em abril de 2007 (início do outono), em seis pontos pré-estabelecidos, descritos a seguir: P1, córrego do papagaio; P2, córrego tangará; P3, córrego indaiá; P4, córrego jurema; P5, água do ipiguá e P6, córrego jurema (Fig. 1). Os pontos de coleta P2, P3 e P4 localizam-se em regiões tipicamente agrícolas, já os pontos P1, P5 e P6, estão localizados em regiões urbanas, com águas provenientes de pequenos córregos que recebem efluentes

de indústrias dos mais variados tipos. A distância média entre cada ponto estudado é de 4 km.

A coleta realizada em dezembro de 2006 foi feita em dia ensolarado, com temperatura em torno de 30°C, sem a presença de chuva nos dias que a antecederam. Já a coleta realizada em abril de 2007, foi feita em dia ensolarado, com temperatura em torno dos 25°C e com a presença de chuva em alguns dias anteriores a coleta (aguardou-se 48h sem a presença de chuva para se realizar essa coleta). As amostras de água foram coletadas superficialmente nos pontos em estudo nos dois períodos avaliados.

Avaliação da Ação Mutagênica

Para a realização deste estudo foram adquiridas cebolas de uma fonte comercial e colocadas para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), aerada, até obtenção de raízes com cerca de 1 a 1,5 cm de comprimento.

Para a coleta de água em cada ponto estabelecido no Rio Pirapó foi utilizada uma garrafa plástica transparente com tampa previamente desinfetada. Uma vez colhida a amostra, a mesma era acomodada no gelo para transporte e levada imediatamente para o laboratório, e em seguida dividida em seis frascos menores (em cada frasco menor foi colocado 40 mL da água de coleta). Antes de iniciar o experimento, foram retiradas algumas raízes para servirem de controle do próprio bulbo (0h) e em seguida os mesmos foram colocados nos frascos menores em

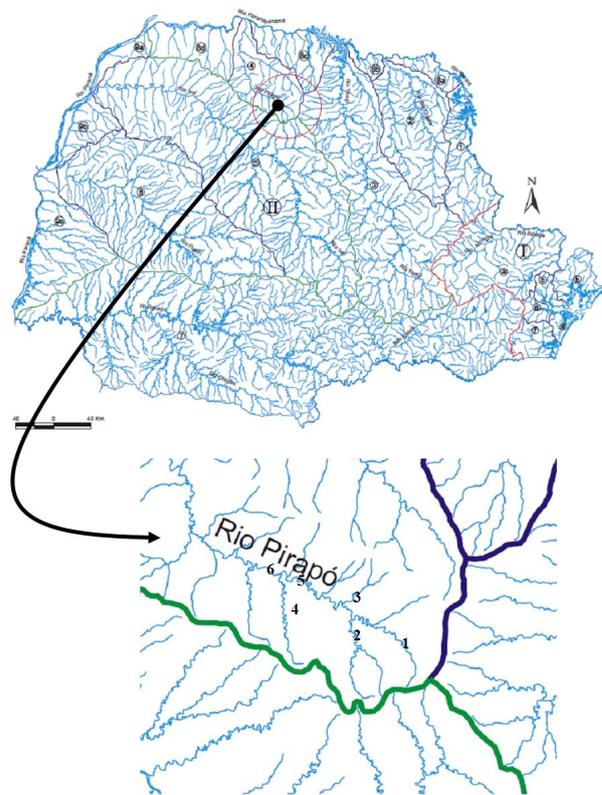


Figura 1. Localização dos pontos avaliados no Rio Pirapó, Apucarana, Paraná. 1, córrego do papagaio; 2, córrego tangará; 3, córrego indaiá; 4, córrego jurema; 5, água do ipiguá; 6, córrego jurema. Fonte: IPARDES (1995).

contato com a água em estudo. Para análise da água de cada ponto foram utilizadas cinco cebolas e o tempo em que cada bulbo ficou em contato com a água de coleta foi chamado de tratamento.

Após 24h do tratamento, foram retiradas algumas raízes de cada cebola e fixadas. As raízes restantes foram lavadas e os bulbos novamente colocados em água destilada, a temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), aerada para recuperar (tempo esse chamado de recuperação) por mais 24h, sendo as raízes restantes retiradas e fixadas. As raízes foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético).

O pH das amostras de água coletadas em dezembro de 2006 foi 6,8, para P1, P2 e P6, enquanto que foi igual a 6,5, para P3, P4 e P5. Para as amostras coletadas em abril de 2007, o pH foi 7,5 para todos os pontos.

Análise dos dados

A técnica aplicada para este experimento foi a de Kihlman (1971) com modificações, onde foi usada a reação de Feulgen e a coloração foi feita com o reativo de Schiff. As lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento suave e analisadas em “teste cego” ao microscópio óptico (EK 2000) em objetiva de 40X. Foram avaliadas 1.000 células por bulbo, totalizando 5.000 células para cada grupo controle, tratamento e recuperação. Foram avaliadas alterações no índice mitótico e anomalias no ciclo mitótico: mitoses C (problemas no fuso), pontes anafásicas e telofásicas (cromossomos dicêntricos ou intertrocas, cromossomos ou fragmentos livres). O cálculo do índice mitótico em porcentagem foi feito pelo número de células em divisão dividido pela soma do número das células em interfase e das células em divisão. Foi utilizado o teste estatístico Qui-quadrado para a análise dos dados ($\alpha=0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados mostraram que o grupo tratamento teve uma redução drástica, estatisticamente significativa, do índice de divisão celular em relação aos seus respectivos controles (Tab. 1). Essa diminuição do índice mitótico se manteve mesmo após o tempo de recuperação em todos os pontos analisados ($\alpha=0,05$). Na tabela 2, os resultados obtidos tanto no tratamento como na recuperação não foram significativos em relação aos valores dos seus

respectivos controles ($\alpha=0,05$). Em nenhum dos pontos analisados foi verificado a presença de alterações cromossômicas.

As principais causas da poluição do alto Rio Pirapó (local onde as coletas foram realizadas) são o desenvolvimento agroindustrial e o crescimento populacional. Em Apucarana este rio recebe efluentes industriais de várias origens, principalmente de lavanderias dos mais variados tipos, de pequeno a grande porte (jeans, malharias em geral e bonés), abatedouros de animais, fundições e indústrias de ração animal. É fato que o desenvolvimento tecnológico tende a provocar incremento no consumo de água, aumento significativo no lançamento de efluentes, e conseqüente aumento da carga de matéria orgânica e inorgânica. De acordo com Cassaro (1999) mais de 40% de toda esta região é de áreas agriculturáveis, o que permite constatar que a vulnerabilidade ambiental está também concentrada nos processos erosivos e escoamentos superficiais, devido ao uso indevido de áreas ripárias.

O mês de dezembro de 2006 na cidade de Apucarana caracterizou-se como um período de escassez de chuvas, com altas temperaturas e de clima seco. Portanto os resultados encontrados caracterizam-se por eutrofização artificial dos pontos de água avaliados, decorrida da industrialização e do uso de fertilizantes químicos utilizados na agricultura. Em função do pH ácido verificados nesses pontos é provável que tenha ocorrido grande concentração de cianobactérias tóxicas o que segundo Lopes *et al.* (2007) gera impacto negativo na qualidade da água. Segundo esta mesma autora a eutrofização de corpos d'água aumenta em muito a concentração de CO_2 e também está associada à presença de nutrientes, especialmente fósforo e nitrogênio, em concentrações acima dos níveis encontrados nas condições naturais. Já o mês de abril de 2007, mês em que foi realizada a segunda coleta, caracterizou-se como um período de grande volume de chuvas. Isto pode explicar os resultados obtidos na tabela 2, ou seja, com o grande volume de chuvas ocorreu uma diluição dos nutrientes e diminuição da concentração de CO_2 nos pontos avaliados.

Os resultados obtidos nesse trabalho não indicaram uma ação mutagênica. Apesar da diminuição significativa do índice de divisão celular obtidos nos grupos

Tabela 1. Índices Mitóticos (IM) médios totais obtidos para o controle, tratamento e recuperação em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*, de seis pontos de coleta de água no Rio Pirapó. Coleta realizada em dezembro (final da primavera) de 2006.

Grupos	Tempo de amostragem		
	Co (0h)	Tr (24h)	Re (24h)
PONTO 01	9,1	2,5*	2,4*
PONTO 02	9,3	2,7*	2,0*
PONTO 03	9,3	2,2*	2,4*
PONTO 04	9,0	2,0*	2,0*
PONTO 05	9,7	1,9*	2,5*
PONTO 06	9,5	2,6*	2,0*

IM de 5.000 células/grupo. Abreviaturas: Co (0h), Controle; Tr (24h), Tratamento com a água de coleta; Rec (24h), Recuperação. ($\alpha=0,05$).

*Valor estatisticamente significativo em relação ao controle.

Tabela 2. Índices Mitóticos (IM) médios totais obtidos para o controle, tratamento e recuperação em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* de seis pontos de coleta de água no Rio Pirapó. Coleta realizada em abril (início do outono) de 2007. ($\alpha=0,05$).

Grupos	Tempo de amostragem		
	Co (0h)	Tr (24h)	Re (24h)
PONTO 01	9,1	7,5	9,4
PONTO 02	9,3	7,7	9,0
PONTO 03	9,3	7,2	9,4
PONTO 04	9,0	7,0	9,5
PONTO 05	9,7	7,9	9,0
PONTO 06	9,5	7,1	9,0

IM de 5.000 células/grupo. Abreviaturas: Co (0h), Controle; Tr (24h), Tratamento com a água de coleta; Rec (24h), Recuperação. P=0,05.

*Valor estatisticamente significativo em relação ao controle.

tratamentos da coleta realizada em dezembro de 2006, não foram encontradas nenhuma classe de alterações cromossômicas. Porém os resultados da tabela 1 podem representar uma toxicidade aguda e ser um dos primeiros níveis de impacto, em nível celular, nesse ecossistema aquático estudado.

Segundo Houk (1992) e Silva *et al.* (2004), descargas industriais contêm muitas substâncias que podem ter efeito agudo, e que são capazes de reduzir, em longo prazo, a sobrevivência de organismos via danos em células somáticas e germinativas. Tais danos celulares podem estar relacionados a desordens genéticas hereditárias e alterações no índice de divisão celular. Estes danos celulares podem conseqüentemente levar ao início do desenvolvimento do câncer.

Inúmeras pesquisas têm detectado frequência anormalmente alta de neoplasias em peixes em regiões industrializadas e agricultáveis (Wrege 2000). Alguns estudos em plantas e animais selvagens de ambientes impactados por despejos perigosos ou efluentes industriais proporcionam evidência adicional dos efeitos citotóxicos proporcionado por esses locais. Aumento de mutações cromossômicas e alterações no índice de divisão celulares estatisticamente significativas foram verificados em plantas coletadas ao longo de rios contaminados, quando comparadas a plantas crescendo em regiões não contaminadas (Moraes & Quinzani-Jordão 2002).

Esses dados, aliados aos resultados obtidos neste trabalho, despertam cada vez mais preocupação do ponto de vista ambiental em relação ao organismo humano, pois resultados provenientes de bioensaios genéticos são relevantes à saúde humana em função do alvo toxicológico ser a célula. Em geral, perturbações no índice de divisão celular e do material genético podem ser deletérias para o organismo e podem levar a conseqüências severas e irreversíveis à saúde.

Portanto, há necessidade de estudos adicionais e de maior investigação das matas ciliares, de monitoramento dos efluentes lançados por instalações, legais ou irregulares, próximos aos pontos analisados no rio Pirapó.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, E. J. A., MORAIS, J. O. R., SOUZA, P. R. & SABÓIA-

MORAIS, S. M. T. 2001. Efeito de poluentes químicos cumulativos e mutagênicos durante o desenvolvimento ontogenético de *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae). *Acta Scientiarum*, 23(2): 391-399.

BUSS, D. F. 2002. Proteção à vida aquática, participação das comunidades e políticas de recursos hídricos. *Ciência & Ambiente*, 25: 71-84.

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

CASSARO, L. 1999. Estudo da degradação ambiental da bacia de captação de água para abastecimento da cidade de Maringá - Rio Pirapó. 120f. Monografia (Especialização em Controle e Gestão Ambiental). Departamento de Engenharia Química. Universidade Estadual de Maringá.

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

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

FISKEJO, G. 1994. *Allium* Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Root Tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal*, 9: 235-241.

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

HOUCK, V. S. 1992. Genetic analysis of the mitotic spindle. *Annu. Rev. Genet.*, 30: 7-33.

KIHLMAN, E. 1971. *Molecular Mechanisms of Mutations in Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. New York: Plenum Press. 250 p.

IPARDES. 1995. *Indicadores analíticos: recurso de gestão e planejamento: metodologia e operacionalização*. Curitiba: Iparades. 84 p.

LEME, D. M. & MARIN-MORALES, M. A. 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. *Mutation Research*, 650: 80-86.

LOPES, F., MERTEN, G. H., FRANZEN, M., GIASSON, E., HELFER, F. & CYBIS, L. F. A. 2007. Utilização de P-Index em uma bacia hidrográfica através de técnicas de geoprocessamento. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11(3): 312-317.

MAACK, R. 2002. *Geografia Física do Estado do Paraná*. Rio de Janeiro: Secretaria da Cultura e do Esporte do Governo do Estado do Paraná. 450 p.

MATSUMOTO, S. T., MANTOVANI, M. S., MALAGUTTI, M. I. A., DIAS, A. L., FONSECA, I. C. & MARIN-MORALES, M. A. 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 148-158.

- MINISSI, S. & LOMBI, E. 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by Vicia faba micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutation Research*, 39: 317-321.
- MITTEREGGER-JÚNIOR, H., FERRAZ-DIAS, J., LÚCIA-YONEMA, M., ARENZON, SILVA, J. & PEGAS-HENRIQUES, J. A. 2006. Avaliação das águas tóxicas e mutagênicas da água e do sedimento do Arroio Estância Velha, Região coureira calçadista, utilizando *Allium cepa*. *J. Braz. Ecotoxicol.*, 1 (2): 147-151.
- MORAES, D. S. L. & QUINZANI-JORDÃO, B. 2002. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, 36 (3): 370-374.
- MORAES, D. S. L., JORDÃO, B. Q., OLIVEIRA, M. D. & EILERS, V. 2002. Investigação da atividade mutagênica de efluente municipal pelo teste de *Allium*. *Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética*. CD Rom.
- PASCALICCHIO, A. E. 2002. *Contaminação por metais pesados*. São Paulo : Ed. Annablume, 132 p.
- PERUÇO, J. D. 2004. *Identificação das principais fontes poluidoras de afluentes da bacia do alto rio Pirapó*. 63f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá.
- PREFEITURA MUNICIPAL DE APUCARANA. 2008. Disponível em: <<http://www.apucarana.pr.gov.br/>>. Acesso em: 10 abr. 2008.
- SILVA, M. F. P. T. B., FERRARI, G. P., TOLEDO, F., ROCHA, C. L. M. & VICENTINI, V. E. P. 2004. Mutagenic effect of fresh water (well, rivers Fichta and Minas Gerais close to the town of Ubatã, Paraná, Brasil) in the animal test systems. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 26(1): 101-105.
- SILVA, J. & FONSECA, M. B. 2003. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, J., ERDTMANN, B. & HENRIQUES, J. A. P. (org.). *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance. p.70-84.
- WREGGE, M. 2000. A ética da água. *InformANDES*, 96: 12.