



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

AGNES BARBÉRIO

**“EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS NO MERISTEMA RADICULAR  
DE *ALLIUM CEPA* EXPOSTA À ÁGUA DO RIO PARAÍBA DO SUL – ESTADO  
DE SÃO PAULO – REGIÕES DE TREMEMBÉ E APARECIDA”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Agnes Barbério</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Doutor em Biologia Celular e Estrutural,  
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

<b>B233e</b>	<p>Barbério, Agnes</p> <p>Efeitos citotóxicos e genotóxicos no meristema radicular de <i>Allium cepa</i> exposta à água do rio Paraíba do Sul - estado de São Paulo – regiões de Tremembé e Aparecida / Agnes Barbério. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Paraíba do Sul, Rio. 2. Genotoxicidade. 3. Citotoxicidade. 4. <i>Allium cepa</i>. I. Mello, Maria Luiza Silveira, 1943-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">(pbg/ib)</p>
--------------	---

**Título em inglês:** Citotoxic and genotoxic effects in the root meristem of *Allium cepa* exposed to the water of the Paraíba do Sul river- São Paulo state - regions of Tremembé and Aparecida.

**Palavras-chave em inglês:** Paraíba do Sul river; Genotoxicity; Cytotoxicity; *Allium cepa*.

**Área de concentração:** Biologia Celular.

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

**Banca examinadora:** Maria Luiza Silveira Mello, Maria Aparecida Marin Morales, Dejanira de Franceschi de Angelis, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, João Ernesto de Carvalho.

**Data da defesa:** 30/01/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 30 de janeiro de 2009

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

  
Assinatura

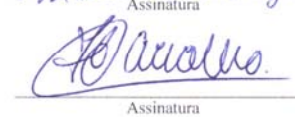
Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales

  
Assinatura

Profa. Dra. Dejanira de Franceschi de Angelis

  
Assinatura

Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

  
Assinatura

Profa. Dra. Eliana Regina Forni Martins

  
Assinatura

Profa. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

  
Assinatura

Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

  
Assinatura

A Deus, por me abençoar de forma tão única e me conceder oportunidades para as minhas conquistas e perseverança necessária para enfrentar os momentos mais difíceis.

À minha amiga Layra, sem a qual esta conquista tão importante na minha vida profissional teria sido muito mais árdua.

Aos meus pais, Augusto Barbério (*in memoriam*) pelos ensinamentos do quanto à vida é uma escola e Maria José Ferreira Barbério pelas orações, que sempre me fortaleceram.

Às minhas queridas filhas, Bárbara e Rebeca. Amo vocês.

Aos meus orientados que me impulsionaram a atingir esta meta.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Maria Luiza S. Mello, pela orientação ímpar, por ser exemplo de pesquisadora hábil, segura, sensata, competente. Agradeço também pela confiança depositada no meu trabalho.

À amiga sempre presente e atenta, Layra de Barros Silva, que teve uma participação efetiva em todos os momentos e muito me auxiliou em mais essa conquista.

A Profa. Alindacir Grassi pela amizade e auxílio na formatação final da tese.

À UNITAU, pela bolsa de estudos concedida pela Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação e pelos recursos cedidos para a realização do projeto.

A Roberto Schmidt, engenheiro da CETESB, pelas informações, pelos materiais disponibilizados e pela prontidão em me auxiliar.

Ao engenheiro Demétrio, pela prontidão constante.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas.

À Liliam Alves Senne Pannagio, secretária da Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural da Unicamp, por todo apoio e amizade dado ao longo do meu doutorado.

Aos Profs. Drs. Maria Aparecida Marin-Morales, Gisela de Aragão Umbuzeiro e João Ernesto de Carvalho, pela valiosa contribuição durante a pré-banca deste trabalho.

Ao técnico Mário Bianchi, pela introdução técnica à metodologia utilizada neste trabalho.

Aos colegas do laboratório, Antonella, Alberto, Flávia e Marcela, pelo companheirismo e sugestões. E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>SIGLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>01</b>
1.1 - A poluição .....	01
1.2 - O monitoramento exercido pela CETESB .....	04
1.3 - O Teste <i>Allium</i> e o biomonitoramento da poluição ambiental .....	05
1.4 - Vale do Paraíba - Rio Paraíba do Sul .....	10
1.5 - Aparecida e Tremembé .....	11
<b>2 – JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>3 – OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>5 – RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
5.1 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO .....	21
5.2 - MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO .....	44
5.3 - MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO .....	71
<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>7 – ANEXOS .....</b>	<b>85</b>

## SIGLAS

AC/CA - anomalias cromossômicas

ANOVA - análise de variância

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

CTRL - controle

CV - coeficiente de variação

DBO - demanda bioquímica de oxigênio

DNA - ácido desoxirribonucleico

DQO - demanda química de oxigênio

EDTA - ácido etileno diaminotetracético

EP - erro padrão

HCl - ácido clorídrico

IAP - índice de qualidade das águas para fins de abastecimento

INMET - Instituto de Meteorologia

IPCS - Programa Internacional de Segurança Química

IPPB - Programa Internacional de Bioensaios com Plantas

IVA - índice de vida aquática

MA - anomalias mitóticas

MI - índice mitótico

MMS - metilmetanosulfonato

MN - micronúcleo

NI - não informado

PARB - ponto de amostragem do rio Paraíba

SABESP - Saneamento Básico do Estado de São Paulo

SH - grupo sulfidrila

UNEP - Programa Ambiental das Nações Unidas

UNITAU - Universidade de Taubaté

USEPA - Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

WHO - Organização Mundial de Saúde



## RESUMO

Uma das principais fontes de poluição dos ecossistemas de água doce se refere aos resíduos de efluentes industriais e urbanos. Os esgotos não tratados e excrementos humanos são considerados causa importante na deterioração da qualidade da água de países em desenvolvimento. Os poluentes ambientais têm causado uma diminuição da qualidade da água, induzindo efeitos deletérios nos organismos que estão em contato direto ou indireto com os mesmos. O efeito da exposição dos organismos a qualquer substância potencialmente tóxica, depende de sua concentração e do tempo de exposição. Um dos efeitos, freqüentemente observado pelos agentes ambientais é a alteração química do DNA. Tais modificações são prejudiciais às células, uma vez que podem afetar processos vitais, como a duplicação e a transcrição do DNA, a regulação gênica e a divisão celular, e levar ao desenvolvimento de processos patogênicos e/ou à morte celular. Nesse contexto, testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental, como também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes. O rio Paraíba do Sul é um dos integrantes da bacia do rio Paraíba do Sul, de importância para a região sudeste do Brasil, pois serve ao abastecimento urbano, à irrigação, à geração de energia, e à assimilação de despejos urbanos, industriais e agrícolas nessa região. No presente trabalho foram pesquisados efeitos citotóxicos e genotóxicos em raízes de *Allium cepa* expostas a amostras de água do rio Paraíba do Sul, coletadas em agosto de 2005, 2006 e 2007, em pontos localizados nas cidades de Tremembé e Aparecida (SP). Foram utilizados para investigação parâmetros anátomo-morfológicos (crescimento das raízes), índices mitóticos (IM), índices de fases da divisão celular (IF), freqüência de micronúcleos (MN) e anomalias cromossômicas (AC). O comprimento das raízes de cada bulbo foi acompanhado, diariamente, ao longo de 24 a 120 h. Somente as raízes tratadas

com amostras de água coletadas em 2005, na cidade de Tremembé, apresentaram um decréscimo em taxa de crescimento. Entretanto, nesse mesmo ano, houve redução no IM das raízes tratadas com água coletada em Tremembé e Aparecida. Considerando-se os dados de crescimento de raiz e especialmente os valores de IM, admite-se que em 2005 a água do rio Paraíba do Sul nas regiões de Tremembé e Aparecida tenha tido potencial citotóxico. Por outro lado, ainda nesse mesmo ano, a frequência de MN não se mostrou alterada, o que indica que a água do rio, nos pontos mencionados, não apresentaria potencial genotóxico. Em 2007 não houve diferença no crescimento das raízes assim como os valores de IM nas raízes tratadas com água de ambos os pontos de coleta não diferiram dos valores do controle negativo. As frequências das fases da mitose (IF) diferiram de modo significativo dos respectivos controles; as frequências de prófase e anáfase das raízes tratadas com as águas coletadas em Tremembé e em Aparecida foram maiores e a frequência de telófases menor do que as dos controles negativos. As frequências de metáfase foram maiores para as raízes tratadas por água coletada em Aparecida. Foram constatados aumentos significativos de MN e de AC em raízes tratadas com água das duas regiões de coleta. A frequência de c-mitose foi significativamente maior após tratamento com a água proveniente de Tremembé, enquanto a frequência de pontes cromossômicas foi maior para as raízes tratadas por água coletada em Aparecida. Considerando-se a frequência de MN, AC e IF, admite-se efeito citotóxico e genotóxico para *A. cepa* tratada com as amostras de água do rio Paraíba do Sul das regiões de Tremembé e Aparecida, no ano de 2007. O teste *Allium* mostrou ser uma ferramenta sensível na detecção de citotoxicidade e genotoxicidade promovidas pela água do rio Paraíba do Sul nos pontos nomeados.

## ABSTRACT

One of the main sources of pollution of fresh water ecosystems refers to the discharge of industrial and urban wastes. Untreated sewage is considered an important cause to the deterioration of water quality in developing countries. Environmental pollutants have caused a decrease in water quality, inducing harmful effects in organisms which are in direct or indirect contact with them. The effect of exposure of organisms to any potentially toxic substance depends on its concentration as well as exposure time. One of the effects frequently observed by environmental agents is the chemical alteration of the DNA affecting vital processes, like DNA duplication and transcription, gene regulation and cell division, and leading cells to pathologic processes and/or cell death. In this context, toxicity and genotoxicity biological tests are mandatory for the evaluation of reactions of living organisms to environmental pollution, as well as for the identification of potential synergetic effects of several pollutants. The Paraíba do Sul river is one of the components of the Paraíba do Sul basin, of importance to the southeast region of Brazil, as it serves for urban supply, irrigation, generation of energy, and assimilation of urban, industrial and agricultural discharges in the mentioned region. This work aimed at researching cytotoxic and genotoxic effects in *Allium cepa* roots exposed to water samples collected from the Paraíba do Sul river in August 2005, 2006 and 2007, at sites located in the cities of Tremembé and Aparecida. Anatomico-morphologic parameters (root growth), mitotic indices (MI), cell division phase indices (PI), frequency of micronuclei (MN) and chromosome anomalies (CA) were investigated. Root lengths from each bulb were evaluated daily along 24 to 120 h. Only in the roots treated with the water samples collected at Tremembé in 2005, a decrease in root growth rate was found. However, in the same year, there was reduction in the MI of the roots treated with water collected at Tremembé and Aparecida. Considering the root growth data and especially the

MI values, it is assumed that the water of the Paraíba do Sul river in the regions of Tremembé and Aparecida had a cytotoxic potential in 2005. On the other hand, still in the same year, no change in MN frequency was detected, which indicates that the water at the mentioned river points had probably no genotoxic potential. In 2007, there was no difference in root growth, as the MI values for roots treated with the water collected at both sites did not differ from the values of the negative control. The frequencies of the mitosis phases differed significantly from the respective controls; the frequencies of prophases and anaphases for roots treated with water collected at Tremembé and Aparecida were higher and the frequency of telophases were lower than those of the negative controls. Frequencies of metaphases were higher for roots treated with water collected in Aparecida. A significant increase in MN and CA was found for the roots treated with water collected from both sites. The frequency of c-mitosis significantly increased after treatment with the river water collected at Tremembé, whereas the frequency of chromosome bridges increased for roots treated with water collected at Aparecida. By considering the frequencies of MN, CA and PI, a cytotoxic and genotoxic effect is supposed for *A. cepa* treated with the water collected from the river Paraíba do Sul at sites of Tremembé and Aparecida, in 2007. The *Allium* test has proved to be a sensitive tool for detecting cytotoxicity and genotoxicity effects promoted by the Paraíba do Sul water in the mentioned sites.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 - A poluição**

A poluição dos ecossistemas aquáticos de água doce ocorre pelo despejo de efluentes industriais e esgotos domésticos não adequadamente tratados nesses ambientes, sendo esses elementos causa importante da deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento. A qualidade da água é um importante fator de risco na indução de câncer e seu risco potencial tem sido estimado em áreas com abastecimento de água contaminada por compostos mutagênicos e carcinogênicos (Chernozemski & Shishkov, 2001; Egito et al., 2007). Além disso, os poluentes químicos ambientais têm prejudicado a qualidade da água e dos sedimentos dos rios, induzindo efeitos deletérios nos organismos que estão em contato direto ou indireto como os mesmos (Pantaleao & Spanó, 2003). Mecheva et al. (1987) relataram redução no número de populações e restrição na distribuição de espécies da fauna de uma região no sudeste da Bulgária, como efeito de poluição das águas superficiais de rios da região, contaminados com metais pesados de diversas origens, como atividade industrial de extração de minério de cobre.

Diante disso, há um crescente interesse acerca da citotoxicidade e genotoxicidade de misturas ambientais como água natural (pura), água tratada (para abastecimento) e água contaminada, principalmente devido aos riscos de danos genéticos e câncer em organismos aquáticos e humanos (Rank & Nielsen, 1993).

Devido ao crescimento demográfico exponencial e às atividades antropogênicas não conscientizadas, é comum se encontrar nos rios e lagos uma imensa quantidade de substâncias tóxicas. Estas não são facilmente definidas, uma vez que o efeito da exposição a qualquer substância potencialmente tóxica depende de sua concentração e do tempo de exposição à mesma (Hellawell, 1988).

Dentre as diversas substâncias tóxicas às células, encontram-se alguns metais (Dash et al., 1988; Fiskesjö, 1988; Sala et al., 1995; Peralta-Videa et al., 2002; Evseeva et al., 2003; Leonard et al., 2004; Staykova et al., 2005; Matsumoto et al., 2006), inseticidas e herbicidas (El-Khodary et al., 1990; Ateeq et al., 2002; Bolle et al., 2004; Marcano et al., 2004; Fernandes et al., 2007), e aditivos alimentares (Evandri et al., 2000; Rencüzoğullari & Topaktaş, 2001; Türkoğlu, 2008). A cloração tem sido amplamente utilizada como um método simples, efetivo e econômico no tratamento da água para o consumo humano, mas produtos genotóxicos são formados pela interação entre o cloro e os compostos orgânicos, como os trihalometanos, halonitrometano, bromoclorometano, haloamida, aldeídos, etc (Komulainen, 2004; Richardson et al., 2007).

Existem muitos trabalhos referentes à nocividade de alguns metais aos seres vivos, principalmente quanto a seus efeitos cancerígenos (Sala et al., 1995; Leonard et al., 2004). A conhecida toxicidade dos metais pesados para os seres humanos deve-se à sua alta capacidade de reagir com ligantes difusores, com macromoléculas e com ligantes presentes nas membranas biológicas. Essas características lhes conferem propriedades de bioacumulação, biomagnificação (na cadeia alimentar), permanência no ambiente e distorção nos processos metabólicos dos seres vivos, que se encarregam de transformar concentrações normais em tóxicas, para diferentes espécies da biota e para o homem. A principal fonte artificial da introdução dos metais pesados no ambiente aquático é a poluição dos corpos d'água por descarga direta de vários efluentes, tratados ou não, provenientes de atividade agrícola, doméstica e industrial (Forstner & Wittmann, 1981). Segundo Ramalho et al. (1999), Matsumoto e Marin-Morales (2004) e Matsumoto et al. (2006), metais tóxicos originados de metalúrgicas, indústrias de aço, de curtumes e de fertilizantes, liberados por indústrias de plástico e alimento, assim como esgoto urbano, com poucas exceções, são despejados na água do rio. Outros resíduos, como agrotóxicos e mercúrio de garimpo, também são frequentemente lançados no meio ambiente e nos rios (Lacerda et al., 1993).

A preocupação de que os agentes químicos introduzidos no ambiente levem a possíveis alterações genéticas nos organismos, foi um dos principais motivos que ocasionou o desenvolvimento de métodos que avaliam a genotoxicidade por substâncias químicas (Brusick, 1987). Um estudo colaborativo internacional sobre o uso de bioensaios com plantas para biomonitoramento de genotoxicidade de poluentes ambientais foi iniciado e organizado por órgãos mundiais como o Programa Internacional de Segurança Química (IPCS), o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e a Organização Mundial de Saúde (WHO). Desde então, a tarefa do Programa Internacional de Bioensaios com Plantas (IPPB) foi colocar em prática a aplicabilidade dos bioensaios: teste de micronúcleo e anomalias cromossômicas e/ou mitóticas em *Allium/Vicia*; teste de micronúcleo e mutações em pêlos estaminais de *Tradescantia*. Assim, muitos laboratórios em diferentes cidades espalhadas pelo mundo vem utilizando estes bioensaios para analisar a genotoxicidade no ar, na água e no solo.

O estado de São Paulo é a área mais desenvolvida do Brasil, com elevado nível de industrialização, urbanização em expansão e altas taxas de crescimento demográfico. Consequentemente, há uma tendência ao agravamento de algumas situações, no que se refere à deficiência em vários aspectos, como infra-estrutura (dificuldades para acomodar uma população que cresce anualmente), saneamento básico, escassez de recursos hídricos frente à demanda, e comprometimento da qualidade dos mesmos, decorrente, principalmente, do lançamento direto dos esgotos urbanos e industriais, não tratados ou não adequadamente tratados, em rios, lagos e represas, entre outros (Wirz, 2002). As principais fontes de poluição dos recursos hídricos no estado de São Paulo são os lançamentos de efluentes líquidos domésticos e industriais, assim como a carga difusa de origem urbana e agrícola (CETESB, 2007).

Há, portanto, preocupação de que seus corpos d'água sejam monitorados para conhecimento de possível ação de poluentes que afetassem a qualidade de sua água, e para tomada de providências por entidades competentes que combatam ou evitem tais danos.

## **1.2 - O monitoramento exercido pela CETESB**

A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) realiza monitoramento dos corpos d'água paulistas, tendo procurado contribuir para com as ações de controle de poluição e recuperação da qualidade das águas dos rios e reservatórios paulistas desenvolvidas pelos órgãos municipais, estaduais e federais. Nestes monitoramentos, a CETESB faz uso de 50 variáveis de qualidade de água (físicas, químicas, hidrobiológicas, microbiológicas e ecotoxicológicas), sendo as mais representativas:

- variáveis físicas: são as associadas com as propriedades físicas da água como absorvância no ultravioleta, coloração, série de resíduos (dissolvido, total e volátil), temperatura da água e do ar, turgidez e transparência.
- variáveis químicas: alumínio, bário, cádmio, carbono orgânico dissolvido, chumbo, cloreto, cobre, condutividade específica, cromo, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), fenóis, ferro, fluoreto, fósforo total, manganês, mercúrio, níquel, óleos e graxas, ortofosfato solúvel, oxigênio dissolvido, pH, potássio, potencial de formação de trihalometanos, série de nitrogênio (Kjeldahl, amoniacal, nitrato e nitrito), sódio, sulfato, surfactantes e zinco.
- variáveis microbiológicas: coliformes termotolerantes.
- variáveis hidrobiológicas: clorofila a, fitoplâncton e zooplâncton.



- variáveis toxicológicas: microcistinas, ensaio de toxicidade aguda com a bactéria luminescente – *V. fischeri* (Sistema microtox); ensaio de toxicidade crônica com o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e ensaio de mutação reversa (teste de AMES).

Nos últimos 20 anos, 1007 amostras de água superficial da água foram analisadas pelo teste de AMES na CETESB, sendo que 137 (14%) destas mostraram atividade mutagênica. O motivo desta contaminação foi, via de regra, o despejo de efluentes industriais (Umbuzeiro et al., 2001; Oliveira et al., 2006). Outros ensaios ecotoxicológicos, como os realizados com *Ceriodaphnia dubia*, mostraram, segundo relatório da CETESB de 2007, toxicidade crônica em 21 % das amostras coletadas no rio Paraíba do Sul.

### **1.3 - O Teste *Allium* e o biomonitoramento da poluição ambiental**

Vários bioensaios podem ser empregados para monitorar a saúde ambiental em ecossistemas aquáticos. A ação de poluentes indutores de fragmentação de DNA, inibição da divisão celular, paralisação do ciclo celular em metáfase, aberrações cromossômicas numéricas e estruturais, trocas de cromátides irmãs pode ser detectada citologicamente (Matsumoto & Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al., 2006).

Ensaio que envolvem a detecção de micronúcleos em preparados celulares têm se mostrado muito eficientes para monitoramento de genotoxicidade, inclusive em corpos d'água doce (Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Minissi et al., 1996). O micronúcleo é formado por material genético que não migrou para os pólos da célula, durante a anáfase mitótica, mas que apresenta envoltório nuclear independente do envoltório nuclear do núcleo principal (Grover & Kaur, 1999). Segundo Chandra et al. (2005), a indução de micronúcleos, normalmente resulta de quebras/fragmentos de cromossomos ou comprometimento do fuso, levando à disjunção anômala de cromossomos no estágio de anáfase. De acordo com Dash et al. (1988), os micronúcleos que se

originam por quebras cromossômicas, são decorrentes de uma resposta clastogênica. Desta forma, agentes químicos podem induzir micronúcleos por meio de distúrbios do fuso (efeitos aneugênicos), ou por quebras cromossômicas.

Bioensaios com plantas são sensíveis à detecção da genotoxicidade a agentes industriais e podem servir como um primeiro alerta para detectar a presença de perigo ambiental na água, ar e solo. Três bioensaios em plantas, incluindo-se análise de micronúcleos e anomalias cromossômicas em raízes de *Allium cepa* e *Vicia sp.* e pesquisa de mutação em pêlos e frequência de micronúcleos em *Tradescantia sp.*, têm sido também realizados e indicados pelo *International Programme Chemical Safety* (IPCS), desde 1996 em Qingdão, na China (Gopalan, 1999; Ma, 1999).

Desde 1970, a pesquisa de mutações e anomalias cromossômicas em plantas superiores passou a ser utilizada em estudos de monitoramento ambiental, em vários institutos, centros e programas internacionais de pesquisa (Grant, 1999). Por outro lado, Grover & Kaur (1999) observaram concordância de 91% entre efeito genotóxico de pesticidas em plantas e em mamíferos, quando analisaram anomalias cromossômicas e indução de micronúcleos.

Dentre as plantas superiores utilizadas como organismos-teste para a detecção de substâncias genotóxicas no ambiente estão: *Tradescantia*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Zea mays*, e *Allium cepa* (USEPA, 1980). A utilização de *A. cepa* como organismo teste foi originalmente introduzida por Levan, em 1938 (Fiskesjö, 1985; Rank & Nielsen, 1993), prestando-se, desde então, para avaliar e classificar a toxicidade de substâncias químicas presentes no meio ambiente (Rigonato & Jordão, 2002; Marcano et al., 2004; Chandra et al., 2005; Staykova et al., 2005; Egito et al., 2007; Fernandes et al., 2007; Leme et al., 2008; Leme & Marin-Morales, 2008; Caritá & Marin-Morales, 2008; Türkoğlu, 2008). Dentre os vegetais superiores, *A. cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo em teste de genotoxicidade, devido à sua cinética de proliferação celular, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, alta

tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, fácil manuseio e por possuir número reduzido de cromossomos ( $2n = 16$ ) de grande tamanho (Fiskesjö, 1985; Ma et al., 1995).

Os testes de biomonitoramento, usando-se *A. cepa*, por se realizarem num sistema eucarioto, podem conferir um maior grau de proximidade a espécies da biota exposta a substâncias tóxicas (Fiskesjö, 1988; Rigonato & Jordão, 2002). Embora um grande número de sistemas desenvolvidos para monitorar poluentes genotóxicos possa ser utilizado, é difícil monitorar baixos níveis desses poluentes e fazer um prognóstico ambientalmente realista, ao nível do ecossistema. Nestes casos, o uso de *A. cepa* tem sido indicado, devido à sua grande sensibilidade (Moraes et al., 2002). Tem também a vantagem de poder ser usado sem que se proceda qualquer condensação, purificação ou esterilização da água poluída testada, permitindo assim uma análise da amostra total (Fiskesjö, 1985; Rank & Nielsen, 1994; Rigonato & Jordão, 2002). O bioensaio utilizando o teste *Allium*, assim como aqueles que utilizam células V7 de hamster chinês, crustáceos, *Daphnia magna*, peixes, algas, protozoários e bactérias, entre outros, apresentam limitações e sensibilidades diferentes frente a mutágenos distintos, por isso, a associação de vários bioensaios pode levar a um conjunto de resultados mais confiáveis. Portanto, a extrapolação dos resultados de um sistema teste para outros (e eventualmente para humanos) deve, ser baseado em uma bateria de testes e com a devida consideração às vias metabólicas dos compostos testados.

Uma revisão de literatura feita por Grant (1982) mostra que 148 substâncias químicas apresentavam potencial clastogênico, quando testadas por meio do teste *Allium*. Destas substâncias, 76% tinham comportamento positivo para indução de aberrações cromossômicas. O autor sugeriu, então, a introdução do teste com *Allium* entre os testes rotineiramente usados para detecção de danos cromossômicos induzidos por substâncias químicas. Considerando-se apenas as análises de aberrações em células anafásicas e telofásicas, o teste de *A. cepa* é o mais simples e

consideravelmente o mais confiável dentre os métodos de investigação (Fernandes et al., 2007). Este teste é adequado para a análise de parâmetros microscópicos, como aderências cromossômicas, pontes, fragmentação e perdas cromossômicas, c-mitoses e micronúcleos, que podem espelhar até alterações ao nível genético celular (Rank & Nielsen, 1993).

Segundo Rank & Nielsen (1993), a exposição de raízes de *A. cepa* por 24 horas a poluentes induz um alto número de aberrações cromossômicas e um número ligeiramente maior de micronúcleos, em comparação com 4 h de exposição. Os autores afirmam que a sensibilidade do teste de mutagenicidade com *A. cepa* seria 82% superior aos resultados obtidos em roedores.

O biomonitoramento da água do Lago do Parque Ecológico Hermógenes de Freitas Leitão Filho, em Campinas (SP), vem sendo realizado desde 1998, por meio do teste de micronúcleo em *A. cepa* e em eritrócitos de tilápia do Nilo, já tendo sido detectados níveis caracterizados como episódicos para esse corpo d'água (Mello et al., 2004; Augusto & Mello, 2008). Biomonitoramento de rios que recebem efluentes industriais também utilizando *A. cepa* como organismo teste foi realizado para a região de Franca (SP), tendo sido encontradas células interfásicas alteradas, células c-metáfásicas, com aderência cromossômica e com quebras cromossômicas, e células com multipolaridade, atrasos, pontes e quebras cromossômicas, na anáfase (Matsumoto & Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al., 2006).

Ventura et al. (2002) analisaram a citotoxicidade e a genotoxicidade pelo herbicida atrazina utilizando o mesmo teste, relatando uma inibição nos índices mitóticos para as várias concentrações testadas da droga. Não houve uma fase específica da mitose que tivesse sido preferencialmente atingida pela ação deste herbicida, supondo-se que os seus componentes químicos tiveram como alvo da ação tóxica, vários eventos da mitose, o que levaria a uma relação de compensação entre as fases mais ou menos atingidas.

Outros herbicidas foram também estudados, quanto à sua ação em *A. cepa*, seja modificando o índice mitótico, seja na indução de aberrações cromossômicas (Marcano et al., 2004) ou de micronúcleos (Fernandes et al., 2007).

Nos meristemas radiculares de *A. cepa* tratada com água do Ribeirão Claro, do município de Rio Claro (SP), foram também encontradas c-metáfases e anáfases com pontes cromossômicas (Hoshina et al., 2002).

Populações diretamente expostas a agressores ambientais podem ser avaliadas, quanto aos efeitos genotóxicos por meio da análise da frequência de micronúcleos como um biomarcador. Kovalchuk et al. (1998), buscando analisar as consequências genéticas da poluição radioativa, derivada do acidente atômico ocorrido em 4 de abril de 1986, em Chernobyl, realizaram estudos com *A. cepa*, tendo encontrado um alto índice de mitoses aberrantes, bem como inibição na taxa de germinação e diminuição do índice mitótico, dado o aumento dos níveis de contaminação radioativa no solo.

Concentrações elevadas de cobre também inibem o índice mitótico de *A. cepa* e causam alterações interfásicas, como a presença anormal de material cromossômico condensado dentro de aglomerados de heterocromatina (Fiskesjö, 1988). Cromo residual, advindo de efluentes de curtume induz efeito mutagênico nas células meristemáticas radiculares de *A. cepa*, constatado pela alta frequência de anomalias cromossômicas, células com aderência entre cromossomos, micronúcleos, células multinucleadas, quebras cromossômicas e cromatídicas, pontes intracromossômicas e fragmentos cromossômicos (Matsumoto & Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al., 2006). A ação tóxica ou genotóxica do alumínio depende do pH e de outros íons presentes na solução. Entretanto, este metal na concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{M}$  promove o aparecimento de um fenômeno celular característico, em que muitas células em intérfase apresentam corpos

hialinos oblongos formados por material expulso do núcleo; em geral, estes se dividem posteriormente em dois corpos oblongos localizados lateralmente ao núcleo (Fiskesjö, 1988).

#### **1.4 - Vale do Paraíba - Rio Paraíba do Sul**

A região do Vale do Paraíba, localizada entre dois centros produtores e consumidores, São Paulo e Rio de Janeiro, é uma região em franco desenvolvimento urbano e industrial. A rodovia Presidente Dutra percorre as cidades situadas neste eixo, o que facilitou a instalação de várias indústrias nessa região com o decorrer do tempo (Alston, Basf, Votorantin-Celulose e Papel, Embraer, Johnson & Johnson, General Motors, Petrobrás, Ford, Rhodia, Volkswagen, L. G. Eletronics, FAÉ, entre muitas outras). Dentro deste contexto, há, conseqüentemente, uma preocupação no que tange à poluição ambiental nessa região (Amaral et al., 2007; Barbério et al. *in press*). Coelho (1995) demonstrou mutagenicidade com a utilização do teste AMES, em amostras de efluentes de indústrias de Química, Papel e Celulose, Refinaria de Petróleo e Automobilística, situadas entre as cidades de Jacareí e São José dos Campos. Amaral et al. (2007) detectaram citotoxicidade e genotoxicidade em *A. cepa* expostas à amostras de água da bacia do rio Tapanhon em Pindamonhangaba/SP.

A bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, composta, basicamente, por cinco rios e quatro reservatórios, apresenta uma área de drenagem da ordem de 14.444 km<sup>2</sup>; percorre 34 municípios distribuídos entre os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, os quais abrigam uma população de aproximadamente 1.975.465 habitantes. Entre o principal eixo econômico do país, esta região apresenta um crescente parque industrial onde se destacam as áreas de aeronáutica, automobilística, papel e celulose, química, mecânica, eletroeletrônica e extrativista, além de centros de pesquisa tecnológica; na agricultura predominam culturas destinadas à pecuária.

Verificam-se também extensas áreas com o cultivo de eucalipto, além da presença de culturas de arroz, feijão e milho (CETESB, 2007).

Surge, assim, a necessidade de que se investigue o potencial citotóxico e/ou genotóxico da água do rio Paraíba do Sul, especialmente em algumas regiões com concentração demográfica e de indústrias instaladas atravessadas pelo mesmo.

### **1.5 - Aparecida e Tremembé**

Aparecida possui uma população de 36.817 habitantes, predominantemente, urbana. Apresenta uma carga poluidora de origem doméstica de 1.960 Kg DBO (demanda bioquímica de oxigênio)/dia, lançada no rio Paraíba do Sul sem nenhum tratamento (CETESB, 2007). Tremembé apresenta uma população de 41.544 habitantes, sendo destes 36.672 de origem urbana e, assim como Aparecida, não apresenta nenhum tratamento de seus 1.980 Kg DBO/dia de carga orgânica despejados no rio Paraíba do Sul (CETESB, 2007).

As médias anuais do IAP (Índice de qualidade das águas para fins de abastecimento) do rio Paraíba do Sul enquadraram-se na categoria “Boa” em 2007, com exceção do trecho de Tremembé à Guaratinguetá, onde estão localizados os pontos PARB 02490 (Tremembé) e PARB 02600 (Aparecida), que apresentaram média anual na categoria “Regular”. Este trecho, além de estar à jusante das principais contribuições de carga orgânica, advindas dos municípios de Jacareí, São José dos Campos e Taubaté, recebe também os esgotos domésticos sem tratamento de Tremembé, Potim, Aparecida e Guaratinguetá.

Tendo em vista a preocupação com a formação de compostos organoclorados leves (como por exemplo, clorofórmio), durante o processo de cloração, e os chamados trihalometanos, torna-se necessária, a análise da água do rio Paraíba do Sul nas regiões mencionadas, uma vez que essa classe de compostos é sabidamente prejudicial à saúde humana, tanto que existe um padrão de

potabilidade para os trihalometanos estabelecido na Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde, com um limite de 100 µg/L (CETESB, 2007).

As médias anuais do índice de estado trófico do rio Paraíba do Sul têm variado de ultraoligotrófica a mesotrófica, considerados normais para corpos d'água enquadrados na categoria 2. Esse índice leva em consideração o fósforo total e a clorofila a (CETESB, 2007). A classe 2 engloba águas destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário; à irrigação de hortaliças, plantas frutíferas, parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; à aqüicultura e à atividade de pesca (CONAMA, 2005).

Água coletada nas regiões de Aparecida e de Tremembé deveria, pois, ser biomonitorada e o teste *Allium* poderia ser utilizado nessa avaliação.

A média do mês de agosto de 2007 para o índice de vida aquática (IVA) no ponto de monitoramento de Aparecida enquadrou-se na categoria ruim. O nível de oxigênio dissolvido, abaixo do limite considerado para a proteção da vida aquática, foi o que mais influenciou negativamente este resultado (CETESB, 2007).

## **2 - JUSTIFICATIVA**

Os recursos hídricos constituem-se em um componente essencial e indispensável a todos os ecossistemas, quer sejam eles terrestres ou aquáticos. A qualidade das fontes d'água está correlacionada às atividades humanas, uma vez que estas utilizam produtos químicos para alcançar objetivos sociais e econômicos e, com a falta de um manejo ecologicamente correto, há despejo dos resíduos humanos e industriais nesses ambientes (Barros et al., 2003). Muitas substâncias com potencial mutagênico podem ser encontradas nos alimentos, em drogas farmacêuticas, nos



defensivos agrícolas e nos complexos de efluentes domésticos e industriais, e algumas dessas substâncias podem causar mudanças prejudiciais herdáveis no material genético (Vogel, 1982).

Os organismos vivos estão, freqüentemente, expostos a agentes ambientais que podem induzir alterações químicas no DNA. As lesões nesta molécula podem ser induzidas por agentes químicos, provenientes do meio ambiente, ou resultantes de reações químicas que ocorrem nas próprias células, ou ainda por radiações (UV e raios-X). Alterações na estrutura do DNA geralmente são prejudiciais às células, uma vez que podem prejudicar processos vitais, tais como a sua funcionalidade e herança. Estes fenômenos podem levar ao desenvolvimento de processos patogênicos e morte celular (Costa & Menk, 2000).

Segundo Moraes et al. (2002), testes biológicos de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental, como também para a identificação dos efeitos sinérgicos potenciais de vários poluentes.

Entre os diferentes sistemas-teste rotineiramente empregados para estudo de mutagenicidade, o sistema de meristema radicular de *A. cepa* tem se mostrado eficiente e aceito para o estudo de alterações no ciclo celular e observação de micronúcleos (Marcano et al., 2004; Staykova et al., 2005; Egito et al., 2007; Türkoğlu, 2008). Uma avaliação dos riscos dos poluentes para o ambiente precisa ser baseada no uso simultâneo de testes que evidenciem genotoxicidade e toxicidade.

O rio Paraíba do Sul tem grande importância para o estado de São Paulo devido aos seus múltiplos usos, inclusive garantidos pelo seu enquadramento na categoria 2 nas regiões de Tremembé e Aparecida, de modo que, informações sobre a qualidade de sua água são relevantes. Desta forma, o emprego do teste *Allium* poderá prover informações complementares às análises físico-químicas, microbiológicas e toxicológicas, já realizadas no seu monitoramento e indicar a

necessidade de investigação sobre as potenciais fontes de poluição para que as mesmas sejam controladas.

### 3 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo investigar a ação de efeitos potencialmente poluidores na água do rio Paraíba do Sul, utilizando-se o teste de *Allium cepa* e visando:

- Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade de amostras de água coletadas do rio nas cidades de Tremembé e Aparecida, nos anos de 2005, 2006 e 2007.
- Testar a sensibilidade do teste de *Allium cepa* no sentido de sua contribuição para com o biomonitoramento desse importante rio que abastece a região do Vale do Paraíba;
- Estabelecer uma proposta de padronização do tamanho amostral, necessária para a realização do teste de *Allium cepa* com confiabilidade e precisão.

### 4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 343, n. 2-3, p. 121-135, june. 1995.

AMARAL, A. M. et al. 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*, Brazil, vol. 20, n.1-2, p. 65-71, 2007.

ATEEQ, B. et al. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 514, n. 1-2, p. 105-113, february. 2002.

AUGUSTO, M. M.; MELLO, M. L. S. Biomonitoramento da água do Lago Hermógenes Freitas Leitão Filho (Campinas, SP) por detecção de micronúcleos em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*. In: Reunião Anual da SBPC, 60, 2008, Campinas. Anais eletrônicos. São Paulo: SBPC/Unicamp, 2008. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/60ra>. Acesso em: 25 jul 2008.

BARBÉRIO, A. et al. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the Brazilian river Paraíba do Sul with the *Allium cepa* test. **Brazilian Journal of Biology**, Brazil, vol. 69 (*in press*).

BARROS, L. B. et al. Avaliação do potencial genotóxico da represa de captação de água de Ponta Grossa-PR. *In*: Resumos do 49º Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo. 2003. CD-ROM.

BOLLE, P. et al. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, United States, vol. 43, n. 2, p. 137-141, february. 2004.

BRUSICK, D. **Principles of Genetic Toxicology**. 2 ed. United States: Plenum Publishing Corporation, 1987. 432 p.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, England, vol. 72, n. 5, p. 722-725, june. 2008.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. **Relatório**. São Paulo, 2007, 521p.

CHANDRA, S. et al. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. **The Science of the Total Environment**, Netherlands, vol. 347, n. 1-3, p. 46-52, july. 2005.

CHERNOZEMSKI, I.; SHISHKOV, T. Oncology, SIELA-SOFT. Sofia. p. 15-21, 2001.

COELHO, M. C. L. S. **Mutagenicidade de quatro efluentes líquidos industriais lançados no rio Paraíba do Sul, avaliada através do teste de AMES**. 1995. Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade de São Paulo, São Paulo.

CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). *In*. Resolução 357, Brasília (BR), pp. 23, 2005.

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

DASH, S.; PANDA, K. K.; PANDA, B. B. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 203, n. 1, p. 11-21, february. 1988.

EGITO, L. C. M. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbú river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, vol. 30, n. 2, p. 435-441, march. 2007.

EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. Effects of the herbicide tribunal on root mitosis of *Allium cepa*. **Cytologia**, Japan, vol. 55, n. 2, p. 209-215, june. 1990.

EVANDRI, M. G.; TUCCI, P.; BOLLE, P. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. **Food Additives and Contaminants**, England, vol. 17, n. 12, p. 1037-1045, 2000.

EVSEEVA, T. I.; GERAS'KIN, S. A.; SHUKTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, England, vol. 68, n. 3, p. 235-248, 2003.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, United States, vol. 88, n. 3, p. 252-259, july. 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 197, n. 2, p. 243-260, february. 1988.

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

FORSTNER, L. E. F.; WITTMANN, G. T. W. **Metal pollution in the aquatic environment**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1981. 486 p.

GOPALAN, H. N. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 426, n. 2, p. 99-102, may. 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 99, n. 3, p. 273-291, november. 1982.

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

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater sample from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 426, n. 2 p. 183-188, may. 1999.

HELLAWELL, J. M., Toxic substances in river and streams. **Environmental Pollution**, England, vol. 50, n. 1-2, p. 61-85, january. 1988.

HOSHINA, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação da possível ação genotóxica de efluentes domésticos despejados no Ribeirão Claro-Município de Rio Claro, usando *Allium cepa* como organismo teste. *In*: Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo. 2002. CD-ROM.

KOMULAINEN, H. Experimental cancer studies of chlorinated by products. **Toxicology**, Ireland, vol. 198, n. 1-3, p. 239-248, may. 2004.

KOVALCHUK, O. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. Chernobyl, Ukraine. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 415, n. 1-2, p. 47-57, july. 1998.

LACERDA, L. D. et al. Mercury in sediments from the Paraíba do Sul river continental shelf, S. S. Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, England, vol. 26, n. 4, p. 220-222, april. 1993.

LEME, D. M. et al. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, Netherlands, vol. 88, n. 4, p. 214-219, july. 2008.

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**, Netherlands, vol. 650, n. 1, p. 80-86, january. 2008.

LEONARD, S. S.; BOWER, J. J.; SHI, X. L. Metal induced toxicity carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, Netherlands, vol. 255, n. 1-2, p. 3-10, january. 2004.

LEVAN, A. Effect of colchicines on root mitosis in *Allium*. **Hereditas**, Sweden, vol. 24, p. 471-486, 1938.

MA, T. H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 334, n. 2, p. 185-195, april. 1995.

MA, T. H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 426, n. 2, p. 103-106, may. 1999.

MARCANO, L. et al. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, United States, vol. 94, n. 2, p. 221-226, february. 2004.

MATSUMOTO, S. T. et al. Determinação do potencial genotóxico das águas de rios da região de Franca/SP que recebem efluentes industriais. In: Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo. 2002. CD-ROM.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome alterations in onion root-tips. **Genetic and Molecular Biology**, Brazil, vol. 29, n. 1, 148-158, 2006.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, Japan, vol. 69, n. 4, p. 399-408, february. 2004.

MECHEVA, R.; KARAPETKOVA, M.; GERASIMOV, S. Heavy metal accumulation in bioindicators vertebrates in the region of Srednogorie. In: *First National Conference on the Problems of Biological Monitoring*. Inst. Zoo. BAS. Sofia. 1987.

MELLO, M. L. S. et al. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do Parque Ecológico Hermógenes Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso do Meio Ambiente Paulínia e Região Metropolitana de Campinas. Campinas: UNICAMP, p. 1-8, 2004. Anais-CD Rom.

MINISSI, S.; CICCOTTI, E.; RIZZONI, M. Micronucleus test erythrocytes of *Barbus plebejus* (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the *in situ* detection of mutagens in freshwater. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 367, n. 4, p. 245-251, april. 1996.

MORAES, D. S. L. et al. Investigação da atividade mutagênica de efluente municipal pelo teste de *Allium*. In: Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo. 2002. CD-ROM.

OLIVEIRA, D. P. et al. Mutagenic Compounds Generated from the Chlorination of Disperse Azo-Dyes and Their Presence in Drinking Water. **Environmental Science Technology**, United States, vol. 40, n. 21, p. 6682-6689, march. 2006.

PANTALEAO, S de M.; SPANÓ, M. A. Impacto genotóxico de poluentes químicos presentes na água do rio Japaratuba (SE), por meio do teste do micronúcleo em peixes. *In: Resumos do 49º Congresso Nacional de Genética*. Águas de Lindóia, São Paulo. 2003. CD-ROM.

PERALTA-VIDEA, J. R. et al. Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. **Environmental Pollution**, England, vol. 119, n. 3, p. 291-301, october. 2002.

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. Acúmulo de metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso contínuo de adubação fosfatada e água de irrigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Brasil, vol. 2, p. 971-979, 1999.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, Sweden, vol. 118, n. 1, p. 49-53, february. 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. **Hereditas**, Sweden, vol. 121, n. 3, p. 249-254, december. 1994.

RENCÜZOĞULLARI, E.; TOPAKTAŞ, M. The cytogenetics effects of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L. **Turkish Journal of Biology**, Turkey, vol. 25, n. 4, p. 361-370, november. 2001.

RICHARDSON, S. D. et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: A review and roadmap for research. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 636, n. 1-3, p. 178-242, november/december. 2007.

RIGONATO, J.; JORDÃO, B. Q. Uso do teste de *Allium* na avaliação de amostras ambientais. *In: Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética*. Águas de Lindóia, São Paulo. 2002, CD-ROM.

SALA, L. F. et al. Contaminación ambiental por el metal de transición cromo. Estamos frente a um sério problema ECOLÓGICO? **Química Nova**, Brazil, vol. 18, n. 5, p. 468-474, setembro/outubro. 1995.

STAYKOVA, T. A.; IVANOVA, E. N.; VELCHEVA, I. G. Cytogenetic effect of heavy metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. **Journal of Cell and Molecular Biology**, Turkey, vol. 4, n. 1, p. 41-46, 2005.

TÜRKÖĞLU, Ş. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Food and Chemical Toxicology**, England, vol. 46, n. 6, p. 2035-2041, june. 2008.

UMBUZEIRO, G de A. et al. The *Salmonella* mutagenicity assay in a surface water quality monitoring program based on a 20-year survey. **Mutation Research**, Netherlands, vol. 491, n. 1-2, p. 119-126, april. 2001.

USEPA Publication. Current status of bioassays in genetic toxicology (Gene-Tox). n. 3-5, p. 1-69, december. 1980.

VENTURA, B. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos da atrazina usando sistema-teste de *Allium cepa*. In: Resumos do 48º Congresso Nacional de Genética. Águas de Lindóia, São Paulo. 2002. CD-ROM.

VOGEL, E. W. **Assessment of chemically induced genotoxic events**. In:\_\_\_\_\_ Prospectives and Limitations. The Netherlands University Press Leiden, Leiden. 1982, 2: 24.

WIRZ, M. V. M. A. **Avaliação da frequência de micronúcleos em eritrócitos de sangue periférico de girinos de *Rana catesbeiana* expostos em três pontos do Rio Paraíba do Sul, São Paulo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade de São Paulo, São Paulo.



## **5 - RESULTADOS**

### **5.1 - ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL OF  
WATER FROM THE BRAZILIAN RIVER PARAÍBA DO SUL WITH THE *Allium*  
*cepa* TEST

**Revista: Brazilian Journal of Biology, 69(3), 2009.**

# **EVALUATION OF THE CYTOTOXIC AND GENOTOXIC POTENTIAL OF WATER FROM THE BRAZILIAN RIVER PARAÍBA DO SUL WITH THE *Allium cepa* TEST**

Agnes Barbério<sup>1,2</sup>, Layra Barros<sup>1</sup>, Júlio César Voltolini<sup>2</sup> and Maria Luiza S. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, 13083-863 Campinas (SP), Brazil

<sup>2</sup>Universidade de Taubaté, Departamento de Biologia, 12030-010 Taubaté (SP), Brazil

Send correspondence to Agnes Barbério – Universidade de Taubaté, Departamento de Biologia, 12030-010 Taubaté (SP), Brazil. e-mail: agnesbarberio@yahoo.com.br

Fax: 5512 36297909

Título abreviado: Cytotoxic and genotoxic potential of water from Paraíba do Sul river

## **4 Figuras existentes no trabalho**

**Keywords:** cytotoxicity; genotoxicity; *Allium cepa*; mitotic index; river Paraíba do Sul

**Palavras-chave:** citotoxicidade; genotoxicidade; *Allium cepa*; índice mitótico; rio Paraíba do Sul

**BARBÉRIO, A. et al.**

## ABSTRACT

This work investigated the cytotoxic and genotoxic potential of water from the river Paraíba do Sul (Brazil) using *Allium cepa* roots. An anatomo-morphological parameter (root length), mitotic indices, and frequency of micronuclei were analyzed. Eight bulbs were chosen at random for treatment by 24 to 120 h with the river water collected in the years of 2005 and 2006 from sites at the cities of Tremembé and Aparecida (São Paulo state, Brazil). Daily measurements of the length of the roots grown from each bulb have been accomplished along the experiment. Mitotic index (MI) and frequency of micronuclei (MN) were determined for 2000 cells per root, using 3–5 root tips from other bulbs (7–10). Only in the roots treated with samples of the river water collected in 2005 at Tremembé city there was decrease in the root length growth compared to respective control. However, a reduction in MI values was verified for both sites analyzed for that year. Considering the data involving root length growth and especially MI values, a cytotoxic potential is suggested for the water of the river Paraíba do Sul at Tremembé and Aparecida, in the year of 2005. On the other hand, since in this year the MN frequency was not affected with the river water treatments, genotoxicity is not assumed for the river water sampled at the mentioned places.

**Keywords:** cytotoxicity; genotoxicity; *Allium cepa*; mitotic index; river Paraíba do Sul

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DA ÁGUA DO RIO PARAÍBA DO SUL POR MEIO DO TESTE *Allium cepa*

Este trabalho é parte de uma investigação sobre o potencial citotóxico e genotóxico da água do rio Paraíba do Sul (Brasil) utilizando raízes de *Allium cepa*. Foi analisado um parâmetro anatomo-morfológico (crescimento das raízes), bem como o índice mitótico e a frequência de micronúcleos. Aleatoriamente oito bulbos foram submetidos aos tratamentos de 24 a 120 h com a água do rio, provenientes dos pontos de coletas das cidades de Tremembé e Aparecida nos anos de 2005 e 2006. O comprimento das raízes de cada bulbo foi acompanhado diariamente ao longo do experimento. O índice mitótico (IM) e a frequência de micronúcleos (MN) foram determinados pela análise de 2000 células por raiz, sendo utilizadas 3-5 raízes de outros bulbos (7-10). Somente as raízes tratadas com amostras de água coletadas em 2005 na cidade de Tremembé, apresentaram decréscimo no comprimento das raízes quando comparadas com o controle. Entretanto, foi observada redução do IM nas raízes tratadas com água de ambos os pontos de coleta no mesmo ano. Considerando os dados de crescimento de raiz e especialmente IM, um potencial citotóxico é sugerido para a água do rio Paraíba do Sul em Tremembé e Aparecida, no ano de 2005. Por outro lado, para este mesmo ano, a frequência de micronúcleos não foi alterada; assim, a genotoxicidade não foi assumida para a água do rio nos pontos mencionados.

**Palavras-chave:** citotoxicidade; genotoxicidade; *Allium cepa*; índice mitótico; rio Paraíba do Sul

## 1. INTRODUCTION

The human population in developing countries has been suffering the effects of the pollution generated by the growing urbanization and industrialization. A preventive measure to detect the environmental hazards that infringe the human health should be established on a global scale. In a broad sense, since humans are ultimately a part of the ecosystem, the ecosystem health encompasses human health.

In Brazil, the quality of river water has been regulated since March 17, 2005 by CONAMA (National Council of Environment) resolution number 375, which classifies waters and determines their physical and chemical parameters, seeking to control the casting of pollutants in the environment under levels no harmful to man, other animals, and plants. There is a concern related with the precision of established tolerated levels, because some studies have shown that, for certain parameters, even low values may be associated with genotoxic effects (Matsumoto *et al.*, 2006).

Like many other rivers receiving supposedly toxic elements from their effluents, contributed by residues from industries, agriculture and domestic sewage, the river Paraíba do Sul, located in Southeastern Brazil, requires monitoration for possibly toxic effects of its water. This river provides energy generation, urban water supply, assimilation of urban, industrial and agricultural wastes, and irrigation, among many benefits, for an extensive area. Consequently, there is a growing concern regarding environmental pollution in this river.

Pollutants with mutagenic and cytotoxic potentials produce effects as DNA fragmentation, induction of chromosome aberrations, inhibition of the cellular division, and arrest of the cellular cycle, that can be cytologically detected (Grant, 1999; Evseeva *et al.*, 2003).

Among the bioassays developed for detection of mutagenicity, genotoxicity, cytotoxicity and clastogenicity due to environmental pollutants, plant systems have proven to be sensitive, cheap, and effective (Gopalan, 1999; Cabrera & Rodriguez, 1999a,b; Cabrera *et al.*, 1999; Grant, 1999; Ma, 1999; Majer *et al.*, 2005). Plant bioassays, which are mostly sensitive to detect genotoxicity, may warn for environmental hazards in the water (Gopalan, 1999). Plant roots are generally useful tools in biological tests, because they are the first structures to be exposed to chemical variations in the water and soil (Fiskesjö, 1988).

Among the plants commonly used as indicators for studies of potential toxicity of river water, *Allium cepa* constitutes a convenient system for the analysis of anatomical (root growth, deformity, twist) and microscopic parameters (chromosome abnormalities, altered mitotic index (MI), and micronucleus (MN) formation) (Egito *et al.*, 2007). Induction of micronucleus formation, the outcome of chromosome breaks/fragments or spindle poisoning which induces an anomalous disjunction of chromosome at anaphase, has usually been considered a genotoxic indicator (Dash *et al.*, 1988; Grover & Kaur, 1999; Chandra *et al.*, 2005). Onion is available year round and its roots show a fast growth (Nielsen & Rank, 1994; Ateeq *et al.*, 2002). The *A. cepa* test has been demonstrated useful for biological monitoring of waters contaminated with heavy metals and cyanides (Staykova *et al.*, 2005). The *Allium/Vicia* root tip chromosome aberration assay has also been adopted by the International Program on Plant Bioassays (IPPB) for monitoring or testing environmental pollutants (Ma, 1999).

This study describes the growth of *A. cepa* roots treated with water sampled at two sites of the Brazilian river Paraíba do Sul in the years of 2005 and 2006, for evaluation of the cytotoxic potential of this river water. MI and MN frequency were also studied in roots of *A.*

*cepa* treated with water sampled in the year of 2005 for investigation of potential cytotoxic and genotoxic effects promoted by the river water.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *Sampling*

Water samples from the river Paraíba do Sul, at the cities of Tremembé (22°57'40" S, 45°33'10" W) and Aparecida (22°50'40" S, 45°14'04" W) (Fig. 1) were collected in 2005 and 2006. August was selected as period for collection, since it is a dry month in the region (Fisch, 1999). The monthly values of precipitation at the Meteorological Station UNITAU/INMET at Taubaté were 1.7 mm (August 2005) and 2.9 mm (August 2006). A 20-liter bucket was used for collecting the samples. The water was collected at bridges over the river passing along the mentioned cities. A mixture was composed from water sampled from the margins and the middle of the river, and transferred to 40-L containers. Physicochemical and microbiological parameters for the water of the river Paraíba do Sul at Tremembé and Aparecida and for the control water in August 2005 and 2006, were obtained from official reports (CETESB, 2005, 2006; SABESP, 2005, 2006).

The *A. cepa* bulbs were obtained from a local trade source and originated from Petrolândia (Brazilian state of Santa Catarina). Forty onion bulbs of appropriate size (3-3.5 cm) had their ring of the root primordia primarily suspended in jars filled with clean tap water, for 48 h, in order to demonstrate their viability for root growth, when the newly emerged roots were of 1.5-2.0 cm. The jars were kept protected from direct sun light. Then, eight bulbs were chosen at random, per year, for treatment with the river water at the two mentioned cities plus the negative and positive controls (two bulbs each), which lasted from 24 to 120 h.

Negative (no effect on the cell samples) and positive (effect on the cell samples, promoting mitotic index inhibition and elevated frequency of micronucleus) controls were used. The negative control consisted of tap water and the positive control for the year of 2005 consisted of 8 mM ethylene diaminetetra acetic acid (EDTA, CAS# 60004) (Grant, 1982) and for the year of 2006 consisted of 4 mg/L methyl methanesulfonate (MMS, CAS# 66273) (Rank & Nielsen, 1993, 1994, 1997, 1998; Grant, 1998; Grant & Owens, 2006). The choice of different drugs as positive controls depended on operational facilities, considering that both of them are effective as promoters of mitotic index inhibition and of increasing levels of micronucleus production (Grant, 1982; Rank & Nielsen, 1993, 1994, 1997, 1998; Grant, 1998; Grant & Owens, 2006). Daily measurements of the length of all of the roots grown from each bulb have been accomplished along the assay.

For determination of the microscopic parameters, another forty bulbs were used. They were subjected for 24 h to treatments (10 bulbs each) as follows: tap water (negative control); 8 mM ethylene diaminetetra acetic acid - EDTA (positive control); and water sampled from the sites of Tremembé and Aparecida.

#### *Allium test*

All root tips were fixed in absolute ethanol-glacial acetic acid 3:1 (v/v) for 5 min and subjected to the Feulgen reaction *en bloc*. The acid hydrolysis pertinent to the Feulgen reaction was done in 4 M HCl at 24°C for 75 min. Each stained root was squashed between slide and coverslip, and the squashes frozen in liquid nitrogen for the coverslip removal, and air dried. The preparations were then counterstained with fast green at pH 2.7 (Mello & Vidal, 1980), rinsed in distilled water, air dried, cleared in xylene, and mounted in Canada balsam. The



observations were done in a Zeiss binocular light microscope (Oberkochen, Germany), using a CP achromat 40/0.65 objective.

MI and the MN frequency were determined by examination of 2000 cells per slide, using 3–5 root tips from each bulb. The number of bulbs used depended on the availability of roots produced. The slides were examined from right to left, up end down, and the first 2000 cells were scored for MI and MN frequency.

#### *Statistical analysis*

Data on root length, MI, and the MN frequency were compared using ANOVA and Tukey test. Variance heterogeneity was tested. Data on root length regarding the Tremembé site and the negative control in the year of 2005 were compared by a Welch test (t test for different variances). The analyses were done using Statistica (Tulsa, USA, 2005) and Statsdirect (London, England, 2006) softwares.

### **3. RESULTS**

As regards the temporal analysis of data obtained for the growing *A. cepa* root length (Fig. 2), no general difference was statistically found with the different treatments and years. There was a decrease in growth in roots treated with the water collected at the Tremembé city (year 2005) in comparison with the control (Fig.2) ( $p < 0.05$ ). As regards the water collected at the Aparecida city (year 2005), there was a certain delay in growth in roots treated with this water in comparison with the control (Fig. 2).

Based on a non-temporal analysis of the growth of the *A. cepa* roots in the years of 2005 and 2006, no significant difference was detected when comparing results for the water collected from the two river sites and the negative control. However, the results obtained for

the Aparecida city apparently indicated that the roots grew less when treated with the water sampled in the year of 2005 compared with the results obtained with the water sampled at the same site in the year of 2006 (Fig. 3).

A significant decrease in the MI values was demonstrated in cells of the *A. cepa* roots treated with the water collected from the river Paraíba do Sul at the cities of Tremembé and Aparecida in the year of 2005 (Table 1). No significant difference was found in the MN frequency with the same treatments regarding the same year (Table 1).

#### **4. DISCUSSION**

Many types of assays for evaluation of cytotoxicity and genotoxicity employing microorganisms and mammalian cells have been used for monitoring complex environmental samples such as river water. Plant assays and the *A. cepa* test, particularly, have some advantages over microbial and mammalian cell tests because they are highly sensitive to many environmental pollutants (Fiskesjö, 1985), including heavy metals (Panda et al., 1996; Palacio et al., 2005), and are also useful for monitoring the potential synergistic effects of mixtures of pollutants, including hydrophylic and lipophylic chemicals. Furthermore, test plants can be directly exposed to complex mixtures or environmental samples either in the laboratory or in situ. Because of the large size of their chromosomes, some higher plants are suitable for cytological analysis and the responses so obtained are highly correlated with those seen in other biological systems, thus making plant tests also good candidates for evaluating the genotoxicity of environmental samples (Fiskesjö, 1985, 1988; Palacio et al., 2005; Egito et al., 2007).

In the present study, the potential toxicity of the water of the river Paraíba do Sul was evaluated with the *A. cepa* test by analyzing one macroscopic parameter, the root length, and microscopic parameters as the MI and the MN frequencies in the plant roots treated with the tested water. Plant root growth inhibition has been considered a toxicity indicator since it may result from a certain inhibition of cell division (Fiskesjö, 1985; Odeigah et al., 1997; Babatunde & Bakare, 2006; Egito et al., 2007). Changes in MI estimate the altered frequency of cell division and are an indication that cell proliferation is affected (Marcano et al., 2004). Induction of micronucleus formation is generally considered an indication of genotoxicity (Dash et al., 1988; Grover & Kaur, 1999; Chandra et al., 2005).

Our results did not show differences in terms of root growth inhibition in *A. cepa* treated with the water sampled from the river in the years of 2005 and 2006, except for the roots exposed to the water sampled at the Tremembé city in the year of 2005. In this case, it is suggested that in the mentioned year and place the river water was potentially cytotoxic, in a similar way as that reported by other authors with the same assay for other rivers (Palácio et al., 2005; Babatunde & Bakare, 2006; Egito et al., 2007).

As regards the growth delay at day 3 in roots treated with the water sampled at Aparecida in the year of 2005, whether considered as an isolate event, it might be interpreted as an episodic finding, since no difference was detected from there on. However, in terms of an atemporal analysis of the root growth, a slower growth was found for the roots treated with the water sampled in 2005 compared to the year of 2006, at Aparecida. In addition, considering the decrease in MI in the *A. cepa* roots treated with the river water sampled at the two mentioned sites in 2005, a cytotoxic effect by substances interfering with the cell cycle may be considered. This hypothesis is in agreement with published data which have revealed a

deep mitodepressive effect promoted in *A. cepa* by cytotoxic substances like heavy metals, polycyclic hydrocarbons, herbicides, industrial and domestic discharges and other drugs (Fiskesjö, 1981a,b; Liu et al., 1992; Odeigah et al., 1997; Bakare & Wale-Adeyemo, 2004; Marcano et al., 2004; Grisolia et al., 2005; Fernandes et al., 2007).

Indeed, physicochemical and microbiological analyses of the water of the river Paraíba do Sul indicated parameters with levels not above those tolerated by the CONAMA Statutory Instrument 357/2005, with the exception of dissolved aluminium, total iron, and thermotolerant *E. coli* (CETESB, 2005, 2006). A report from CETESB for August 2006 has revealed 0.12 and 0.15 mg/L dissolved aluminium in water collected at Tremembé and Aparecida, respectively (maximum tolerated, 0.1 mg/L). Total iron represented values above the maximum tolerated of 0.3 mg/L (0.49 and 0.97 mg/L in the water collected at Tremembé and Aparecida, respectively) only in the year of 2005 (CETESB, 2005, 2006). Thermotolerant *E. coli* values were 2,300 and 3,300 UFC/100 mL (maximum tolerated, 1,000 UFC/100 mL) in August 2005 and 2006, respectively, in the water sampled at the Tremembé city, and 24,000 and 33,000 UFC/100 mL in August 2005 and 2006, respectively, in the water sampled at the Aparecida city (CETESB, 2005, 2006). The tap water used as negative control in this study was free from *E. coli* (SABESP, 2005, 2006). In summary, parameter levels much higher than those officially tolerated are apparently those concerned with *E. coli*, especially in the water sampled in the years of 2005 and 2006 at the Aparecida city, and possibly provided by fecal contamination.

Therefore, if a cytotoxic potential for the water sampled from the river Paraíba do Sul at Tremembé and Aparecida was promoted by chemicals associated with the *E. coli* levels in 2005, up to the point of affecting the MI values in *A. cepa*, we could anticipate that the same

will occur for the samples obtained in 2006, the analysis of which is in progress. If the cytotoxic potential is promoted only by the total iron level, such an effect is expected not to occur for the water obtained at both cities in 2006. No data on free aluminium have been found in the report by CETESB for 2005.

Although a cytotoxic effect could be assumed for the tested water, no genotoxic effect was demonstrated for the river water sampled in 2005 at Tremembé and Aparecida, since no change in MN formation in *A. cepa* cells was elicited by it. Indeed, tests on frequency of chromosome abnormalities could furnish additional confidence to MN data in terms of genotoxic effects. Work in progress is being undertaken for the analysis of chromosomes of the *A. cepa* roots treated with the water of the river Paraíba do Sul.

The results obtained with EDTA and MMS are in agreement with the expected effect of these drugs as good positive controls (Grant, 1982, 1998; Rank & Nielsen, 1993, 1994, 1997, 1998; Grant & Owens, 2006).

Present findings reinforce the sensitivity of the *A. cepa* test, especially concerning the MI evaluation, for monitoring river waters, thus serving as a tool for the early warn of presence of cytotoxins in the hydric environment. We consider that this test could even be recommended for the prescreening of cytotoxicity in wastewaters.

In conclusion, considering the data involving root length growth and especially MI values, a cytotoxic potential is suggested for the water of the river Paraíba do Sul at Tremembé and Aparecida, in 2005. On the other hand, since in this year the MN frequency was not affected with the river water treatments, genotoxicity is not assumed for the river water sampled at the mentioned places. The estimation of MI values for material obtained in the year of 2006 is still required in order to establish a better relationship with the root growth and

physicochemical and microbiological parameters reported by CETESB (2006), as mentioned above.

### **Acknowledgments**

The authors are indebted to Mr. José Roberto Schmidt (Director of CETESB, Jacareí, Brazil) and Dr. Adekunle A. Bakare (Cell Biology and Genetics Unit, University of Ibadan, Nigeria) for providing useful information on assisting with literature on environmental sciences. This research received financial support from the University of Taubaté/SP – Brazil.

## 5. REFERENCES

- ATEEQ, B., FARRA, MA., ALI, MN. and AHMAD, W., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutat. Res.*, vol. 514, p. 105-113.
- BABATUNDE, BB. and BAKARE, AA., 2006. Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara industrial estate, Nigeria evaluated with the *Allium* test. *Poll. Res.*, vol. 25, p. 227-234.
- BAKARE, AA. and WALE-ADEYEMO, AR., 2004. The mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domestic solid wastes and Aba-Eku landfill, Nigeria on *Allium cepa*. *Nat. Environ. Poll. Technol.*, vol. 3, p. 455-462.
- CABRERA, GL. and RODRIGUEZ, DMG., 1999a. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 207-210.
- CABRERA, GL. and RODRIGUEZ, DMG., 1999b. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 211-214.
- CABRERA, GL., RODRIGUEZ, DMG. and MARURI, AB., 1999. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 201-206.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). In. Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB, 2002, 263p.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). In. Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB, 2005. Available in <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/relatorios.asp>
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). In. Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo. São Paulo, CETESB, 2006. Available in <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/relatorios.asp>
- CHANDRA, S., CHAUHAN, LKS., MURTHY, RC., SAXENA, PN., PANDE, PN. and GUPTA, SK., 2005. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Sci. Total Environ.*, vol. 347, p. 46-52.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). In. Resolução 357, Brasília (BR), 2005, 23p

DASH, S., PANDA, KK. and PANDA, BB., 1988. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. *Mutat. Res.*, vol. 203, p. 11-21.

EGITO, LCM., MEDEIROS, MG., MEDEIROS, SRB. and AGNEZ-LIMA, LF., 2007. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbú river, northeastern/RN Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 30, p. 435-441.

EVSEEVA, TI., GERAS'KIN, SA. and SHUKTOMOVA, II., 2003. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *Environm. Radioact.*, vol. 68, p. 235-248.

FERNANDES, TCC., MAZZEO, DEC. and MARIN-MORALES, MA., 2002. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochem Physiol.*, vol. 88, p. 252-259.

FISCH, G., 1999. Distribuição da precipitação em Taubaté, Vale do Paraíba (SP). *Rev Biociênc.*, vol. 5, p. 7-11.

FISKESJÖ, G., 1981a. Benzo[a]pyrene and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 95, p. 155-162.

FISKESJÖ, G., 1981b. Chlorinated phenoxyacetic acids and chlorophenols in the modified *Allium* test. *Chem. Biol. Interact.*, vol. 34, p. 333-334.

FISKESJO, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, vol. 102, p. 99-112.

FISKESJÖ, G., 1988. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.*, vol. 197, p. 243-260.

GOPALAN, HN., 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 99-102.

GRANT, WF. and OWENS, ET., 2006. *Zea mays* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, vol. 613, p. 17-64.

GRANT, WF., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, vol. 99, p. 273-291.

GRANT, WF., 1998. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, vol. 410, p. 291-307.



GRANT, WF., 1999. Higher plant assay for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 107-112.

GRISOLIA, CK., OLIVEIRA, ABB. and BONFIM, H., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Gen. Mol. Biol.*, vol. 28, p. 334 - 338.

GROVER, IS. and KAUR, S., 1999. Genotoxicity of wastewater sample from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 183-188.

LIU, D., JIANG, W. and LI, M., 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, vol. 117, p. 23-29.

MA, TH., 1999. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 103-106.

MAJER, BJ., GRUMMT, T., UHL, M. and KNASMUELLER, S., 2005. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 33, p. 45-55.

MARCANO, L., CARRUYO, I., CAMPO, AD. and MONTIEL, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.*, vol. 94, p. 221-226.

MATSUMOTO, ST., MANTOVANI, MS., MALAGUTI, MIA., DIAS, AL., FONSECA, IC. and MARIN-MORALES, MA., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome alterations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 29, p. 148-158.

MELLO, MLS and VIDAL, BC., 1980. Práticas de Biologia Celular. 1 ed. Edgard Blücher/Funcamp. São Paulo. p. 57-58.

NIELSEN, MH. and RANK, J., 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 121, p. 249-254.

ODEIGAH, O., NURUDEEN, O. and AMUND, OO., 1997. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas*, vol. 126, p. 161-167.

PALACIO, SM., ESPINOZA-QUIÑONES, FR., GALANTE, RM., *et. al.* 2005. Correlation between heavy metal ions (Copper, Zinc, Lead) concentrations and root length of *Allium cepa* L. in polluted river water. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 48, p. 191-196.

PANDA, KK., PATRA, J. and PANDA, BB., 1996. Induction of sister chromatid exchanges by heavy metal salts in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Biol. Plant.*, vol. 38, p. 555-561.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, vol. 118, p. 49-53.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 121, p. 249-254.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, vol. 390, p. 121-127.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.*, vol. 418, p. 113-119.

SABESP (Companhia de Saneamento Básico do estado de São Paulo) 2005 Informações da qualidade das águas do estado de São Paulo; Available in:  
[http://www.sabesp.com.br/sabesp/filesmng.nsf/D4E25A3C5E1ACBE683257209006DDE3B/\\$File/relatorio\\_qualidade.pdf](http://www.sabesp.com.br/sabesp/filesmng.nsf/D4E25A3C5E1ACBE683257209006DDE3B/$File/relatorio_qualidade.pdf)

SABESP (Companhia de Saneamento Básico do estado de São Paulo) 2006 Informações da qualidade das águas do estado de São Paulo; Available in:  
[http://www.sabesp.com.br/sabesp/filesmng.nsf/52BB882D899FBD3883257251004ABB84/\\$File/rel\\_ago06.pdf](http://www.sabesp.com.br/sabesp/filesmng.nsf/52BB882D899FBD3883257251004ABB84/$File/rel_ago06.pdf)

STAYKOVA, TA., IVANOVA, EN. and VELCHEVA, IG., 2005. Cytogenetic effect of heavy-metal and cyanide in contaminated waters from the region of southwest Bulgaria. *J. Cell Mol. Biol.*, vol. 4, p. 41-46.

### Legend of Figures

**Figure 1.** Indication of the cities (Tremembé and Aparecida) (red triangles) at which the water was sampled from the river Paraíba do Sul.

**Figure 2.** Growth of *Allium cepa* roots along the period of 5 days (120 h) of treatment with the sampled water of the river Paraíba do Sul [years of 2005 (straight lines) and 2006 (dashed lines)]. Each point represents the arithmetic mean of six measurements. CTRL, controls;  $\Delta$ , positive (EDTA, 2005; MMS, 2006);  $\square$ , negative (tap water).

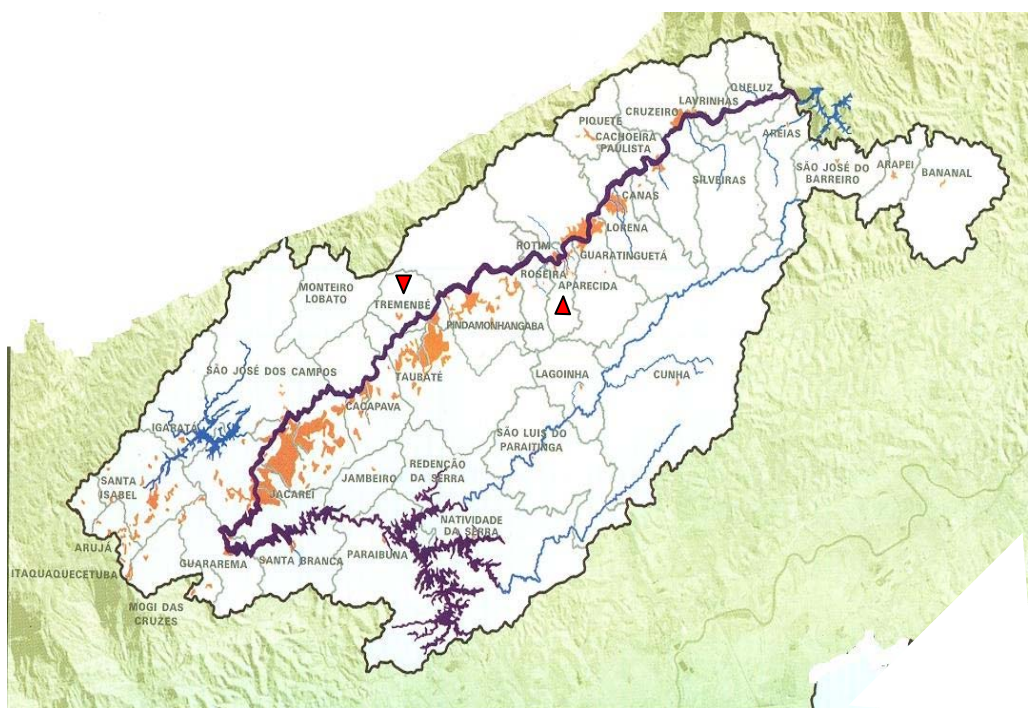
**Figure 3.** Cumulative growth (mean  $\pm$  SE) along the 120-h treatment of *Allium cepa* roots with the water of the river Paraíba do Sul sampled at the cities of Tremembé and Aparecida, discriminating results obtained in the year of 2005 separated from those in the year of 2006. CTRL, controls; positive (EDTA, 2005; MMS, 2006); negative (tap water).

**Table 1.** Changes in MI and MN for *Allium cepa* roots treated with water of the river Paraíba do Sul sampled at Tremembé and Aparecida in the year of 2005.

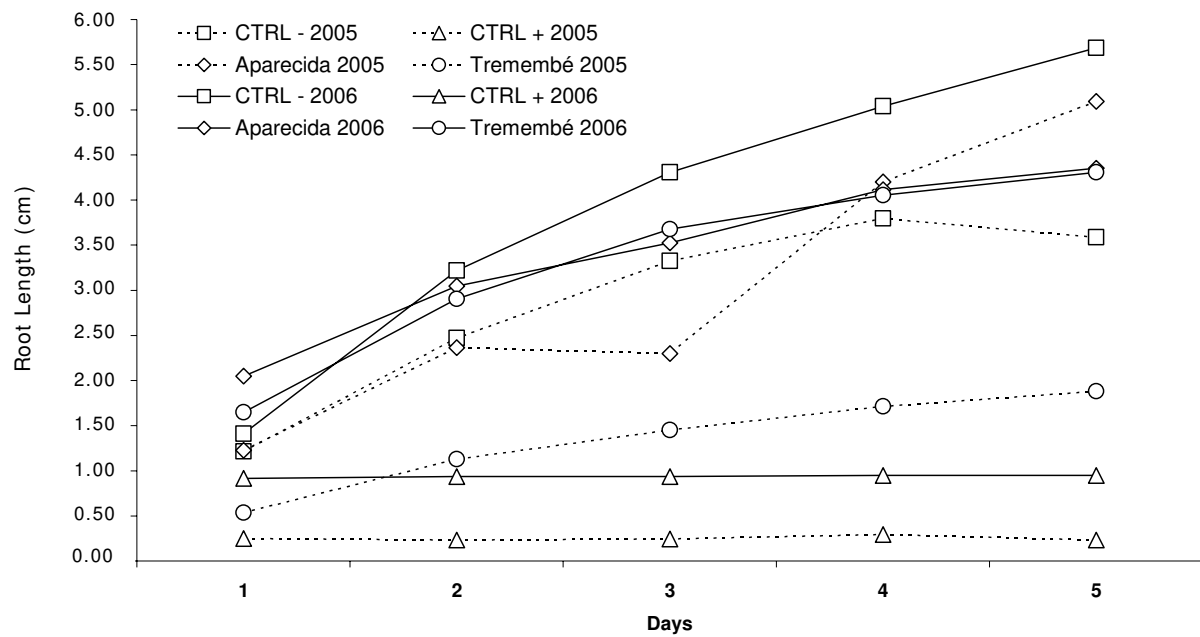
Water	MI	MN	Total cells scored
	X ± SE	X ± SE	
CTRL -	9.71 ± 1.99	0.21 ± 0.15	78,000
CTRL +	0.44 ± 0.07*	**	68,000
River site at Tremembé	5.27 ± 0.77*	0.15 ± 0.09	64,000
River site at Aparecida	4.96 ± 0.57*	0.09 ± 0.04	70,000

\* Statistically different from the control at the  $p < 0.05$  level by Tukey test.; CTRL-, negative control; CTRL+, positive control

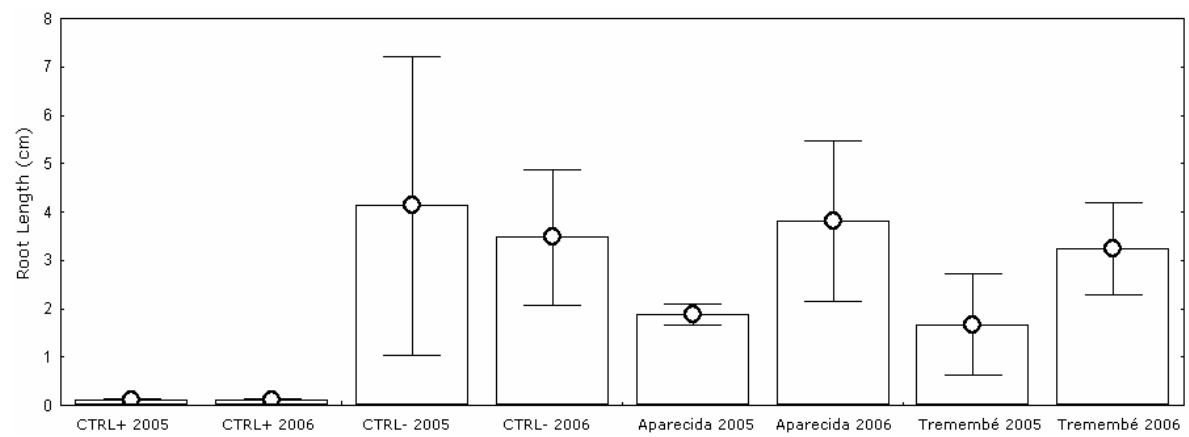
\*\* Samples too small to be tested.



**Figure 1**



**Figure 2**



**Figure 3**

## **5.2 - MANUSCRITO EM PREPARAÇÃO**

GENOTOXICIDADE EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO PARAÍBA DO SUL  
POR MEIO DO TESTE *Allium*

Barbério, A., Voltolini, J.C., & Mello, M.L.S.



# GENOTOXICIDADE EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO PARAÍBA DO SUL POR MEIO DO TESTE *Allium*

Agnes Barbério<sup>1,2</sup>, Júlio César Voltolini<sup>2</sup> and Maria Luiza S. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Celular, 13083-863 Campinas (SP), Brazil

<sup>2</sup>Universidade de Taubaté, Departamento de Biologia-Instituto de Biociências, 12030-010 Taubaté (SP), Brazil

Send correspondence to Agnes Barbério – Universidade de Taubaté, Departamento de Biologia, 12030-010 Taubaté (SP), Brazil. e-mail: agnesbarberio@yahoo.com.br

Fax: 5512 36297909

**Título abreviado:** Genotoxicidade por meio do teste *Allium*

**1 Figura existente no trabalho**

**Keywords:** Paraíba do Sul river; genotoxicity; cytotoxicity; *Allium cepa*; micronuclei; chromosome anomalies

**Palavras-chave:** rio Paraíba do Sul; genotoxicidade; citotoxicidade; *Allium cepa*; micronúcleos; anomalias mitóticas

**BARBÉRIO, A. et al.**

## RESUMO

Os efluentes podem conter substâncias com potencial e características mutagênicas, carcinogênicas, clastogênicas, genotóxicas e citotóxicas, as quais são responsáveis pela poluição dos ecossistemas de água doce e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Bioensaios com plantas são altamente sensíveis a muitos poluentes ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar efeitos citotóxicos e genotóxicos, se produzidos pela água do rio Paraíba do Sul coletada nas cidades de Tremembé e Aparecida, no ano de 2007, sobre células da raiz de *Allium cepa*. O índice mitótico (IM), fases da mitose e a frequência de micronúcleos (MN) foram determinados pela análise de 2000 células por raiz e anomalias cromossômicas e/ou mitóticas (AC) pela contagem de 100 células por raiz, sendo utilizadas 30 raízes de 10 bulbos. IM nas raízes tratadas com água de ambos os pontos de coleta não diferiram do controle negativo (solução de Hoagland), porém as frequências de fases da mitose prófase, anáfase e telófase (Tremembé) e prófase, metáfase, anáfase e telófase (Aparecida) diferiram de modo significativo. MN, “sticks” (aderências) e outras anomalias cromossômicas foram, significativamente, mais elevadas em ambos os pontos de coleta. A indução de c-mitose foi, significativamente, maior para raízes tratadas com água coletada em Tremembé, enquanto pontes cromossômicas foram mais freqüentes em raízes tratadas com água coletada em Aparecida. Considerando-se os dados de frequência de MN, de fases da mitose e de anomalias cromossômicas, sugere-se que a água do rio Paraíba do Sul, coletada em Tremembé e em Aparecida, no ano de 2007, tenha tido um potencial citotóxico e genotóxico.

## ABSTRACT

Effluents may contain substances with mutagenic, carcinogenic, clastogenic, genotoxic and cytotoxic potential and characteristics, which are responsible for the pollution of fresh water ecosystems and may, as a consequence affect human health. Plant bioassays are highly sensitive to many environmental pollutants. The aim of this work was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects, if produced by the water of the Paraíba do Sul river, collected in the cities of Tremembé and Aparecida in 2007, in the cells of the roots of *Allium cepa*. The Mitotic index (MI), mitosis phases, and the frequency of micronuclei (MN) were determined by the analysis of 2000 cells per root, and chromosome anomalies (CA) by count of 100 cells per root, using 30 root tips from 10 bulbs. MI in roots treated with water from both collecting spots did not differ from those of the negative control (Hoagland's solution); however, the frequency of phases of prophase, anaphase and telophase mitosis (Tremembé), and prophase, metaphase, anaphase and telophase (Aparecida) differed significantly. MN, sticks, and other chromosome anomalies were significantly higher in both collecting spots. The presence of c-mitosis was significantly higher for roots treated with water collected in Tremembé, while chromosome bridges were more frequent in roots treated with water collected in Aparecida. Considering the frequency data of MN, mitosis phases and chromosome anomalies, it can be suggested that the water from the Paraíba do Sul river collected both in Tremembé and Aparecida in the year 2007, has had a cytotoxic and genotoxic potential.

## 1. INTRODUÇÃO

A água é de vital importância para os seres vivos. É utilizada pelo homem com diversas finalidades, como abastecimento de água potável, irrigação, navegação e geração de energia, entre outras. Entretanto, há tempos, este recurso natural valioso vem sendo degradado por ações antropogênicas indiscriminadas e inconseqüentes.

Os efluentes de diversas origens (industrial, doméstico, agrícola), que são, indiscriminadamente, liberados no meio ambiente, contêm substâncias com características mutagênicas, genotóxicas e citotóxicas, as quais são responsáveis pela poluição dos ecossistemas e, conseqüentemente, afetam a saúde humana. Usualmente, esta mistura complexa de substâncias contamina o solo e a superfície da água dos rios e reservatórios destinados ao abastecimento público. Esses poluentes ambientais produzem efeitos que podem ser detectados e quantificados citologicamente.

O rio Paraíba do Sul, localizado no sudeste do Brasil, requer monitoramento para detecção de possíveis efeitos tóxicos, já que suas águas apresentam várias finalidades no decorrer de sua extensão: geração de energia, fornecimento de água para abastecimento público, irrigação; recebimento de esgotos urbanos, industriais e agrícolas, entre outras. Conseqüentemente, há uma crescente preocupação no que tange à poluição deste importante rio (Barbério et al., *in press*).

Aplicação de bioensaios de toxicidade e genotoxicidade são indispensáveis para a avaliação das reações dos organismos à complexa poluição ambiental e para a indicação de um potencial sinérgico das substâncias tóxicas.

O teste *Allium cepa* tem sido utilizado desde a década de 1930 (Levan, 1938) e, posteriormente, padronizado em outros estudos por Fiskesjö (1985). Desde então, muitos

estudos adotam esta metodologia e os resultados obtidos confirmam sua eficiência na detecção dos efeitos promovidos por substâncias tóxicas encontradas no meio ambiente (Mohapatra et al., 1986; Fiskesjö, 1988; Mishra, 1993; Grant, 1994, 1999; Rank & Nielsen, 1994ab, 1997, 1998; Kovalchuk et al., 1998; Evseeva et al., 2003; Bakare & Wale-Adeyemo, 2004; Grisolia et al., 2005; Palacio et al., 2005; Majer et al., 2005; Babatunde & Bakare, 2006; Matsumoto et al., 2006; Egito et al., 2007; Türkoğlu, 2007, 2008; Leme et al., 2008; Leme & Marin-Morales, 2008; Caritá & Marin-Morales, 2008; Barbério et al., *in press*, entre outros). A escolha do teste deve-se a uma série de vantagens, como a facilidade na obtenção de preparados, ao número, tamanho e facilidade de observação de seus cromossomos e por se tratar de um teste rápido, fácil e de alta correlação com outros testes para sistemas biológicos. Além disso, bioensaios com plantas são mais simples e mais sensíveis do que bioensaios com animais (Grant, 1999; Ma, 1999; Sadowska et al., 2001).

Os parâmetros indicadores de toxicidade avaliados pelo teste *Allium* podem ser macroscópicos (alterações de crescimento, deformidades e tumores nas raízes) e microscópicos, tais como alterações no índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC), e indução de micronúcleos (MN) (Fiskesjö, 1988).

O índice mitótico é um parâmetro que permite estimar a frequência de células em divisão celular. Portanto, um índice mitótico baixo (efeito mitodepressivo) caracteriza poucas células em divisão (Fiskesjö, 1993) e é mais frequentemente relatado na literatura. Ao contrário, Amaral e colaboradores (2007) observaram aumento do IM em amostras obtidas de tributários da bacia do rio Tapanhon (Pindamonhangaba, estado de São Paulo), sugerindo que este efeito reflita em uma citotoxicidade tão relevante quanto o efeito mitodepressivo

mencionado por vários autores (Odeigah et al., 1997; Marcano et al., 2004; Chandra et al., 2005).

As AC causadas por poluentes ambientais são *stickness* (mais comuns), cromossomos desgarrados, quebras cromossômicas, c-mitose, anáfase multipolar, pontes cromossômicas e células multinucleadas – as quais podem ser classificadas como mitoses com funcionamento anormal das fibras do fuso acromático (Dash et al., 1988; Knasmuller et al., 1998), e MN – os quais são resultados de cromossomos perdidos na anáfase, por mal-funcionamento do fuso ou como resultado de quebras cromossômicas ou fragmentos acêntricos (Yamamoto & Kikuchi, 1980; Panda & Sahu, 1985; Dash et al., 1988; Grover & Kaur, 1999). Os micronúcleos surgem quando o material genético perdido é envolvido por um envoltório nuclear, independente do envoltório nuclear do núcleo principal (Grover & Kaur, 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade de substâncias presentes na água do rio Paraíba do Sul, nas cidades de Tremembé e Aparecida, por meio do teste de *A. cepa*, para os parâmetros microscópicos acima mencionados.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### *Locais de estudo*

As amostras de água foram coletadas no rio Paraíba do Sul, nas cidades de Tremembé (22°57'40" S, 45°33'10" W) e Aparecida (22°50'40" S, 45°14'04" W). O Vale do Paraíba é uma região localizada entre o estado de São Paulo e do Rio de Janeiro, sendo composto por dezenas de cidades que, por um lado são percorridas por uma das principais rodovias do país – a rodovia Presidente Dutra; e por outro o rio Paraíba do Sul, cujas águas são tratadas e utilizadas

para abastecimento público. Este importante rio recebe efluentes domésticos, industriais e agrícolas.

#### *Amostras*

As amostras de água obtidas ao longo das margens foram coletadas de pontes sobre o rio e transferidas para galões plásticos de 40-L. A “mistura composta” consistiu de amostras de água coletadas em ambas as margens e no meio do rio. O período selecionado para coleta foi agosto de 2007, um mês de baixos índices pluviométricos (Fisch, 1999). A média mensal de precipitação para este mês em Taubaté foi de 1.2 mm, dado obtido da Estação Meteorológica da Universidade de Taubaté (UNITAU/INMET). Os dados de parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água do rio Paraíba do Sul em Tremembé e Aparecida em agosto de 2007, foram obtidos a partir de relatórios dos Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas no ano 2007, fornecidos pela CETESB (2007).

#### *Ensaio citogenético*

Os experimentos foram conduzidos como descrição de Fiskesjö (1989) no Protocolo Invitox n. 8, com modificações.

Quarenta bulbos de *A. cepa* (dez para cada tratamento), com 3.0-3.5 cm de tamanho, foram obtidos no comércio local com procedência conhecida (Juazeiro, estado da Bahia). O anel das raízes primordiais foi cuidadosamente limpo antes do início do experimento. Os bulbos foram colocados em recipientes plásticos contendo solução de *Hoagland* (Hoagland & Arnon, 1950; Béraud et al., 2007) por 48 h para atestar a viabilidade à produção de raízes. Assim que novas raízes surgiram, e atingiram, aproximadamente, 2 cm, os bulbos foram

submetidos aos tratamentos por 24 horas: água do rio Paraíba do Sul coletada nas cidades de Tremembé e Aparecida; controle negativo, por solução de macro e micronutrientes de *Hoagland*; e controle positivo, por solução a 15 µg/L metilmetanosulfonato (Sigma) (MMS). Após tratamento, todos os ápices radiculares foram cortados e fixados em etanol absoluto: ácido acético glacial 3:1 (v/v) por 5 min, transferidos para um recipiente com álcool etílico a 70% e acondicionados em *eppendorfs* no refrigerador. Cinco raízes foram submetidas integralmente à reação de Feulgen “en bloc”, sendo a hidrólise ácida realizada em HCl 4 M a 24°C por 75 min. A hidrólise foi interrompida com uma rápida lavagem em HCl 1 M, imersas por 40 min no reativo de Schiff, lavadas em água sulfurosa por 3 vezes (5 min cada), lavadas com água destilada e esmagadas entre lâmina e lamínula, congeladas em nitrogênio líquido para remoção da lamínula, e secas à temperatura ambiente (Mello & Vidal, 1980). As lâminas foram contra-coradas com *fast green* a (pH 2,7), lavadas em água destilada, secas ao ar, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá (Mello et al., 2004).

### *Controles*

O controle positivo foi desenvolvido pela exposição do organismo teste ao MMS a 15µg/L (CAS# 66273), um reconhecido agente alquilante, e o controle negativo realizado com solução de *Hoagland*. A escolha da droga MMS se baseou em sua reconhecida capacidade de induzir aumento nas frequências de micronúcleos e de anomalias cromossômicas (Rank & Nielsen, 1993, 1994ab, 1997, 1998; Grant, 1998; Grant & Owens, 2006). Este tipo de agente alquilante se caracteriza por sua reatividade com o DNA. A alquilação pode se dar nas bases ou no grupo fosfato, como por exemplo, a guanina N-7 é mais nucleofílica do que O-6 da guanina ou do que o grupo fosfato, por isso, se a droga reage mais com a guanina N-7, ele é



muito mais eficiente na indução de AC (em plantas, mamíferos e *Drosophila*) do que quando reage com os outros sítios citados. O MMS é um agente alquilante que se encaixa neste exemplo, atuando no sítio guanina N-7 (Swain & Scott, 1953; Vogel & Natarajan, 1982).

#### *Parâmetros citogenéticos*

As AC foram determinadas pela contagem de 300 células por bulbo (100/lâmina), 3000/tratamento. As lâminas foram examinadas da direita para a esquerda, de cima para baixo, sendo contadas as primeiras 100 células em metáfase, anáfase e telófase. Foram observados seis tipos de anomalias cromossômicas e/ou mitóticas: *sticks*, cromossomos desgarrados, pontes cromossômicas, c-mitoses, anáfases com multipolaridades e “outras” (abrangendo outros tipos de AC, que não foram separadamente classificadas, por apresentarem aspectos anômalos indefinidos).

O IM e MN foram avaliados pela análise de 6000 células por bulbo (2000/lâmina), 60000/tratamento.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz binocular *Zeiss* (Oberkochen, Germany), com objetiva CP acromática 40/0.65. A média e o erro padrão (EP) foram calculados após avaliação dos parâmetros mencionados em 3 lâminas provenientes de cada bulbo e cada grupo experimental foi composto por 10 bulbos.

#### *Análise estatística*

Os dados de frequências de AC, de fases mitóticas, IM, MN e número total de células aberrantes foram comparados entre os tratamentos (controles negativos e positivos vs. água

coletada em Tremembé e Aparecida), utilizando o teste de *Welch*. As análises foram executadas com o *software* Statistica 5.0 (Tulsa, USA, 2005).

### 3. RESULTADOS

Exemplos de anomalias cromossômicas e de formação de micronúcleos, observados neste trabalho, estão apresentados na Figura 1.

Na Tabela 1 observa-se que as frequências de *sticks*, de MN e de outras anomalias foram significativamente maiores em raízes tratadas com água do rio Paraíba do Sul, em ambos os pontos de coleta. Quanto à c-mitose, ela foi mais frequente para as raízes tratadas com água coletada em Tremembé, enquanto pontes cromossômicas foram vistas com maior frequência em raízes tratadas com água coletada em Aparecida.

A frequência de células em prófase e anáfase foi, significativamente, maior para as raízes tratadas com água do rio Paraíba do Sul em ambos os pontos de coleta. Quanto à frequência de células em metáfase, esta foi significativamente maior em raízes tratadas com a água do rio coletada em Aparecida. Quanto à frequência de células em telófase, esta foi, significativamente, menor para as raízes tratadas com água do rio Paraíba do Sul, em ambos os pontos de coleta. Não foi constatada diferença entre a frequência de intérfases e IM (Tabela 2).

### 4. DISCUSSÃO

Resultados positivos, detectados pela análise de alguns parâmetros em bioensaios com plantas superiores, indicam a presença de substâncias genotóxicas e/ou citotóxicas no meio ambiente, demonstrando um risco potencial direto ou indireto para os seres vivos em contato com o mesmo (Fiskesjö, 1997).

No presente trabalho não foi observado efeito das amostras testadas sobre o IM. Entretanto, foi constatada alteração na frequência de células em fases específicas da mitose. A agressão dos poluentes no sistema celular utilizado, avaliado pelo IM, não refletiu a inexistência de citotoxicidade, porque os resultados mostraram alterações na frequência de fases mitóticas, o que nos leva a sugerir uma citotoxicidade diferenciada. Este fato pode indicar uma interferência no processo natural de divisão celular envolvendo todo o aparato bioquímico, durante este momento. Assim, é possível que haja na água testada, presença de substâncias nocivas atuando no ciclo celular e isso possa ter ocasionado alteração na duração das fases do ciclo e do próprio IM. A toxicidade da água de rios, de reservatórios e de praias é avaliada pelo órgão oficial do estado de São Paulo – CETESB, por outros sistemas-teste, como ensaio de toxicidade com a bactéria luminescente *V. fischeri* (Sistema microtox), ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia* e ensaio de mutação reversa (teste AMES). Os testes de toxicidade, realizados pela CETESB nos pontos amostrais deste trabalho no mês de agosto de 2007 mostraram resultados negativos.

Em muitos casos, o teste *Allium* é mais sensível do que outros ensaios, como “microscreen” e o teste de AMES. O primeiro pode detectar a ação de algumas substâncias carcinógenas, e que se revelem negativas com o teste de AMES (Rank & Nielsen, 1994b). O teste *Allium* pode detectar substâncias genotóxicas em níveis muito baixos, enquanto o teste de AMES mostrou efeito negativo para o ciclohexano presente em extratos de esgoto (Rank & Nielsen, 1998).

As análises físico-químicas e microbiológicas da água do rio Paraíba do Sul indicaram que entre os 34 parâmetros analisados, como cromo, mercúrio, chumbo, entre outros, não se acham presentes em níveis acima dos tolerados pela legislação CONAMA 357/2005, com

exceção das concentrações de alumínio dissolvido, fósforo total, oxigênio dissolvido e *E. coli* termotolerante. O Relatório da CETESB revelou, em agosto de 2007, 0.2 mg/L de alumínio dissolvido na água coletada no rio Paraíba do Sul em Aparecida (máximo tolerado = 0.1 mg/L) (CETESB, 2007). O efeito citológico mais típico promovido pelo alumínio é a formação de *sticks* e pontes cromossômicas. Segundo Fiskesjö (1988), o modo de ação depende, completamente, do pH e outros íons presentes na solução. Os valores de fósforo total também estavam acima do máximo tolerado de 0.1 mg/L (0.14 mg/L encontrado na água coletada em Aparecida). O oxigênio dissolvido na água do rio em Aparecida apresentou valor de 4.7 mg/L, sendo que o mínimo requerido é de 5.0 mg/L. Os valores de *E. coli* termotolerantes em agosto de 2007 foram de 26.000 e 24.000 UFC/100 mL (máximo tolerado = 1.000 UFC/100 mL), respectivamente para a água do rio Paraíba do Sul em Tremembé e Aparecida (CETESB, 2007).

Em estudos anteriores, detectamos decréscimo do IM (efeito mitodepressivo) em raízes de *A. cepa* tratadas com água do rio Paraíba do Sul coletadas nas cidades de Tremembé e Aparecida em agosto de 2005, mostrando que a citotoxicidade por substâncias presentes nessas amostras interferiram no ciclo celular, promovendo efeito citotóxico (Barbério et al., *in press*). Neste mesmo estudo não foram observados efeitos genotóxicos pela análise da frequência de MN (Barbério et al., *in press*). Vale ressaltar que estudos com *A. cepa*, mostram que nem sempre a toxicidade está correlacionada com a genotoxicidade, porque, alterações relacionadas com o crescimento da raiz e IM, são parâmetros indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações como anomalias cromossômicas (*stickness*, micronúcleos, pontes cromossômicas, entre outras), indicam genotoxicidade (Fiskesjö, 1997).

Quando a célula interfásica é exposta a poluentes ambientais, danos são produzidos seja em cromossomos inteiros - em G1, ou danos individuais nas cromátides - nas fases S e G2. Anomalias tipicamente encontradas na fase S são *gaps* e quebras cromatídicas (Natarajan et al., 1996). Por outro lado, durante a mitose, todos os tipos de AC podem ser encontrados.

Um efeito genotóxico significativo observado neste trabalho, foi a presença de micronúcleos, *sticks*, pontes cromossômicas, c-mitoses, anáfase com multipolaridades, outras AC e número total de células anômalas. Resultados semelhantes foram discutidos em outros estudos (Smaka-Kincl et al., 1996; Rencüzoğullari & Topaktaş, 2001; Marcano et al., 2004; Babatunde & Bakare, 2006).

Os danos que conduzem às alterações cromossômicas como *sticks*, c-mitoses, anáfase multipolar, dentre outras, são consideradas, decorrentes de ação tipicamente genotóxicas. O aparecimento de MN é derivado de ação clastogênica de uma dada substância, sendo considerado uma alteração indicadora de mutagenicidade. Os MN são decorrentes, ou de distúrbios do fuso acromático (efeito aneugênico), ou de quebras cromossômicas (efeito clastogênico) que originam fragmentos acêntricos (Grant, 1978; Chauhan & Sundararaman, 1990; Matsumoto et al., 2006). Segundo Fernandes et al. (2007), substâncias com potencialidade de induzir poliploidização, como o herbicida trifluralina, podem também induzir a formação de MN, devido ao comportamento celular de expulsão de material genético amplificado. Estes resultados decorrentes das ações citada podem ser observados em águas com presença de contaminantes que tenham a potencialidade de interagir com os sistemas celulares de organismos expostos.

A frequência de MN, observada nas células do meristema radicular de *A. cepa* foi significativa para os dois pontos amostrados, indicando a presença de substâncias

clastogênicas e/ou aneugênicas (inibidoras das fibras do fuso acromático) (Grover & Kaur, 1999; Albertini et al., 2000; Egito et al., 2007; Fernandes et al., 2007; Türkoğlu, 2008). A formação de MN implica em perda de material genético (Auerbach, 1962; Marcano et al., 2004; Türkoğlu, 2008). Sabe-se que aditivos alimentares, tais como propionato de cálcio, propionato de potássio, propionato de sódio, bissulfito de sódio e metabissulfito de sódio (Meng & Zhang, 1992; Rencüzoğullari & Topaktaş, 2001; Türkoğlu 2007, 2008), herbicidas e pesticidas (Ahmed & Grant, 1972; Rank & Nielsen, 1997; Marcano et al., 2004; Fernandes et al., 2007), mercúrio (Dash et al., 1988), diversos metais como cromo, níquel e ferro, entre outros (Fiskesjö, 1988; Knasmuller et al., 1998; Chandra et al., 2005; Matsumoto & Marin-Morales, 2004; Matsumoto et al., 2006; Babatunde & Bakare, 2006) e outras substâncias químicas (Panda & Sahu, 1985; Rank & Nielsen, 1994b) induzem a formação de MN em diferentes organismos. A presença de metais pesados é comum nas misturas complexas, como efluentes domésticos, industriais e agrícolas. Estes agentes são altamente genotóxicos e mutagênicos, pois induzem AC e MN (Fiskesjö, 1988; Mishra, 1993; Rank & Nielsen, 1998; Bakare et al., 2000; Bakare & Wale-Adeyemo, 2004). Muitos metais ocorrem no meio ambiente como resultado das ações antropogênicas, relacionadas à indústria e agricultura. Seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos são detectados, facilmente, em bioensaios com plantas, pela observação de fragmentos, quebras cromossômicas e MN (Fiskesjö, 1988; Knasmuller et al., 1998; Evseeva et al., 2003; Unyayar et al., 2006). Estas substâncias podem interagir, sinergisticamente ou antagonicamente, ou ainda individualmente e promover diversas alterações celulares (Babatunde & Bakare, 2006). Dash e colaboradores (1988) detectaram indução de MN e de AC em células expostas à água e solo contaminados com mercúrio. A água poluída induziu mais efeitos nocivos nas células do meristema radicular de *A. cepa* do

que o solo poluído. Neste caso, a função das fibras do fuso acromático estaria prejudicada, devido à reatividade de alguns derivados do mercúrio com grupos SH e com as tubulinas. Os autores sugerem que os MN sejam estruturas indicativas de mal-funcionamento do fuso acromático.

Anomalias cromossômicas do tipo *stick* se constituíram na alteração mais freqüente, indicando alta genotoxicidade nas amostras testadas. Estes resultados estão de acordo com estudos de outros autores para situações diversas (Briand & Kapoor, 1989; Smaka-Kincl et al., 1996; Odeigah et al., 1997; Marcano et al., 1998; 2004; Bakare & Wale-Adeyemo, 2004; Gömürgen, 2005; Egito et al., 2007; Türkoğlu, 2007, 2008). Este efeito, por ser geralmente irreversível, pode levar a célula à morte (Fiskesjö, 1985, 1988, 1997; Türkoğlu, 2007, 2008). Quebras cromossômicas, pontes e cromossomos desgarrados podem ser resultados de *sticks* e são consideradas indutoras de células poliplóides e aneuplóides (Fiskesjö, 1981). Isto reflete a relação entre a formação de diferentes tipos de anomalias cromossômicas. Marcano e colaboradores (2004) verificaram que o herbicida hidrazida maléica induz uma correlação altamente positiva entre a formação de *sticks* e células com pontes cromossômicas; a formação de pontes, MN e perdas cromossômicas. Cromossomos *sticks* podem resultar de quebras e trocas entre fibras cromatínicas (Klasterska et al., 1976). A formação de *stick* pode estar relacionada com a despolimerização do DNA, a dissolução de proteínas nucleares ou ainda com um aumento na condensação dos cromossomos (Darlington, 1942; Kaufman, 1958; Ahmed & Grant, 1972). Stephen (1979) sugeriu que a aderência cromossômica denominada *stick* represente um tipo de adesão física, que envolve principalmente proteínas da matriz nuclear.

A c-mitose (colchicina mitose) foi primeiramente descrita por Levan (1938), quando estudava o efeito da colchicina em raízes de *A. cepa*. Este autor definiu-a como sendo uma inativação de segmentos de fibras do fuso acromático por cromossomos condensados aleatoriamente, dispersos pelo citoplasma da célula. A formação de c-mitose está relacionada com inibidores das fibras do fuso. A calmodulina, envolvida na regulação da concentração de cálcio na célula, foi, especificamente, localizada no fuso acromático de células em mitose, sugerindo seu envolvimento no movimento dos cromossomos por meio do controle da polimerização e despolimerização dos microtúbulos (Li & Sun, 1991). O armazenamento irregular de cálcio na célula inibe a polimerização dos microtúbulos, levando à formação de c-mitoses (Liu et al., 1992). A c-mitose pode ser definida, também, como a permanência de cromossomos anafásicos na placa equatorial, em vez de se moverem para seus respectivos pólos (Fiskesjö, 1985).

As lesões induzidas no DNA são, quase sempre, eficientemente reparadas pelo processo de reparo celular. Este processo envolve muitos estágios e enzimas e a interferência destes com todo o processo de reparo promove o aumento de efeitos biológicos, incluindo as alterações cromossômicas e mitóticas. Muitas doenças humanas são originadas de defeitos específicos no sistema de reparo, por exemplo, a ataxia telangiectasia, anemia de Fanconi e a síndrome de Bloom (Natarajan, 2002).

Em conclusão, este estudo revelou a presença de agentes poluentes na água do rio Paraíba do Sul, amostrada em Tremembé e Aparecida, cuja ação foi identificada pelo teste de *A. cepa*. Os dados apresentados reforçam a sensibilidade do teste para uso em estudos de monitoramento da água dos rios, por se tratar de uma ferramenta útil para identificação da presença de citotoxinas e genotoxinas nesses corpos d'água de elevada vazão, podendo prover



informações complementares às análises já realizadas no monitoramento e indicar a necessidade de investigação sobre as potenciais fontes de poluição para que as mesmas sejam controladas.

## 5- REFERÊNCIAS

AHMAD, S., and GRANT, WG., 1972. Cytological effects of the pesticides phosdrin and bladex in *Tradescantia* and *Vicia faba*. *Can. J. Genet. Cytol.*, vol. 14, p. 157-165.

ALBERTINI, RJ, *et al.*, 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in human. *Mutat. Res.*, vol. 463, p.111-172.

AMARAL, AM., BARBÉRIO, A., VOLTOLINI, JC., and BARROS, L., 2007. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade da água da bacia do rio Tapanhon (SP – Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Rev. Bras. Toxicol.*, vol. 20, p. 65-71.

AUERBACH, C., 1962. *Mutation: An introduction to research on mutagenesis*. Part1: Methods. Oliver and Royd, Edinburgh, London, 176 pp.

BABATUNDE, BB. and BAKARE, AA., 2006. Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara industrial estate, Nigeria evaluated with the *Allium* test. *Poll. Res.*, vol. 25, p. 227-234.

BAKARE, AA. and WALE-ADEYEMO, AR., 2004. The mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domestic solid wastes and Aba-Eku landfill, Nigeria on *Allium cepa*. *Nat. Environ. Poll. Technol.*, vol. 3, p. 455-462.

BAKARE, AA., MOSURO, AA. and OSIBANJO, O., 2000. Effect of simulated leachate on chromosome and mitosis in roots of *Allium cepa* (L). *J. Environ. Biol.*, vol. 21, p.263-271.

BARBÉRIO, A., BARROS, L., VOLTOLINI, JC., and MELLO, MLS., 2009. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the brazilian river Paraíba do Sul with the *Allium cepa* test. *Braz. J. Biol.*, vol. 69. *In Press*.

BÉRAUD, E., COTELLE, S., LEROY, P., and FÉRARD, JF., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat. Res.*, vol. 633, p. 112-116.

BRIAND, CH. and KAPOOR, BM., 1989. The effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativum* L. *Cytologia*, vol. 54, p. 203-209.

CARITÁ, R., and MARIN-MORALES, MA., 2008. Induction of chromosome aberration in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, vol. 72, p. 722-725.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). In. Dados das variáveis de qualidade das águas e sedimentos. São Paulo, CETESB, 2007. Available in <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/publicacoes.asp>

CHANDRA, S., et al., 2005. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Sci. Total Environ.*, vol. 347, p. 46-52.

CHAUHAN, LKS., and SUNDARARAMAN, V., 1990. Effects of substituted ureas on plant cells. I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *A. cepa*. *Cytologia*, vol. 55, p. 91-98.

DARLINGTON, CD., 1942. Chromosome chemistry and gene action. *Nature*, vol. 149, p. 66.

DASH, S., PANDA, KK. and PANDA, BB., 1988. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. *Mutat. Res.*, vol. 203, p. 11-21.

EGITO, LCM., MEDEIROS, MG., MEDEIROS, SRB. and AGNEZ-LIMA, LF., 2007. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 30, p. 435-441.

EVSEEVA, TI., GERAS'KIN, SA. and SHUKTOMOVA, IL., 2003. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. *Environ. Radioact.*, vol. 68, p. 235-248.

FERNANDES, TCC., MAZZEO, DEC. and MARIN-MORALES, MA., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 88, p. 252-259.

FISCH, G., 1999. Distribuição da precipitação em Taubaté, Vale do Paraíba (SP). *Rev Biociênc.*, vol. 5, p. 7-11.

FISKESJÖ, G., 1981. Benzo[a]pyrene and N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 95, p. 155-162.

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

FISKESJÖ, G., 1988. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.*, vol. 197, p. 243-260.

FISKESJÖ, G., 1989. INVITTOX Protocol No. 8. *Allium* test (1989), (ed. G. Fiskesjö), Russel and Burch House. Nottingham.

FISKESJÖ, G., 1993. The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ. Toxicol. Water. Qual.*, vol. 8, p. 291-298.

FISKESJÖ, G., 1997. *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters, in: W. Wang, J. W. Gorsuch, J. S. Hughes (Eds.), *Plants for Environmental Studies*, CRC, Lewis Publishers, New York, p. 307-333.

GÖMÜRGEN, NA., 2005. Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tip of *Allium cepa* L. *Cytologia*, vol. 70, p. 119-128.

GRANT, WF. and OWENS, ET., 2006. *Zea mays* assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, vol. 613, p. 17-64.

GRANT, WF., 1978. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. *Environ. Health Perspect.*, vol. 99, p. 273-291.

GRANT, WF., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, vol. 310, p. 175-185.

GRANT, WF., 1998. Chromosome aberration assays in *Crepis* for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, vol. 410, p. 291-307.

GRANT, WF., 1999. Higher plant assay for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations – a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 107-112.

GRISOLIA, CK., OLIVEIRA, ABB. and BONFIM, H., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Gen. Mol. Biol.*, vol. 28, p. 334 - 338.

GROVER, IS. and KAUR, S., 1999. Genotoxicity of wastewater sample from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 183-188.

HOAGLAND, DR., and ARNON, DI., 1950. The water: culture method for growing plants without soil. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 32pp.

KAUFMAN, BP., 1958. Cytochemical studies of changes induced in cellular materials by ionizing radiations. *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 59, p. 553.

KLATERSKA, I., NATARAJAN, AT., and RAMEL, C., 1976. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness a category of chromatid aberrations. *Hereditas*, vol. 83, p. 153-162.

KNASMULLER, S., et al., 1998. Detection of genotoxicity effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.*, vol. 420, p. 37-8.

KOVALCHUK, O., et al., 1998. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabits areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. Chernobyl, Ukraine. *Mutat. Res.*, vol. 415, p. 47-57.

LEME, D.M., and MARIN-MORALES, MA., 2008. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. *Mutat. Res.*, vol. 650, p. 80-86.

LEME, D.M., DE ANGELIS, DF., and MARIN-MORALES, MA., 2008. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat. Toxicol.*, vol. 88, p. 214-219.

LEVAN, A., 1938. Effect of colchicines on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, vol. 24, p. 471-486.

LI, JX., and SUN, DY., 1991. A study on CaM distribution in cells of living things. *Chin J Cell Biol.*, vol. 13, p. 1-6.

LIU, D., JIANG, W. and LI, M., 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, vol. 117, p. 23-29.

MA, TH., 1999. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat. Res.*, vol. 426, p. 103-106.

MAJER, BJ., GRUMMT, T., UHL, M. and KNASMUELLER, S., 2005. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, vol. 33, p. 45-55.

MARCANO, L., CARRUYO, I., CAMPO, AD. and MONTIEL, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.*, vol. 94, p. 221-226.

MARCANO, L., et al., 1998. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en poblaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebolla). *Ciencia*, vol. 6, p. 93-99.

MATSUMOTO, ST., et al., 2006. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome alterations in onion root-tips. *Genet. Mol. Biol.*, vol. 29, p. 148-158.

MELLO, MLS and VIDAL, BC., 1980. Práticas de Biologia Celular. 1 ed. Edgard Blücher/Funcamp. São Paulo. p. 57-58.

MELLO, MLS., et al., 2004. Monitoramento por ensaios biológicos de poluição ambiental no lago do Parque Ecológico Hermógenes Freitas Leitão Filho (1998 a 2004). In: I Congresso do Meio Ambiente Paulínia e Região Metropolitana de Campinas, 2004, Paulínia. Anais-CD ROM. Campinas: UNICAMP, p.1-8.

MENG, Z., and ZHANG, L., 1992. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite. *Mutat. Res.*, vol. 298, p. 63-69.

MISHRA, K., 1993. Cytotoxic effects of distillery waste on *Allium cepa* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 50, p. 199-204.

MOHAPATRA, K., GURU, KM. and DAS, RK., 1986. Mitotic irregularities induced by paper mill effluent in the root tip cells of *Allium cepa*. *Perspec. Cytology Genetic.*, vol. 5, p. 337-342.

NATARAJAN, AT., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutat. Res.*, vol. 504, p. 3-16.

NATARAJAN, AT., et. al., 1996. Current cytogenetics methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens. *Environ. Health Perspect.*, vol. 104 (Suppl.3), p. 445-448.

ODEGAH, PGC., NURUDEEN, O., and AMUND, O., 1997. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas*, vol. 126, p. 161-167.

PALACIO, SM., et. al. 2005. Correlation between heavy metal ions (Copper, Zinc, Lead) concentrations and root length of *Allium cepa* L. in polluted river water. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 48, p. 191-196.

PANDA, BB., and SAHU, UK., 1985. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibiting in mitotic cells of *Allium cepa* by organophosphorus insecticide Fensulfothion. *Cytobios*, vol. 42, p. 147-155.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1993. A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. *Hereditas*, vol. 118, p. 49-53.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1994a. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas*, vol. 121, p. 249-254.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1994b. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutat. Res.*, vol. 312, p. 17-24.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.*, vol. 390, p. 121-127.

RANK, J. and NIELSEN, MH., 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.*, vol. 418, p. 113-119.

RENCÜZOĞULLARI, E., and TOPAKTAŞ, M., 2001. The cytogenetics effects of sodium metabisulphite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L. *Turk J Biol.*, vol. 25, p. 361-370.

SADOWSKA, A., et al., 2001. Use of higher plants in the biomonitoring of environmental genotoxic pollution. *Folia Histochem. Cytobiol.*, vol. 39, p. 52-53.

SMAKA-KINCL, V., STEGNAR, P., LOVKA, and TOMAN MJ., 1996. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutat. Res.*, vol. 368, p. 171-179.

STATSOFT, Inc. Statistica for Windows. 2005. version 7.1. Tulsa, Oklahoma (USA).

STEPHEN, J., 1979. Cytological causes of spontaneous fruit abortion in *Haemanthus katherinae* Baker. *Cytologia*, vol. 44, p. 805-812.

SWAIN, CG. and SCOTT, CB., 1953. Quantitative correlation of relative rates: comparison of hydroxide ion and other nucleophilic reagents towards alkyl halides, esters, epoxides and acyl halides. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 75, p. 141-147.

TÜRKÖĞLU, Ş., 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Muta.*, vol. 626, p. 4-14.

TÜRKÖĞLU, Ş., 2008. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, p. 2035-2041.

UNYAYAR, S., CELİK, A., CEKIC, FO., and GOZEL, A., 2006. Cadmium – induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, vol. 21, p. 77-81.

VOGEL, E. and NATARAJAN, AT., 1982. The relation between reaction kinetics and mutagenic action of monofunctional alkylating agents in higher eukaryotic systems: interspecies comparisons, in: F.J. de Serres, A. Hollaender (Eds.), *Chemical Mutagens*, vol. 7, Plenum Press, New York, p. 295-336.

YAMAMOTO, K., and KIKUCHI, Y., 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat. Res.*, vol. 71, p. 127-131.

Tabela 1 – Alterações microscópicas nas células radiculares de *Allium cepa* tratadas com água do rio Paraíba do Sul, Sudeste do Brasil.

Tratamentos	Anomalias cromossômicas (% média ± erro padrão)							No. Total de células anômalas (%)
	Micronúcleos	Stickiness	Desgarrados	Pontes	c-mitoses	Anáfases Multipolares	Outras	
Controle negativo	0.03±0.01	5.04±0.61	0.34±0.15	0.31±0.16	0.55±0.18	0.26±0.08	1.68±0.29	8.18±0.53
Controle Positivo	0.23±0.01*	18.92±1.87*	0.80±0.22	1.01±0.38*	3.87±0.96*	2.51±0.38*	4.58±0.47*	31.69±2.18*
Tremembé	0.19±0.03*	9.76±0.96*	0.63±0.21	0.69±0.21	1.64±0.35*	0.48±0.16	4.62±0.60*	17.82±1.30*
Aparecida	0.15±0.03*	12.02±0.83*	0.36±0.15	1.20±0.26*	1.95±0.84	0.78±0.33	3.28±0.51*	19.58±1.23*

Obs: Para cada tratamento foi utilizado 3 lâminas por bulbo e 10 bulbos por amostra de água. Para a análise de anomalias cromossômicas foram contadas 100 células em metáfases e anáfases por lâmina. Para a análise de micronúcleos foram contadas 2000 células interfásicas por lâmina. Resultados significantes (teste de Welch;  $\alpha < 0.05$ ) estão indicados por \* quando comparados com o controle negativo.



Tabela 2 – Distribuição de fases mitóticas em raízes de *Allium cepa* tratadas com amostras de água do rio Paraíba do Sul, sudeste do Brasil.

Tratamento	Fases mitóticas (% média $\pm$ erro padrão)					
	Índice Mitótico (%)	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Controle negativo	2.06 $\pm$ 0.25	97.94 $\pm$ 0.25	0.20 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.07	0.32 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.14
15 $\mu$ g/L MMS	2.23 $\pm$ 0.19	97.77 $\pm$ 0.19	0.35 $\pm$ 0.05*	0.90 $\pm$ 0.09*	0.47 $\pm$ 0.04*	0.51 $\pm$ 0,05*
Tremembé	2.20 $\pm$ 0.22	97.80 $\pm$ 0.22	0.50 $\pm$ 0.07*	0.86 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.06*	0.40 $\pm$ 0.04*
Aparecida	2.49 $\pm$ 0.35	97.29 $\pm$ 0.32	0.36 $\pm$ 0.05*	1.06 $\pm$ 0.11*	0.48 $\pm$ 0.07*	0.81 $\pm$ 0.12*

\* Resultados significativos ( $q < 0.05$ ), em relação ao controle negativo.

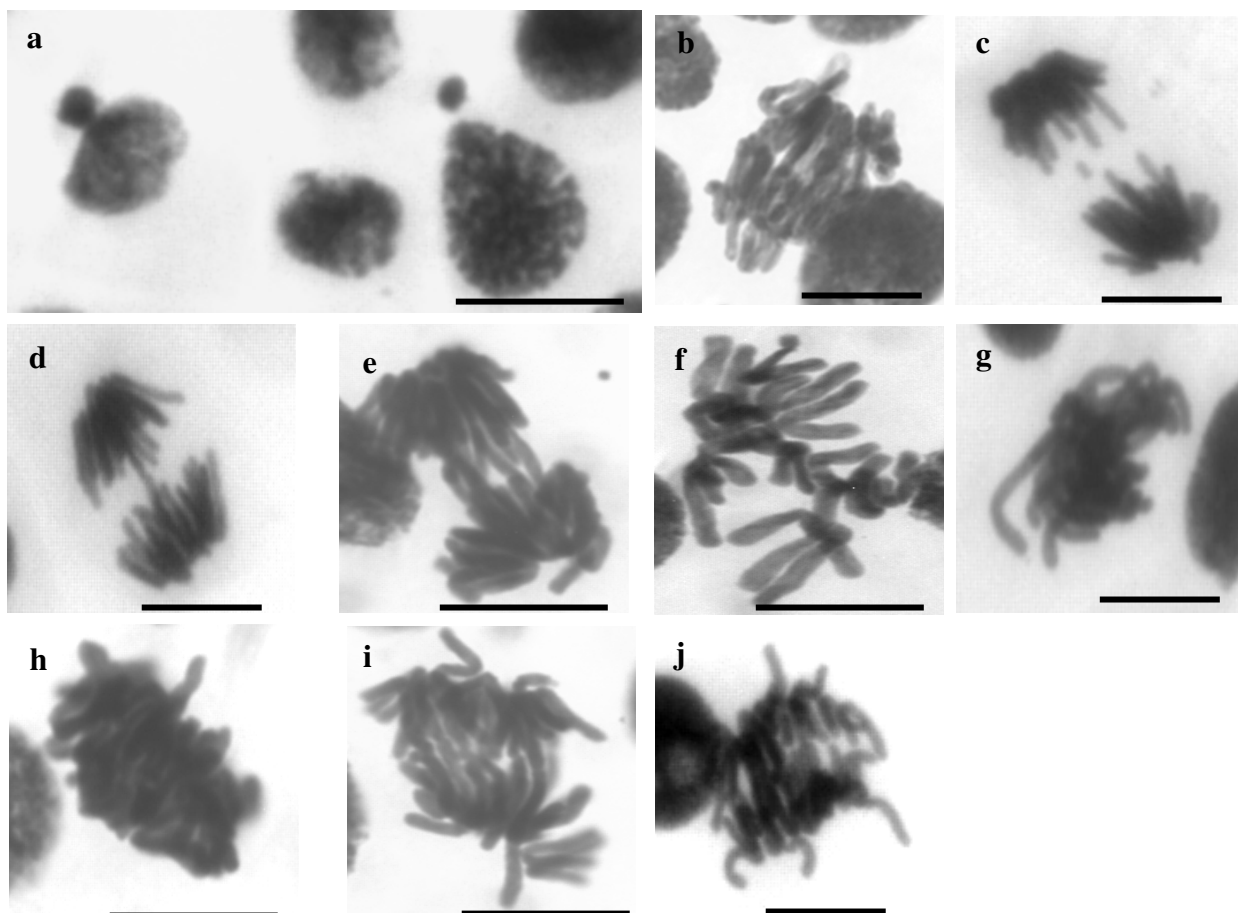


Figura 1. Anomalias observadas em raízes de *A. cepa*. **a** micronúcleo. **b** alterações inespecíficas “outras”. **c** fragmento cromossômico. **d** ponte simples. **e** pontes múltiplas. **f** c-mitose. **g** *stickiness*. **h** *stickiness* com poliploidização. **i, j** anáfases com polaridades anômalas (multipolaridades). Escala = 10  $\mu$ m.

### **5.3 - MANUSCRITO SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO**

#### **PADRONIZAÇÃO DO NÚMERO DE BULBOS E RAÍZES PARA O TESTE DE *Allium cepa***

Barbério, A., Voltolini, J.C., & Mello, M.L.S.

## Standardization of bulb and root numbers for the *Allium cepa* test

Agnes Barbério<sup>1,2\*</sup>, Júlio César Voltolini<sup>2</sup>, and Maria Luiza S. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Cell Biology, Institute of Biology, University of Campinas, 13083-863 Campinas (SP), Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Biology, Institute of Biosciences, University of Taubaté, 12030-010 Taubaté (SP), Brazil*

\*Corresponding author: fax: 55-12-36297909.

*E-mail address:* agnesbarberio@yahoo.com.br (A. Barbério)

**Running title:** Sample size for the *Allium cepa* test.

**Keywords:** sample size; *Allium* test; cytotoxicity; micronuclei; mitotic anomalies

## ABSTRACT

Although the *Allium cepa* test has been used widely for identifying potentially cytotoxic and genotoxic pollutants in aquatic environments, variable non-standardized choices have been reported in the literature regarding the number of plant bulbs and roots analyzed. The present study proposes statistically standard numbers for bulbs and roots in assays that use the *Allium cepa* test for comparing the frequencies of micronuclei, mitotic indices and mitotic abnormalities. For this purpose, we used roots treated with different aqueous solutions, such as water samples collected from the river Paraíba do Sul at the cities of Tremembé and Aparecida (Brazil) in the year 2007, and Hoagland's and methylmethanesulfonate solutions (negative and positive controls, respectively). The presence of pollutant agents in this river water has been previously inferred from cytotoxic and genotoxic effects found after using the *A. cepa* test. The results for ten bulbs were compared by the Kruskal-Wallis test and the coefficient of variation was evaluated for three roots from each bulb. The sampling of ten *A. cepa* bulbs was consistent and adequate for comparative studies that evaluated the potential damage inflicted by pollutants in aquatic environments. Even three bulbs were revealed to be sufficient for discerning this damage, saving time and other efforts to attain a statistically confident comparative evaluation. Regarding the number of roots per bulb recommended for the same purpose, we suggest that more than three roots should be used due to largely variable results, especially when examining the micronucleus formation parameter.

## 1. Introduction

When comparing quantitative biological data, one of the most frequent issues lies in the adequate number of samples to be chosen. Such a decision is influenced by several factors, including the purpose of the study, the size of the population, the risk of using a sample that differs markedly from the population, and the sample error allowed. Determining the sample size is therefore of great importance, since exceeding the necessary sample size may prove detrimental in terms of time, and human and financial resources, whereas too small a sample size may lead to inconsistent results. As sample sizes increase, their variability may become lower up to a certain point, thus leading to better hypothesis testing, a higher statistical power, and lower intervals of confidence (Cochran, 1977).

Another consideration regarding sample size is its adequacy for statistical analysis. Too small a sample size can be enough for a descriptive analysis; however, it may not be useful for multiple regressions, covariance analysis or even for log-linear models. Therefore, there is an ideal sample size for each type of analysis, and identification of this size should precede data collection.

The *A. cepa* test has been used widely as an excellent assay for monitoring potentially cytotoxic and genotoxic effects promoted by pollutants in water, air, and soil because of its high sensitivity and easy and rapid execution (Grant, 1982; Fiskesjö, 1985; Rank, 2003).

Nevertheless, standardization in relation to the ideal sample size of bulbs and their roots to be analyzed could not be found in the literature. Upon reviewing 31 articles published in the last three decades, we found that authors have used six bulbs on average (varying between two and eleven), one to twenty roots, and an average of 2350 cells for micronucleus investigation (varying

from 500 to 7000), 1552 cells for estimating mitotic indices (varying from 100 to 10000), and 626 cells for analysis of mitotic abnormalities (varying from 80 to 7.000) (Table 1).

The aim of this study was thus to propose statistically relevant standard numbers for bulbs and their roots in cytotoxicity and genotoxicity assays that use the *A. cepa* test, by comparing parameters such as micronucleus formation, mitotic abnormalities and mitotic indices.

## 2. Material and methods

Ten *A. cepa* bulbs were used for each treatment as follows: 1. Hoagland's solution (negative control) (Hoagland and Arnon, 1950; Béraud et al., 2007); 2. 15µg/L methylmethanesulfonate (MMS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (positive control); and 3. water samples collected in the year of 2007 from the river Paraíba do Sul at the cities of Tremembé and Aparecida (Brazil), where the presence of polluting agents has been inferred from cytotoxic and genotoxic effects detected using the *Allium* test (Barbério, 2008; Barbério et al., 2009). The bulbs were treated with the above-cited solutions until their roots emerged, usually after a 48-h period. Then the roots remained in the same solutions for another 24-h period. The bulbs that were the positive control were initially (48 h) placed in Hoagland's solution and subsequently transferred to MMS solution where they stayed for a 24-h period. The root tips (2-3 mm in length) were fixed in an absolute ethanol-glacial acetic acid mixture (3:1, v/v) for 5 min. Five roots from each bulb were subjected to the Feulgen reaction (Mello and Vidal, 1978; Mello, 1997). Acid hydrolysis was performed in 4 M HCl at 25°C for 75 min. The hydrolysis was stopped with a rapid bath in cold 0.1 M HCl and the roots were immediately immersed in the Schiff reagent for 40 min at room temperature, followed by treatment with sulfurous water (three bathes, 5 min each) and distilled water. Then each root was squashed between a slide and a coverslip in two drops of 45% acetic acid and the

coverslip was removed in liquid nitrogen. The squashes were then immersed in 70% ethanol for 5 min, air dried, counterstained briefly (5 s) with fast green solution at pH 2.7, rinsed in distilled water, air dried, cleared in xylene and mounted in Canada balsam (Mello et al., 2004). Observations were made on a Zeiss binocular light microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), with an achromatic CP objective 40/0.65. The three best slides per bulb, each slide corresponding to one root, were selected on a basis of deep staining and negligible cell overlapping for analysis at 400 x magnification. The frequency of cells containing micronuclei (MN) and the mitotic indices (MI) was estimated in 2000 cells per root (6000 per bulb). Mitotic abnormalities (stickiness, lagging, bridges, c-mitosis, and multipolar anaphases) (MA) were estimated in ~ 100 metaphase and anaphase cells per root (300 per bulb).

The results for bulbs were compared via the Kruskal-Wallis test ( $\alpha = 0.05$ ) and those for preparations obtained from roots of the same bulb were compared in terms of their coefficient of variation (CV). The statistical analyses were carried out with the Statsdirect software (London, England, 2008).

### **3. Results and Discussion**

When comparing the values of the parameters MA, MN and MI among ten bulbs of *A. cepa* bulbs under each of the various treatments with different aqueous solutions, including the water collected from the river Paraíba do Sul at Tremembé and Aparecida, no significant differences were found (Table 2). One exception was detected after comparing the MI among *A. cepa* bulbs treated with water collected from the river Paraíba do Sul at Aparecida (Table 2).



With regard to the variability in results obtained when three roots were compared per bulb, it was found to be generally higher than 50% for the MN parameter in the case of the bulbs treated with the water from the river Paraíba do Sul at the cities of Tremembé and Aparecida (Table 3). The water samples collected from this river in the year 2007 contained pollutants that significantly affected the MN values as estimated via the *A. cepa* test (Barbério, 2009). At least five out of ten bulbs showing CV values higher than 50% were also observed for the MN parameter under the other aqueous treatments, inclusive under the negative control (Table 3).

When considering the MA and especially the IM, some roots were also found to display CV values higher than 50% (Table 3). It is interesting to notice that when treated with Hoagland's solution, as reported by other authors (Hoagland and Arnon, 1950; Béraud et al., 2007) and found by one of us (AB – unpublished data) to be an efficient negative control, three out of ten CV values for the MA and five out of ten CV values for the IM were higher than 50%, whereas no CV value for the MA and two out of ten CV values for the IM were higher than 50% when treated as the positive control. It should be mentioned that in the case of the negative control, the MA frequency (%) and MN values were generally found to be very low (data not shown). As a consequence, when a few values appear to depart from most of the total values, the CV (%) may result as expressive as in the positive control.

In conclusion, using ten *A. cepa* bulbs for the evaluation of a potential damage induced by pollutants in aquatic environments, the analysis of changes in MI, MN, and MA parameters, proved to be consistently adequate for comparative studies. Indeed, based on present findings, three bulbs can be recommended as an adequate and sufficient sample size for this purpose, reducing the time and effort needed to attain a statistically confident comparative evaluation. With regard to the number of roots analyzed per bulb, on account of a large variability demonstrated especially for the parameter MN, it is suggested that more than three roots be used.

## Acknowledgments

This work was part of a thesis by A.B. for partial fulfillment of the requirements for a PhD degree (UNICAMP, Campinas) (Cell and Structural Biology Graduate Program). A.B. was recipient of a fellowship from the University of Taubaté. The authors are indebted to American Journal Experts (USA) service for English review.

## 4. References

- Amaral, A.M., Barbério, A., Voltolini, J.C., Barros, L., 2007. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). Rev. Brasil. Toxicol. 20, 65-71.
- Ateeq, B., Farah, A.M., Ali, N.M., Ahmad, W., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. Mutat. Res. 514, 105-113.
- Babatunde, B.B., Bakare, A.A., 2006. Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara industrial estate, Nigeria evaluated with the *Allium* test. Poll. Res. 25, 227-234.
- Bakare, A.A., Wale-Adeyemo, A.R., 2004. The mutagenic and cytotoxic effects of leachates from domestic solid wastes and Aba-Eku landfill, Nigeria on *Allium cepa*. Nat. Environ. Poll. Technol. 3, 455-462.
- Barbério, A., 2008. Efeitos citotóxicos e genotóxicos no meristema radicular de *Allium cepa* exposta à água do rio Paraíba do Sul - estado de São Paulo – regiões de Tremembé e Aparecida. Ph D thesis, Unicamp, Campinas.
- Barbério, A., Barros, L., Voltolini, J.C., Mello, M.L.S., 2009. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the Brazilian river Paraíba do Sul with the *Allium cepa* test. Braz. J. Biol. 69 (in press).
- Béraud, E., Cotelle, S., Leroy, P., Féraud, J.F., 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatins in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. Mutat. Res. 633, 112-116.
- Bolle, P., Mastrangelo, S., Tucci, P., Evandri, M.G., 2004. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. Environm. Mol. Mutagen. 43, 137-141.
- Briand, C.H., Kapoor, B.M., 1989. The cytogenetic effects of sodium salicylate on the root meristem cells of *Allium sativum* L. Cytologia 54, 203-209.
- Chandra, S., Chauhan, L.K.S., Murthy, R.C., Saxena, P.N., Pande, P.N., Gupta, S.K., 2005. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. Sci. Total Environ. 347, 46-52.
- Cochran, W.G., 1977. Sampling techniques, 3rd ed. Wiley & Sons, New York.
- Dash, S., Panda, K.K., Panda, B.B., 1988. Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. Mutat. Res. 203, 11-21.

- Egito, L.C.M., Medeiros, M.G., Medeiros, S.R.B., Agnez-Lima, L.F., 2007. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbú river, northeastern/RN Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 30, 435-441.
- El-Khodary, S., Habib, A., Haliem, A., 1990. Effects of the herbicide tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia* 55, 209-215.
- Evandri, M.G., Tucci, P., Bolle, P., 2000. Toxicological evaluation of commercial mineral water bottled in polyethylene terephthalate: a cytogenetic approach with *Allium cepa*. *Food Addit. Contamin.* 17, 1037-1045.
- Evseeva, T.I., Geras'kin, S.A., Shuktomova, I.I., 2003. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium* test. *Environ. Rad.* 68, 235-248.
- Fiskesjö, G., 1981. Benzo[a]pyrene and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the *Allium* test. *Hereditas* 95, 155-162.
- Fiskesjö, G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas* 102, 99-112.
- Fiskesjö, G., 1988. The *Allium* test – an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat. Res.* 197, 243-260.
- Fiskesjö, G., 1989. INVITTOX Protocol No. 8. *Allium* test (1989), (ed. G. Fiskesjö), Russel and Burch House, Nottingham.
- Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. *Mutat. Res.* 99, 273-291.
- Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genet. Mol. Biol.* 28, 334-338.
- Grover, I.S., Kaur, S., 1999. Genotoxicity of wastewater sample from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 183-188.
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water: culture medium for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station, Berkeley. 32 p.
- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Telyuk, P., Hohn, B., Kovalchuk, L., 1998. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutat. Res.* 415, 47-57.
- Liu, D., Jiang, W., Li, M., 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas* 117, 23-29.
- Marcano, L., Carruyo, I., Campo, A.D., Montiel, X., 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94, 221-226.
- Mello, M.L.S., 1997. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Braz. J. Genet.* 20, 257-264.
- Mello, M.L.S., Vidal, B.C., 1978. A reação de Feulgen. *Ciênc. Cult.* 30, 665-676.
- Mello, M.L.S., Barbisan, L.F., Lareef, M.H., Russo, J., Vidal, B.C., 2004. Cell death evaluation in benzo[a]pyrene-transformed human breast epithelial cells after microcell-mediated transfer of chromosomes 11 and 17. *Mutat. Res.* 546, 39-43.
- Muzio, M.P.H., Mendelson, A., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., Moretton, J., 2006. Evaluation of genotoxicity and toxicity of Buenos Aires city hospital wastewater samples. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* 1, 1-6.
- Nielsen, M.H., Rank, J., 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* 121, 249-254.
- Odeigah, O., Nurudeen, O., Amund, O.O., 1997. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas* 126, 161-167.

- Rank, J., 2003. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija* 1, 38-42.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1994. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* 121, 249-254.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1997. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on *N*-methyl-*N*-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat. Res.* 390, 121-127.
- Rank, J., Nielsen, M.H., 1998. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Mutat. Res.* 418, 113-119.
- Rank, J., Lopez, L.C., Nielsen, M.H., Moretton, J., 2002. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas* 136, 13-18.
- Rencüzoğullari, E., Kayraldiz, A., İla, H.B., Çakmak, T., Topaktaş, M., 2001. The cytogenetic effects of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L. *Turk J. Biol.* 25, 361-370.
- Türkoğlu, Ş., 2008. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2035-2041.

**Table 1**

Sample size design used with the *Allium cepa* test: a literature review

No of bulbs	No of slides/ roots per bulb	Number of analyzed cells /slide			Statistic	References
		MI	MA	MN		
5	5	1000	500	500	Mean and standard deviations	Fiskesjö, 1981
5	1	400	100	-	Mean and standard deviations	Fiskesjö, 1985
5	4-6	3000	3000	3000	Tables of Kastenbaum and Bowman	Dash et al., 1988
10	5	1000	100	-	Confidence Interval	Fiskesjö, 1988
10	5	100	100	-	NI	Fiskesjö, 1989
NI	4-5	3000-7000	3000-7000	3000-7000	$\chi^2$	INVITTOX Briand and Kapoor, 1989
NI	NI	8000-10000	NI	-	t Student's test	El-Khodary et al., 1990
10	NI	500	500	-	NI	Liu et al., 1992
5	5	400	100	-	$\chi^2$	Nielsen and Rank, 1994
6	5-6	400	100	-	$\chi^2$	Rank and Nielsen, 1994
10	1	400	100	-	$\chi^2$	Odeigah et al., 1997
5	1	1000	100	1000	$\chi^2$	Rank and Nielsen, 1997
5	1	1000	100	-	$\chi^2$	Rank and Nielsen, 1998
NI	5	400	100	-	t Student's test; correlation coefficients with Fisher's Z transformation	Kovalchuk et al., 1998
3	3-5	-	300	3000-5000	2x2 contingency $\chi^2$	Grover and Kaur, 1999
6	6	1000	80	-	t Student's; Mann-Whitney <i>U</i> tests	Evandri et al., 2000
10	1	3000	3000	3000	t Student's test; correlation and regression coefficients	Rencüzoğullari et al., 2001
6	10	500	500	-	ANOVA - Dunnett 't'	Ateeq et al., 2002
5	1	1000	100	-	$\chi^2$	Rank et al., 2002
5	1	1000	100	-	$\chi^2$	Rank, 2003
5	NI	1500	300/bulb	-	t Student's test; Euclidean Distance Measure; regression coefficients	Evseeva et al., 2003
2	4	1000	1000	-	t Student's test	Bakare and Wale-Adeyemo, 2004
11	4	1000	80	-	ANOVA - Dunnett's	Bolle et al., 2004
3	4	3000	NI	NI	MANOVA; Duncan's correlation; t Student's test	Marcano et al., 2004
10	5-6	1000	100	-	Mann-Whitney's <i>U</i>	Grisólia et al., 2005
5	5	1000	100	1000	t Student's test	Chandra et al., 2005
NI	NI	1000	100	-	$\chi^2$	Muzio et al., 2006
2	4	1000	1000	-	t Student's test	Babatunde and Bakare, 2006
6	3	2000	100	2000	ANOVA, Tukey	Amaral et al., 2007
8	1	2000	100	2000	t Student's test for independent samples	Egito et al., 2007
7-10	3-5	2000	100	2000	ANOVA, Tukey	Barbério et al., 2009
3	20	1500	1500	-	One-way ANOVA – Duncan mean range test (DMR)	Türkoglu, 2008

MA, mitotic anomalies; MI, mitotic index ; MN, micronucleus; NI, not informed

**Table 2**

Comparison of the frequency of mitotic abnormalities (MA, %), micronucleus-bearing cells (MN), and mitotic index (MI) for cells of ten *Allium cepa* bulbs, with the Kruskal-Wallis test. The *p*-value in bold indicates a significant difference.

<b>Treatments</b>	<b>Parameters</b>	<b>Kruskal-Wallis test</b>
Hoagland's solution	MA%	H (9, N= 29) = 08,10; p = 0.52
	MN	H (9, N= 29) = 14,81; p = 0.10
	MI	H (9, N= 30) = 16,36; p = 0.06
Methylmethanesulfonate	MA%	H (9, N= 30) = 13,54; p = 0.14
	MN	H (9, N= 30) = 10,40; p = 0.32
	MI	H (9, N= 30) = 13,06; p = 0.16
Water from the river Paraíba do Sul at Tremembé city	MA%	H (9, N= 30) = 09,48; p = 0.39
	MN	H (9, N= 30) = 07,58; p = 0.58
	MI	H (9, N= 30) = 10,12; p = 0.34
Water from the river Paraíba do Sul at Aparecida city	MA%	H (9, N= 30) = 12,59; p = 0.18
	MN	H (9, N= 30) = 14,08; p = 0.12
	MI	H (9, N= 30) = 20,75; p = <b>0.01</b>

n, 6000 cells (MN and MI) and ~ 300 metaphases and anaphases (MA) per bulb

**Table 3**

Coefficient of variation (CV, %) of mitotic abnormalities (MA, %), micronucleus frequency (MN), and mitotic index (MI) for cells observed in three roots (= slides) analyzed per bulb (n = 10). The values of CV in bold indicate variability above 50%.

Bulb code	Hoagland's solution (negative control)			MMS (positive control)			Water from the river P. do Sul at Tremembé city			Water from the river P. do Sul at Aparecida city		
	MA%	MN	MI	MA%	MN	MI	MA%	MN	MI	MA%	MN	MI
1	27	<b>173</b>	11	45	44	18	44	<b>136</b>	29	44	<b>114</b>	<b>92</b>
2	32	<b>173</b>	34	24	<b>67</b>	<b>58</b>	16	<b>115</b>	46	26	<b>58</b>	20
3	23	<b>173</b>	<b>51</b>	5	<b>103</b>	47	24	<b>138</b>	40	23	<b>96</b>	30
4	37	<b>87</b>	13	11	<b>126</b>	50	17	<b>58</b>	<b>74</b>	<b>63</b>	<b>173</b>	13
5	41	~ 0	40	19	48	15	20	<b>88</b>	31	13	<b>173</b>	35
6	<b>92</b>	<b>173</b>	<b>60</b>	10	<b>100</b>	27	6	<b>60</b>	29	21	42	20
7	38	~ 0	21	8	28	17	40	<b>81</b>	<b>74</b>	19	<b>121</b>	8
8	<b>106</b>	~ 0	<b>66</b>	27	<b>69</b>	19	39	50	<b>63</b>	10	<b>57</b>	14
9	22	33	<b>80</b>	31	43	44	36	<b>72</b>	<b>70</b>	24	<b>121</b>	25
10	<b>54</b>	<b>141</b>	<b>67</b>	29	<b>125</b>	26	9	<b>96</b>	27	11	<b>173</b>	38

MMS, methylmethanesulfonate; n, 6000 cells (MN and MI) and ~ 300 metaphases and anaphases (MA) per bulb

## 6 - CONCLUSÕES

1. No presente trabalho ficou evidente que, nos anos de 2005 a 2007 o rio Paraíba do Sul exibiu efeitos de uma carga poluidora, quando amostras de sua água, coletadas nas regiões de Tremembé e Aparecida, foram avaliadas em relação a efeitos citotóxicos e genotóxicos com o teste *Allium*. Os parâmetros investigados em *Allium cepa* foram: crescimento de raízes, índices mitóticos, frequência de micronúcleos e de anomalias cromossômicas.

2. O teste *Allium* se mostrou eficiente na detecção de efeitos citotóxicos e genotóxicos nas amostras de água pesquisadas.

3. Em termos de delineamento amostral, sugere-se que o teste *Allium* possa ser realizado com amostras de pequeno porte, o que o torna uma excelente ferramenta para o biomonitoramento da bacia do rio Paraíba do Sul. Com isso seria reduzido o trabalho exaustivo advindo do uso de grandes amostragens, tornando viável sua execução dentro de um programa com periodicidade bimestral, como atualmente realizado pela CETESB com relação a outros bioindicadores.



## 7 - ANEXOS

### Anexo 1 - Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas do rio Paraíba do Sul em Tremembé no mês de agosto, ano de 2007

Descrição do Parâmetro	Unidade	Padrão CONAMA	28/08/2007
			14h10

#### Parâmetro : Campo

Chuva 24h	-		Não
Coloração	-		Transparente
pH	U.pH	entre 6 e 9	6,4
Temp. Água	°C		17
Temp. Ar	°C		21

#### Parâmetro : Físico-Químicos

Absorb. no UV	-		0,103
Alumínio Dissolvid	mg/L	máximo 0,1	0,08
Cádmio Total	mg/L	máximo 0,001	< 0,0001
Chumbo Total	mg/L	máximo 0,01	< 0,002
Cloreto Total	mg/L	máximo 250	4,5
Cobre Dissolvido	mg/L	máximo 0,009	< 0,004
COD	mg/L		3,75
Condutividade	µS/cm		84
Cor Verdadeira	mg Pt/L	máximo 75	8
Cromo Total	mg/L	máximo 0,05	
DBO (5, 20)	mg/L	máximo 5	< 2
DQO	mg/L		
Fenóis Totais	mg/L	máximo 0,003	< 0,001
Ferro Dissolvido	mg/L	máximo 0,3	0,15
Fósforo Total	mg/L	máximo 0,1	0,08
Manganês Total	mg/L	máximo 0,1	0,05
Mercurio Total	mg/L	máximo 0,0002	< 0,0002
N. Amoniacal	mg/L	máximo 3,7	0,16
Níquel Total	mg/L	máximo 0,025	< 0,008
Nitrato	mg/L	máximo 10	0,3
Nitrito	mg/L	máximo 1	0,017
NKT	mg/L		0,3
OD	mg/L	mínimo 5	5,3
Óleos e Graxas	mg/L		< 10
Pot. Form. THM	µg/L		239
Sól. Dissolv. Total	mg/L	máximo 500	59
Sól. Total	mg/L		66
Sól. Volátil Total	mg/L		8
Subst. Tensoat.	mg/L	máximo 0,5	< 0,01
Sulfato Total	mg/L	máximo 250	13
Surfactantes	mg/L		
Turbidez	UNT	máximo 100	14
Zinco Total	mg/L	máximo 0,18	< 0,008

#### Parâmetro : Microbiológicos

Coli Termo	UFC/100mL	máximo 1000	* 64000
------------	-----------	-------------	---------

#### Parâmetro : Ecotoxicológicos

Toxicidade	-	Não Tóxico	Não Tóxico
------------	---	------------	------------

#### Parâmetro : Hidrobiológicos

Clorofila-a	µg/L	máximo 30	0,71
Feofitina-a	µg/L		1,03

(\*) Não atendimento aos padrões de qualidade da Resolução CONAMA 357/05

(i) Conformidade indefinida quanto ao limite da classe, devido à análise laboratorial não ter atingido os limites legais

Nitrogênio Amoniacal - Varia em função do valor do pH da amostra

Fósforo Total - Varia em função do regime do corpo hídrico

UFC - Unidade Formadora de Colônia

Emitido pelo EEQI - Setor de Águas Interiores

CETESB  
Banco Interáguas

Anexo 2 – Resultados dos parâmetros e indicadores de qualidade das águas do rio Paraíba do Sul em Aparecida no mês de agosto, ano de 2007

Descrição do Parâmetro	Unidade	Padrão CONAMA	28/08/2007
			09h05

**Parâmetro : Campo**

Chuva 24h	-		Não
Coloração	-		Transparente
pH	U.pH	entre 6 e 9	6,5
Temp. Água	°C		17
Temp. Ar	°C		17

**Parâmetro : Físico-Químicos**

Absorb. no UV	-		0,112
Alumínio Dissolvid	mg/L	máximo 0,1	* 0,2
Cádmio Total	mg/L	máximo 0,001	< 0,0001
Chumbo Total	mg/L	máximo 0,01	< 0,002
Cloreto Total	mg/L	máximo 250	5,8
Cobre Dissolvido	mg/L	máximo 0,009	< 0,004
COD	mg/L		3,61
Condutividade	µS/cm		94
Cor Verdadeira	mg Pt/L	máximo 75	9
Cromo Total	mg/L	máximo 0,05	< 0,002
DBO (5, 20)	mg/L	máximo 5	< 2
DQO	mg/L		
Fenóis Totais	mg/L	máximo 0,003	< 0,001
Ferro Dissolvido	mg/L	máximo 0,3	0,22
Fósforo Total	mg/L	máximo 0,1	* 0,14
Manganês Total	mg/L	máximo 0,1	0,04
Mercurio Total	mg/L	máximo 0,0002	< 0,0002
N. Amoniacal	mg/L	máximo 3,7	0,24
Niquel Total	mg/L	máximo 0,025	< 0,008
Nitrato	mg/L	máximo 10	0,19
Nitrito	mg/L	máximo 1	0,019
NKT	mg/L		0,37
OD	mg/L	mínimo 5	* 4,7
Pot. Form. THM	µg/L		321
Sól. Dissolv. Total	mg/L	máximo 500	55
Sól. Total	mg/L		72
Sól. Volátil Total	mg/L		18
Subst. Tensoat.	mg/L	máximo 0,5	< 0,01
Sulfato Total	mg/L	máximo 250	14
Surfactantes	mg/L		
Turbidez	UNT	máximo 100	19
Zinco Total	mg/L	máximo 0,18	< 0,008

**Parâmetro : Microbiológicos**

Coli Termo	UFC/100mL	máximo 1000	* 24000
------------	-----------	-------------	---------

**Parâmetro : Ecotoxicológicos**

Toxicidade	-	Não Tóxico	Não Tóxico
------------	---	------------	------------

**Parâmetro : Hidrobiológicos**

Clorofila-a	µg/L	máximo 30	
Feofitina-a	µg/L		

(\*) Não atendimento aos padrões de qualidade da Resolução CONAMA 357/05

(i) Conformidade indefinida quanto ao limite da classe, devido à análise laboratorial não ter atingido os limites legais

Nitrogênio Amoniacal - Varia em função do valor do pH da amostra

Fósforo Total - Varia em função do regime do corpo hídrico

UFC - Unidade Formadora de Colônia

Emitido pelo EEQI - Setor de Águas Interiores

CETESB  
Banco Interáguas