

ANÁLISE DA CITOGENOTOXICIDADE DA ÁGUA DE POÇO DA ÁREA AGRÍCOLA DO IFSP – CAMPUS BARRETOS UTILIZANDO O MODELO DE ALLIUM CEPHA

CYTOGENOTOXICITY ANALYSIS OF THE WELL WATER FROM THE AGRICULTURAL AREA OF THE IFSP - BARRETOS CAMPUS USING THE ALLIUM CEPHA MODEL

Data de entrega dos originais à redação em: 02/05/2020
e recebido para diagramação em: 31/05/2021

Rodrigo Rodrigues Franco¹ Rafaela Martins Franco²
Emanuel Carlos Rodrigues³ Marcos de Lucca Junior⁴

A contaminação das águas subterrâneas por atividades agrícolas e resíduos de origem industrial e doméstica podem gerar efeitos tóxicos aos organismos. Análises físico-químicas são medidas importantes para determinar a constituição da água, bem como para constatar a presença de contaminantes, mas para que seja possível avaliar os resultados biológicos da contaminação, é indispensável a aplicação de ensaios in vivo. O modelo *Allium cepa* se adequa ao estudo toxicológico por apresentar boa correlação com outros organismos, sendo possível considerar alterações de natureza macro e microscópicas no bulbo. Objetivou-se neste trabalho, avaliar a qualidade da água de poço disponível na área agrícola do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) – Campus Barretos. Foram considerados diferentes biomarcadores de toxicidade: crescimento/número de raízes e índice mitótico. A análise demonstrou que o tratamento com água de poço estimulou efeitos citotóxicos e genotóxicos nos exemplares testados.

Palavras-chave: Bioindicadores. Atividade Antiproliferativa. Citogenotoxicidade. Índice Mitótico. Água de Poço.

*Contamination of groundwater by agricultural activities, industrial and domestic waste has toxic effects on organisms. Physico-chemical analyzes are important measures to determine the constitution of water, as well as to verify the presence of contaminants, but in order to evaluate the biological results of the contamination, it is indispensable to apply in vivo tests. The *Allium cepa* model is suitable for the toxicological study because it has good relation with other organisms, being possible to consider macro and microscopic changes in the bulb. The objective of this study was to evaluate the quality of well water available in the agricultural area of the Federal Institute of São Paulo - Barretos Campus. Different markers of toxicity were considered: growth and number of roots and mitotic index. The analysis demonstrated that the treatment with well water stimulated cytotoxic and genotoxic effects in the tested specimens.*

Keywords: Bioindicators. Antiproliferative Activity. Cytogenotoxicity. Mitotic Index. Well Water.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) e o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), cerca de 6,2 milhões de pessoas no Brasil não possuem acesso a água potável em 2017. A violação da pureza e a distribuição desigual da água justificam o aumento da exploração de reservatórios subterrâneos no Brasil, que possui 12% da água doce disponível no mundo (DE ANDRADE & NUNES, 2017). Esses reservatórios, também chamados de aquíferos freáticos, constituem uma fonte muito utilizada no país por ser barata e abundante, mas por outro lado, são suscetíveis à contaminação por serem superficiais (FRANCO *et al*, 2016).

O monitoramento da água subterrânea é necessário para determinar seu grau de pureza e para constatar a possível presença de contaminantes (AMORIM; MORAIS; ARAÚJO, 2011). Entre os principais contaminantes das fontes de água são os defensivos químicos usados na agricultura e os líquidos percolados

dos aterros sanitários, considerados tóxicos e prejudiciais para todo o ecossistema (FILGUEIRAS, 2017). Os insumos agrícolas podem estimular o desenvolvimento de certos tipos de tumores, bem como causar danos ao sistema nervoso humano. Os insumos agrícolas podem ainda influenciar a divisão celular, estimulando ou inibindo o processo, pois muitos desencadeiam efeitos similares aos hormônios dependendo da concentração administrada (SPIRO & STIGLIANI, 2009). Em estudos anteriores, diferentes agrotóxicos foram submetidos a testes de toxicidade e revelaram-se potencialmente genotóxicos (KRÜGER, 2009).

O chorume pode conter metais pesados provenientes de resíduos industriais e domésticos, levando ao desenvolvimento de tumores e doenças genéticas, além de inibir a divisão celular (WANG *et al*, 2014). O modelo *A. cepa* (cebola comercial) é utilizado no biomonitoramento aquático (QUEIROZ *et al*, 2017) adequando-se ao estudo toxicológico por apresentar

1 - Biólogo pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Barretos - Mestre em Genética e Bioquímica pela Universidade Federal de Uberlândia. < rodrigorfr@yahoo.com.br >.

2 - Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia.

3 - Professor do curso de Licenciatura em Química do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Barretos.

4 - Professor do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – Campus Barretos.

boa correlação com outros organismos, inclusive com o ser humano. Nesse método, avalia-se diferentes marcadores, tais como quantidade e comprimento das raízes, bem como o número de divisões mitóticas realizadas pelas células meristemáticas (OLIVEIRA; DOS SANTOS; BOEIRA, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de contaminantes na água do poço cacimba pertencente à área agrícola cedida ao IFSP – *Campus* Barretos, considerando o desenvolvimento das raízes e a inibição da divisão das células meristemáticas de *Allium cepa* como marcadores de toxicidade.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo – *Campus* Barretos.

2.1 Local em estudo e coleta das amostras

O estudo foi realizado na área rural cedida ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo pela prefeitura de Barretos, próxima ao aterro sanitário gerenciado pelo município (coordenadas: latitude 20°30'6.51"S e longitude 48°34'11.91"O). A região está situada sobre os aquíferos Bauru e Serra Geral, formados por rochas sedimentares e basálticas respectivamente. As amostras de água foram coletadas uma vez ao mês, de maio a setembro de 2015, adotando-se os procedimentos prescritos pela FUNASA (2009) e pela CETESB (2011).

2.2 Aplicação do bioindicador, tratamentos e critérios de análise

As cebolas foram obtidas no mercado local, padronizando-se o tamanho e o tempo de prateleira. Foram utilizados dois grupos teste, o primeiro, contendo água coletada do poço e o segundo, água destilada como controle. Para cada grupo, utilizaram-se três cebolas imersas em béqueres contendo 100 mL do tratamento por 72 horas (Fiskesjö, 1985). Ao final desse ciclo, avaliou-se o número e comprimento das raízes (cm) e extraiu-se três raízes de até 0,5 cm do bulbo de cada exemplar. As raízes removidas foram submetidas à hidrólise ácida com ácido clorídrico (HCl) por 15 min e posteriormente as mesmas foram coradas com solução de azul de metileno (0,3%) por 10 min. As raízes foram então maceradas, possibilitando a visualização das células e dos cromossomos através do microscópio óptico. Para cada lâmina, foram analisados dez campos de 0,231 mm², considerando todas as fases da divisão mitótica. O índice mitótico, foi calculado com o uso da seguinte equação: $IM (%) = CM/CT \times 100$, onde *CM* é o número de células em mitose e *CT*, o número total de células observadas.

2.3 Análises estatísticas

As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism 6.0. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão e a diferença estatística foi calculada utilizando one-way

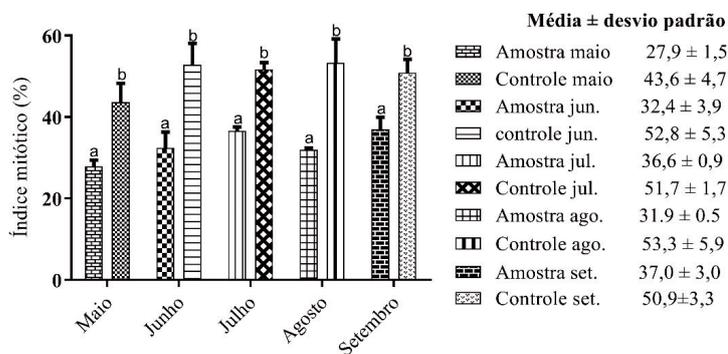
ANOVA e teste Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de contaminantes na água do poço cacimba pertencente à área agrícola cedida ao IFSP – *Campus* Barretos, considerando como marcadores de toxicidade o número e crescimento de raízes, bem como a inibição da divisão das células meristemáticas do bioindicador *Allium cepa*. As análises ambientais estão sujeitas às variações das condições climáticas que por sua vez, propiciam alterações químicas na água. Este efeito pôde ser visto nos resultados das análises do mês de maio que apresentaram maiores valores médios de toxicidade em relação aos outros meses, uma vez que estas análises foram realizadas após período de chuvas (FRANCO *et al.*, 2016).

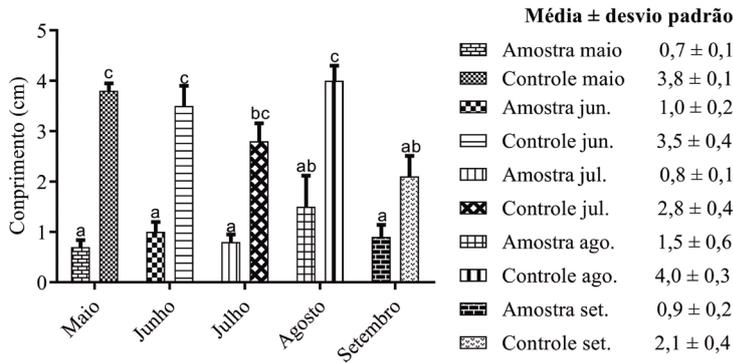
Os resultados obtidos entre os meses de maio e setembro para o índice mitótico são apresentados na figura 1, já o crescimento e número de raízes são apresentados na figura 2 e 3 respectivamente. Além dos marcadores avaliados, foram visualizadas pontes anafásicas, cromossomos perdidos, micronúcleos e células binucleadas nas cebolas experimentais (dados não mostrados), que assim como os marcadores adotados, também sugerem toxicidade da água (STURBELLE *et al.*, 2010). Os valores médios de índice mitótico (IM) foram superiores nas cebolas controles (50,5%) quando comparados aos das experimentais (33,2%), tendo sido encontrado o menor valor de IM para as cebolas experimentais em maio ($27,9 \pm 1,5\%$) (figura 1).

Figura 1- Índice mitótico (IM) das células meristemáticas das raízes cultivadas nas amostras de água de poço e das cultivadas em controle com água destilada. Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão. * Diferença significativa entre os tratamentos (P<0.05).



A análise macroscópica demonstrou que as cebolas experimentais desenvolveram poucas raízes e baixo crescimento quando comparadas aos seus controles mensais, tendo sido visualizado o menor valor de crescimento em maio (figura 2) e menor número de raízes em agosto (figura 3). De acordo com estudos de Vesna (1996), a toxicidade de líquidos é indicada pela diminuição do crescimento das raízes. A diferença no número de raízes entre os indivíduos também pode ser gerada pela variabilidade genética e morfológica de cada exemplar, uma vez que foram obtidos no mercado local, podendo acarretar, assim, nas diferenças observadas.

Figura 2 - Comprimento das raízes cultivadas nas amostras de água de poço e das em *Allium cepa*, são capazes de promover inibição significativa do crescimento e do surgimento de raízes, bem como do índice de mitoses ainda que em baixas concentrações (KRÜGER, 2009).



As células de *A. cepa* são sensíveis a compostos tóxicos em qualquer concentração, mas segundo Palácio et al (2013), níveis altos de metais pesados, tais como de cobre e cromo, diminuem o crescimento das raízes. Também foi relatada diminuição no crescimento das raízes e grande quantidade de micronúcleos em exemplares submetidos a altas concentrações de cádmio em trabalho realizado por Wang (2014). Em trabalho realizado por Oliveira et al (2012), foi encontrado altas concentrações de substâncias contendo íon cromo hexavalente (Cr⁶⁺), o que desencadeou baixo crescimento das raízes, baixo IM e grande quantidade de micronúcleos. O Cromo pode desencadear efeitos deletérios aos ecossistemas aquáticos, com sua toxicidade variando com a temperatura, pH, estado de oxidação e concentração de oxigênio dissolvido na água.

Segundo Spiro & Stigliani (2009), os xenobióticos de origem agrícola podem se comportar como hormônios, desencadeando inibições e/ou ativações de rotas bioquímicas das células responsáveis pelo desenvolvimento do organismo. Os agroquímicos apresentam em sua composição moléculas com potencial oxidante, que estimulam a formação de radicais livres nos sistemas biológicos, que por sua vez desencadeiam peroxidação de lipídios e de proteínas, bem como mutações no DNA com potencial teratogênico e carcinogênico. Considerando alguns desses agrodefensivos, a literatura demonstra que a administração de produtos cujos princípios ativos são o glifosato, o mancozeb, o fention e a beta-ciflutrina

Segundo Franco et al (2016), a água do poço em estudo esteve dentro dos padrões estipulados pelo ministério da Saúde em parâmetros físico-químicos, no entanto, foram determinadas a presença de Coliformes Totais, *Escherichia coli*, de *Pseudomonas* sp., bem como de bactérias mesófilas. Os ensaios físico-químicos são importantes, entretanto não são suficientes para que haja pleno conhecimento da potabilidade de uma fonte de água, pois não fornecem informações sobre os efeitos da contaminação por compostos tóxicos sobre os seres vivos, sendo necessário o uso de ensaios biológicos para uma completa avaliação (SOUZA, 2001). Assim, nosso trabalho contribui com os resultados vistos anteriormente na literatura.

Em resumo, a utilização de águas subterrâneas é uma alternativa de abastecimento, mas para tal se faz necessário a verificação da qualidade destas águas. Mediante os valores obtidos de crescimento e número de raízes, somados ao baixo número de índice mitótico dos exemplares de *Allium cepa*, cultivados na água do poço, quando comparados ao controle, acredita-se que haja compostos citogenotóxicos naquela água. Para que se possa determinar quais substâncias estão ali presentes, faz-se necessário análises específicas para metais pesados e agroquímicos, que podem ter chegado ao poço devido às atividades realizadas na região. A utilização desta água poderá se tornar possível mediante a reestruturação do poço e por técnicas de remediação química e biológica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP) Campus Barretos pela infraestrutura, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

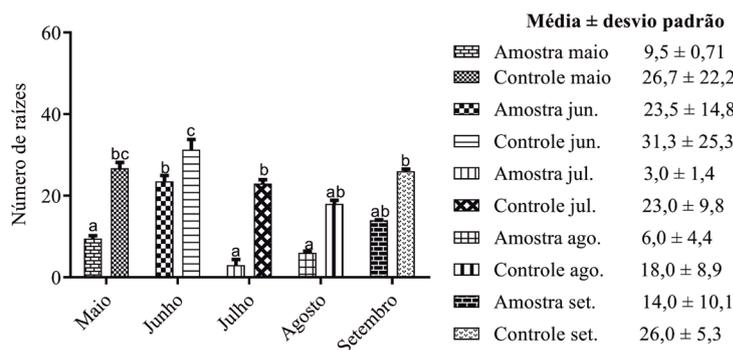
AMORIM, E. C., MORAIS, R. L., ARAÚJO, J. V. de G. A água subterrânea no Brasil e a necessidade de uma gestão sustentável. **XIX Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**. 2011.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 3ª ed. rev. - Brasília: Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, 2009. 144 p

BRANDÃO, C. J., BOTELHO, M. J. C., SATO, M. I. Z., LAMPARELLI, M. C. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas**. São Paulo: CETESB, 2011.

DE ANDRADE, J. A. & NUNES, M. A. Acesso à água no Semiárido Brasileiro: uma análise das políticas

Figura 3 - Número de raízes das cebolas cultivadas nas amostras de água de poço e das cultivadas em controle com água destilada. Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão. * Diferença significativa entre os tratamentos (P<0.05).



públicas implementadas na região. **Revista Espinhaço | UFVJM**, p. 28-39, 2017.

DIAS, M.G., CANTO-DOROW, T.S., COELHO, A.P.D., TEDESCO, S.B. Efeito genotóxico e antiproliferativo de *Mikania cordifolia* (L. F.) Willd. (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa* L. **Revista brasileira de plantas medicinais**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 202-208, 2014.

FILGUEIRAS, C. M. **Caracterização hidrogeoquímica das águas subterrâneas da Ilha de Boipeba litoral da Bahia, Brasil**. 2017.

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

FRANCO, R. R., LEITE, J. A., RODRIGUES, E. C., LUCCA JUNIOR, M. Análise físico-química e microbiológica da água de poço da área agrícola do IFSP/BARRETOS. **Sinergia (IFSP. Online)**, v. 17, p. 106-110, 2016.

KRÜGER, R. A. (2009). **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com Allium cepa**. 58f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Universidade Feevale, v. 58, 2009.

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

OLIVEIRA, J. P. W., DOSSANTOS, R. N., BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e análises físico-químicas das águas do rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012.

PALÁCIO, S. M. et al. Toxicidade de Metais em Soluções Aquosas: Um Bioensaio para Sala de Aula. **Química Nova na Escola**, V. 35, N° 2, 2013.

QUEIROZ, L. G., SILVA, F. T. D., PAIVA, T. C. B. de. Caracterização estacional das variáveis físicas, químicas, biológicas e ecotoxicológicas em um trecho do Rio Paraíba do Sul, SP, Brasil. **Revista Ambiente e Água**, v. 12, n. 2, p. 238-248, Apr. 2017.

SPIRO, T. G., STIGLIANI, W.M. Química Ambiental. 2ª ed. São Paulo: **Pearson Prentice Hall**, 2009. 333p.

SOUZA, P. A. P. Importância do uso de bioindicadores de qualidade: o caso específico das águas. FELICIDADE, N. **et al.** Uso e gestão dos recursos hídricos no Brasil. São Carlos: **Rima**, p. 55-66, 2001.

STURBELLE, R. T., PINHO, D. S. D., RESTANI, R. G., OLIVEIRA, G. R. D., GARCIAS, G. D. L., MARTINO-ROTH, M. D. G. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 409-415, jul. 2010.

VESNA, S., STEGNAR, P., LOVKA, M., TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, v. 368, n. 3-4, p.171-179, 1996.

WANG, Q. L., LT, Z., JH, Z., DH, L., JY, Y. Effects of cadmium on root growth, cell division and micronuclei formation in root tip cells of *Allium cepa* var. agrogarum L. **PHYTON**, v. 83, p. 291-298, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) and United Nations Children's Fund (UNICEF). Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines. 2017.