



Artigo Original

e-ISSN 2177-4560

DOI: 10.19180/2177-4560.v15n12021p70-85

Submetido em: 10 mai. 2020

Aceito em: 28 jan. 2021

.....

União de esforços, ajuste da metodologia do teste Allium cepa como suporte para avaliar genotoxicidade na bacia do Rio Una e o papel do Comitê de Bacia Hidrográfica Lagos São João-RJ no planejamento das ações de monitoramento

Guilherme Botelho Mendes  <https://orcid.org/0000-0003-0290-9069>

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense.

Mestrando em Engenharia Ambiental pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Fluminense – Macaé/RJ – Brasil.

E-mail: guilhermemendesengenharia@gmail.com

Victor Barbosa Saraiva  <https://orcid.org/0000-0002-9130-8902>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.

Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica). Docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense – Cabo Frio/RJ – Brasil.

E-mail: vsaraiva@gmail.com

André Luiz dos Santos Fonseca  <https://orcid.org/0000-0002-6334-6063>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.

Doutor em Ecologia e Recursos Naturais. Docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense – Cabo Frio/RJ – Brasil.

E-mail: andrefonsecabio@gmail.com

Marcos Vinicius Leal Costa  <https://orcid.org/0000-0002-3846-6135>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.

Doutor em Biotecnologia Vegetal. Docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense – Cabo Frio/RJ – Brasil.

E-mail: marcos.costa@iff.edu.br

Adriana Miguel Saad  <https://orcid.org/0000-0002-1897-8483>

Consórcio Intermunicipal Lagos São João.

Doutora em ecologia e recursos naturais. Secretária Executiva do Consórcio Intermunicipal Lagos São João.

E-mail: saadadriana1@gmail.com

Manildo Marcião de Oliveira  <https://orcid.org/0000-0003-4245-7132>

Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense.

Doutor em Ciências (Biociências Nucleares). Docente do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Fluminense – Cabo Frio/RJ – Brasil.

E-mail: manildodpicf@gmail.com

Resumo: Com a crescente pressão sobre os usos múltiplos dos recursos hídricos e o consequente aumento da poluição das águas, estudos ecotoxicológicos são essenciais para o monitoramento da qualidade da água em prol da gestão e recuperação dos corpos hídricos. Este trabalho visa realizar um estudo que contemple a parceria com os atores socioambientais e que promovam o planejamento de ações de monitoramento ecotoxicológico que sejam úteis aos gestores ambientais. Desse modo, foram realizadas consultas e reuniões com membros do Comitê de Bacias Hidrográficas Lagos São João para nortear a proposta do monitoramento, seguindo então para o laboratório, onde foi realizado o ajuste da metodologia da aplicação do Teste *Allium cepa* (cebola) para avaliação ecotoxicológica no Rio Una. Na padronização, foram utilizadas diferentes concentrações de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) e, em seguida, analisou-se a presença de indicadores de efeitos citotóxicos e genotóxicos. Diferentes indicadores foram encontrados, entre eles a presença de cromossomo vagante, micronúcleo, anormalidade de fuso, aderência cromossômica, anáfase irregular e ponte anafásica. Após ajustes e padronização do método, este será utilizado no monitoramento dos pontos estabelecidos nas reuniões com os representantes do Comitê de Bacia Hidrográfica Lagos São João.

Palavras-chave: Recursos Hídricos. Ecotoxicologia. *Allium cepa*. Rio Una. Micronúcleo.

Joint efforts, adjustment of the Allium cepa test methodology as support for assessing genotoxicity in the Una River basin and the role of the Lagos São João-RJ Watershed Committee in the planning of monitoring actions

Abstract: With increased pressure of the multiple uses of water resources and the consequent increase in water pollution, ecotoxicological studies are essential for monitoring water quality in order to manage and restore water bodies. This work aims at carrying out a study that contemplates the partnership with socio-environmental actors and that promotes the planning of ecotoxicological monitoring actions useful for environmental managers. In this way, consultations and meetings were held with members of the Lagos São João Watershed Committee to guide the monitoring proposal, then leading to the laboratory, where the methodology for applying the *Allium cepa* (onion) test was carried out for ecotoxicological assessment in the Una River. Within the standardization, different concentrations of Potassium Dichromate ($K_2Cr_2O_7$) were used and then the presence of indicators of cytotoxic and genotoxic effects were analyzed. Different indicators were found, amongst them the presence of a wandering chromosome, micronucleus, spindle abnormality, chromosomal adhesion, irregular anaphase and anaphase bridge. After adjustments and standardization of the method, it will be used to monitor the points established in the meetings with the representatives of the Lagos São João Watershed Committee.

Keywords: Water Resources. Ecotoxicology. *Allium cepa*. Una River. Micronucleus.

Unión de esfuerzos, adecuación de la metodología de prueba de Allium cepa como soporte para la evaluación de genotoxicidad en la cuenca del Río Una y el rol del Comité de Cuenca Lagos São João-RJ en la planificación de acciones de monitoreo

Resumen: Con la creciente presión sobre los múltiples usos de los recursos hídricos y el consecuente aumento de la contaminación del agua, los estudios ecotoxicológicos son esenciales para monitorear la calidad del agua con el fin de gestionar y recuperar los cuerpos hídricos. Este trabajo tiene como objetivo realizar un estudio que contemple la alianza con actores socioambientales y que promuevan la planificación de acciones de monitoreo ecotoxicológico que sean de utilidad para los gestores ambientales. Así, se llevaron a cabo consultas y reuniones con miembros del Comité de Cuenca Lagos São João para orientar la propuesta de monitoreo, luego al laboratorio, donde se realizó el ajuste de la metodología para la aplicación del test de *Allium cepa* (cebolla) para la evaluación ecotoxicológica en el río Una. En la estandarización se utilizaron diferentes concentraciones de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) y luego se analizó la presencia de indicadores de efectos citotóxicos y genotóxicos. Se encontraron diferentes indicadores, incluyendo la presencia de cromosoma vago, micronúcleo, anomalía de huso, adherencia cromosómica, anafase irregular y puente anafásico. Pasado los ajustes y estandarización del método, se utilizará para monitorear los puntos establecidos en las reuniones con los representantes del Comité de Cuenca Lagos São João.

Palabras clave: Recursos hídricos. Ecotoxicología. *Allium cepa*. Rio Una. Micronúcleo.

1 Introdução

Os recursos naturais do nosso planeta vêm sofrendo forte pressão devido ao crescimento demográfico aliado ao avanço tecnológico, acarretando diversos problemas ambientais, como exemplo a poluição dos corpos hídricos (RODRIGUES *et al.*, 2019).

A água é um recurso natural de domínio público essencial à vida, ao bem-estar social e à manutenção dos ecossistemas (TUNDISI; TUNDISI, 2015). No entanto, é possível observar que, nos últimos anos, a contaminação hídrica se intensificou em virtude do descarte contínuo de novas substâncias no meio aquático, causando efeitos negativos adversos à biota desses ecossistemas assim como à saúde humana (ZAGATTO, 2008).

Em razão da grande quantidade de corpos hídricos poluídos e dos inúmeros casos de danos à biota e à saúde humana, estudos ecotoxicológicos vêm se tornando cada vez mais relevantes, e, de forma integrada às análises físicas e químicas, podem caracterizar e controlar de forma mais eficiente os efeitos deletérios das fontes de poluição antrópicas (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Testes ecotoxicológicos agudos e crônicos são os mais aplicados em monitoramento de efluentes, extratos naturais e outras amostras ambientais (COSTA *et al.*, 2008). Nesses casos, organismos padronizados são expostos à amostra teste, e, através dos *end points* (mortalidade, mobilidade, perda da reprodução), são geradas em testes agudos (CL50 - concentração letal média e CE50 - concentração efetiva média) e testes crônicos (CEO - concentração de efeito observado e CENO - concentração de efeito não observado) informações de toxicidade da amostra teste (COSTA *et al.*, 2008). Esses protocolos geram informações que podem ser usadas pelo gestor para atender os limites impostos pela legislação e para auxiliá-lo na tomada de decisões. Entretanto, abordagens ecotoxicológicas com menor relevância ecológica, mas com caráter de prevenção mais evidente, são também uma opção. Nessa categoria, os biomarcadores são considerados alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas provocadas por exposição ou efeitos de xenobióticos químicos, vindo por este modo a contribuir para a avaliação de risco ecológico (FORBES; PALMQVIST; BACH, 2006). Os biomarcadores de genotoxicidade são importantes ferramentas na avaliação do ambiente aquático quanto à exposição ou efeito de xenobióticos com capacidade de serem genotóxicos (interagem quimicamente com o material genético, causando danos na molécula de DNA) (BIANCHI, 2008).

Um biomarcador de genotoxicidade amplamente utilizado pela ecotoxicologia é o teste do micronúcleo. Esse método é caracterizado pela observação microscópica de pequenos núcleos próximos ao núcleo principal oriundos da divisão celular como consequência de efeito de dano no DNA (BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Atualmente, o teste é aplicado em vários organismos, dentre estes, o teste *Allium cepa* é aceito desde 1938 (FISKESJÖ, 1985), dada a alta sensibilidade, o baixo custo e a fácil aplicação. Muitos autores utilizam a técnica em seus estudos para avaliarem citotoxicidade e genotoxicidade de substâncias (DÜSMAN, 2014).

O Rio Una, localizado na Região Hidrográfica VI do estado do Rio de Janeiro, sofreu uma série de modificações e, devido às pressões antrópicas em conjunto com a carência de práticas de conservação e estudos em sua bacia, teve sua qualidade e disponibilidade hídrica afetadas negativamente. Dessa forma, esse corpo hídrico demanda informações técnicas para basear tomadas de decisões em prol da melhoria da qualidade e manutenção de sua disponibilidade hídrica (BIDEGAIN, 2005).

Há, na Região Hidrográfica Lagos São João (RH-VI), onde se encontra a Bacia do Rio Una, uma forte pressão da população em prol da despoluição da Laguna de Araruama (localizada na bacia da laguna de Araruama). No passado, as inúmeras praias da Laguna eram intensamente frequentadas por banhistas atraídos pela beleza do local e suas águas calmas (MELO, 2011). Há anos, porém, a Laguna de Araruama enfrenta um grave problema de poluição ambiental ocasionado pelo crescimento demográfico e pela ocupação desordenada às margens da laguna, o que contribuiu para o aumento da pressão antrópica e dos impactos ambientais sobre esse ecossistema (MOREIRA-TURCQ, 2000; LIMA-GREEN, 2008).

A principal causa da poluição da Laguna de Araruama é o lançamento de efluentes, que, em conjunto com a baixa troca das águas com o mar, contribui para o aporte de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, caracterizando o surgimento do fenômeno conhecido por eutrofização (KJERFVE, 1996).

A maioria das estações de tratamento lança, após tratamento, os efluentes na Laguna de Araruama, e, pelo fato de esse corpo hídrico ainda se apresentar em situação de poluição por esgoto, isso causa desconforto na população. Como alternativa ao lançamento de efluentes na Laguna de Araruama, há estudos (GEOPORT, 2005; VON SPERLING, 2008) com vistas a realizar uma transposição dos efluentes lançados na bacia da Laguna de Araruama para a Bacia do Rio Una, tendo como principal foco os efluentes derivados das Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) de São Pedro da Aldeia, Cabo Frio e Iguaba Grande, que são lançados próximos a algumas praias banhadas pela Laguna de Araruama.

Pelo fato de existirem estudos e discussões à respeito da transposição desses efluentes tratados para a calha do Rio Una, este estudo se faz relevante para dar um parecer qualitativo atual do rio sem a influência do provável futuro recebimento dessas cargas de efluentes e como se comporta o trecho de um de seus afluentes que já recebe efluentes tratados na ETE Jardim Esperança.

O Consórcio Intermunicipal Lagos São João (CILSJ), Entidade Delegatária, com funções de Agência de Bacia, do Comitê de Bacia Hidrográfica Lagos São João (CBHLSJ) solicitou um estudo (GEOPORT, 2005), elaborado pela Divisão de Geoprocessamento e Estudos Ambientais da empresa GEOPORT, para avaliar a viabilidade da transposição dos efluentes das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) dos Municípios de Araruama, Armação dos Búzios, Cabo Frio, Iguaba Grande e São Pedro da Aldeia. Neste trabalho são levantadas informações acerca das Bacias Hidrográficas da Laguna de Araruama e do Rio Una, incluindo dados georreferenciados de mapeamento de relevo e da rede de drenagem, mapeamento e cálculos hidrológicos das capacidades de vazão dos canais para receber os efluentes das ETEs. Este estudo concluiu que as transposições propostas são viáveis do ponto de vista hidrológico, trazendo benefícios diretos, caso

seja realizado o tratamento terciário de forma adequada pelas ETEs, como por exemplo: interrupção do aporte de nutrientes para o interior da Laguna de Araruama e aumento de vazão do Rio Una e seus afluentes, trazendo perenidade a seus afluentes intermitentes e diminuindo a influência salina no Rio Una.

Complementando o estudo realizado por GEOPORT (2005), foi elaborado um estudo de modelagem por Von Sperling (2008), com o objetivo de realizar a modelagem da qualidade das águas do Rio Una após futuros lançamentos dos efluentes tratados das Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) de Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia e Cabo Frio. Tal estudo utilizou o modelo matemático QUAL-UFMG, versão similar ao Qual2-E, da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), utilizado mundialmente em estudos desse tipo.

Na simulação do modelo foram considerados alguns parâmetros (oxigênio dissolvido, DBO, nitrogênio, fósforo e coliformes termotolerantes) e futuros corpos receptores (Rio Arrozal-Papicu – futuro receptor dos efluentes da ETE Iguaba Grande, Rio Flecheiras – futuro receptor dos efluentes da ETE São Pedro da Aldeia, Córrego da Malhada – futuro receptor dos efluentes da ETE Cabo Frio – Praia do Siqueira – e atual receptor da ETE Jardim Esperança). Em resumo, o autor concluiu que “a implementação ou não da reversão dos esgotos tratados terá pouquíssima influência na qualidade da água dos rios e no atendimento aos padrões, os quais são mais influenciados pelas condições prévias dos cursos d’água. A influência é desprezível, no caso de se ter cursos d’água bastante poluídos” (VON SPERLING, 2008).

Os dois estudos desenvolvidos indicaram que não haverá impactos negativos sobre o Rio Una, seus afluentes e sua foz após a transposição dos efluentes. No entanto, esses resultados positivos dependem do tratamento adequado dos efluentes por parte da concessionária e da adequação das ETEs para o tratamento terciário. A fiscalização e o monitoramento contínuos dos corpos hídricos receptores também são necessários para garantir seus usos e os parâmetros de qualidade da água de acordo com a legislação vigente.

Considerando a necessidade de adaptação de metodologias do Teste *Allium cepa* às condições ambientais do laboratório (ex: lote das cebolas utilizadas, temperatura, materiais disponíveis) utilizado para realizar sua aplicação, o presente estudo visou à padronização e ao ajuste metodológico do ensaio *Allium cepa*. Além disso, esse trabalho também buscou a identificação de pontos amostrais relevantes para uma avaliação ecotoxicológica no Rio Una tendo em vista a transposição de efluentes tratados lançados na Laguna de Araruama para a bacia do Rio Una, baseada em estudos científicos e debates com os atores sociais presentes no ambiente em questão. Este artigo representa a primeira etapa de um estudo, que tem como objetivo realizar uma avaliação ecotoxicológica do Rio Una com vistas a subsidiar, com informações técnicas, tomadas de decisões em prol da conservação do ecossistema.

2 Material e Método

2.1 Área de Estudo

A área de estudo deste trabalho abrange a região da bacia do Rio Una, que está inserida na RH-VI do estado do Rio de Janeiro. Com aproximadamente 480 km², compreende parcelas dos territórios de São Pedro da Aldeia, Cabo Frio, Araruama, Iguaba Grande e Armação dos Búzios (BIDEGAIN, 2005).

O Rio Una, assim como seus afluentes, foram bastante modificados pelas obras do Departamento Nacional de Obras de Saneamento (DNOS) realizadas nos anos de 1940, e, por esse motivo, é possível observar a maior parte do seu trajeto retilinizado. Pela margem esquerda, o Rio Una recebe afluentes de pouca expressão. Pela margem direita, recebe a contribuição dos Rios Carijó e Conceição. Passando pela Vila de São Vicente; recebe a contribuição de pequenos córregos durante o trajeto pela baixada; e seus principais afluentes, Rio Papicu e Rio Frecheiras. A nascente do rio está localizada no morro do Igarapiapunha, tendo como seu formador o Rio Godinho, e sua foz na praia de Unamar, dentro da propriedade da Marinha do Brasil (BIDEGAIN, 2005).

2.2 Preparo para padronização de metodologia do teste *Allium cepa*

Para padronização da metodologia do teste *Allium cepa*, incluindo a preparação das soluções de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇); obtenção e visualização das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*, foram seguidas as metodologias de Grant (1982) e Costa *et al.* (2016). Foi necessária a combinação de duas metodologias para adequar o teste às condições do laboratório utilizado para o estudo; pois, na falta dos reagentes utilizados por Grant (1982) para preparar a solução de controle positivo, utilizou-se a metodologia de Costa *et al.* (2016), que utilizou o dicromato de potássio (disponível no laboratório).

2.2.1 Preparo de soluções de dicromato de potássio

O dicromato de potássio, controle positivo de genotoxicidade do teste, possui alta solubilidade e é altamente genotóxico e citotóxico (FERETTI *et al.*, 2007; ISLAM *et al.*, 2017; MOHAMMED *et al.*, 2015; ROCHA *et al.*, 2011). O dicromato de potássio é constituído de cromo hexavalente, Cr (VI), muito utilizado na indústria para fabricação de pigmentos e corantes, curtumes, preparação de antissépticos, produtos de limpeza e como um titulante redox (PRIETO *et al.*, 2008; MAGRO *et al.*, 2013).

Seguindo a metodologia de Costa *et al.* (2016), as concentrações de soluções de dicromato de potássio, às quais as cebolas foram expostas inicialmente, foram de 12 mg/L e 6 mg/L. Para controle negativo, utilizou-se água deionizada. Esse fato ocorreu, porque, na ocasião do experimento, estávamos sem condição de produzir água destilada, que normalmente é utilizada no teste, em nosso laboratório. Porém, em nenhuma delas houve crescimento de raízes até o quinto dia de exposição, quando apenas uma pequena raiz cresceu na solução de 6 mg/L.

Por este motivo, o protocolo foi ajustado, e, num segundo experimento, obteve-se crescimento significativo preparando as soluções com concentrações menores de dicromato de potássio (6 mg/L, 3 mg/L, 1,5 mg/L) adicionando solução de cloreto de sódio 100 mg/l à água deionizada, com vistas a corrigir um possível desequilíbrio osmótico causado pela ausência íons na água.

2.2.2 Tratamento das raízes

Foram selecionadas cebolas (*Allium cepa L.*) da variedade Cebola Amarela ou Pera de tamanhos e pesos semelhantes compradas em um pequeno hortifrúti próximo ao laboratório do IFFluminense – *Campus* Cabo Frio. As cebolas foram dispostas em potes de polietileno de 140 ml com a solução de dicromato de potássio, de modo que apenas as bases dos bulbos ficassem submersas ou em contato com as soluções do controle negativo e controle positivo, contidas dentro dos frascos. Em conformidade com Grant (1982), raízes velhas foram retiradas com uma pinça para evitar qualquer alteração na solução e uniformizar o estado dos bulbos em todas as cebolas (Figura 1).

Em seguida, seguindo a metodologia de Grant (1982), acompanhou-se o crescimento radicular das cebolas durante cinco dias a fim de identificar o tempo ótimo de crescimento das raízes nas condições do ambiente que proporcionasse um melhor preparo das lâminas e visualização das células.

Figura 1 – Disposição das cebolas para obtenção e observação dos efeitos das soluções em raízes de *Allium cepa*. CN- Controle negativo

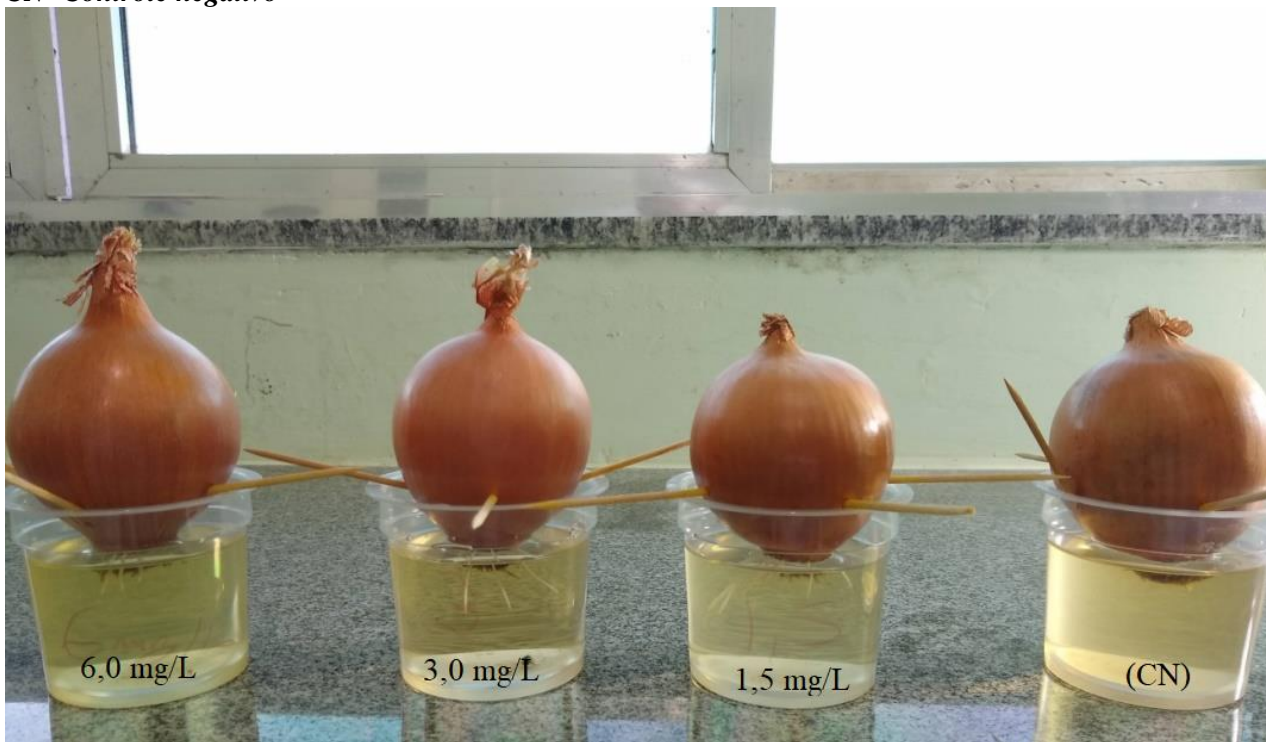


Foto: Autor, 2019

2.2.3 Preparo de Lâminas

Para o preparo e observação das lâminas do teste *Allium cepa*, foi adotada, com adaptações às condições do laboratório, a metodologia Guerra; Souza (2002).

Primeiramente, seccionou-se, com o auxílio de uma tesoura, um pedaço de aproximadamente 0,5 cm da ponta das raízes, a fim de separar a região do meristema, região onde há maior índice mitótico. Em seguida, essa secção da raiz foi colocada em um tubo eppendorff com solução fixadora Carnoy 3:1 (Etanol: Ácido acético glacial) preparada imediatamente antes de ser utilizada, aguardando cerca de 15 horas até ser retirada da solução (GUERRA; SOUZA, 2002).

Em seguida, as raízes foram retiradas do fixador, secadas levemente em papel filtro e colocadas em tubos de ensaio com uma solução corante de orceína acética 2% e de HCl 1N (proporção de 9:1, respectivamente). Aqueceram-se os tubos em chama de uma lamparina a álcool e aguardaram-se cerca de 20 minutos até que esfriasse totalmente (GUERRA; SOUZA, 2002).

As raízes foram retiradas dos tubos de ensaio e colocadas sobre lâminas, e, com o auxílio de agulhas e microscópico estereoscópio, seccionou-se cada meristema em quatro pequenas partes. Em seguida, adicionou-se uma pequena gota de orceína acética 2% e colocou-se a lamínula sobre lâmina, pressionando levemente para espalhar o tecido para melhor visualização das células ao microscópico óptico (GUERRA; SOUZA, 2002).

2.3 Metodologia para definição dos pontos de coleta

Buscando o objetivo de desenvolver ações de monitoramento ecotoxicológico que possam ser discutidas pelas plenárias dos Comitês de Bacias Hidrográficas, foram realizadas entrevistas e reuniões junto ao Subcomitê do Rio Una, as quais foram norteadoras no planejamento dos pontos de coleta de amostras de água e das metodologias mais apropriadas na execução do projeto.

O projeto deste presente estudo foi apresentado em Reunião do Subcomitê da Bacia Hidrográfica do Rio Una, realizada no dia 30 de setembro de 2019. Os Comitês de Bacias Hidrográficas são órgãos do Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos nos quais a comunidade da bacia hidrográfica discute e delibera em prol da gestão dos recursos hídricos. Devido aos poucos estudos realizados sobre esse rio, o objetivo desta apresentação foi coletar informações de atores sociais envolvidos diretamente com a área de estudo e com conhecimentos específicos sobre a Bacia.

Além disso, foi realizada uma entrevista com o Sr. Gilton, representante do Sindicato dos Trabalhadores e Trabalhadoras Rurais de Cabo Frio, para nortear a escolha dos pontos de amostragem e também levantar outras informações, como, por exemplo, atividades econômicas que podem impactar o Rio Una.

Para definição dos pontos de coleta, nossos estudos também estão aliados a algumas perguntas sobre a condição da qualidade ambiental do Rio Una mediante a possibilidade de transposição de efluentes de

Estações de Tratamento de Esgotos (ETE) da bacia da Laguna de Araruama. Portanto, buscaram-se pontos de coleta em trechos de futuros corpos hídricos receptores de efluentes, que podem sofrer influência da transposição.

2.4 Análise Estatística

Os resultados de micronúcleo (MN), índice mitótico (IM) e aberrações cromossômicas (AC) serão analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey usando o *software* Graphpad Prism 5.0 ($p < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

O estudo atual procurou ajustar a metodologia do teste do *Allium cepa* e a identificação de pontos amostrais relevantes para uma avaliação ecotoxicológica do Rio Una tendo em vista a transposição de efluentes tratados lançados na Laguna de Araruama para a calha do rio. Esta é a primeira etapa de um estudo que busca desenvolver ações de monitoramento ecotoxicológico que possam ser discutidas pelas plenárias dos Comitês de Bacias Hidrográficas. Este estudo também buscou soluções de forma compartilhada, ou seja, Institutos Federais de Educação Ciência e Tecnologia planejando suas ações de pesquisa e extensão junto com as demandas da sociedade, neste caso representadas pelos Comitês de Bacias.

Os pontos definidos para futuras amostragens (Figura 2 e Quadro 1) se basearam nos estudos realizados por GEOPORT (2005) e Von Sperling (2008), avaliações prévias realizadas pela concessionária responsável pelo saneamento na região e sugestões da diretora do Subcomitê do Rio Una e Cabo Búzios, participantes da reunião do Subcomitê do Rio Una e Cabo Búzios, na qual o projeto deste trabalho foi apresentado.

Além disso, na entrevista realizada com o Representante do Sindicato dos Trabalhadores Rurais de Cabo Frio, Sr. Gilton, ele citou os pontos do canal da Malhada e Rio Papicu (próximo à Fazenda Araçá) como uns dos principais pontos para se monitorar a qualidade da água, além de mencionar a pecuária, plantação de cana-de-açúcar e mineração de areia como umas das atividades econômicas que mais o preocupam pelo potencial poluidor. Falou também da importância de se estudar o Rio Una e pressionar o poder público para melhorias nessa bacia hidrográfica:

Gilton – [...] “Temos que ver o Rio Una de uma visão ampliada, é um rio que cruza vários municípios e traz recursos para muitos, porém o descaso é grande”.

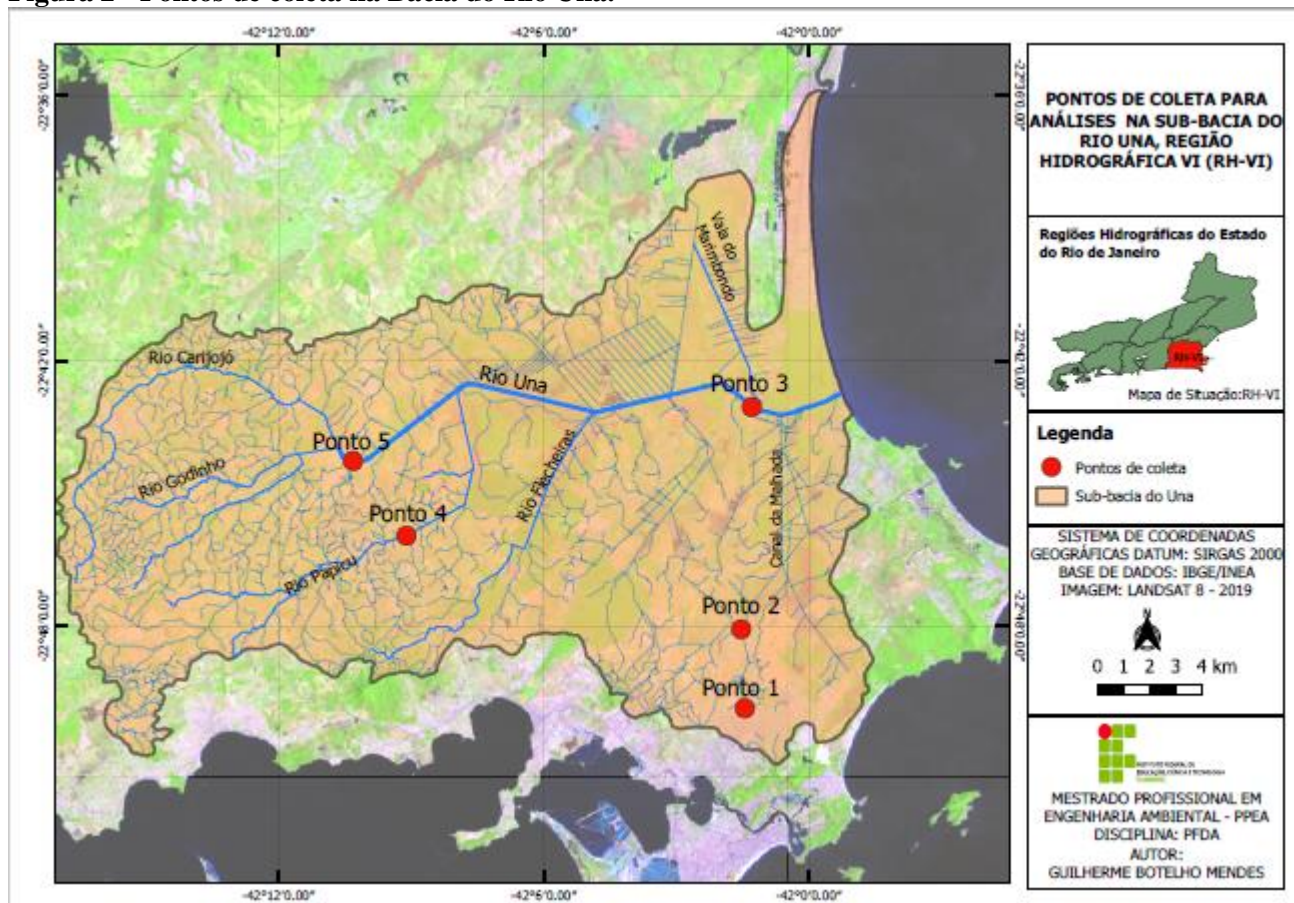
Quadro 1 – Coordenadas dos pontos de coleta na Bacia do Rio Una.

Pontos de coleta	Coordenadas	Referência
------------------	-------------	------------

Ponto 1	22°49'48.62"S; 42° 1'26.75"O	Canal da Malhada (afluente do Una), a montante ETE Jardim Esperança.
Ponto 2	22°48'32.31"S; 42° 1'26.10"O	Canal da Malhada (afluente do Una), a jusante da ETE Jardim Esperança. Trecho cotado como futuro receptor do efluente tratado da ETE Cabo Frio (GEOPORT, 2005; VON SPERLING, 2008)
Ponto 3	22°43'3.48"S; 42° 1'16.13"O	Rio Una, mais próximo à foz, a jusante da zona rural, RJ-106
Ponto 4	22°45'57.0"S; 42°09'06.0"O	Trecho do rio Papicu, cotado como futuro receptor do efluente tratado da ETE Iguaba (GEOPORT, 2005; VON SPERLING, 2008)
Ponto 5	22°44'16.26"S; 42°10'18.97"O	Rio Una, Trecho mais a montante, localizado na zona rural, próximo a canaviais.

Fonte: Os autores, 2019.

Figura 2 - Pontos de coleta na Bacia do Rio Una.



Fonte: Autores, 2019.

A escolha do teste genotóxico com *Allium cepa* também passou pela conversa realizada com pescadores locais e atores que atuam junto ao Comitê de Bacias Lagos São João. A proposta de início era utilizar uma espécie de peixe ou algum outro organismo que fosse representativo em todo o leito do Rio

Una. Entretanto, essa condição não foi atendida em função das diferentes conjunturas tanto no que se refere ao volume quanto às características físico-químicas que se alteram no leito do rio, impossibilitando a coleta regular de espécimes que pudessem fornecer dados ecotoxicológicos do ambiente nos pontos escolhidos para o estudo. Por tal motivo, foi necessário usar a água do rio, obtida nos pontos de coleta, para os experimentos de verificação da genotoxicidade, e o teste com *Allium cepa* foi a opção mais adequada para atender à necessidade apresentada.

Desse modo, a adequação do teste foi realizada. Num primeiro experimento, utilizando soluções de $12,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicromato de potássio, conforme Costa *et al.* (2016), preparadas com água deionizada, pôde-se observar uma inibição no crescimento das raízes expostas a essas substâncias até o quinto dia, quando apenas na solução de $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$ iniciou um pequeno crescimento que se mostrou estagnado.

É possível que a inibição de crescimento tenha sido causada pela utilização de água deionizada e consequente desequilíbrio osmótico, dada ausência de sais minerais ou mesmo a utilização de algum inibidor de crescimento durante o período de estoque e venda das cebolas compradas. Segundo Grant (1982), os bulbos de *Allium cepa* comerciais podem ser tratados com um inibidor de crescimento, como a hidrazida maleica, para evitar o surgimento durante o armazenamento.

Um segundo experimento foi realizado. Neste, foram testadas concentrações menores de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($1,5 \text{ mg.L}^{-1}$, $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $6,0 \text{ mg.L}^{-1}$) preparadas com solução de água deionizada e cloreto de sódio a 100 mg/l . A mesma solução de água deionizada e cloreto de sódio a 100 mg/l foi utilizada como controle negativo. Em seguida observou-se o comportamento das raízes após 24 horas e 48 horas, de acordo com Grant (1982).

As raízes com crescimento de 24 horas não atingiram um tamanho considerável para efeito de comparação entre as soluções, poucas mitoses foram identificadas e, além disso, cresceram de forma rígida e ressecadas, não proporcionando, como consequência, boas lâminas para observação das células.

Corroborando esses resultados, Zou *et al.* (2006), por meio de experimentos com cromo hexavalente (Cr-VI), verificou crescimento radicular completamente interrompido por $10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ Cr (VI) nas primeiras 24 horas em raízes vegetais de *Amaranthus viridis L.*

Em nosso estudo, após 48 horas de experimento, as raízes atingiram um crescimento ideal para comparar a inibição do crescimento entre as diferentes concentrações de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, proporcionando boa visualização das lâminas, onde se pôde observar, em todas as concentrações, uma quantidade considerável de mitoses, aberrações cromossômicas (AC) e presença de micronúcleos (MN) (Figura 4).

Nas mesmas 48 horas de experimento, o crescimento das raízes expostas ao controle negativo foi mínimo e, diferentemente das soluções de controle positivo, não proporcionou boas lâminas, por crescerem de forma rígida e ressecada, reforçando a hipótese de que algum inibidor de crescimento utilizado nas cebolas diferente da água deionizada poderia ter influenciado no resultado (Tabela 1).

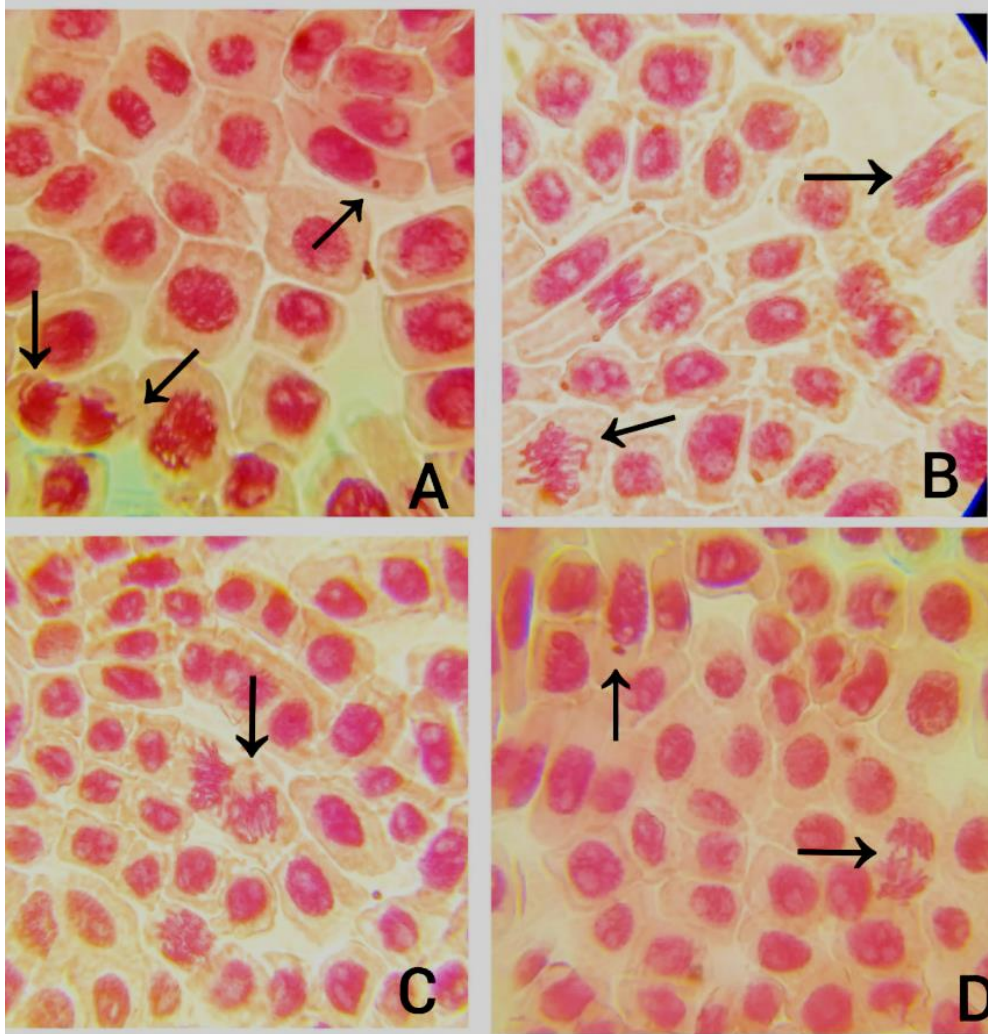
Tabela 1 – Efeitos do $K_2Cr_2O_7$ sobre o crescimento e nascimento de raízes de *Allium cepa L.*

Concentração de $K_2Cr_2O_7$ (mg.L ⁻¹)	Média de crescimento atingido (mm)	Número de raízes brotadas
1,5	23,07	13
3,0	19,97	4
6,0	12,28	4

Fonte: Os autores, 2019.

As AC são ocorrências de alterações estruturais ou no número de cromossomos existentes numa célula, em decorrência da exposição dessas a xenobióticos. As AC podem ser divididas em dois grupos, as aberrações clastogênicas e aneugênicas/fisiológicas. Entre as aberrações clastogênicas incluem-se as (i) pontes cromossômicas e (ii) quebras cromossômicas, ambas caracterizadas por fragmentações de cromossomos em função dos efeitos de agentes químicos. No entanto, as aberrações aneugênicas são compostas principalmente por (iii) c-mitoses, caracterizadas pelo espalhamento dos cromossomos pela célula; (iv) aderência, caracterizada pela contração ou condensação cromossômica; (v) retardamentos, caracterizados pela falha de movimentação dos cromossomos para os polos durante a divisão celular; (vi) multipolaridade, caracterizado pelo afastamento dos fusos para as extremidades das células; e (vii) perdas cromossômicas, também chamadas de cromossomo vagante, que ocorre quando um cromossomo se desprende de seu grupo cromossômico em direção aos polos da célula (Figura 3) (LEME; MARIN-MORALES, 2008; KAYHAN *et al.*, 2019; MASOOD; MALIK, 2013; KHANNA; SHARMA, 2013).

Figura 3 - Alterações do material nuclear obtidos pelo ensaio em *Allium cepa*, visualizadas em microscópio em aumento de 1000 vezes. A) (vii) perda cromossômica e micronúcleo, B) (iii) C-metáfase e (iv) aderência; C) (vi) anáfase com multipolaridade e (vii) perda cromossômica; D) (i) Ponte anafásica e micronúcleo.



Fonte: Autor, 2019.

Assim como nesse estudo, Hoshina e Marin-Morales (2009) aplicaram o Teste *Allium cepa* e consideraram para avaliação de AC a presença dos seguintes tipos: (vii) perdas, (ii) fragmentos e (i) pontes cromossômicas. Com a aplicação do teste puderam sugerir que, mesmo após os tratamentos, o efluente final de uma refinaria de petróleo poderia induzir aberrações cromossômicas e micronúcleos em células meristemáticas de *A. cepa* e que a descarga dos efluentes da refinaria pode interferir na qualidade da água do Rio Atibaia, SP.

Cabe ressaltar que as aberrações cromossômicas podem vir a compor uma célula micronucleada, pois os cromossomos e seus fragmentos não podem voltar a compor o núcleo principal da célula durante o ciclo nuclear (FENECH, 2002).

Os Micronúcleos são derivados de danos não reparados em células, em decorrência da exposição a agentes xenobióticos. São caracterizados pela formação de uma estrutura semelhante e próxima ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido e de fácil visualização. Por esse fato, a técnica de micronúcleo é

considerada por muitos autores a técnica mais simples e eficiente para avaliar efeitos mutagênicos em células, causados por agentes químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009; TURKOGLU, 2007).

4 Considerações finais

A etapa de planejamento e organização de um programa de monitoramento deve ser construída segundo o estudo aqui apresentado, realizado de maneira integrada e baseada por uma discussão prévia com os atores sociais presentes no ambiente em questão, os quais são os mais afetados por perdas da qualidade ambiental.

As escolhas do ambiente, dos pontos de coleta e da metodologia aplicada foram diretamente influenciadas pelas discussões abordadas. A padronização do ensaio de genotoxicidade com *Allium cepa* foi proposta como forma de atender às demandas para se avaliar o risco ecológico e produzir um arcabouço de informações ecotoxicológicas antes do início do processo de transposição de efluentes da Laguna de Araruama para a bacia do Rio Una. Ao final deste trabalho, aliado a outras análises, como as físico-químicas, microbiológicas e de modelagem matemática, espera-se caracterizar de forma mais adequada a qualidade da água do Rio Una e produzir dados que servirão como subsídio técnico para tomadas de decisões em prol da recuperação e manejo da bacia desse rio.

Referências

BIANCHI, J. Análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do inseticida Malation, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e células de mamíferos. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2008.

BIDEGAIN, P.; PEREIRA, L. F. Plano de Bacia Hidrográfica da Região dos Lagos e do Rio São João, Tomo I, II e III. Rio de Janeiro. Comitê de Bacia Lagos São João Consórcio Intermunicipal Lagos São João, 2005.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 205–213, 1 jan. 2011.

COSTA, M. H. P.; SILVA, P. C. C.; ROCHA; C. A. M. Efeitos do cromo hexavalente sobre o crescimento de raízes e ciclo celular no meristema da ponta da raiz de *Allium cepa*. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 6(3), 40-44, 2016.

COSTA, C. R. *et al* . A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DÜSMAN, E. *et al*. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the

- Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. Environmental monitoring and assessment, v. 186, n. 3, p. 1793-1800, 2014.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.
- FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, Toxicology. 411-416, 2002.
- FERETTI, D. *et al.* *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. Food Additives and Contaminants, v. 24, n. 6, p. 561-572, 2007.
- FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 25, n. 1, p. 272-280, 2006.
- GEOPORT, DIVISÃO DE GEOPROCESSAMENTO E ESTUDOS AMBIENTAIS. Projeto Estudo de Alternativas para o Lançamento dos Efluentes das Estações de Tratamento de Esgoto dos Municípios de Araruama, Armação dos Búzios, Cabo Frio, Iguaba Grande e São Pedro da Aldeia. Consórcio Intermunicipal Lagos São João, 2005.
- GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 201, 2002.
- HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009.
- ISLAM, M. T. *et al.* Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. Chemosphere, v. 177, p. 93-101, 2017.
- KAYHAN, H. *et al.* Investigation of Potential Genotoxic Effects of Magnetic Field Used in Imaging. Meandros Medical and Dental Journal, v. 20, n. 1, p. 57, 2019.
- KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium cepa* root chromosomal aberration assay: a review. Indian J. Pharm, v. 1, n. 3, 2013.
- KJERFVE, B.; SCHETTINI, C. A. F.; KNOPPERS, B.; LESSA, G.; FERREIRA, H. O. (1996). Hydrology and salt balance in a large, hypersaline coastal lagoon: Lagoa de Araruama, Brazil. *Estuarine, coastal and shelf science*, 42(6), 701-725.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 650(1), 80-86, 2008.
- LEME, D. M., & MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 682(1), 71-81, 2009.
- LIMA-GREEN, Aristides Pereira. Análise político-institucional da gestão das águas na bacia Lagos São João, RJ. 2008.

- MAGALHÃES, D. D. P.; FERRÃO FILHO, A. D. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p. 355-381, 2008.
- MAGRO, C. D.; DEON, M. C.; THOMÉ, A.; PACCIN, J. S.; COLLA, L. M. Bioissorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. *Química Nova*, v. 36, n. 8, p. 1139-1145, 2013.
- MASOOD, F.; MALIK, A. Cytotoxic and genotoxic potential of tannery waste contaminated soils. *Science of the total environment*, 444, 153-160, 2013.
- MELO, E. S. O. Gênese da urbanização turística em Cabo Frio (1950-1978). In: ENCONTRO NACIONAL DA ANPUR, 14., 2011, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro, p. 20, 2011.
- MOHAMMED, K. P. *et al.* Forskolín: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 777, p. 29-32, 2015.
- MOREIRA-TURCQ, P. F. Impact of a low salinity year on the metabolism of a hypersaline coastal lagoon (Brazil). *Hydrobiologia*, v. 429, p. 133-140, 2000.
- PRIETO, Z. *et al.* Efecto Genotóxico del Dicromato de Potasio EnEritrocitos de sangre periférica de *Oreochromis Niloticus* (Tilapia). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, v. 25, n. 1, p. 51-58, 2008.
- ROCHA, C. A. M. *et al.* Detection of micronuclei and other nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* exposed to potassium dichromate. *Global Veterinaria*, v. 7, n. 3, p. 301-304, 2011.
- RODRIGUES, S. C. M. *et al.* Os recursos naturais no processo de desenvolvimento econômico capitalista. *Semioses*, 13(4), 50-68, 2019.
- TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. As múltiplas dimensões da crise hídrica. *Revista USP*, n. 106, p. 21-30, 2015.
- TURKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626: 4-14, 2007.
- VON SPERLING, M. Modelagem da qualidade das águas da bacia do rio una após reversão dos efluentes tratados de Iguaba Grande, São Pedro da Aldeia e Cabo Frio. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG. 2008.
- ZAGATTO, P. A. *et al.* Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2008.
- ZOU, J. H. *et al.* Effects of hexavalent chromium (VI) on root growth and cell division in root tip cells of *Amaranthus viridis* L. *Pakistan Journal of Botany*, 38(3), 673, 2006.