

## Genotoxicity and Physical Chemistry Analysis of waters from Sinos River (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores

Joana Paula Wagner Oliveira<sup>1</sup>, Raíssa Nunes dos Santos<sup>1</sup>,  
Cristiane Cassales Pibernat<sup>1</sup>, Jane Marlei Boeira<sup>1,1\*</sup>

### ABSTRACT

In recent years there was an increase in pollutant dump into Sinos River (RS) due to population growth and increasing development in “Vale dos Sinos” region. Therefore, it is important to assess this river in highly industrialized areas. This study aims at analyzing toxic and genotoxic effects of Sinos River water, subjected to industrial and urban dump from the cities of Novo Hamburgo (NH) and São Leopoldo (SL), as well as analyzing some of the physicochemical parameters. Water samples were collected from the river during Summer (December/2010) and Autumn (April/2011), using the *Allium cepa* test and some physicochemical analysis. The *Eichhornia crassipes* macrophyte was also considered as bioindicator, during Autumn. The results showed that the water samples analyzed presented substances with toxic and genotoxic effects, according to period and place assessed. The hexavalent Chromium found in the physicochemical analysis of these water samples could be responsible for inducing toxicity and genotoxicity in meristematic cells of *A. cepa* and *E. crassipes*. The *E. crassipes* macrophyte seemed to be more resistant to pollution effects when compared to *A. cepa*.

**Key words:** *Allium cepa*, *Eichhornia crassipes*, genotoxicity and toxicity.

### RESUMO

Nos últimos anos houve um aumento nas descargas poluidoras no Rio dos Sinos (RS) devido ao aumento da população e desenvolvimento da Região do Vale dos Sinos. Por isso, torna-se importante avaliar este rio em locais com acentuada industrialização. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos tóxicos e genotóxicos das águas do Rio dos Sinos sujeitas às descargas industriais e urbanas, coletadas nos municípios de Novo Hamburgo (NH) e São Leopoldo (SL), assim como realizar a análise de alguns parâmetros físico-químicos. Foram coletadas amostras de água deste rio durante as estações do Verão (dez/2010) e o Outono (abril/2011) utilizando o teste *Allium cepa* e algumas análises físico-químicas. A macrófita *Eichhornia crassipes* também foi avaliada como bioindicadora, apenas durante o outono. Os resultados mostraram que as amostras de água analisadas apresentaram substâncias com potencial efeito tóxico e genotóxico, dependente do período e local avaliado. O cromo hexavalente, encontrado nas análises físico-químicas nas amostras de água, poderia ser um dos responsáveis pela toxicidade e genotoxicidade induzidas em células meristemáticas do *A. cepa* e *E. crassipes*. A macrófita *E. crassipes* mostrou ser mais resistente aos efeitos da poluição quando comparada ao *A. cepa*.

**Palavras-chave:** *Allium cepa*, *Eichhornia crassipes*, genotoxicidade e toxicidade.

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, UERGS, Unidade em Novo Hamburgo, Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

<sup>1,1\*</sup> Correspondência para o autor: Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, UERGS, Av. Inconfidentes, 395, B. Primavera, Novo Hamburgo/RS – CEP 93340-140, Telefone: 35958091, E-mail: jane-boeira@uergs.edu.br

## INTRODUÇÃO

A poluição das águas doces superficiais é um dos grandes problemas ambientais do mundo pela deterioração do ambiente em função das atividades antrópicas (FLORES-LOPES, 2006). Em países que estão em desenvolvimento, efluentes domésticos e industriais são as principais causas de poluição das águas. Estes efluentes contêm substâncias tóxicas, como pesticidas, metais pesados, produtos industrializados, entre outros compostos contaminantes (AGENDA 21 BRASILEIRA, 2004).

O Rio dos Sinos, importante rio da Região do Vale dos Sinos, no estado do Rio Grande de Sul (RS), vem sendo poluído por despejos industriais e domésticos e ocupa a quarta posição no *ranking* de poluição do país. Estes dados foram divulgados um ano após a mortandade de 86 toneladas de peixes ocorrida em novembro de 2006 (ABES, 2011; FEPAM, 2011a; VICTÓRIA, 2011). Desta forma, torna-se importante avaliar a qualidade da água deste rio em trechos dos municípios com acentuada industrialização, principalmente do setor coureiro-calçadista, além do aumento populacional que tem ocorrido na região (BORBA, 2002; FEPAM, 2011b).

A indústria couro-calçadista do Vale dos Sinos é uma das mais importantes do país, a qual curtiu em 2002, em torno de 34,5 milhões de couros para o setor. Estima-se que cada pele gera em torno de 7,5 Kg de lodo de cromo sendo 14 milhões de peles tratadas por ano. Uma das características do processo de tratamento do couro é o elevado teor de cromo liberado no processo (BORBA, 2002; ABREU, 2006). Sabe-se que o cromo, principalmente o hexavalente ( $\text{Cr}^{+6}$ ) é considerado potencialmente tóxico e mutagênico e, este fato, representa um dos fatores que pode alterar a qualidade da água.

Além disto, a alta concentração urbana reflete os principais problemas ambientais da região. Nos municípios que compõem a bacia do Rio dos Sinos, a média do esgoto doméstico que recebe algum tratamento antes de ser despejado no rio ainda é baixa, considerando os dias atuais. O município de Novo Hamburgo que possui densidade demográfica de 1.068,6 hab/km<sup>2</sup> trata apenas 2% do esgoto produzido e São Leopoldo, que possui 2.092,5 hab/km<sup>2</sup>, trata 50% do seu esgoto urbano (FEE, 2011; FEPAM 2011a; VICTÓRIA, 2011).

Existem relatos de que o aumento da incidência de carcinomas gastrointestinais e de bexiga, anomalias reprodutivas e malformações congênitas são exemplos de alterações encontradas em populações que vivem próximas

a depósitos de despejo de efluentes contaminados (AGENDA 21 BRASILEIRA, 2004). Portanto, o monitoramento ambiental deve ser efetivo e contínuo.

Alguns parâmetros físico-químicos, como pH, temperatura, demanda química de oxigênio (DQO), oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e concentração de metais, como o cromo hexavalente, são rotineiramente utilizados para o monitoramento da qualidade em amostras de águas. A DQO é um parâmetro que estima o potencial poluidor (consumidor de oxigênio) dos efluentes domésticos e industriais, assim como o impacto dos mesmos sobre os ecossistemas aquáticos (ZUCCARI *et al.*, 2005). O índice de OD é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a capacidade de um corpo hídrico em suportar a atividade biológica de organismos aquáticos. Um teor de 5 a 6 mg/L já é capaz de suportar uma população variada de peixes. Diferentemente, a DBO é a quantificação indireta de matéria orgânica presente no corpo d'água, fundamental na caracterização da carga poluidora orgânica que é associada a poluição antrópica como a presença de esgotos domésticos sem o tratamento adequado (NAIME; NASCIMENTO, 2009).

A forma de cromo mais tóxica para o ambiente é o cromo hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$  ou  $\text{Cr VI}$ ). Praticamente todos os compostos que apresentam  $\text{Cr}^{6+}$  são mutagênicos e carcinogênicos para humanos e animais expostos. Além disto, nos ecossistemas, o  $\text{Cr}^{6+}$  pode ter efeitos tóxicos entre moderados e agudos sobre plantas, aves, peixes e mamíferos, pois não se degrada facilmente, podendo ainda se acumular nos organismos. Para a vida aquática, a toxicidade do cromo varia com a temperatura, pH, estado de oxidação e concentração de oxigênio dissolvido na água. Por outro lado, os compostos que apresentam cromo trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$  ou  $\text{Cr III}$ ) possuem baixa toxicidade e seus efeitos não são tão graves quanto os efeitos da forma hexavalente (PIRETE, 2009).

Testes de monitoramento genotóxico voltados ao ambiente têm sido amplamente usados (FISKESJÖ, 1985; SILVA *et al.*, 2004; BENINCA; HEUSER, 2006; XAVIER *et al.*, 2011) para complementar os testes físico-químicos e outros testes biológicos utilizados. Dentre estes, o teste de Micronúcleos (MN) detecta alterações nos cromossomos, como perda de parte do cromossomo ou de um cromossomo inteiro durante a divisão celular (ANDRADE *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2011). O teste *Allium cepa* é um dos mais utilizados para este objetivo, por ser um método rápido e barato. Além disso, permite avaliar danos nos cromossomos e distúrbios no ciclo mitótico, pois apresenta cromossomos grandes e em número

reduzido ( $2n=16$ ) (FISKESJÖ, 1985), além de apresentar elevada sensibilidade na detecção de agentes químicos ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Recentemente, a macrófita *Eichhornia crassipes*, conhecida como aguapé, vem sendo utilizada no tratamento biológico de águas contaminadas por diversos poluentes devido a sua capacidade de adsorver alguns poluentes, principalmente metais (MISHRA; RAI; PRAKASH, 2007). Esta característica se deve à presença de células pequenas com capacidade de adsorver grandes íons e substâncias, localizadas em torno de sistemas de poros da epiderme inferior de suas folhas flutuantes. Alguns pesquisadores (MISHRA; RAI; PRAKASH, 2007) utilizaram esta planta como bioindicadora de poluição para monitorar baixos níveis de metais pesados usando testes para avaliação da genotoxicidade, apesar de esta planta possuir cromossomos pequenos ( $2n=32$ ) (PEDROSA *et al.*, 1999). Segundo Mishra, Rai e Prakash (2007) e Mishra, Gupta, Rai (2009) a *E. crassipes* foi apropriada para avaliação de danos induzidos por  $Cr^{6+}$  e  $Cd^{2+}$ , devido ao aumento da frequência de micronúcleos e diminuição do índice mitótico observados em amostras de água.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os efeitos tóxicos e genotóxicos das águas do Rio dos Sinos sujeitas as descargas industriais e urbanas, nos municípios de Novo Hamburgo (NH) e São Leopoldo (SL), usando as espécies *A. cepa* e *E. crassipes* como bioindicadoras, assim como avaliar a qualidade destas águas, utilizando alguns parâmetros físico-químicos.

## METODOLOGIA

As amostras de água do Rio dos Sinos foram coletadas em dois locais: próximo à Rodoviária do município de São Leopoldo (Coordenadas: S 29°45'27,7" HO 51°88'43,9", Centro, SL) e na Ponte da Estação COMUSA, em Novo Hamburgo (Coordenadas: S 29°43'50" HO 51°05'00", Bairro Lomba Grande, NH). Foram coletados 5L de amostras de água, durante o verão (dezembro/2010 a janeiro/2011) e o outono (abril a junho/2011), as quais foram levadas imediatamente ao Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), em Novo Hamburgo, RS, e mantidas sob refrigeração até o procedimento dos testes.

## 1. Testes Físico-Químicos

Para as análises físico-químicas, em ambos os locais, as amostras foram coletadas em frascos de polietileno (500 mL) e o volume coletado variou de acordo com as análises a serem realizadas. As coletas foram realizadas quinzenalmente, de dezembro de 2010 a junho de 2011, compreendendo as estações do verão e outono.

Para a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) as amostras foram coletadas em frascos com tampa de vidro esmerilhada de 300 mL e foram analisadas pelo método de Winckler (ABNT – NBR 12614, 1992).

As amostras destinadas à análise da Demanda Química de Oxigênio (DQO) foram preservadas com ácido sulfúrico P.A em  $pH < 2$  e armazenadas sob refrigeração para análises em até 28 dias após a coleta. A DQO foi determinada pelo Método de Refluxo Aberto (ABNT – NBR 10357, 1988).

A temperatura e o pH das amostras foram medidos no local da coleta. Para o registro da temperatura (em °C) foi utilizado um termômetro de vidro e para a medida do pH foi utilizado o papel indicador universal. Assim que as amostras foram recebidas no Laboratório e, antes de serem armazenadas sob refrigeração (até 2h após a coleta), o pH foi medido com potenciômetro de bancada (em triplicata).

A concentração de Cromo Hexavalente foi determinada pelo Método Colorimétrico da Difenilcarbazida, de acordo com ABNT (NBR 13738, 1996).

## 2. Testes de Genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade foram realizados em dezembro de 2010 e abril de 2011 nas estações do verão e outono, respectivamente.

Para o teste com *A. cepa*, 10 bulbos foram expostos a cada uma das amostras (NH ou SL) ou água potável (controle negativo) por 48 h, totalizando 30 bulbos. Após o crescimento, as raízes foram retiradas de cada bulbo, fixadas em Carnoy (24 h) e hidrolisadas com HCl 1M (6 min, em BM a 60°C). Para a preparação das lâminas, uma radícula já corada (Giemsa 10%) foi colocada sobre uma lâmina e a região meristemática foi seccionada, recoberta com lamínula, flambada e refrigerada (24 h). Após a retirada das lamínulas, deixou-se secar a temperatura ambiente e as lâminas foram finalizadas com Entellan. Foram analisadas, ao microscópio óptico, 1.000 células/bulbo para análise da frequência de Micronúcleos (MN) e do Índice Mitótico (IM). Para a contagem de MN foram

incluídas principalmente as células não sobrepostas, com os núcleos normais e intactos e com citoplasma também intacto. Foram considerados micronúcleos as estruturas que apresentaram um halo circundante sugestivo de uma membrana, com aproximadamente 1/3 do diâmetro do núcleo principal, intensidade da coloração semelhante ao núcleo e mesmo plano focal na microscopia (FISKEJÖ, 1985).

O índice mitótico foi avaliado pela razão do número de células em divisão pelo número total de células contadas por lâmina. Foram contadas 500 células / lâmina (duas lâminas por bulbo), totalizando a contagem de 1000 células/bulbo (FISKEJÖ, 1985).

Para os testes com *E. crassipes*, amostras da planta foram obtidas de local não poluído (Barragem Corsan, Rua Ercílio José Flores, Garibaldi, RS) e transferidas para o laboratório para ambientação em solução de Hoagland, por no mínimo 15 dias, de acordo com Mishra, Rai e Prakash (2007). Os testes com *E. crassipes* foram realizados somente no outono. Somente plantas jovens de tamanho uniforme e com raízes saudáveis foram utilizadas. Cinco (5) plantas foram transferidas para copos de plástico contendo: a) 200 mL de solução Hoagland a 5% (controle), ou b) 200 mL de amostra teste SL; ou c) 200 mL de amostra teste NH, totalizando 15 plantas. Raízes de cada planta expostas às amostras e ao controle foram coletadas após 48 h do tratamento e lavadas 3 vezes com água destilada. Os meristemas radiculares foram fixados e preparados de acordo com os mesmos procedimentos utilizados com *A. cepa*. Foram confeccionadas 2 lâminas para cada planta para a contagem de MN e IM.

### 3. Teste de Toxicidade

A análise toxicológica foi realizada extraíndo-se a maior raiz de cada bulbo de *A. cepa*, após 7 dias de crescimento em contato com as amostras e controle negativo. As raízes excisadas foram medidas em centímetros. A média obtida de cada teste foi comparada com a média obtida para o controle negativo, que foi considerado 100% de crescimento. Desta forma, foram obtidos valores relativos (percentagem de crescimento em relação ao controle negativo) (BENINCA; HEUSER, 2006).

### 4. Análise Estatística

Os dados foram apresentados em média  $\pm$  dp e analisados estatisticamente

por ANOVA, seguido do Teste Tukey para comparações múltiplas, utilizando o software *Graph Pad Prism*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram analisadas as amostras de águas do Rio dos Sinos coletadas nos municípios de Novo Hamburgo (NH) e São Leopoldo (SL), durante as estações do verão e outono.

### 1. Parâmetros Físico-Químicos

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de águas são mostrados na Tabela 1. No verão, a DQO das amostras de SL revelou um perfil de poluição orgânica superior às amostras de NH. O Oxigênio dissolvido (OD) no dia zero, em ambas as localidades, apresentou valores muito similares (4,37 a 4,39 mg/L de O<sub>2</sub>) e fora dos padrões estabelecidos pelo CONAMA 357 (não inferior a 5 mg/L de O<sub>2</sub>). Além disto, a DBO<sub>5</sub> apresentou um valor mais elevado na localidade de SL, indicando que houve maior consumo de O<sub>2</sub> nesta amostra, uma vez que mostrou um percentual restante menor comparado ao OD da medição inicial.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos avaliados em Média  $\pm$  desvio padrão em amostras de água do Rio dos Sinos coletadas em Novo Hamburgo e São Leopoldo, durante o verão e o outono.

Parâmetros físico-químicos	Novo Hamburgo (NH)		São Leopoldo (SL)		Valores de Referência*
	Verão	Outono	Verão	Outono	
Temperatura (°C)	25,5 $\pm$ 1,45	18,5 $\pm$ 3,34	25,0 $\pm$ 1,15	19,3 $\pm$ 3,11	-
pH	7,04 $\pm$ 0,18	7,07 $\pm$ 0,10	6,93 $\pm$ 0,18	7,08 $\pm$ 0,23	6,0-9,0
DQO (mg/L de O <sub>2</sub> )	79,75 $\pm$ 53,67	57,17 $\pm$ 19,57	87,67 $\pm$ 29,71	41,49 $\pm$ 33,35	**
OD (mg/L de O <sub>2</sub> )	4,37 $\pm$ 0,36	4,39 $\pm$ 1,00	4,36 $\pm$ 0,72	4,39 $\pm$ 0,86	não < 5 mg/L O <sub>2</sub>
DBO <sub>5</sub> (mg/L de O <sub>2</sub> )	1,72 $\pm$ 1,05	0,90 $\pm$ 0,59	2,22 $\pm$ 0,66	1,07 $\pm$ 1,02	não > 5 mg/L O <sub>2</sub>
Cr <sup>6+</sup> (mg/L)	0,045 $\pm$ 0,085	0,059 $\pm$ 0,037	0,065 $\pm$ 0,077	0,075 $\pm$ 0,02	até 0,05 mg/L

\*De acordo com CONAMA 357 para águas do tipo II. \*\*A DQO infere perfis de poluição orgânica qualitativos neste estudo.

No outono, os resultados foram diferentes das análises realizadas no verão, ressaltando a importância deste estudo sazonal. O pH nas duas amostras apresentou valor levemente mais alto no outono, mas ainda dentro do padrão

estabelecido, enquanto que o OD manteve valores similares aos obtidos no verão. Por outro lado, os resultados de DQO e de DBO tanto das amostras de SL quanto de NH no outono apresentaram resultados inferiores comparados com as amostras coletadas no verão. Este fato se deve, possivelmente, à redução do nível de água no rio, característica do período de verão que pode levar a concentração dos poluentes nos pontos de amostragem. Observou-se também que NH apresentou valores superiores de DQO no outono em relação a SL. Houve um aumento da concentração de  $\text{Cr}^{+6}$  nas duas localidades durante o outono, destacando-se SL com uma concentração de 0,075 mg/L de  $\text{Cr}^{+6}$ , superior ao estabelecido pelo CONAMA 357 (0,05 mg/L), enquanto que, no verão, as amostras de Novo Hamburgo apresentaram concentração de  $\text{Cr}^{+6}$  dentro do limite permitido (0,049 mg/L).

De acordo com os relatórios da FEPAM, as médias de OD de 2007 a 2010, obtidas a partir de amostras de água do Rio dos Sinos, também apresentaram valores superiores ao padrão estabelecido pelo CONAMA 357, devido a uma combinação de fatores resultantes da deficiência de controle das diversas fontes poluidoras industriais e cloacais, além da ocorrência de chuvas na região, as quais proporcionaram diluição destes efluentes (FEPAM, 2010).

Em um estudo realizado por Naime e Nascimento (2009) no Vale dos Sinos durante 2006 e 2007, os testes físico-químicos mostraram-se sazonais, possivelmente pela variação que ocorre naturalmente nos corpos d'água ou devido aos despejos antrópicos, característicos da localidade. A capacidade de autodepuração e do fluxo unidirecional de ecossistemas lóticos, os efluentes sólidos carregados por drenagens pluviais para dentro dos ecossistemas aquáticos podem ser diluídos dependendo das concentrações e do tamanho do rio o que pode ocasionar modificações nos valores das variáveis analisadas (GOULART; CALLISTO, 2003), como observado em nosso estudo.

## 2. Toxicidade

O tamanho das raízes de *A. cepa*, expostas às amostras de água do Rio dos Sinos foram analisadas para avaliação da toxicidade e estão expressos na Tabela 2. No verão houve uma diminuição no crescimento das raízes, em ambas as amostras (NH e SL), em comparação com o controle, sugerindo uma maior concentração de substâncias tóxicas nestas amostras. No entanto, o mesmo não foi observado nas amostras coletadas no outono, o que sugere que estas

amostras de água poderiam estar mais diluídas neste período. Segundo Oliveira *et al* (2009), na Região do Vale do Rio dos Sinos as chuvas são bem distribuídas ao longo do ano, com leve concentração nos meses mais frios (outono e inverno), quando ocorre a entrada de massas de ar frias e úmidas vindas do Oceano Atlântico Sul. A maior parte das áreas inundadas está localizada ao longo do rio principal, o Rio dos Sinos, onde estão localizadas as cidades de NH e SL. De acordo com um levantamento realizado pela Defesa Civil, o mês de abril (outono) de 2011, período de realização dos nossos testes, registrou uma média de chuvas de aproximadamente 120 mm de precipitação, maior do que ocorre normalmente (maior que o dobro) em pelo menos nove cidades gaúchas incluindo os municípios do Vale dos Sinos (VALE DOS SINOS, 2011; ZERO HORA, 2011).

Outros dados que podem estar relacionados aos resultados de toxicidade encontrados neste estudo são os valores do Índice de Qualidade da Água (IQA) publicados pela FEPAM (2011a), relativo aos meses de verão. Este índice é um número que expressa a qualidade geral da água em certo local e tempo, baseado em variáveis de qualidade da água, desenvolvido pela NSF (*National Sanitation Foundation*). A partir da captação de amostras de água de Novo Hamburgo (ponte Lomba Grande), o IQA mostrou valores na faixa "Regular" (nota de 51 a 70) e em amostras do trecho que segue de Novo Hamburgo até São Leopoldo revelou valores na faixa "Ruim" (40 a 50) (FEPAM, 2011a). Os resultados de toxicidade (Tabela 2), revelados pela inibição do crescimento das raízes de *Allium cepa* durante o verão, estão de acordo com estes valores de IQA e, portanto, pode-se inferir que as amostras de águas do município de SL, neste período, poderiam estar mais contaminadas em relação às de NH.

**Tabela 2.** Avaliação toxicológica através da medida do comprimento das raízes (média  $\pm$  D.P.) de *Allium cepa*, em centímetros, expostas às amostras de água do Rio dos Sinos coletadas durante o verão (dez/2010) e outono (abril/2011).

Bulbo	Verão			Outono		
	Controle	NH	SL	Controle	NH	SL
1	5,9	1,5	5,3	5,7	4,1	3,7
2	-	4,9	6,3	7,6	5,2	5,8
3	4,0	3,1	4,2	3,0	-	7,8
4	9,0	8,4	1,5	6,2	6,3	4,5
5	6,9	1,7	2,9	5,5	5,5	6,9
6	2,6	5,2	4,8	7,2	7,9	5,4
7	2,6	3,2	5,3	9,1	6,8	7,6
8	8,0	2,3	3,5	3,9	8,1	7,0
9	6,8	7,2	2,9	6,4	4,6	7,0
10	8,2	4,5	2,1	4,1	4,8	9,1
<b>Média <math>\pm</math> dp</b>	6,0 $\pm$ 2,41	4,20 $\pm$ 2,29	3,88 $\pm$ 1,55	5,87 $\pm$ 1,85	5,92 $\pm$ 2,31	6,57 $\pm$ 1,68
<b>% Inibição</b>	—	30%	35,34%	—	0%	0%

### 3. Genotoxicidade

Os resultados da frequência de micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) analisados em 1.000 células meristemáticas de *A. cepa* e *E. crassipes* são mostrados na Tabela 3. No teste com *A. cepa*, houve um aumento significativo de MN em ambas as amostras (NH e SL), coletadas nas duas estações, comparadas com o controle. No entanto, para o IM, somente a amostra de NH apresentou diminuição significativa, quando coletada no outono, enquanto que a amostra de SL apresentou redução do IM durante o verão. Estes dados sugerem que ambas as amostras de águas do Rio dos Sinos estão sujeitas ao descarte de efluentes contaminados com substâncias genotóxicas e que sua concentração varia de acordo com a estação e com a localidade.

**Tabela 3.** Avaliação da frequência de micronúcleos (MN) e índice mitótico (IM) observados em 1.000 células meristemáticas de *A. cepa* e *E. crassipes* expostas às amostras de água do Rio dos Sinos (RS).

Amostra	<i>Allium cepa</i>		<i>Eichhornia crassipes</i>			
	Micronúcleos (MN)		Índice mitótico (IM)		MN	IM
	Verão	Outono	Verão	Outono	Outono	Outono
Controle	0,14 ±0,37	0,42 ±0,78	0,13±0,04	0,24 ± 0,02	0 ± 0	0,20±0,2
NH	8,28±3,04*	8,14±3,28*	0,11±0,03	0,13±0,06*	4,0±1,41*	0,16±0,04
SL	11,57±4,64*	10,28±2,87*	0,07±0,02*	0,22 ± 0,07	3,6±1,51*	0,16±0,02

\*Significante ao nível de  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle (ANOVA, Tukey).

As diferenças na genotoxicidade entre os pontos de coleta em um rio podem estar relacionadas ao volume de água (variação na concentração dos agentes genotóxicos) e/ou ao efeito cumulativo de diferentes fontes (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Resultados similares aos nossos foram encontrados por Scalon (2009), que mostrou que a genotoxicidade observada em células meristemáticas de *Allium cepa* em exposição às amostras do Rio dos Sinos, nos municípios de Caraá, Taquara, Sapucaia e Novo Hamburgo, foi mais significativa durante a primavera e o verão, e diminuiu nas estações do outono e inverno, sugerindo influência das diferenças sazonais de precipitação pluviométrica.

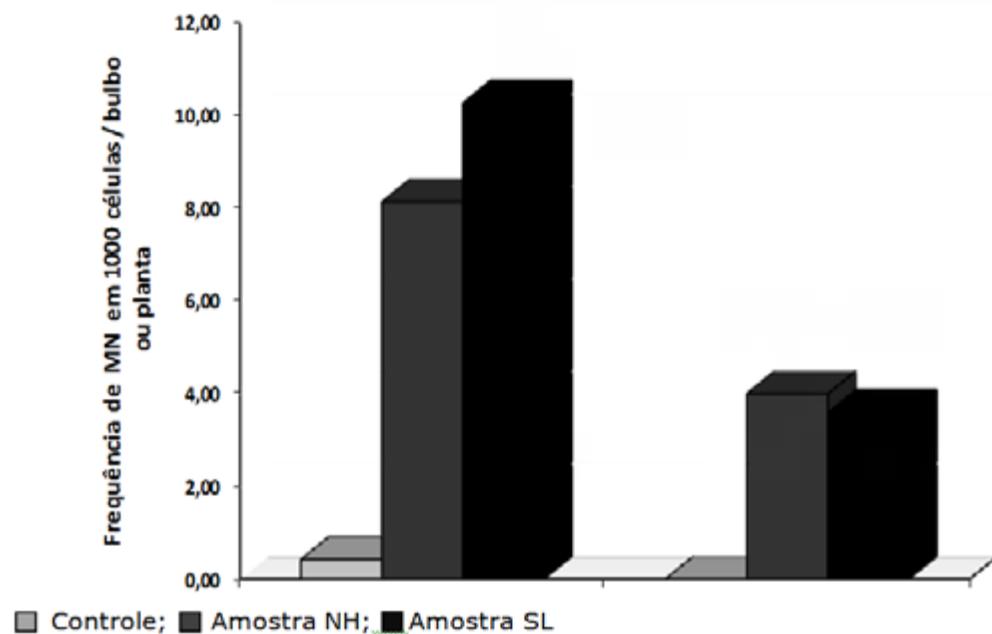
É de conhecimento que a região do Vale dos Sinos possui empresas que realizam o curtimento de couro, processo no qual são empregados sais de cromo, que transformam o produto orgânico em inorgânico. Neste processo também são usados corantes para o acabamento do produto (CASTRO, sd). Além disso,

os testes físico-químicos realizados com as amostras em estudo mostraram a presença de Cromo hexavalente ( $\text{Cr}^{+6}$ ; NH= 0,045 mg/L; SL= 0,065 mg/L), acima dos níveis permitidos pelo CONAMA 357. Segundo Amaral *et al.* (2007), metais pesados, como o  $\text{Cr}^{+6}$ , estão entre os agentes que induzem genotoxicidade, portanto, podem influenciar na redução do índice mitótico e no aumento da frequência de micronúcleos em testes com *A. cepa*.

O teste com *E. crassipes* também mostrou um aumento de MN no período analisado (outono), em ambas as amostras (SL e NH). Por outro lado, o IM mostrou uma redução, embora não significativa em comparação com o controle. Segundo Lavarda (2010), a capacidade de *E. crassipes* em absorver metais pesados está diretamente relacionada às concentrações de macronutrientes disponíveis para a planta e à concentração de metais pesados presentes no meio aquoso. Se, em excesso, estes se tornam prejudiciais ao desenvolvimento da planta. Shanker *et al.* (2005) demonstraram que o cromo pode se acumular em partes específicas desta macrófita, sendo 98% deste metal encontrado em suas raízes. Por ser um elemento considerado não essencial e tóxico para as plantas, se especula que não devem existir mecanismos específicos para entrada de cromo na célula. Assim, considera-se que a absorção de cromo possa ocorrer via carreadores usados para a absorção de elementos essenciais para o metabolismo vegetal, ou seja, pela imobilização do metal nos vacúolos dos meristemas radiculares, o que poderia ser uma resposta natural da planta à toxicidade (SHANKER *et al.*, 2005).

Comparando-se os resultados de frequência de micronúcleos de *A. cepa* com *E. crassipes* durante o outono (Figura 1), a macrófita mostrou-se mais resistente aos efeitos dos poluentes. De acordo com Venancio (2009), *E. crassipes* possui tolerância ao cromo, devido à baixa sensibilidade do seu aparato fotossintético à este metal. Somente elevadas concentrações da forma hexavalente induziram sinais fisiológicos de estresse. Acredita-se que os sistemas de transporte do tonoplasto (vacúolo) desta macrófita sejam resistentes a metais tóxicos, sequestrando o cromo no sentido de reduzir a sua concentração no citoplasma, contribuindo para a homeostase celular e, desta forma, prevenindo danos à fisiologia e bioquímica dos processos celulares (MAHAMADI; NHARINGO, 2010). Neste estudo, a resistência foi demonstrada pela macrófita pela diminuição da frequência de micronúcleos, quando comparada com os resultados de *A. cepa*, em ambas as amostras de água de SL e NH.

**Figura 1.** Comparação da frequência de MN observados em 1.000 células meristemáticas de *A. cepa* e de *E. crassipes* expostas às amostras de água do Rio dos Sinos e controle durante o outono (abril/2011).



Os resultados encontrados nas amostras de água do Rio dos Sinos dos municípios de São Leopoldo e Novo Hamburgo indicam que este rio apresentou substâncias com potencial tóxico e genotóxico, variável de acordo com a estação e local estudado. A concentração de cromo hexavalente encontrada nas amostras, poderia induzir a genotoxicidade avaliada pela frequência de micronúcleos em células meristemáticas das raízes do *A. cepa* e *E. crassipes*. No entanto, mais estudos são necessários para avaliação de outros poluentes que poderiam estar presentes nestas amostras de água.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro concedido para Raíssa Nunes dos Santos e Joana Paula Wagner Oliveira, respectivamente. Também agradecemos ao apoio técnico voluntário dos graduandos do curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Kathrin Diehl Franzoi, Karolina Cardoso Hernandez, André Dalcin Salvagni e Bruna Canalli.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABES. **Os rios mais poluídos do Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.abes-mg.org.br/visualizacao-de-clippings/pt-br/ler/2082/os-rios-mais-poluidos-do-brasil>>. Acesso em: 22 de outubro de 2011.
- ABNT – NBR 12614 (1992). **Águas – Determinação de demanda bioquímica de oxigênio (DBO)**.
- ABNT – NBR 13738 (1996). **Águas – Determinação de cromo hexavalente**.
- ABREU, Míriam Antonio de. **Reciclagem do Resíduo de Cromo da Indústria do Curtume com Pigmentos Cerâmicos**. 2006. 151f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- AGENDA 21 BRASILEIRA: AÇÕES PRIORITÁRIAS. **Comissão de Políticas de Desenvolvimento Sustentável e da Agenda 21 Nacional**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2ª ed., 2004.
- AMARAL, Alexandre de Moraes; BASBÉRIO, Agnes; VOLTOLINI, Júlio Cesar; BARROS, Layra. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da Bacia do Rio Tapanhon (SP-BRASIL) através do Teste Allium (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n. 1 e 2, p. 65-72. 2007.
- ANDRADE, Vanessa Moraes de; SILVA, Julina da; SILVA, Fernanda R. da; HEUSER, Vanina D.; DIAS, Johnny F.; YONEAMA, Maria Lucia; FREITAS, Thales R.O. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, n. 5, p. 459-468. 2004.
- BENINCA, Daniela; HEUSER, Vanina Dahlström. Avaliação da toxicidade de amostras do Rio Tigre utilizando *Allium cepa* bioindicador. In: IIº SIMPÓSIO SUL DE GESTÃO E CONSERVAÇÃO AMBIENTAL, **Anais**, Erechim: URI, p. 49-58, 2006.
- BORBA, Sheila Villanova; CUNHA, Carla Giane Souza. Dilemas da gestão cooperativa: o caso da/na Região Metropolitana de Porto Alegre. **Cadernos Metrópole**, n. 7, p. 75-96. 1º sem. 2002.
- CASTRO, sd. **Tesouro Promissor**. Disponível em: <[www.deere.com/pt\\_BR/ag/veja\\_mais/o\\_sulco/.../osulco30\\_p14-17.pdf](http://www.deere.com/pt_BR/ag/veja_mais/o_sulco/.../osulco30_p14-17.pdf)>. Acesso em: 23 junho 2011.
- FEE. **Resumo Estatístico RS**. 2011. Disponível em: <<http://www.fee.tche.br/sitefee/pt/content/resumo/index.php>>. Acesso em: 22 de outubro de 2011.
- FEPAM. **Qualidade das Águas da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos**. 2011a. Disponível em: <[http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade\\_sinos/sinos.asp](http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/qualidade_sinos/sinos.asp)>. Acesso em: 22 de maio de 2011.
- FEPAM. **Qualidade Ambiental**. 2011b. Disponível em: <<http://www.fepam.rs.gov.br/qualidade/guaiba.asp>>. Acesso em: 22 de maio de 2011.
- FEPAM. **Relatório de qualidade ambiental das águas do Rio dos Sinos produzido pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental**. 2010. Disponível em: <[www.comitesinos.com.br](http://www.comitesinos.com.br)>. Acesso em: 2 de julho de 2011.
- FISKESJÖ, Geirid. *Allium* test on river water from Braan and Sexan before and after closure of a chemical factory. **Ambio**, v. 14, p. 99-103. 1985.
- FLORES-LOPES, Fábio. **Monitoramento ambiental da Bacia Hidrográfica do lago Guaíba –RS– Brasil, através da utilização de diferentes metodologias aplicadas à toxocenoses de peixes**. Tese (Doutorado em Biologia Animal) – Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GOULART, Michael Dave; CALLISTO, Marcos. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FEPAM**, n. 1. 2003.

LAVARDA, Fábio Luciano. **Estudo do Potencial de Biossorção dos Íons Cd (II), Cu (II) e Zn (II) pela Macrófita *Eichhornia crassipes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2010.

LEME, Daniela.Morais ; MARIN-MORALES, Maria Aparecida . Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water - a case study. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, p. 80-86, 2008.

MAHAMADI, Courtie.; NHARINGO, Tichaona. Competitive adsorption of Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions onto *Eichhornia crassipes* in binary and ternary systems. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 859-864, 2010.

MATSUMOTO, Silvia Tamie; MANTOVANI, Mário Sérgio; MALAGUTTI, Mirtis Irene Ariza; DIAS, Ana Lúcia. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.148-158, 2006.

MISHRA, Kumkum; RAI, Upendra Nath; PRAKASH, Om. Bioconcentration and phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. **Environmental Monitoring Assessment**, v. 130, p. 237-243, 2007.

MISHRA, Kumkum; GUPTA, Kiran; RAI, Upendra Nath. Bioconcentration and phytotoxicity of chromium in *Eichhornia crassipes*. **Journal Environment Biology**, v. 30, p. 521-526, 2009.

NAIME, Roberto; NASCIMENTO, Carlos Augusto do. Monitoramento de pH, temperatura, OD, DBO e condições microbiológicas das águas do arroio Pampa em Novo Hamburgo (RS). **Estudos Tecnológicos (Online)**, v. 5, p. 228-246, 2009.

OLIVEIRA, Guilherme Garcia de; PENTEADO, Adriana de Fátima.; SALDANHA, Dejanira Luderitz; ROSS, Jurandyr Luciano Sanches. Mapeamento e análise da distribuição das áreas inundáveis na bacia do rio dos Sinos/RS. In: XIV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, **Anais**, Natal: INPE, p. 4173-4180, 2009.

PIRETE, Marcelo; DALCIN, Maurielem, CARDOSO, Vicelma. Resultados preliminares da redução biológica de cromo hexavalente em filtro biológico de fluxo contínuo. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, **Anais**, Uberlândia, MG. COBEQ-IC, 2009.

Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf)>. Acesso em: 25 de janeiro de 2011.

SCALON, Madalena Cristina Streb. **Avaliação dos Efeitos Genotóxicos da Água do Rio dos Sinos sobre Peixes e Vegetais**. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.

SHANKER, Arunk K.; CERVANTES, Carlos; LOZA-TAVERA, Herminia; AVUDAINAYAGAM, S. Chromium Toxicity in Plants. **Environment International**, v. 31, p.739-753, 2005.

SILVA, Maria Fernanda P. Tomasi Baldez da; FERRARI, Gisele Pezente; TOLEDO, Fabiana de; ROCHA, Carmem Lucia M. Sartori Cardoso da; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta. Mutagenic effect of fresh water (well, rivers Fichta and Minas Gerais, close to the town of Ubitatã, Paraná, Brazil) in the animal test system. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. Maringá, v. 26, n. 1, p. 101-105. Abr. 2004.

**Vale dos Sinos**, Vale dos Sinos, 10 abr. 2011. Clima. Sapucaia do Sul e Esteio decretam situação de emergência. Disponível em: <<http://www.jornalvs.com.br/clima/305166/sapucaia-do-sul-e-esteio-decretam-situacao-de-emergencia.html>>. Acesso em: fevereiro, 2012.

VENANCIO, Josimara Barcelos. **Mecanismo de Tolerância ao Cromo de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: Capacidade de Acumulação do Metal, Efeitos sobre a Fotossíntese e Modulação das Bombas de H<sup>+</sup>**. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Goitacazes, 2009.

VICTÓRIA, Clóvis. Esperança para o Sinos. Caderno Ambiente, **Extra Classe**. Porto Alegre, jul. 2011.

XAVIER, Bárbara de Oliveira; PASSOS Letícia; OLIVEIRA Regiani Carvalho de; MIELLI Ana Cristina. **Avaliação do Efeito Genotóxico de Diferentes Tipos de Solos para Biomonitoramento com Tradescantia Pallida**. *Genética na Escola*. 2011. Disponível em: <[http://www.geneticanaescola.com.br/ano6vol1/MS11\\_011.pdf](http://www.geneticanaescola.com.br/ano6vol1/MS11_011.pdf)>. Acesso em: 22 out. 2011.

ZUCCARI, Maria Lucia; GRANER, Celso Augusto Fessel; LEOPOLDO, Paulo Rodolfo. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo. **Engenharia Agrícola**, Botucatu, vol. 20, n.4, p. 69-82, 2005.

**Zero Hora**, Porto Alegre, 25 abr. 2011. Plantão. Chuva em abril é mais que dobro da média histórica do mês em pelo menos nove cidades. Disponível em: <<http://zerohora.clicrbs.com.br/zerohora/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&section=Geral&newsID=a3286781.xml>>. Acesso em: julho, 2011.