

**BIOMONITORAMENTO NO CÓRREGO OLARIA, MONTE CARMELO - MG  
UTILIZANDO O TESTE ALLIUM**

Pablo Alves de Freitas Rosa<sup>1</sup>  
Edimar Olegário De Campos Júnior<sup>2</sup>  
Denise Dias Alves Cocco<sup>3</sup>

**RESUMO:**

Quando compostos químicos quaisquer interagem com as células de organismos bioindicadores, ocorrem fatores como a instabilidade cromossômica durante a divisão celular. O presente trabalho teve como objetivo utilizar o teste Allium na avaliação da qualidade de água em quatro pontos do córrego Olaria em Monte Carmelo em Minas Gerais. Foram realizados testes de análise de crescimento de raízes e índice mitótico (IM) em células meristemáticas radiculares tratadas com águas dos quatro pontos, incluindo o controle negativo, caracterizado como Ponto 1. Os resultados da análise do IM foram significativos em todos os pontos testados (2, 3 e 4), quando comparados ao controle negativo. De maneira similar a variável crescimento das raízes demonstrou que nos pontos do grupo de teste, foi significativa o retardamento do crescimento em relação ao grupo controle, principalmente no ponto 4, que apresentou índice mitótico de  $0,6954 \pm 0,3359$ . O Teste do Micronúcleo (MN) em concordância com os parâmetros físico-químicos da água demonstrou que os pontos 3 e 4 diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do Ponto 1, segundo teste de Mann-Whitney. Por meio dos bioensaios realizados foram detectados efeitos genotóxicos significativos nos parâmetros microscópicos analisados, assim como efeitos citotóxicos, atestando a inviabilidade do consumo da água do córrego sem os devidos tratamentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Micronúcleo; Citotoxicidade; Biomonitoramento.

**ABSTRACT:**

When any chemical compounds interact with cells of bioindicators organisms occur factors such as chromosomal instability during cell division. This study aimed to use the Allium test in the assessment of water quality in four points of Olaria stream in Monte Carmelo in Minas Gerais. Tests of root growth and mitotic index (MI) in meristematic root cells

---

<sup>1</sup> Graduado em Ciências Biológicas pela Fundação Carmelitana Mário Palmério – FUCAMP, Monte Carmelo-MG.

<sup>2</sup> Doutor em Genética pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Professor da Fundação Carmelitana Mário Palmério, Monte Carmelo -MG, Brasil. Contato: [edimarcampos@yahoo.com.br](mailto:edimarcampos@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Graduada em Ciências Biológicas e responsável técnica de laboratórios pela Fundação Carmelitana Mário Palmério – FUCAMP, Monte Carmelo-MG.

treated with waters from the four points, including the reference site (negative control), characterized as site 1. The results of analysis of MI were significant at all points tested (2, 3 and 4) compared to reference site. Similarly, the variable root growth showed that in sections of the test group was significant slowing of growth compared to the control group, especially in site 4, which showed mitotic index of  $0.6954 \pm 0.3359$ . The Test Micronuclei (MN) in accordance with the physico-chemical parameters of the water showed that points 3 and 4 differed significantly ( $p < 0.05$ ) for site 1, according to Mann-Whitney test. The bioassays detected significant genotoxic effects in microscopic parameters analyzed, as well as cytotoxic effects, confirming the viability of the consumption of stream water without proper treatment.

**KEY-WORDS:** Micronucleus; Cytotoxicity; Biomonitoring.

### 1. INTRODUÇÃO

Os novos hábitos e meios de produção para atender o crescimento industrial, alteraram progressivamente a essência dos recursos naturais. Nesse sentido, a ação antrópica é responsável pelas modificações ocasionadas no ambiente de maneira não natural (COSTA, 2004; SILVA; SOUZA, 2013). Assim, o progresso, aliado ao desenvolvimento tecnológico e ao aumento populacional, mudou drasticamente as condições do meio ambiente, já que os fatores de desenvolvimento do homem levaram a uma ocupação desordenada dos espaços, reduzindo drasticamente a qualidade do ambiente (GENDA, 1982; SEMARH, 2010).

O estudo de agentes poluidores é crescente, tendo em vista seus efeitos sobre a saúde humana e sobre a conservação dos ecossistemas. A bioindicação é utilizada quando se quer determinar os níveis de qualidade de qualquer recurso ambiental. Neste processo podem ser obtidas informações dos efeitos dos agentes sobre algum sistema biológico, além da possibilidade de inferir sobre a qualidade e quantidade do agente atuante. Ao contrário da bioindicação, o monitoramento através de parâmetros químicos tem como base avaliar o tipo e a intensidade do agente estressor, podendo se deduzir, os efeitos biológicos causados (PIMENTA et al., 2016).

São encontradas diversas substâncias químicas estranhas ao meio ambiente com possibilidades de afetar o material genético dos seres vivos, acarretando em danos ou alterações na fita de DNA ou ainda na síntese não programada de DNA e trocas entre cromátides-irmãs; ou mesmo indução de mutação em nível cromossômico ou gênico

(BOER; HOEIJMAKERS, 2000; DEARFIELD et al., 2002). Caso tais alterações não sejam reparadas, podem resultar na formação de micronúcleos, que são pequenas massas esféricas constituídas de cromatina não incorporadas ao núcleo devido a instabilidade cromossômica durante a divisão celular. A fim de identificar os poluentes que possivelmente podem ocasionar tais danos, tem sido utilizado o biomonitoramento, que consiste basicamente na exposição de organismos vivos a poluentes ou mesmo para controle in situ de áreas passíveis de poluentes (CANTO; PICH; GEREMIAS, 2013; ROWLEY, 1984; TSUTSUI et al., 1983; YUNIS, 1983;).

O biomonitoramento pode ser utilizado basicamente em três situações: quando há suspeita de que organismos no ecossistema estudado estejam sendo afetados; quando a saúde humana está sendo ameaçada devido à ingestão de espécies afetadas; e por último, quando se deseja saber as condições ambientais de um determinado ambiente (SILVA; HEUSER; ANDRADE, 2003).

Para ocorrer maior eficiência no biomonitoramento, surgiram metodologias de avaliação de genotoxicidade de algumas substâncias químicas. Os testes indicados para o estudo do monitoramento ambiental são de fácil execução e com capacidade de gerar resultados em menor tempo (BRUSICK, 1987; SOUSA et al., 2014).

Observou-se que para avaliar os poluentes ambientais, as plantas superiores apresentam características que as tornam excelentes modelos genéticos (SHARMA; PANNEER-SELVAN, 1990; LEME; MARIN-MORALES, 2009). Dessa forma, dentre os vegetais superiores, o sistema *Allium cepa* é frequentemente utilizado por apresentar cromossomos grandes e com número reduzido (FISKESJÖ, 1985), além de apresentar maior sensibilidade para detectar os produtos químicos presentes no ambiente (AIUB; FELZENSZWALB, 2011; LEME; MARIN-MORALES, 2009; VANZETTO, 2014).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local de estudo**

As amostras de água foram coletadas no córrego Olaria do município Monte Carmelo - MG (coordenadas geográficas: 20°07'12''S e 44°08'19''W), em quatro trechos, sendo o primeiro (Ponto 1) em sua nascente, designada como ponto referência (Controle negativo); o segundo ponto (Ponto 2), possui localização susceptível à descarga de

resíduos domésticos; o terceiro ponto (Ponto 3), está localizado em área passível de efluentes industriais, além de domésticos e o quarto ponto (Ponto 4), se localiza na intersecção de dois córregos, portanto, este ponto foi caracterizado por despejos em maior carga que nos anteriores.

### 2.2. Parâmetros Físico-químicos

As características Físico-químicas das amostras de água recolhidas do Córrego Olaria foram analisadas segundo os procedimentos de Boyd and Tucken (1992), com análise de taxa de oxigênio dissolvido, demanda bioquímica de oxigênio, temperatura, pH, Amônia não-ionizada, nitrito, dureza e alcalinidade.

### 2.3. Ensaio citogenético

Os experimentos foram conduzidos como descrito por Fiskesjö (1989) no protocolo Invitox nº 8 com algumas modificações. Foram colocados 5 bulbos de cebola (*Allium cepa*) com 6 cm em média de diâmetro procedentes do comércio local para cada um dos pontos de coleta. Os bulbos foram colocados em recipientes contendo as soluções de controles positivo e negativo e amostra da água do córrego, de modo a poderem enraizar durante um período de 72 h.

Após essa fase, os ápices radiculares dos três bulbos com maior desenvolvimento das raízes foram cortados e fixados em etanol/ácido acético glacial numa proporção de 3:1 (v/v) por 5 min para cada ponto e conservados em tubos eppendorfs contendo 1 mL de álcool 70%, mantidos sob refrigeração.

Para o preparo das lâminas, as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolizadas em HCl 1M a 60 °C por 8 min. Em seguida, transferiu-se as raízes para frascos escuros (âmbar), contendo o reativo de Schiff (fuccina básica/metabissulfito de sódio - 3:1 p/p), por aproximadamente 2 horas. Com auxílio de uma pinça e de uma lâmina de bisturi, a coifa (porção apical da raiz) de aproximadamente 1 mm a 2 mm de comprimento foi retirada, desprezando o restante da raiz. Adicionaram-se duas gotas de carmim acético 2% durante 10 minutos.

Logo, em seguida, os ápices de raízes foram transferidos para uma lâmina. A lamínula foi então colocada sobre a lâmina para realização do squash (esmagamento) com

o dedo polegar, com razoável pressão. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz com aumento em objetiva de 40x ou 100x quando necessário.

#### **2.4. Controles**

Para o controle positivo foram usados 15 g/L de MMS (Metil-metanossulfonato), substância essa capaz de promover alterações celulares como aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos. Para o controle negativo reitera-se a utilização do ponto 1 como referência, visto que é um ponto em que não há presença de agentes xenobióticos.

#### **2.5 Índice Mitótico**

O índice mitótico (IM), caracterizado por o número total de células em divisão do ciclo celular, tem sido utilizado como um parâmetro para avaliar a citotoxicidade dos agentes diversos. Os níveis de citotoxicidade de um agente pode ser determinado pelo aumento ou diminuição da IM.

Para a análise do índice de fases (prófases, metáfases, anáfases e telófases) foram contadas em média 2.000 células (7 lâminas/repetições para cada ponto) por raiz.

#### **2.6 Crescimento de raiz**

Ao final das 72h, as raízes dos bulbos de cebola foram observadas e medidas, com auxílio de uma régua milimetrada, para a análise de morfologia e do comprimento radicular.

#### **2.7 Micronúcleo (MN) em *Allium cepa***

O teste para investigação de micronúcleo foi realizado conforme descrito por Fiskejö (1985), sendo que, as lâminas foram lavadas em água deionizada com o pH 7,0 e secadas em temperatura ambiente. Em cada lâmina foram contados micronúcleos encontrados em 1000 células.

#### **2.8. Análise estatística**

A média e o erro padrão (EP) foram obtidos pela contagem de 5 raízes provenientes de cada bulbo e cada grupo experimental foi composto por 3 bulbos. O índice de micronúcleos (MN) foi avaliado pela análise de aproximadamente 2.000 células/raiz. A

análise foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, considerando  $p < 0,05$  como índice de significância.

### 3. RESULTADOS

De acordo com a Tabela 1, os danos citogenéticos detectados neste estudo são indicativos da presença diferencial de MN nas amostras. Foram encontradas taxas relativamente baixas no ponto referência (controle negativo) e valores crescentes nos pontos seguintes do córrego, de maneira que o ponto 2 foi o único que não apresentou diferenças quanto ao controle negativo.

O Teste do Micronúcleo em concordância com os parâmetros físico-químicos da água demonstrou que os Pontos 3 e 4 diferiram significativamente ( $p < 0,05$ ) do ponto referência segundo teste estatístico de Mann Whitney, mas somente o Ponto 4 apresentou-se com taxas de relevância quanto ao controle positivo, mesmo que o Ponto 3 seja apontado com índices ( $0,022 \pm 1,372$ ) bem aquém do esperado para água de boa qualidade, como aquelas dos locais: Ponto 1 ( $0,004 \pm 0,632$ ) e o subsequente a ele, Ponto 2 ( $0,007 \pm 0,798$ ).

**Tabela 1:** Frequência de Micronúcleos nas raízes de *Allium cepa* analisadas.

Pontos de Coleta	Nº de amostras	Células Totais	Mn Totais	$X(\%) \pm SD$
				MN
Ponto Referência	15	30000	6	$0,004 \pm 0,632^a$
Controle Positivo	15	30000	69	$0,046 \pm 1,454^b$
Ponto 2	15	30000	11	$0,007 \pm 0,798^a$
Ponto 3	15	30000	33	$0,022 \pm 1,372^c$
Ponto 4	15	30000	43	$0,028 \pm 1,246^b$

<sup>a,b,c</sup> Caracteres diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de acordo com o teste de Mann-Whitney

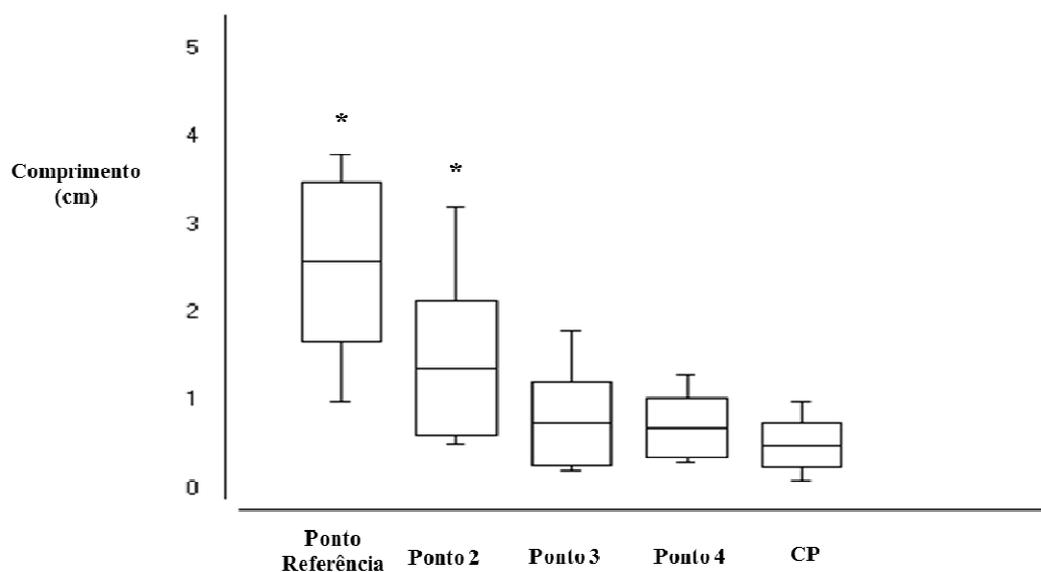
De acordo a Tabela 2 percebe-se uma variação significativa entre os pontos em relação ao IM. Nos Pontos 3 ( $28,73 \pm 3,76$ ) e 4 ( $25,44 \pm 6,15$ ) houve um retardamento do crescimento, visto que comparados ao controle positivo ( $19,34 \pm 4,17$ ). O índice mitótico tem relação direta com o crescimento de raízes, sendo assim, podemos perceber de acordo

com a Figura 1, de forma que os pontos 3 e 4 não apresentaram diferença significativa quando comparados ao ponto Controle Positivo.

**Tabela 2:** Frequência do Índice Mitótico (fase de prófase, metáfase, anáfase e telófase) em *Allium cepa* em trechos do Córrego Olaria.

<b>Pontos Amostrados</b>	<b>Células Totais</b>	<b>IM (índice <math>\pm</math> desvio padrão)</b>
Ponto referência	14000	57,68 $\pm$ 4,56 <sup>a</sup>
Controle Positivo	14000	19,34 $\pm$ 4,17 <sup>b</sup>
Ponto 2	14000	32,37 $\pm$ 5,65 <sup>c</sup>
Ponto 3	14000	28,73 $\pm$ 3,76 <sup>b</sup>
Ponto 4	14000	25,44 $\pm$ 6,15 <sup>b</sup>

\*Diferença significativa quando comparado ao ponto Referência (Controle negativo), de acordo com o teste de Kruskal Wallis,  $\alpha=0.05$ .



**Figura 1:** Taxas médias de crescimento de raízes de *Allium cepa*. \*Indica diferença significativa segundo o teste de Kruskal Wallis ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao Controle Positivo (CP).

Através dos dados apresentados pode-se concluir que os efluentes presentes no córrego Olaria, influenciaram na germinação e causaram uma variação considerável no índice mitótico, associado com uma leitura preliminar das condições químicas analisadas, as quais revelaram nos Pontos 3 e 4 baixo índice de qualidade de água, relacionados com padrões aquém dos estabelecidos pelo Conama, como: OD, DBO, taxa de sulfato, sólidos totais, alumínio e chumbo.

#### 4. DISCUSSÃO

Quanto às alterações nas células, foi observado que a água do córrego, revelou um alto potencial genotóxico quando comparado ao controle negativo, visto que a alta frequência de micronúcleos indica a presença de contaminantes que promoveram genotoxicidade em células de *Allium cepa*.

É evidenciado que a presença de parâmetros químicos irregulares, segundo os padrões do Conama, e a especial presença de chumbo nos pontos 3 e 4, refletem a maior frequência de micronúcleos nesses pontos. Segundo Leme e Morales (2009), vários trabalhos mostraram que parâmetros irregulares quanto ao chumbo e outros metais pesados

provocam anormalidades nucleares e inibição do índice mitótico, os quais podem ser indicados em ensaios com *Allium cepa*. Em concordância Godet et al. (1996) confirmam em seus estudos que alguns metais, como alumínio, chumbo e cromo podem ser genotóxicos.

Em desacordo ao que foi observado, Koca et al. (2008), não encontrou alterações micronucleares em indivíduos na presença de alguns metais como chumbo. Diante de resultados adversos, pode-se estabelecer que o incremento de micronúcleos está associado a interferência de misturas complexas e suas interações com o meio. Independente das induções celulares pode-se inferir que a água do córrego Olaria possui substâncias nocivas aos organismos que vivem nesse ambiente.

De acordo com Hoshina (2002), o IM significativamente menor do que o controle negativo pode indicar alterações, decorrentes da ação química no crescimento e desenvolvimento dos organismos. Por outro lado, o IM maior do que o controle negativo são os resultados de um aumento da divisão celular, o que pode ser prejudicial para as células, levando a uma proliferação celular desordenado e até mesmo para a formação de tecidos tumorais.

No entanto, tanto a redução e o aumento da IM são indicadores importantes no monitoramento da poluição ambiental, especialmente para a avaliação de contaminantes tóxicos que apresentam e potencial citotóxico. Smaka-Kincl et al. (1996) demonstraram que a diminuição do IM de células meristemáticas de *Allium cepa* pode ser considerado como um método viável para determinar a presença de agentes citotóxicos no ambiente e, portanto, pode ser considerado como um teste sensível para a estimativa dos níveis de poluição.

Portanto, vários estudos têm utilizado a avaliação IM para detectar citotoxicidade e a maior parte deles têm mostrado resultados satisfatórios para as análises propostas. É perceptível visualizar pela tabela que o IM teve uma variação relevante, pode ser observado que o Ponto 1 (controle negativo) por ser uma área não poluída obteve o IM maior em relação aos outros pontos. O Ponto 4 onde se encontra uma área mais poluída foi encontrado o menor IM comparado ao Ponto 1. Isso significa que os agentes poluidores interferem relevantemente no Índice Mitótico. Quanto maior a poluição do córrego, maior sua taxa de MN e menor seu IM.

Segundo Rodrigues et *al.* (1992), os compostos alelopáticos são inibidores de germinação e crescimento, pois interferem na divisão celular, permeabilidade de membranas e na ativação de enzimas, porém os efeitos observados neste trabalho parecem indicar que não só a inibição, mas também a aceleração mitótica pode interferir no processo de divisão celular, pois o aumento no índice de divisão parece corroborar os dados de germinabilidade das sementes de cebola.

#### **4. CONCLUSÃO**

Por meio dos bioensaios realizados foram detectados efeitos genotóxicos significativos nos parâmetros microscópicos analisados das amostras dos pontos 3 e 4 no córrego Olaria, assim como efeitos citotóxicos, atestando a inviabilidade do consumo da água do córrego sem os devidos tratamentos.

## REFERÊNCIAS

AIUB, C. A. F; FELZENSZWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares.

**Genética na escola**, Rio de Janeiro, p. 12-15, 2011.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and humansyndromes.

**Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 453-460, 2000.

BOYD, C.E.; TUCKER, C.S. **Water quality and pond soil analyses for aquaculture**.

Auburn: Auburn University, 1992. 183p.

BRUSICK, D. J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987, 284p.

CANTO, T.; PICH, C. T.; GEREMIAS, R. Bioensaios de toxicidade em percolados no aterro sanitário do município de Araranguá (Santa Catarina Brasil), **Revista**

**biociências**, v.19, p. 53- 60, 2013.

COSTA, M. A. G. **Poluição ambiental: herança para gerações futuras**. Santa Maria, RS: Orium, 2004. 254 p.

FISKESJÖ, G. **INVITTOX Protocol nº 8 - Allium test**. Nottingham: Russel and Burch House, 1989.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, New Jersey, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

GENDA, A. **Saneamento do meio**. São Paulo: FUNDACENTRO, 1982. 235 p.

GOMES, L. A. **O Cultivo de crustáceos e moluscos**. São Paulo: Nobel, 1986. 226 p.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations: a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Leiden, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro - município de Rio Claro, pertencente a bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura - Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.

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

SANDRO MORAIS PIMENTA, S. M.; BOAVENTURA, G. R.; PEÑA, A. P.; RIBEIRO, T. G. Estudo da qualidade da água por meio de bioindicadores bentônicos

em córregos da área rural e urbana. **Rev. Ambient. Água**, v. 11, n. 1 Taubaté, Jan. / Mar. 2016.

RIBEIRO, D. A. F.; SALVADORI, E. E. K.; MARQUES. **Mutagênese ambiental** Ulbra. Canoas. 2003, 356p.

RIBEIRO, Lucia R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In L.R. RODRIGUES, L.R.A.; R ODRIGUES, T.J.D.; REIS, R.A. **Alelopatia em plantas forrageiras**. Jaboticabal: FCAVJ-UNESP/FUNEP, 1992. 18p.

SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS – SEMARH. **Manual de instrução para licenciamento ambiental de fontes potencialmente poluidoras**. GOIÂNIA-GO, 2010. 52p.

SHARMA, C.B.S.R.; PANNEER-SELVAN, N. Genetictotoxicology of pesticides in higher plant systems. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v.9, p.409-442, 1990.

SILVA, A. G.; SOUZA, L. D. Efeitos antrópicos e sazonais na qualidade da água do Rio do Carmo, **Holos**, ano 29, v. 5, 2013.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: J. Silva; B. Erdtmann; J. A. P. Henriques. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure, **Mutat. Res.** 368, 1996.

SOUSA, M. A. N.; PINHEIRO, M. J. C.; SILVA, R. K.; COSTA, E. L.; MELO, N. J. A.; SILVA-FILHO, E. F. Avaliação da qualidade da água dos reservatórios de Santa Cruz e Umari - RN: Citotoxicidade e Genotoxicidade. **Revista Saúde & Ciência On Line**, v. 3, p. 279-288, 2014.

VANZETTO, Guilherme Victor. **A utilização de bioindicadores para avaliar o potencial mutagênico e citotóxico das águas do Rio Pirapó, região norte do Paraná, Brasil**. 2014. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2014.

VIEIRA, D.; VICENTINI, V. E. P. **Estudo do efeito mutagênico do fl oxacin em *Allium cepa***. **Genet Mol Biol Supplement**. 42º Congresso Nacional de Genética, Goiânia, Brazil, 1997.