



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Urutaí
Programa de Pós-Graduação em Conservação de
Recursos Naturais do Cerrado

***SHEDDING LIGHT* SOBRE A TOXICIDADE
DE MISTURA DE POLUENTES NA BIOTA
AQUÁTICA VEGETAL: UM ESTUDO
ENVOLVENDO *Allium cepa* L.**

LORRANA LUCAS GOMES SAMPAIO

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Urutaí, agosto de 2021



Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano

Reitor

Prof. Dr. Elias de Pádua Monteiro

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Alan Carlos da Costa

Campus Urutaí

Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo César Ribeiro Cunha

Diretor de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof. Dr. Anderson Rodrigo da Silva

Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado

Coordenador

Prof. Dr. Daniel de Paiva Silva

Urutaí, agosto de 2021

LORRANA LUCAS GOMES SAMPAIO

***SHEDDING LIGHT* SOBRE A TOXICIDADE DE MISTURA DE
POLUENTES NA BIOTA AQUÁTICA VEGETAL: UM ESTUDO
ENVOLVENDO *Allium cepa* L.**

Orientador

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Co-orientador

Prof. Dr. Guilherme Malafaia

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano -
Campus Urutaí, como parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do
Cerrado para obtenção do título de Mestre.

Urutaí (GO)
2021

Os direitos de tradução e reprodução reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser gravada, armazenada em sistemas eletrônicos, fotocopiada ou reproduzida por meios mecânicos ou eletrônicos ou utilizada sem a observância das normas de direito autoral.

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

<p>Sampaio, Lorrana</p> <p>SA192 SHEDDING LIGHT SOBRE A TOXICIDADE DE MISTURA DE s POLUENTES NA BIOTA AQUÁTICA VEGETAL: UM ESTUDO ENVOVENDO Allium cepa L. / Lorrana Sampaio; orientador Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes; co- orientador Guilherme Malafaia. -- Urutaí, 2021. 50 p.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado) -- Instituto Federal Goiano, Campus Urutaí, 2021.</p> <p>1. Allium cepa L.. 2. Citogenotóxico. 3. Qualidade fisiológica. 4. "Mix" de poluentes. I. Pessoa Pinto de Menezes, Ivandilson, orient. II. Malafaia, Guilherme, co-orient. III. Título.</p>
--

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia – Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Lorrana Lucas Gomes Sampaio
Matrícula: 2019101330940108
Título do Trabalho: SHEDDING LIGHT SOBRE A TOXICIDADE DE MISTURA DE POLUENTES NA BIOTA AQUÁTICA VEGETAL: UM ESTUDO ENVOLVENDO *Allium cepa* L.

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: 16/10/2021

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não
O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

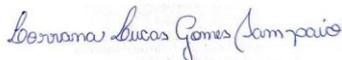
DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais inclusos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Orizona, 15/10/2021.

Local Data



Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:



Assinatura do Orientador (a)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Título da dissertação: Shedding light sobre a toxicidade de mistura de poluentes na biota aquática vegetal: um estudo envolvendo *Allium cepa*.

Orientador: Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Malafaia Pinto

Autora: Lorrana Lucas Gomes Sampaio

Dissertação de Mestrado **APROVADA** em **31 de agosto de 2021**, como parte das exigências para obtenção do Título **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, pela Banca Examinadora especificada a seguir:

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes

Profa. Dra. Ana Paula Silva Siqueira

Dra. Alcione da Silva Arruda

IFCE - Campus Acopiara

IF Goiano - Campus Urutaí

UEG - Campus Ipameri

Documento assinado eletronicamente por:

- Alcione da Silva Arruda, Alcione da Silva Arruda - Membro externo - Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (10651417000259), em 31/08/2021 15:56:45.
- Ana Paula Silva Siqueira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/08/2021 15:37:48.
- Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes, Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal de Educacao, Ciência e Tecnologia do Ceara (10744098000145), em 31/08/2021 15:32:43.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 30/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 304565

Código de Autenticação: 6c842135e4



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Urutaí

Rodovia Geraldo Silva Nascimento, Km 2,5, Zona Rural, None, URUTAI / GO, CEP 75790-000

(64) 3465-1900



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Ata nº 79/2021 - CREPG-UR/DPGPI-UR/CMPURT/IFGOIANO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
ATA Nº/71
BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos trinta e um dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte e um, às catorze horas, reuniram-se os componentes da banca examinadora em sessão pública realizada por videoconferência, para procederem à avaliação da defesa de dissertação em nível de mestrado, de autoria de **Lorrana Lucas Gomes Sampaio**, discente do **Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado do Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí**, com trabalho intitulado "**Shedding light sobre a toxicidade de mistura de poluentes na biota aquática vegetal: um estudo envolvendo *Allium cepa***". A sessão foi aberta pelo presidente da banca examinadora, **Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes**, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação para, em 30 minutos, proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado, a dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRA EM CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS DO CERRADO**, na área de concentração em **Ciências Ambientais**, pelo Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do Programa de Pós-Graduação em Conservação de Recursos Naturais do Cerrado da versão definitiva da dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade se não cumprida essa condição, em até **60 (sessenta) dias** da sua ocorrência. A banca examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa dissertação em periódicos após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação de mestrado, e para constar, foi lavrada a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada eletronicamente pelos membros da banca examinadora.

Membros da Banca Examinadora:

Nome	Instituição	Situação no Programa
-------------	--------------------	-----------------------------

Prof. Dr. Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes	IFCE - Campus Acopiara	Presidente
Profa. Dra. Ana Paula Silva Siqueira	IF Goiano - Campus Urutaí	Membro interno
Dra. Alcione da Silva Arruda	UEG - Campus Ipameri	Membro externo

Documento assinado eletronicamente por:

- Ana Paula Silva Siqueira, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 31/08/2021 17:39:45.
- Alcione da Silva Arruda, Alcione da Silva Arruda - Membro externo - Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí (10651417000259), em 31/08/2021 17:32:20.
- Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes, Ivandilson Pessoa Pinto de Menezes - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal de Educacao, Ciência e Tecnologia do Ceara (10744098000145), em 31/08/2021 15:35:29.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 30/08/2021. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 304563
Código de Autenticação: 0bd85f527f



INSTITUTO FEDERAL GOIANO
Campus Urutaí
Rodovia Geraldo Silva Nascimento, Km 2,5, Zona Rural, None, URUTAI / GO, CEP 75790-000
(64) 3465-1900

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a meu bom Deus, que foi a quem entreguei e confiei minha jornada acadêmica, e que jamais me desamparou.

A minha família, que em todos os momentos estiveram presente me dando coragem para continuar, em especial minha mãe Rosenda Maria Gomes Sampaio, que com seu exemplo de força e dedicação não permitiu que eu desistisse dos meus sonhos, mesmo perante as dificuldades.

Ao meu companheiro Hugo Castro de Paulo, que nunca mediu esforços para que esse sonho se tornasse realidade. Devo muito do que já conquistei a você, meu muito obrigada!

Ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí, pela oportunidade de uma educação de qualidade e pelos muitos auxílios, que foram essenciais para a minha permanência na instituição, além da oportunidade de participação e apresentação de trabalhos em eventos acadêmicos em outro estado e país, que só foram possíveis graças a essa incrível instituição.

Ao Programa de Educação Tutorial - PET Bio Urutaí, que foi de grande importância para a minha formação acadêmica e pessoal. E é claro ao Tutor André Castro, que acreditou no meu potencial e muito contribuiu para minha formação.

Aos amigos Wellington José e Fernando Dourado, que não mediram esforços para me ajudar, sendo fundamentais para a conclusão desse trabalho.

Ao laboratório LaGeM que me proporcionou conhecimento científico. Aos meus amigos de laboratório que sempre se colocaram à disposição para me ajudar. Em especial Maike Baía, Ana Flávia de Jesus, Elias Luiz, Letícia de Maria e Elida Borgéa e por fim, mas não menos importante, ao meu orientador Ivandilson Pessoa P. de Menezes e co-orientador Guilherme Malafaia que não mediram esforços para me ajudar a conquistar esse sonho.

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	1
2.1. Mistura de poluentes: componentes e caracterização química.....	1
2.2. Modelo Experimental <i>A. cepa</i> L. (Sementes).....	2
2.3. Análise da qualidade fisiológica.....	3
2.4. Modelo experimental <i>Allium cepa</i> L. (Bulbo)	4
2.5. Análise do Potencial Citogenotóxico e Mutagênico	5
2.6. Análises Estatísticas	6
3. RESULTADOS	7
3.1 Qualidade Fisiológica.....	7
3.2. Comprimento Radicular do modelo experimental <i>Allium cepa</i> L. (bulbo).....	8
3.3. Análise do potencial Citogenotóxico e Mutagênico.....	9
3.4. Índice de Anormalidade Cromossômica (IAC).....	12
3.5. Micronúcleo.....	16
4. DISCUSSÃO.....	18
4.1 Qualidade Fisiológica.....	18
4.2 Citotoxicidade e Genotoxicidade	20
5. CONCLUSÃO.....	22
6. AGRADECIMENTOS	22
REFERÊNCIAS	23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Design experimental para as análises de qualidade fisiológica de sementes de *A. cepa* L. expostas ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x). 3
- Figura 2 .** Design experimental da exposição dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x) em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Índice do comprimento total do sistema radicular dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de comprimento radicular por tratamentos ao longo do tempo. 9
- Figura 4.** Índice Mitótico estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de índice mitótico por tratamentos ao longo do tempo. 11
- Figura 5.** Índice de Anormalidade Cromossômica estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de índice de anormalidade cromossômica por tratamentos ao longo do tempo. 13
- Figura 6.** Anormalidades cromossômicas nas células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. expostas a concentrações ambientais do “mix” de poluentes. A: célula fantasma; B: célula necrótica; C - C1: micronúcleo; D - D1: prófase perturbada com fragmentos cromossômicos; E

final da prófase com perturbação no fuso; F: final da prófase com poliploidia; G: Metáfase fragmentada com perturbação no fuso; H: c-metáfases; I: metáfase com cromossomo colhido; J: metáfase com aderência cromossômica; K: Metáfase poliploide; L: anáfase retardatária com fragmento cromossômico; M: anáfase com cromossomo retardatário e M1: início da anáfase com vários cromossomos retardatários; N: anáfase com vários fragmentos cromossômicos; O: anáfase multipolar; P: anormalidade não identificada em anáfase; Q: anáfase fragmentada com ponte cromossômica; R: anáfase diagonal; S: telófase com cromossomo retardatário; T: telófase aderente com fragmento e cromossomos retardatários. As lâminas foram coradas com Saffranin, após a fixação. No entanto, um filtro preto e branco foi aplicado às fotomicrografias para permitir uma melhor visualização da estrutura nuclear. 15

Figura 7. Índice de Micronúcleo estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de ½ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental ¼ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de micronúcleo por tratamentos ao longo do tempo. 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações utilizadas de cada contaminante para a composição do “mix” de poluentes.	1
Tabela 2. Resumo da análise de deviance para a variável crescimento radicular e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “Mix” de poluentes.	8
Tabela 3. Resumo da análise de deviance para a variável índice mitótico e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.	10
Tabela 4. Resumo da análise de deviance para a variável anormalidades e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.	12
Tabela 5. Número real de anormalidades observadas para cada fase da divisão celular, para as concentrações do “mix” de poluentes e controles, nos tempos de exposição testados (24, 48, 72 horas).	14
Tabela 6. Resumo da análise de deviance para a variável micronúcleo e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.	16
Tabela 7. Germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento de plântulas de <i>Allium cepa</i> L. submetidas a diferentes níveis de poluentes.	Erro! Indicador não definido.

***SHEDDING LIGHT* SOBRE A TOXICIDADE DE MISTURA DE POLUENTES NA BIOTA AQUÁTICA VEGETAL: UM ESTUDO ENVOLVENDO *Allium cepa* L.**

RESUMO

Embora a toxicidade de diferentes poluentes (isoladamente), seja bem retratada na literatura, a exposição do modelo vegetal *Allium cepa* L. a um “mix” de diferentes classes de contaminantes/poluentes ainda não havia sido avaliado. Logo, avaliamos os efeitos da exposição de *Allium cepa* L. a um “mix” de poluentes em concentrações ambientais, a partir de biomarcadores preditivos de alterações desenvolvimental e cito-genotóxicas. Para isso, foram estabelecidos os grupos: “controle”, “mix 1x” (compostos de indivíduos expostos a 15 poluentes identificados em águas superficiais em concentrações ambientais), “mix 1/4x” e “mix 1/2x” (concentrações 25 e 50 vezes inferiores à concentração 1x, respectivamente). Nossos dados demonstraram que o “mix” de poluentes causou citotoxicidade, genotoxicidade e danos a qualidade fisiológica na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *A. cepa* L., devido aos danos celulares, disfunções comportamentais nos cromossomos de células meristemáticas em raízes de *A. cepa* L. em todos os tempos de exposição e danos fisiológicos observados nas sementes de *A. cepa* L. expostas ao “mix” de poluentes em concentrações ambientais relevantes. Logo, nosso estudo “shedding light” sobre a toxicidade do mix de poluentes sobre a biota vegetal aquática é um alerta para a preservação da mesma, devendo estudos posteriores serem feitos para ampliar nosso conhecimento sobre a magnitude dos impactos observados em nível populacional e ecossistêmico.

Palavras-chave: *Allium cepa* L., Citogenotóxico, Qualidade fisiológica, “Mix” de poluentes.

Shedding light on toxicity of mix of pollutants in vegetal aquatic biota: A study involving *Allium cepa* L.

ABSTRACT

Although the toxicity of different pollutants (alone) is well portrayed in the literature, the exposure of the *Allium cepa* L. plant model to a “mix” of different classes of contaminants/pollutants had not yet been evaluated. Therefore, we evaluated the effects of exposure of *Allium cepa* L. to a “mix” of contaminants at environmental concentrations from predictive biomarkers of developmental and cytogenotoxic alterations. For this, the following groups were established: "control", "mix 1x" (composed of individuals exposed to 15 pollutants identified in surface water at environmental concentrations), "mix 1/4x" and "mix 1/2x" (concentrations 25 and 50 times lower than the 1x concentration, respectively). Our data demonstrated that the "mix" of contaminants caused cytotoxicity, genotoxicity and damage to the physiological quality in germination and early development of *A. cepa* L. seedlings, due to cell damage, behavioral dysfunctions in the chromosomes of meristematic cells in *A. cepa* L. roots at all times of exposure and physiological damage observed in *A. cepa* L. seeds exposed to the “mix” of contaminants at relevant environmental concentrations. Therefore, our "shedding light" study on the toxicity of the pollutants mix on aquatic plant biota, further studies should be continued to expand our knowledge of the magnitude of impacts observed at the population and ecosystem level.

Keywords: *Allium cepa* L., Cytogenotoxic, Physiological quality, “Mix” of pollutants.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro, sendo considerado com um dos biomas com maior biodiversidade do planeta apresentando uma elevada riqueza de espécies vegetais, totalizando 11.627 espécies vasculares nativas (MMA, 2009), dentre essas se destacam as “plantas aquáticas” nomenclatura que abrange também as espécies que ocorrem em áreas úmidas (Amaral et al., 2008; Pivari et al., 2018) que desempenham importantes funções ecológicas, tais como fornecimento de locais de abrigo e refúgio para a fauna aquática, reprodução e alimentação para invertebrados e vertebrados, filtragem/retenção de nutrientes e proteção das margens (Thomaz & Bini 1998; Pott, 2007; Trindade et al., 2010)

Porém o atual cenário ambiental é preocupante para essas plantas aquáticas, uma vez que, a projeção de crescimento populacional prevê 11 bilhões de pessoas habitando o planeta até o ano de 2050, com isso espera-se avanços nos sistemas agrícolas o que levaria a maior produção e produtividade em ambientes que já vêm sofrendo forte pressão antropogênica (Laurance et al., 2014). Conseqüentemente, o aumento do consumo de produtos variados, levará, inevitavelmente, ao incremento na geração de resíduos que, quase sempre, são descartados nos mais variados ambientes, principalmente nos ecossistemas aquáticos (Alteri, 1992; Vieira Filho, 2016; Fereres & Villalobos, 2016; Laurance et al., 2014).

A ocupação agrícola, em particular, vem se expandido ao longo dos últimos anos, principalmente impulsionada pelos avanços tecnológicos (Alteri, 1992; Vieira Filho, 2016). Entre os anos 2000 e 2016, por exemplo, a ocupação agrícola no bioma Cerrado expandiu de 7,4 milhões para 20,5 milhões de hectares em área de cultivo e a área ocupada pela pecuária cresceu de 76 milhões para 90 milhões de hectares (Mapbiomas, 2018). Aliado a isso, observa-se o aumento da demanda de práticas de manejo, que devido à falta de suporte técnico e fiscalização, leva ao extensivo e indiscriminado uso de insumos agrícolas na agricultura convencional e resíduos industriais, causando diferentes impactos ambientais (Fereres & Villalobos, 2016; Laurance et al., 2014).

O potencial toxicológico de diversas substâncias químicas agravadas por sua persistência e longevidade no ambiente, podem afetar a biota em distintos ecossistemas, tais como nascentes, fragmentos de mata nativa, reservas ambientais (Van Bruggen et al., 2018; Mesnage et al., 2015). Além disso, muitos compostos agrícolas (tais como herbicidas e inseticidas) podem ser bioacumulados, expondo organismos não-alvos à diferentes efeitos, além de permitir sua

transferência entre os mais variados níveis tróficos das cadeias alimentares (Barganska & Namiesnik, 2010; Mesnage et al., 2015).

O mancozebe, por exemplo, é um fungicida pertencente a classe etileno-bis-ditiocarbamatos, amplamente usado em frutas, algodão, batata, milho, sorgo, amendoim, tomate e hortaliça, que tem uma ação clastogênica, causando anormalidade na condensação do DNA e inativação do fuso (Fatma et al., 2017). Já dentre os herbicidas, se destaca a formulação comercial baseada no glifosato, não apenas por ser o pesticida mais utilizado no mundo, mas por seu efeito teratogênico, tumorigênico e hepatorenal em diferentes modelos experimentais, mesmo em concentrações abaixo dos limites regulatórios como evidenciado na revisão realizada por Mesnage et al., (2015).

Outro agravante refere-se ao aumento das atividades agroindustriais que vem sendo notado nos últimos anos. O efluente de curtume (EC), por exemplo, gerado durante a produção do couro bovino nas indústrias de curtume (localizadas principalmente na América do Sul e da Ásia) são compostos de diversos componentes tóxicos. Já foram evidenciados efeitos da exposição a esses efluentes em diferentes organismos, tais como nos mamíferos (Estrela et al., 2017; Mendes et al., 2017), répteis (Montalvão et al., 2017), peixes (Chagas et al., 2019) aves (Sampaio et al., 2019) e anfíbios (Do Amaral et al., 2018) o que reforça a preocupação de ecotoxicologistas do mundo todo sobre os impactos desses efluentes nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

Preocupação semelhante tem motivado o desenvolvimento de estudos a respeito dos impactos causados por desreguladores ou disruptores endócrinos em baixas concentrações, os quais constituem substâncias químicas presentes no ambiente, naturais ou sintéticas, que podem alterar o funcionamento do sistema endócrino (hormonal) humano ou de outros animais, além de vegetais (Bila et al., 2007). Várias são as substâncias que possuem a capacidade de afetar o sistema endócrino, tais como, substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A, substâncias farmacêuticas), entre outras.

Conforme discutido por Pinto et al., (2015) e Pinto et al., (2015) o elevado consumo de produtos de higiene e beleza, surfactantes e medicamentos faz com que o esgoto doméstico seja uma das principais vias de acesso destes compostos ao meio ambiente e principalmente nas águas superficiais (Eickhoff et al., 2009). Portanto, diversas substâncias químicas podem ser dispersas no ambiente, abrangendo diferentes grupos de poluentes, que incluem os fármacos, hidrocarbonetos, resíduos agroindustriais, resíduos industriais, hormônios sintéticos e agroquímicos entre outros.

Podendo-se dizer que esses poluentes não são encontrados na natureza individualmente, mas sim misturados. Todavia, pouco se conhece sobre os efeitos negativos causados a partir do “mix” de diferentes poluentes encontrados em águas superficiais na biota. Souza et al., (2018) constitui o único estudo que reuniu 15 diferentes componentes de sete grupos de poluentes, tendo demonstrado que este “mix” de poluentes, em concentrações ambientais e em curto prazo, foi suficiente para causar distúrbios fisiológicos em camundongos.

Mas, quais seriam os impactos as plantas aquáticas, expostas a água contendo esse mix de poluentes? As plantas, a exemplo da espécie *Allium cepa* L., são modelos ecotoxicológicos úteis para estudos de monitoramento ambiental e identificação de impactos precoces de uma variedade de poluentes. Além disso, o *A. cepa* L. é uma espécie indicadora para biomonitoramento genotóxico de poluentes ambientais reconhecida e validada no âmbito do *United Nations Environment Program (UNEP)*, *World Health Organization (WHO)* e *US Environmental Protection Agency (US EPA)*.

Desta forma, testou-se nesse estudo a hipótese que a exposição de *A. cepa* L. à água contendo “mix” de poluentes em concentrações ambientais relevantes causa fragmentação nuclear, aumento de anomalias mitóticas em células meristemáticas, assim como danos na qualidade fisiológica de sementes e prejuízos no desenvolvimento inicial. Acredita-se que estudos como esse permitem que seja avaliado de forma mais realista a magnitude dos impactos de diferentes poluentes disponíveis nos ambientes aquáticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Mistura de poluentes: componentes e caracterização química

O mix de poluentes utilizado foi preparado com 15 poluentes comumente identificados em águas superficiais. O intuito foi simular o que normalmente pode ser encontrado em cursos d'água, ou seja, um mix de poluentes, que servem de fonte de água para as plantas quando são descartados nos esgotos domésticos, industriais e agroindustriais nestes ambientes aquáticos. No presente estudo, as concentrações utilizadas foram definidas com base em estudos prévios que identificaram cada um dos poluentes em águas superficiais, de rios em diferentes localidades (Tabela 1).

Os medicamentos representantes dos resíduos farmacêuticos foram selecionados de acordo com o alto e crescente consumo pela população humana (vide alguns estudos mencionados na Tabela 1) e devido à presença de resíduos desses medicamentos em esgotos domésticos e, conseqüentemente, em águas superficiais, identificados por estudos atuais (Quadra et al.; 2016; Chiavola et al., 2017; Zorpas et al., 2017). Por outro lado, o glifosato e a abamectina foram escolhidos como representantes dos defensivos agrícolas por serem pesticidas utilizados amplamente na agricultura convencional. O glifosato é o herbicida mais utilizado mundialmente (Bai & Ogbourne, 2016), enquanto a abamectina pertence à família das avermectinas, a qual é produzida naturalmente pela fermentação de uma cultura de bactérias, *Streptomyces avermilitis* (Bai & Ogbourne, 2016);

O benzeno foi escolhido como representante dos hidrocarbonetos, uma vez que é um dos hidrocarbonetos aromáticos mais largamente utilizados como matéria-prima para diversos produtos, tais como detergentes, gasolina e plásticos (Barata-Silva et al., 2014). Já o nitrogênio e o detergente doméstico foram escolhidos como representantes da classe dos fertilizantes e surfactantes, uma vez que são aqueles mais utilizados na agricultura convencional (Lu & Tian, 2017) e na limpeza em geral, em residências domésticas (Scheibel, 2004), respectivamente.

Por outro lado, o estradiol foi escolhido como representante dos hormônios sintéticos, pois estudos prévios demonstram o aumento crescente deste hormônio pela população humana nos últimos anos (Louw-du Toit et al., 2017; Yang et al., 2017), em diferentes regiões do mundo. O EC, por sua vez, foi escolhido como representante da classe dos resíduos agroindustriais, pois se trata de um resíduo líquido altamente tóxico e de alta complexidade química produzido em grande quantidade por indústrias curtumeiras que processam a pele bovina. Tal resíduo normalmente é descartado em cursos d'água, ilegalmente, sem qualquer tratamento prévio, especialmente por indústrias curtumeiras rudimentares e de pequeno porte, espalhadas em

países em desenvolvimento, localizados especialmente na Ásia e na América do Sul (Sabumon, 2016).

Todos os medicamentos (similarmente ao estudo de Abreu et al., 2016), estradiol, glifosato, nitrogênio, abamectina e detergente foram adquiridos em estabelecimentos comerciais comuns (vide marcas na Tabela 1). A fonte de nitrogênio utilizada foi a ureia, pois esta é a mais utilizada na agricultura convencional. Já o EC utilizado foi obtido de uma indústria curtumeira localizada na cidade de Inhumas/Goiás - Brasil, tendo sido o mesmo utilizado recentemente por Souza et al. (2017).

Tabela 1. Concentrações utilizadas de cada contaminante para a composição do “mix” de poluentes.

POLUENTES	CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL (CA-III) ENCONTRADA (1X)	REFERÊNCIA PARA CONCENTRAÇÃO	CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL (CA-II) ENCONTRADA ½ x	CONCENTRAÇÃO AMBIENTAL (CA-I) ENCONTRADA ¼ x
Amoxicilina (Antibiótico)	0,0045 µg.L ⁻¹	Sodré et al., (2010)	0,00225 µg.L ⁻¹	0,001125 µg.L ⁻¹
Ácido acetilsalicílico (Anti-inflamatório)	0,34 µg.L ⁻¹	Ternes (1998)	0,17 µg.L ⁻¹	0,085 µg.L ⁻¹
Diclofenaco sódico (Anti-inflamatório)	1,8 µg.L ⁻¹	Hoeger et al., (2005)	0,9 µg.L ⁻¹	0,45 µg.L ⁻¹
Ibuprofeno (Anti-inflamatório)	2,7 µg.L ⁻¹	Flippin et al., (2007)	1,35 µg.L ⁻¹	0,675 µg.L ⁻¹
Fluoxetina (Antidepressivo)	0,030 µg.L ⁻¹	Perreault et al., (2003)	0,015 µg.L ⁻¹	0,0075 µg.L ⁻¹
Clonazepan (Ansiolítico)	0,053 µg.L ⁻¹	Ternes et al., (2001)	0,0265 µg.L ⁻¹	0,01325 µg.L ⁻¹
Dipirona monoidratada (Analgésico)	5 µg.L ⁻¹	Pamplona et al., (2011)	2,5 µg.L ⁻¹	1,25 µg.L ⁻¹
Ranitidina (Antiácido)	10 ng.L ⁻¹	Boxall (2004)	5 µg.L ⁻¹	2,5 µg.L ⁻¹
Benzeno (Benzeno)	0,005 mg/L	Ministério da Saúde (2004)	0,0025 mg/L	0,00125 mg/L
- (Efluente de curtume)	1%	Rabelo et al., (2016)	0,5 %	0,25 %
Cipionato de Estradiol (Estradiol)	2,6 µg.L ⁻¹	Jardim et al., (2006)	1,3 µg.L ⁻¹	0,65 µg.L ⁻¹
Nitrogênio (Nitrogênio)	2,4 mg.L ⁻¹	Xu et al., (2014)	1,2 µg.L ⁻¹	0,6 µg.L ⁻¹
Glifosato (Glifosato)	0,70 mg.L ⁻¹	Peruzzo et al., (2008)	0,35 µg.L ⁻¹	0,175 µg.L ⁻¹
Abamectina (Kraft® 36EC)	0,004 mg.L ⁻¹	Vasconcelos et al., (2016)	0,002 µg.L ⁻¹	0,001 µg.L ⁻¹
- (Detergente)	740 µg.L ⁻¹	Mortatti et al., (2012)	370 µg.L ⁻¹	185 µg.L ⁻¹

2.2. Modelo Experimental *A. cepa* L. (Sementes)

A análise foi conduzida em delineamento inteiramente casualizado, para avaliação da toxicidade dos poluentes nas sementes de *A. cepa* L., foi utilizado cultivar crioula, colhidas na safra 2020, com pureza inicial de 99% e teor de água de 5% conforme descrito pelo fabricante. Foram utilizadas cinco concentrações para o umedecimento do substrato, sendo eles: Água deionizada (Controle Negativo - CN) e três Concentrações Ambientais (CA) de um “Mix” de 15 poluentes representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes, em concentrações encontradas em águas superficiais conforme descrito no subitem 2.1. Neste processo de umedecimento foi utilizado volume de solução de 2,5 vezes a massa seca do papel utilizado para os testes de qualidade fisiológica conforme as Regras para Análises de Sementes (Brasil, 2009). Os papéis foram autoclavados e umedecidos com as concentrações e o Controle Negativo (CN) antes da semeadura. A semeadura foi conduzida utilizando duas folhas de papel tipo mata borrão em caixas de plástico transparente Gerbox (11,0 x 11,0 x 3,5 cm) com tampa com quatro repetições de 50 sementes (Brasil, 2009).

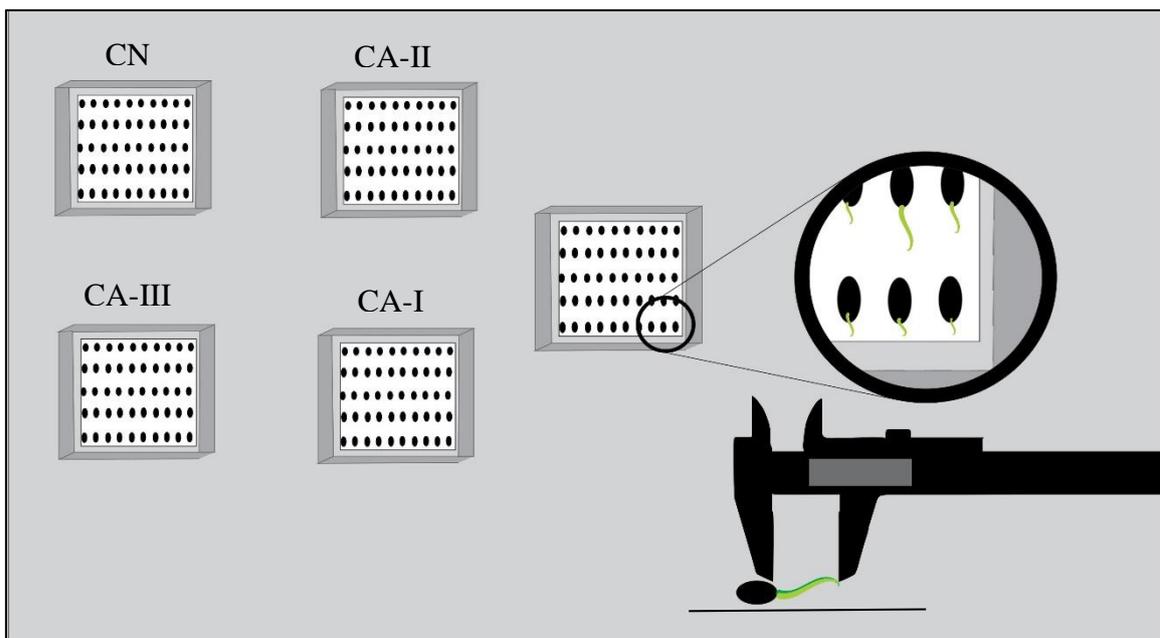


Figura 1. Design experimental para as análises de qualidade fisiológica de sementes de *A. cepa L.* expostas ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x).

2.3. Análise da qualidade fisiológica

Para a avaliação do efeito do “mix” de poluentes sobre qualidade fisiológica das sementes de *A. cepa L.* foram desenvolvidos os seguintes testes:

Germinação e primeira contagem: as sementes de *A. cepa L.* foram expostas à baixas temperaturas (entre 5 e 10 °C) por sete dias para a superação da dormência (Brasil, 2009). Após isso o teste de germinação foi conduzido em câmara de germinação regulada a temperatura de 15 °C e fotoperíodo de 12 horas. Foi avaliada a primeira contagem de germinação no sexto dia após a semeadura computando-se a porcentagem de plântulas normais. A contagem final das plântulas normais foi realizada no 12º dia após a semeadura e os dados foram expressos em porcentagem (Brasil, 2009).

Índice de velocidade de germinação (IVG): realizado conjuntamente com o teste de germinação computando-se diariamente as plântulas normais até o 12º dia após a sementeira e aplicado a fórmula proposta por Maguire (1962).

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

Onde;

G_1, G_2, G_n = número de plântulas na primeira, na segunda e na última contagem.

N_1, N_2, N_n = número de dias de sementeira à primeira, segunda e última contagem.

Comprimento de plântula: realizado ao final do teste de germinação, medindo parte aérea e sistema radicular de 20 plântulas normais de cada repetição, com auxílio de um paquímetro digital e os resultados foram expressos em cm.plântula¹.

2.4. Modelo experimental *Allium cepa* L. (Bulbo)

Para o delineamento experimental da avaliação genotóxica e mutagênica foram utilizados bulbos de cebolas íntegros com cerca de 20-30g. Estes foram cuidadosamente limpos com a retirada do catáfilo externo (casca) e enraizados em água purificada (via osmose reversa) por 48 horas, sendo que as mesmas apresentaram crescimento de 1-2 cm de raízes. Setenta e cinco bulbos de cebola foram distribuídos em cinco grupos experimentais sendo expostos as concentrações aquosas do “mix” de contaminante por 24, 48 e 72 h, sendo n=5 bulbos por grupo/tempo. Os grupos experimentais foram distribuídos da seguinte forma: (Figura 2) - **Grupo Controle Negativo**, em que a área radicular do bulbo da cebola foi exposta apenas à água sem poluentes; - **Grupo Controle Positivo**, em que a área radicular do bulbo da cebola foi exposta a um composto conhecidamente citotóxico para o mesmo modelo experimental em diferentes concentrações (Akinboro et al., 2011) (ciclofosfamida, 10 mg/mL); - **Grupo “Mix” Concentração Ambiental - III (CA-III) 1x**, em que a área radicular do bulbo da cebola foi exposto a água contendo “mix” de 15 poluentes representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes, em concentrações encontradas em águas superficiais conforme utilizado por Souza et al., (2018) (Tabela 1); - **Grupo “Mix” Concentração Ambiental - II (CA-II) 1/2x**, em que a área radicular do bulbo da cebola foi exposto a uma diluição de 50% da mistura de poluentes definida no grupo “Mix” CA-III, e por fim; - **“Grupo “Mix” Concentração Ambiental - I (CA-I) 1/4x**, no qual a diluição foi de 25% da concentração do grupo “Mix” CA-III. Desta maneira, grupos de cinco bulbos de cebola foram suspensos de forma que o prato de cada bulbo ficasse exposto as concentrações (Controles, CA-III, CA-II e CA-I,

separadamente) depositado em uma caixa de polietileno (41 cm comprimento x 25 cm largura x 16 cm altura).

Os bulbos das cebolas foram expostos aos tempos de 24, 48 e 72 horas para a obtenção das raízes, as quais todas foram medidas (mm) com auxílio de um paquímetro digital. Em seguida, as raízes foram cortadas com auxílio de um bisturi e, então, transferidas para microtubos de 2 mL, que continham uma solução de fixação Carnoy 3:1 (etanol PA: ácido acético glacial PA, v/v) por 6 horas em temperatura à 4 °C. Depois deste período, a solução de fixação Carnoy foi renovada e novamente armazenados à 4 °C até o uso (Babich et al., 2001).

2.5. Análise do Potencial Citogenotóxico e Mutagênico

A avaliação do potencial genotóxico e mutagênico foi baseada na identificação e contagem de anormalidades nucleares de células meristemáticas de *A. cepa* L. Desta maneira, lâminas para observação em microscopia óptica foram preparadas conforme Kumari et al., (2009; 2011) com modificações. Para isso, as raízes foram tiradas do microtubos aleatoriamente e hidrolisadas em HCl (1M) a 60 °C por 10 mim e, então, corada com Saffranin a 45% por 10 mim. Em seguida, a região meristemática da raiz (aproximadamente 2-3 mm da ponta) foi seccionada e levada sobre a lâmina, a qual foi macerada com auxílio da lamínula e examinada em microscopia óptica com aumento de 1000x. No total, 5000 células foram analisadas para cada concentração e tempo de exposição, sendo 1000 células para cada raiz/bulbo, incluindo o controle positivo e o negativo. A citotoxicidade foi quantificada através do índice mitótico (IM), calculado pela proporção entre o número de células em divisão e o número total de células observadas. A genotoxicidade foi avaliada com base no índice de genotoxicidade (IGen) estabelecido pela relação do número de células com anormalidade cromossômica (IAC) e o número total de células observadas e, por fim, a mutagenicidade analisada através do índice de micronúcleo (IMN), definida pela proporção do número de células com micronúcleo (MN) sobre o número total de células observadas (Kumari et al., 2011).

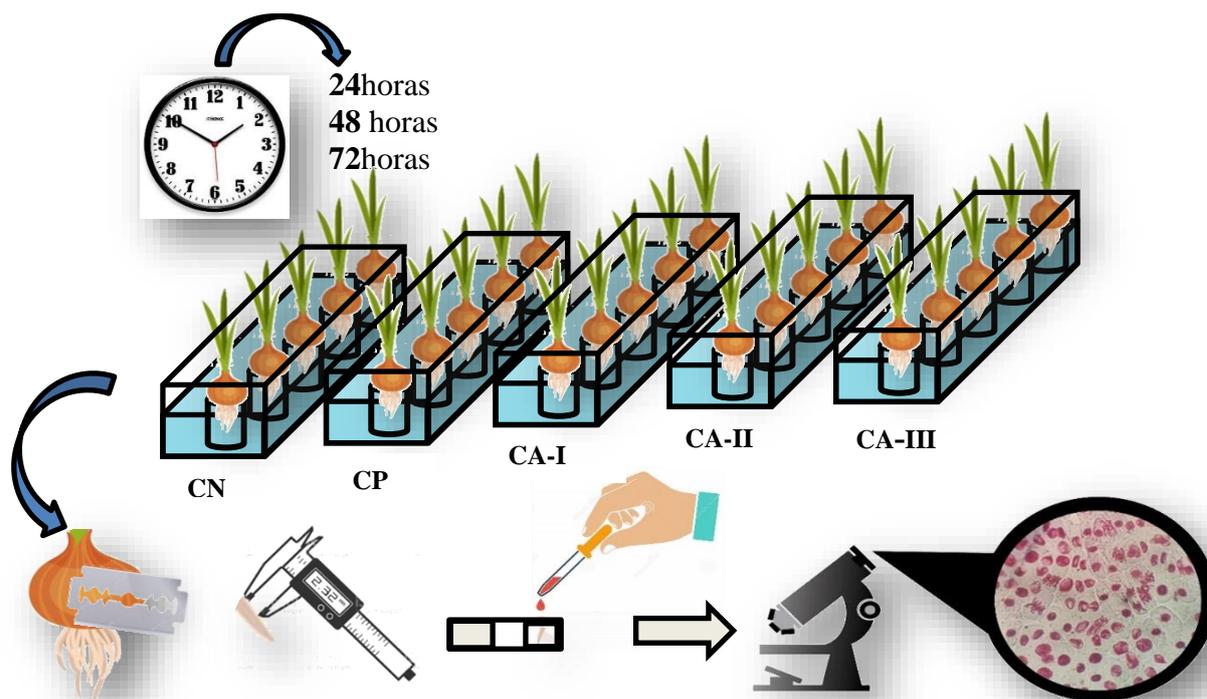


Figura 2. Design experimental da exposição dos bulbos de *Allium cepa L.* expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x) em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas).

2.6. Análises Estatísticas

Os dados de contagem de células (para Índice Mitótico, Índice de Micronúcleo e Índice de Anormalidades Cromossômicas) foram submetidos a análise de deviance de acordo com o modelo linear generalizado (MLG) binomial negativo com função de ligação logarítmica, para teste (qui-quadrado) dos efeitos de tratamento dentro de tempo com nível nominal de 5% de significância. Para os dados de crescimento radicular um MLG Gama foi ajustado. O ajuste geral do modelo foi avaliado por meio do AIC (Akaike’s Information Criterion), da estatística qui-quadrado de Pearson para avaliar superdispersão e erro médio absoluto percentual (EMAP). Em seguida foram construídos intervalos de 95% de confiança para comparação das médias de tratamentos e apresentadas as equações de regressão ajustadas para o efeito da concentração do “mix” de poluentes em cada tempo. Já os resíduos dos dados de germinação e desenvolvimento inicial foram testados quanto a normalidade e homocedasticidade. Quando atendidos os

pressupostos foi realizada análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o software R versão 3.5.3 (R Core Team, 2019).

3. RESULTADOS

3.1 Qualidade Fisiológica

Houve uma redução de 75% na germinação de sementes de *Allium cepa* L. quando as sementes estiveram em contato com a CA-III do “mix” de poluentes, enquanto para os demais tratamentos não foi observada diferença em relação ao CN (Tabela 7).

Tabela 2. Germinação, primeira contagem de germinação, índice de velocidade de germinação e comprimento de plântulas de *Allium cepa* L. submetidas a diferentes níveis de poluentes.

Grupos experimentais	Germinação (%)	Primeira contagem (%)	Índice de velocidade de germinação	Comprimento de plântula (cm)
CN	79 a	66 a	13,6 a	3,98 a
CA-I	77 a	65 a	13,1 ab	2,52 b
CA-II	69 a	44 b	11,1 b	1,37 c
CA-III	20 b	11 c	3,2 c	1,13 c
Quadrado médio	2637,30**	2234,00**	79,74**	11,52**
CV (%)	7,88	12,13	9,34	8,42

**significativo ao nível de 1% de probabilidade conforme o teste F. Na coluna, médias seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A velocidade de germinação foi afetada significativamente com a aplicação a partir da CA-II do “mix” de poluentes no substrato, caracterizado pelas variáveis de primeira contagem e índice de velocidade de germinação. A variável mais afetada foi o comprimento de plântulas, que apresentou redução do tamanho a partir da utilização da CA-I do “mix” de poluentes, com redução gradual do tamanho das plântulas conforme aumento da concentração.

3.2. Comprimento Radicular do modelo experimental *Allium cepa* L. (bulbo)

As análises do crescimento radicular indicaram que o “mix” de poluentes na maior concentração (CA-III) induziu um efeito fitotóxico, devido à redução significativa no comprimento das raízes em todos os tempos de exposição avaliados quando comparados ao controle negativo (Figura 3). O comprimento das raízes foi reduzido com o aumento da concentração do “mix” de poluentes (Tabela 2; Figura 3). O grupo controle negativo (CN) apresentou maiores médias após 48 e 72 horas de exposição, não se diferenciando nestes dois tempos. As raízes expostas à CA-I e II não se diferenciaram em nenhum dos tempos testados se mostrando estatisticamente diferentes do CN, nos tempos de 48 e 72 horas. Já o comprimento das raízes da CA-I no tempo 24 horas se diferenciou estatisticamente apenas da maior concentração (CA-III), e após 48 e 72 horas se diferenciaram em todas as concentrações, exceto da CA-II que apresentou comprimento estatisticamente igual as 24, 48 e 72 horas, não se diferenciando apenas da CA-I nos tempos analisados. Na CA-III as raízes não apresentaram diferença estatística de comprimento entre os tempos, se diferindo de todas as concentrações e do CN, mostrando estatisticamente que não houve alteração no comprimento radicular em relação ao tempo de exposição e sim em consequência das concentrações do “mix” de poluentes.

Tabela 3. Resumo da análise de deviance para a variável crescimento radicular e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “Mix” de Poluentes.

Modelo	Grau de Liberdade Residual	Deviance Residual	p-valor
Nulo	59	23,1	
Tempo	57	18,8	<0,01
Tratamentos no tempo	48	4,6	<0,01
AIC		293,4	

Tempo (h)	Equação ajustada	EMAP
24	$y = 1/(0,1101 + 0,1419x)$	6,26
48	$y = 1/(0,0471 + 0,1748x)$	6,26
72	$y = 1/(0,0459 + 0,1492x)$	6,26

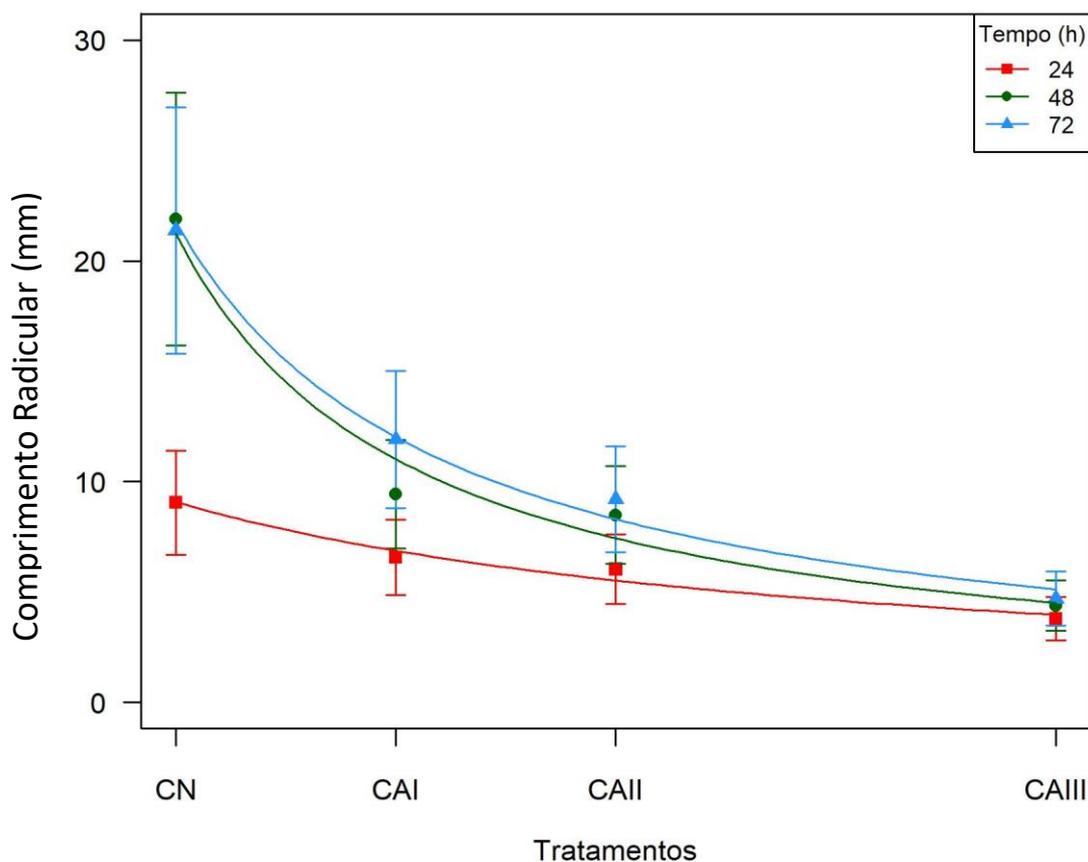


Figura 1. Índice do comprimento total do sistema radicular dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de comprimento radicular por tratamentos ao longo do tempo.

3.3. Análise do potencial Citogenotóxico e Mutagénico

É possível observar a redução do índice mitótico com o aumento da concentração do “mix” de poluentes, observando assim que as CA-I, II e III diferiram significativamente em todos os tempos de exposição em relação ao CN (Tabela 3; Figura 4). O IM das raízes expostas a CA-I não diferiu-se estatisticamente do IM da CA-II em nenhum dos tempos de exposição, assim como a CA-I e CA-II não diferiram-se da CA-III nos tempos de 48 e 72 horas. Na figura 4 ainda é possível verificar que o CP causou efeito de redução do IM no tempo de exposição de 72 horas

em relação ao tempo de 24 e 48 horas, observa se também que no tempo de 72 horas o IM do CP sofreu efeito redução, estatisticamente igual do IM das concentrações do “mix” de poluentes, diferindo do CN. O IM nos tempos de 48 e 72 horas diferiram estatisticamente do tempo de 24 horas na CA-I e CA-II sendo observado redução significativa do IM nessas concentrações e tempos, revelando que não só as concentrações do “mix” de poluentes afetaram o IM, mas sim a associação das mesmas com o tempo de exposição.

Tabela 4. Resumo da análise de deviance para a variável índice mitótico e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.

Modelo	Grau de Liberdade Residual	Deviance Residual	p-valor
Nulo	74	394,3	
Tempo	72	346,3	<0,01
Tratamentos no tempo	60	76,6	<0,01
AIC		814,1	

Tempo (h)	Equação ajustada	EMAP
24	$y = \exp(6,33 + 0,2357x + 0,0919x^{0,5})$	1,47
48	$y = \exp(6,29 - 0,6955x + 0,9919x^{0,5})$	1,47
72	$y = \exp(6,37 - 0,6626x + 0,8944x^{0,5})$	1,47

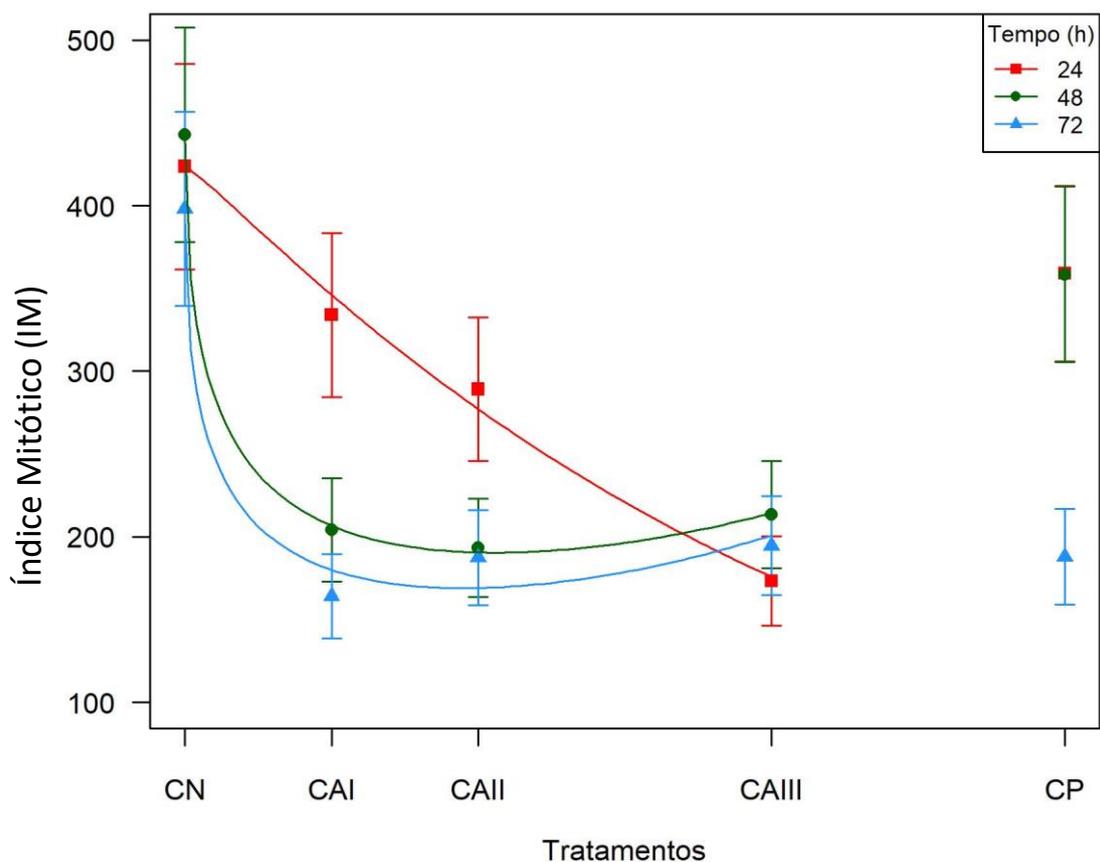


Figura 2. Índice Mitótico estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de índice mitótico por tratamentos ao longo do tempo.

3.4. Índice de Anormalidade Cromossômica (IAC)

Um efeito de indução de anormalidades cromossômicas foi constatado de acordo com que há um aumento das concentrações e tempo de exposição ao “mix” de poluentes (Tabela 4; Figura 5). Como observou-se na figura 6 e tabela 5, houve um efeito de indução não apenas em número de anormalidades, mas em variação de tipos de anormalidades em todas as fases da divisão celular. No tempo de 24 horas de exposição na CA-II, o IAC diferiu estatisticamente do observado nas CA-I e CP. Já o IAC do tempo de 48 horas de exposição ao “mix” houve diferença estatística da CA-I para a CA-III. Observou-se ainda que no tempo de 72 horas todas as concentrações ambientais do “mix” de poluentes e CP diferiram do CN, sendo importante ressaltar ainda que a maior concentração (CA-III) também diferiu estatisticamente do CP e da menor concentração do “mix” de poluentes (CA-I), sugerindo um alto índice de anormalidades cromossômicas observadas.

Tabela 5. Resumo da análise de deviance para a variável anormalidades e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.

Modelo	Grau de Liberdade Residual	Deviance Residual	p-valor
Nulo	74	433,4	
Tempo	72	421,0	<0,01
Tratamentos no tempo	60	63,9	<0,01
AIC		497,0	
Tempo (h)	Equação ajustada	EMAP	
24	$y = \exp(-4,51 - 5,8166x + 13,49x^{0,3})$	5,94	
48	$y = \exp(-2,65 - 3,7153x + 10,05x^{0,3})$	5,94	
72	$y = \exp(-0,47 - 2,2414x + 6,54x^{0,3})$	5,94	

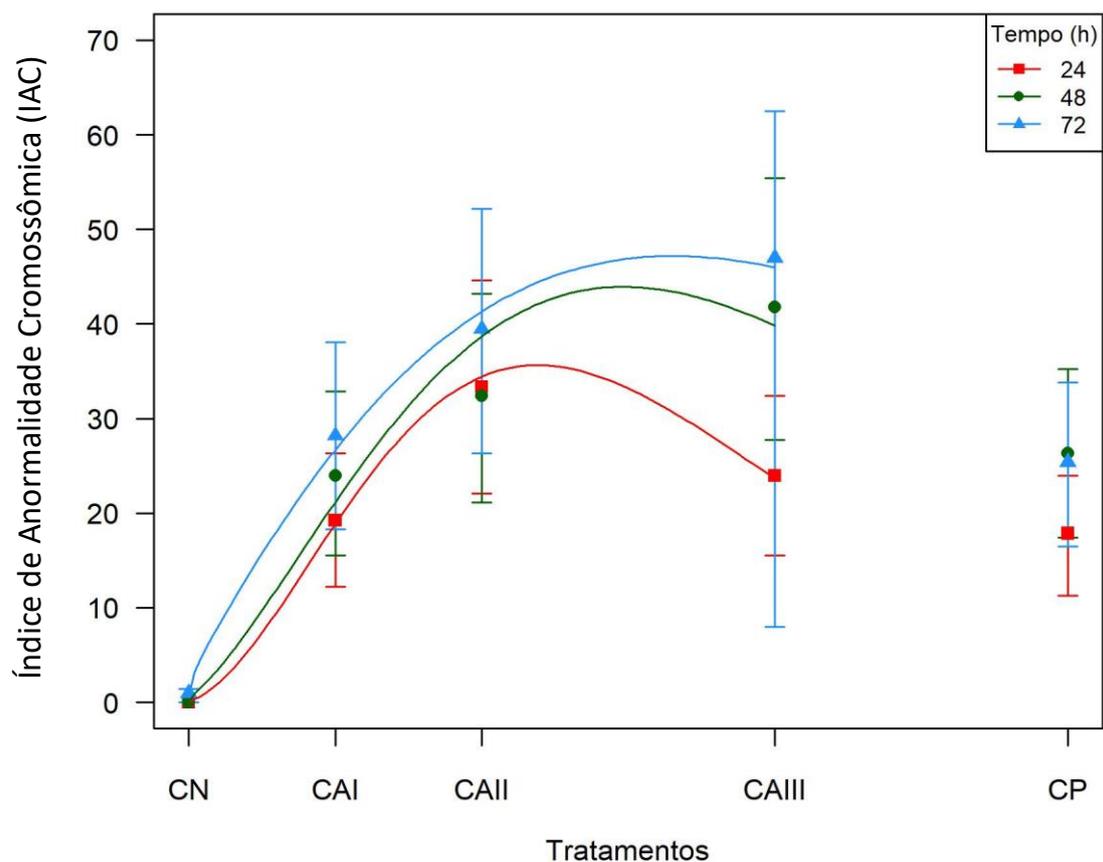


Figura 3. Índice de Anormalidade Cromossômica estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de índice de anormalidade cromossômica por tratamentos ao longo do tempo.

Tabela 6. Número real de anormalidades observadas para cada fase da divisão celular, para as concentrações do “mix” de poluentes e controles, nos tempos de exposição testados (24, 48, 72 horas).

<i>Tipos de AC por fases da divisão celular</i>	<i>Tempo de exposição (horas)</i>	<i>Anormalidades Cromossômicas (n°)</i>	<i>Total de Anormalidades por fase de divisão e tempo de exposição</i>				
		CN	CP	CA-I	CA-II	C-III	
<i>AC em Prófase</i>	24	-	06	09	07	06	28
<i>AC em Prófase</i>	48	-	03	15	11	11	40
<i>AC em Prófase</i>	72	-	13	06	18	12	49
<i>AC em Metáfase</i>	24	-	44	51	62	45	202
<i>AC em Metáfase</i>	48	-	53	58	95	90	296
<i>AC em Metáfase</i>	72	01	74	83	86	114	358
<i>AC em Anáfase</i>	24	-	34	36	50	31	151
<i>AC em Anáfase</i>	48	-	52	41	44	69	206
<i>AC em Anáfase</i>	72	02	27	37	54	98	218
<i>AC em Telófase</i>	24	-	10	11	17	22	60
<i>AC em Telófase</i>	48	-	07	22	21	24	74
<i>AC em Telófase</i>	72	-	17	20	18	21	76
<i>Micronúcleo</i>	24	-	-	03	-	05	8
<i>Micronúcleo</i>	48	-	08	-	03	03	14
<i>Micronúcleo</i>	72	-	08	06	08	08	30
<i>Célula Necrótica</i>	24	-	-	-	40	32	72
<i>Célula Necrótica</i>	48	-	15	06	07	35	63
<i>Célula Necrótica</i>	72	-	03	08	30	03	44
<i>Total de Anormalidade por Concentração</i>		03	374	412	571	629	1989

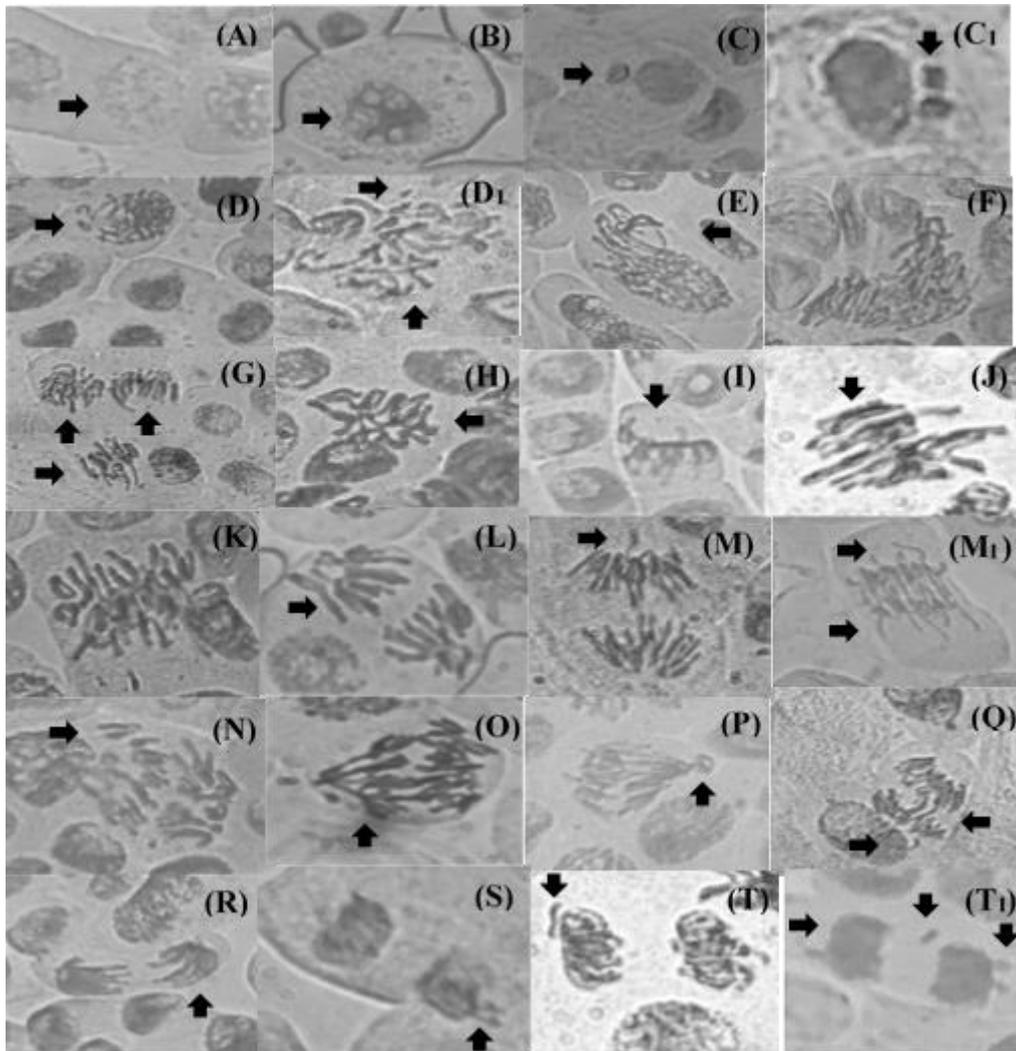


Figura 4. Anormalidades cromossômicas nas células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. expostas a concentrações ambientais do “mix” de poluentes. A: célula fantasma; B: célula necrótica; C - C1: micronúcleo; D - D1: prófase perturbada com fragmentos cromossômicos; E final da prófase com perturbação no fuso; F: final da prófase com poliploidia; G: Metáfase fragmentada com perturbação no fuso; H: c-metáfases; I: metáfase com cromossomo colhido; J: metáfase com aderência cromossômica; K: Metáfase poliploide; L: anáfase retardatória com fragmento cromossômico; M: anáfase com cromossomo retardatório e M1: início da anáfase com vários cromossomos retardatários; N: anáfase com vários fragmentos cromossômicos; O: anáfase multipolar; P: anormalidade não identificada em anáfase; Q: anáfase fragmentada com ponte cromossômica; R: anáfase diagonal; S: telófase com cromossomo retardatório; T: telófase aderente com fragmento e cromossomos retardatários. As lâminas foram coradas com Saffranin, após a fixação. No entanto, um filtro preto e branco foi aplicado às fotomicrografias para permitir uma melhor visualização da estrutura nuclear.

3.5. Micronúcleo

O índice de micronúcleo não apresentou diferença estatística em relação às concentrações e tempos de exposição, mas foi possível observar na figura 7 uma tendência ascendente da curva de dispersão dos dados em consequência do aumento das Concentrações Ambientais e tempos de exposição ao “mix” de poluentes. Foi possível observar ainda pelo intervalo de confiança uma grande variação dentro dos tratamentos a partir da CA-I principalmente no tempo de 72 horas.

Tabela 7. Resumo da análise de deviance para a variável micronúcleo e equações de regressão ajustadas em função da concentração (0 a 1x) do “mix” de poluentes.

Modelo	Grau de Liberdade Residual	Deviance Residual	p-valor
Nulo	74	107,4	
Tempo	72	101,6	0,05
Tratamentos no tempo	60	57,5	<0,01
AIC		497,0	

Tempo (h)	Equação ajustada	EMAP
24	$y = \exp(2,43 - 0,0943x)$	31,5
48	$y = \exp(2,73 - 0,5995x)$	31,5
72	$y = \exp(2,68 - 0,4495x)$	31,5

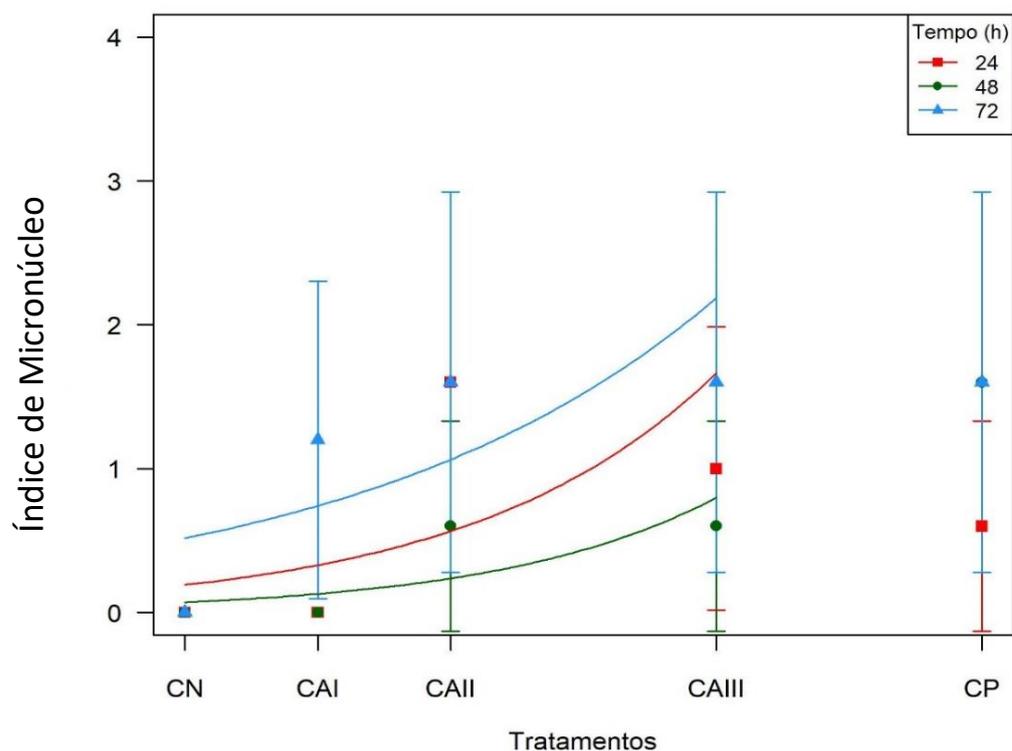


Figura 5. Índice de Micronúcleo estimado a partir de 5 mil células (para cada concentração e tempo de exposição) meristemáticas das raízes dos bulbos de *Allium cepa* L. expostos ou não as concentrações ambientais do “mix” de poluentes, formado a partir de representantes da classe de resíduos farmacêuticos; hidrocarboneto; de resíduos agroindustriais; de hormônio sintético; de fertilizantes agrícolas, pesticidas e de resíduos surfactantes. CN- Controle Negativo (água deionizada); CP- Controle Positivo (ciclofosfamida, 10 mg/mL); CAIII- Concentração Ambiental III (Concentração 1x); CAII- Concentração Ambiental II (Diluição de $\frac{1}{2}$ da concentração 1x); CAI- Concentração Ambiental $\frac{1}{4}$ da concentração 1x), em três tempos de exposição (24, 48 e 72 horas). Análise com Intervalos de 95% de confiança para as médias de micronúcleo por tratamentos ao longo do tempo.

4. DISCUSSÃO

4.1 Qualidade Fisiológica

O teste conduzido com a germinação de sementes e crescimento de raiz de plântulas de *A. cepa* L. é um indicativo do potencial contaminante dos produtos lançados no ambiente, entretanto o dano ou efeito causado depende da concentração destes componentes. Isso pode ser explicado pois, sabe-se que a deterioração das sementes pode ocorrer desde a maturidade fisiológica até no momento pós sementeira e ela depende principalmente das características do genótipo e das condições do ambiente (Marcos-Filho, 2015).

As concentrações críticas dos poluentes variaram de acordo com o parâmetro analisado, sendo ele germinação, velocidade de germinação e comprimento de plântulas, evidenciando que o crescimento total das plântulas e a velocidade de ocorrência deste processo é mais afetado pela concentração de poluentes do que a capacidade de formação de uma plântula normal (germinação). O efeito dependente do parâmetro analisado pode ser explicado pelo fato de que existe uma sequência de eventos do processo de deterioração que é contínuo, inevitável e irreversível (Marcos-Filho, 2015), sequência esta que, de acordo com Delouche & Baskin (1973) inicia com a degeneração das membranas, evolui para a redução da velocidade de germinação e da taxa de crescimento e culmina com a perda do poder germinativo.

No ambiente isto pode ser refletir na maior capacidade de as plantas iniciarem seu desenvolvimento, porém não completarem, de forma rápida e uniforme, devido à absorção dos poluentes. A germinação de sementes ocorre apenas na presença de umidade, em três fases, sendo elas, embebição da semente na presença de água, transporte de substâncias de reservas e protusão da radícula (Marcos Filho, 2015). Assim espera-se que a qualidade desta água embebida afete a eficiência da embebição e dos eventos metabólicos subsequentes.

A germinação dentro de um processo de deterioração é o último estágio a ser afetado, uma vez que está relacionado a viabilidade da semente, ou seja, o vigor pode ser afetado, mas mesmo em condições adversas, havendo a presença de umidade, temperatura e luz a germinação pode ocorrer (Carvalho & Nakagawa, 2012). A formação da plântula ocorrerá apenas na presença de água, assim possivelmente o potencial hídrico pode ter diminuído com a presença dos sais dos poluentes, uma vez que a salinidade pode levar a solução a potenciais hídricos muito negativos que, especialmente no início da embebição, influenciam a absorção de água, podendo inviabilizar a sequência dos eventos relacionados ao processo germinativo das sementes (Bansal, Bhati & Sen, 1980), ou afetá-los de forma a prejudicar a velocidade ou a eficiência deste processo, especialmente quando a altas concentrações como no caso do “mix” na CA-III.

Isso foi observado em sementes de alface (Franco et al., 2017; Thode Filho et al., 2019). Entretanto, quando as sementes são expostas a condições que ainda há água livre no sistema, o processo germinativo pode ocorrer sem afetar a porcentagem final. Este mesmo comportamento foi observado por Rosa et al., (2015), que ao avaliarem a exposição de sementes de *A. cepa* L. aos efluentes bruto e tratado, nas concentrações 25%, 50%, 75% e 100%, identificaram que a germinação foi pouco influenciada pelas concentrações do poluente.

Pela análise do comprimento das plântulas (Tabela 7) foi possível verificar o menor crescimento quando expostas aos poluentes, em relação ao CN, confirmando a posição de Alvin et al., (2011) que relataram que mudança nas condições ambientais, associadas a poluição, podem causar redução do crescimento radicular. Essa redução do comprimento a partir das menores concentrações de poluentes pode estar relacionada a dificuldade de absorção de água pela semente, uma vez que apesar de ter havido a protrusão da radícula, pela umidade do meio, não houve condições hídricas necessárias para a ativação de enzimas e transporte de reservas para o desenvolvimento completo da plântula. Este cenário deve ter ocorrido devido à presença principalmente de sais que compõem os poluentes, causando uma tensão osmótica provocada pela diminuição do potencial de água no meio e, por conseguinte, pela restrição de absorção de água pelas raízes e transporte de reservas (Thode Filho et al., 2020).

Esta condição, além de causar toxidez, quando se acumulam nos tecidos vegetais, pode acarretar mudanças na capacidade da planta em absorver, transportar e utilizar os íons essenciais ao seu crescimento (Lacerda et al., 2004). Thode Filho et al., (2019), comenta que a inserção de poluentes no substrato para a germinação de sementes tem efeito deletério sobre as características morfológicas da plântula a ser formada. Portanto, que a redução do desenvolvimento vegetativo provocado pela presença dos poluentes, pode comprometer seriamente o desenvolvimento vegetativo desta planta ou de outras espécies vegetais em condições de campo.

A velocidade de germinação foi afetada a partir da CA-II do “mix” de poluentes. Ferreira & Borghetti (2004) explicam que em muitas vezes o efeito tóxico das substâncias não é sobre a germinação, mas sobre a velocidade de germinação ou outro parâmetro do processo, como exemplo o comprimento. Resultados similares foram encontrados por Cuchiara, Borges & Bobrowski (2012) ao testarem sementes de alface e cebola como bioindicadores de qualidade da água de acordo com as estações do ano e por Moraes et al., (2002) ao estudarem o efeito de contaminantes na germinação e no vigor de sementes de arroz. Os testes que avaliam a velocidade de germinação, como a primeira contagem e índice de velocidade de germinação foram menos sensíveis aos efeitos de substâncias químicas que o crescimento da plântula.

Segundo Rodrigues & Reis (1992), diferentes compostos químicos agem diretamente na velocidade de emissão das estruturas das plântulas, pois interferem na divisão celular, na permeabilidade das membranas e na ativação de enzimas. Cuchiara Borges, & Bobrowski (2012), atribuem esta redução da velocidade e do crescimento a interferência na divisão celular, como as aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas radiculares de cebola, submetidas a tratamento com água contaminada.

Moraes et al., (2002) em estudos com sementes de arroz submetidas a cloreto de amônio (NH₄Cl) observaram ainda que contaminantes como este podem ter afetado negativamente a composição e manutenção das membranas celulares durante a exposição as substâncias, permitindo a lixiviação de sais minerais, açúcares, proteínas e outros componentes da semente levando ao processo de deterioração e perda do vigor. Rodrigues et al., (2013) ainda verificaram que essa diminuição de comprimento e de velocidade pode estar relacionada a redução da capacidade de conversão destas reservas na presença dos poluentes. Pois, o aumento da salinidade, fator presente no “mix” de poluentes, pode prejudicar a permeabilidade aos íons de sódio e potássio, por exemplo, que são fatores importantes no ganho de biomassa e seu influxo por meio de vias metabólicas.

4.2 Citogenotóxico e Mutagênico

É fundamental a combinação das análises macroscópicas e microscópicas para determinar os efeitos tóxicos de compostos lançados no ambiente (Andrade et al., 2010), exatamente como observado neste trabalho, onde a diminuição do IM (Figura 4) e o aumento do IAC (Figura 5) devido ao aumento das concentrações do “mix” de poluentes corroboraram a redução significativa no sistema radicular dos bulbos de *A. cepa* L. (Figura 3).

De acordo com Sobrero & Ronco (2004) mesmo que as concentrações não sejam tão nocivas a ponto de inibir a germinação, podem retardarem o crescimento da raiz, sendo assim um indicador de efeito subletal, pois a fase inicial do desenvolvimento das raízes é muito sensível a substâncias estranhas ao metabolismo da planta, podendo acarretar em plântulas anormais (Ferreira & Borghetti, 2004). Outro importante parâmetro para se avaliar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular é o índice mitótico (Smaka-Kincl et al., 1996; Sobral et al., 2013), o qual constitui um indicador de divisão celular adequada, sendo sua diminuição utilizada para inferir sobre efeitos citotóxicos (Leme & Marin-Morales, 2009; Tedesco & Laughinghouse, 2012; Souza, 2006; Hoshina, 2002), como observado neste trabalho e também por Silva et al., (2020) onde as concentrações do fármaco (paracetamol) inibiu a divisão celular causando efeito citotóxico em *A. cepa* L.

Exposições a substâncias químicas podem causar alterações cromossômicas caracterizadas por modificações estruturais, sendo observadas pelas quebras, inibição da síntese ou replicação do DNA ou as alterações cromossômicas numéricas como poliploidia e aneuploidia que são consequência da divisão incorreta dos cromossomos (Leme & Marine-Morels, 2009). Neste trabalho observou-se diferentes anormalidades cromossômicas, tais como os cromossomos retardatários (Figura 6. L, M, S, T) que resultam da falha dos cromossomos em mover-se para qualquer um dos polos, ou de fragmentos cromossômicos acêntricos (Figura 6. L, M, Mi, S, T) que permanecem como retardatários (Turkoglu, 2007).

Já a poliploidia cromossômica na metáfase (Figura 6. K) (anormalidade não reversível) foi observada em todas as concentrações e tempos de teste, exceto para ambos os controles (CP e CN). Esta anormalidade pode ter sido causada pela não ligação dos microtúbulos aos cromossomos por problemas na região dos centrômeros (Freitas et al., 2016), afetando a segregação dos cromossomos para as células filhas levando a formação de células poliploides, fazendo que haja a parada do ciclo celular em metáfase, originando assim as c-metáfases (Figura 6. H) que só não foi evidenciada na CAII no tempo de 48 horas e no controle negativo (CN) de todos os tempos, assim como observado por Fernandes et al., (2007) onde após a exposição das raízes de *A. cepa* L. as concentrações do herbicida trifluralina foi observado células poliploides e consequentemente c-metáfases.

As pontes cromossômicas na anáfase (Figura 6. Q) foram observadas no CP e em todas as concentrações do “mix” e tempos de exposição exceto na CAI no tempo de 48 horas, essas ACs resultaram da fusão e quebra de cromossomos devido a processos mutacionais estruturais, algumas podem levar a morte celular, podendo assim ter causado a necrose devido ao estresse induzido por agentes químicos tóxicos, sendo essa anormalidade observada nas concentrações do “mix” de poluentes nos três tempos de exposição testados, anormalidade essa que envolve simultaneamente muitas células e é resultado de lesões celulares, um processo que leva a danos metabólicos e, por fim, à morte celular, como relatado por Zakeri & Lockshin, (2002). Já a anáfase multipolar (Figura.6. O) é resultado da segregação incorreta das cromátides, podendo ser devido ao encurtamento e alongamento de alguns microtúbulos do fuso mitótico, levando a desorientação dos cromossomos e consequentemente podendo vir a originar os micronúcleos.

O “mix” de poluentes testado além de possuir efeito citotóxico evidenciado pelo IM em relação ao CN, possui efeito clastogênico que induziu as quebras e pontes cromossômicas e efeito aneugênico que inativou a estrutura celular como por exemplo as funções do fuso levando a perdas cromossômicas (Figura 6. I), cromossomos desorientados, atrasados, multipolaridades e c-metáfases (Leme & Marin-Morales, 2009). Resultados semelhantes de efeito genotóxico e

citotóxicos foram registrados para *A. cepa* L. exposto a diferentes substâncias químicas, como no estudo de Parvan, et al., (2020) onde o herbicida flumioxazina causou citotoxicidade na menor concentração testada e genotoxicidade em todas as concentrações utilizadas. E como também observado por De Alencar et al., (2019) que evidenciou genotoxicidade em todas as concentrações testadas do antisséptico bucal gluconato de clorexidina 0,12 %.

5. CONCLUSÃO

A partir do modelo experimental *Allium cepa* L., considerando diferentes concentrações ambientalmente relevantes do “mix” de poluentes e tempos de exposição, é evidenciado citotoxicidade devido ao efeito de redução do comprimento radicular e redução significativa do Índice Mitótico (IM). O “mix” de poluentes também causa efeito indução de anormalidades cromossômicas, evidenciando a genotoxicidade além de danos fisiológicos na germinação e desenvolvimento inicial de plântulas de *A. cepa* L., que sugerem danos na qualidade fisiológica das sementes expostas ao “mix” de poluentes. Logo, nosso estudo corrobora nossa hipótese inicial de “shedding light” sobre a toxicidade do “mix” de poluentes sobre a biota vegetal aquática, já que ainda são insuficientes as informações da nocividade do “mix” de inúmeros poluentes lançados no ambiente, que afetam as plantas aquáticas do bioma Cerrado, sendo preocupante já que a fixação do dano na geração subsequente de células divididas por erros pode afetar o organismo como um todo e até mesmo o ambiente onde esses componentes do “mix” são encontrados.

6. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Federal Goiano - Campus Urutaí pela estrutura oferecida que viabilizou a realização das análises, ao Laboratório de Pesquisas Biológicas do referido campus, à Profa. Dra. Érika Fernandes Leão, pelo suporte nas análises da qualidade fisiológicas de sementes e ao Prof. Dr. Anderson Rodrigo Silva, pela grande colaboração nas análises estatísticas deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AKINBORO, A. et al. Antioxidantes em extrato aquoso de *Myristica fragrans* (Houtt.) Suprimem mitose e aberrações cromossômicas induzidas por ciclofosfamida em células de *Allium cepa* L. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 12, n. 11, pág. 915-922, 2011.
- ALTERI, M. Sustainable agricultural development in Latin America: exploring the possibilities. *Agric. Ecosystems Environ.* 39:1-2, 1992.
- AMARAL, M. C. E., et al. Guia de campo para plantas aquáticas e palustres do estado de São Paulo: 1-452. Holos, Ribeirão Preto, 2008.
- BABICH, H.; SEGALL, M. A; FOX, K.D. The Allium Test - A Simple, Eukaryote Genotoxicity Assay. *New York: The American Biology Teacher*, 59 (9), pág. 580-83, 1997.
- BANSAL, R. P.; BHATI, P. R.; SEN, D. N. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. *Biologia Plantarum*, 22(5), 327-331, 1980.
- BARGANSKA, Z. and Namiesnik, J. Pesticide analysis of Bee and Bee product samples, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40: 159-171, 2010.
- BILA, D. et al., Estrogenic activity removal of 17 β estradiol by ozonation and identification of by-products. *Chemosphere*, v. 69, n. 5, pág. 736-746, 2007.
- BORGES, A. T. et al., A resolução de problemas práticos no laboratório escolar. III ENPEC. Atibaia, SP, pág. 8, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA, pág. 399, 2009.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72(5), pág. 722-725, 2008.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 5.ed. Jaboticabal: FUNEP, pág. 590, 2012.
- CERVI, A. C. et al., Macrófitas aquáticas do Município de General Carneiro, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica* 9: 215-222, 2009.
- CHAGAS, T. Q. et al., Behavioral toxicity of tannery effluent in zebrafish (*Danio rerio*) used as model system. *Science of the Total Environment*, v. 685, pág. 923-933, 2019.
- CUCHIARA, C. C.; Borges, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sensibilidade de sementes de hortaliças na avaliação da qualidade da água em bioensaios. *Biotemas*, 25(3), pág.19-27, 2012.
- DA SILVA, S. F. I. et al., Modulação dos efeitos citotóxicos e mutagênicos do paracetamol pelo suco de caju e cajuína em meristemas de raízes de *Allium cepa*. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 12, n. 6, pág. e1909-e1909, 2020.

DE ALENCAR, E. L. C. et al., Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade do antisséptico bucal gluconato de clorexidina 0, 12% em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*. 2019.

DE SOUZA, J. M. et al., A ingestão de água contendo uma mistura de poluentes em concentrações ambientalmente relevantes leva ao déficit de resposta defensiva em camundongos C57Bl/ 6J machos. *Ciência do Ambiente Total* , v. 628, pág. 186-197, 2018.

DELOUCHE, J. C.; Baskin, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, 1(3), pág. 427-452, 1973.

DO AMARAL, D. F. et al., Insights about the toxic effects of tannery effluent on *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Science of the total environment*, v. 621, pág. 791-801, 2018.

EICKHOFF, P.; HEINECK, I.; SEIXAS, L. J. Gerenciamento e destinação final de medicamentos: uma discussão sobre o problema. *Rev. Bras. Farm., Rio Grande do Sul*, v. 90, n. 1, pág. 64-68, 2009.

ESTRELA, F. N. et al., Resposta defensiva a potenciais predadores de camundongos Swiss expostos a água contendo resíduos de cigarro. *Multi-Science Journal*, 1(8), pág. 8-8, 2017.

ESTRELA, F. N. et al. Short-term social memory deficits in adult female mice exposed to tannery effluent and possible mechanism of action. *Chemosphere*, 184, pág. 148-158, 2017.

FATMA, F.; VERMA S.; KAMAL, A. and Srivastava, A. Monitoring of morphotoxic, cytotoxic and genotoxic potential of mancozeb using *Allium* assay. *Chemosphere*. Pág. 1-7, 2017.

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*. San Diego, v. 88, n. 3, pág. 252-259, 2007.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed. Pág. 323, 2004.

FRANCO, H. A. et al., (2017). Ecotoxicidade de lixiviado de aterro sanitário na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa L.*) e pepino (*Cucumis sativus L.*). *Revista de Estudos Ambientais*, 19(1), 36-43. Jaboticabal: UNESP, pág. 160, 1992.

FREITAS, A. S. et al., Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa L.* *Ecotoxicology and Environmental Safety*. San Diego, v. 124, pág. 426-434, 2016.

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. *Relação de trabalhos do Congresso Nacional de Genética*, pag. 48, 2002.

LACERDA, C. D. et al., Influência do cálcio sobre o crescimento e solutos em plântulas de sorgo estressadas com cloreto de sódio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28(2), pág. 289-295, 2004.

LAURANCE, W. F.; SAYER, J.; CASSMAN, K. G. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. *Trends in Ecology & Evolution*. 29 (2): pág. 107-116, 2014.

LELES, D. Avaliação ecotoxicológica de efluente têxtil com corante utilizando sementes de *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. Monografia. Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Goiás. Pág. 45, 2017.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research-reviews In Mutation Research*. Amsterdam: Elsevier B.V., v. 682, n. 1, pág 71-81, 2009.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination—Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor 1. *Crop science*, 2(2), pág. 176-177, 1962.

MAPBIOAMAS - Projeto de Mapeamento Anual da Cobertura e Uso do Solo do Brasil. Disponível em: <http://mapbiomas.org>. Acessado em 06 de Junho de 2020.

Marcos Filho, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALq, pág. 659, 2015.

MENDES, B. O. et al., Mice exposure to tannery effluents changes their olfactory capacity and their response to predators and to the inhibitory avoidance test. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 24 (23): pág. 19234-19248. 2017.

MESNAGE, R. et al., Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*. 84: pág. 133-153, 2015.

MONTALVÃO, M. F. et al., The genotoxicity and cytotoxicity of tannery effluent in bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Chemosphere* 183, pág. 491-502, 2017.

MORAES, D. M. D. et al. Sensibilidade de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) submetidas a contaminantes químicos originários da atividade humana. *Revista Brasileira de Sementes*, 24(2), pág. 38-42, 2002.

PARVAN, L. G. et al., Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 11, pág 10-10, 2020.

PEIXOTO, J.C. et al. Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, Chemical and Biological Profile. *Molecules*. 24(16). 10.3390/molecules24162891, aug. 2019.

PINTO, L. H. et al., O meio ambiente e sua representação social: relação e interface com a saúde contrapondo a medicamentação do processo de saúde. In: SOUSA, Isabelle Cerqueira (Ed.). *Ciências da Saúde no Brasil: Impasses e Desafios* 9. 1. ed. [s.l.]: Atena Editora, pág. 172-180, 2020.

PINTO, L. H. et al., O uso racional de medicamentos no Brasil dentro da assistência farmacêutica brasileira e suas implicações no presente. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 12, n. 1, pág. 27, 2015.

PITELLI R. L. C. M. et al., Composição específica e distribuição da comunidade de macrófitas aquáticas no reservatório de Aimorés. *Planta daninha* 32: 475-482, 2014.

PIVARI, M. O. D. et al., Macrófitas aquáticas do sistema lacustre do Vale do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 62(4): 759-770, 2011.

PIVARI, M. O. D. et al., New initiatives for Brazilian aquatic plant data management. *Acta Botanica Brasilica*. Submitted 24-Sep-2018.

PIVARI, M. O. D.; POTT V. J.; POTT A. Macrófitas aquáticas de ilhas flutuantes (baceiros) nas subregiões do Abobral e Miranda, Pantanal, MS, Brasil. *Acta Botânica Brasilica* 22(2): 563-571, 2008.

POTT, V. J. Plantas aquáticas do Pantanal e da Alta Bacia. *Anais do Congresso de Ecologia do Brasil* 8: 1-3, 2007.

RANK, J. et al., Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. *Hereditas*, 136(1), pág. 13-18, 2002.

RODRIGUES, L. C. D. A. et al., Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 17(10), pág. 1099-1108, 2013.

RODRIGUES, L. R. A.; RODRIGUES, T. J. D.; REIS, R. A. Alelopatia em plantas Forrageiras.

ROMERO, P. R., & CANTÚ, A. M. (Eds.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: la experiencia en México*. Instituto Nacional de Ecología. 2008.

ROSA, M. et al., Potencial citogenotóxico de efluente de indústria de bebidas não alcoólicas em cebola. *Disciplinarum Scientia Naturais e Tecnológicas*, 16(3), pág. 459466, 2015.

SAMPAIO, D. M. R. et al., Ingestão de efluente de curtume como fator de risco à saúde das aves: Estudo toxicológico utilizando *Coturnix coturnix japonica* como sistema modelo. *Science of The Total Environment*, v. 681, pág. 275-291, 2019.

SMAKA-KINCL, V. et al., The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, v. 368, n. 3-4, pág. 171-179, 1996.

SOBRAL, O.; MARIN-MORALES, M. A.; RIBEIRO, R. Could contaminat induced mutations lead to a genetic diversity overestimation? *Ecotoxicology*, v. 22, pág 838-846, 2013.

SOBRERO, M. S.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga In: *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de calidad de aguas: Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones*. Facultad de Ciencias Físicas e Matemáticas Ed. Chile. cap. 4, 2004.

SOLTIS, D. E. et al., *Phylogeny and evolution of Angiosperms*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland. 2005.

SOUZA, J. M. et al., The intake of water containing a mix of pollutants at environmentally relevant concentrations leads to defensive response deficit in male C57Bl/6J mice. *Science of the Total Environment*. 628-629: pág. 186-197, 2018.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 605(12), pág. 87-93, 2006.

TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE, H. D. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test. *Environmental Contamination*. Shanghai. Pág. 137-156, fev, 2012.

THODE FILHO, S. et al., Avaliação do impacto do extrato solubilizado da borra de café sobre de germinação de sementes de alface. *Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science* 9 (1), pág. 414-23, 2020.

THODE FILHO, S. et al., Avaliação ecotoxicológica do extrato solubilizado de bagaço de cana-de-açúcar residual via germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). *Revista de Estudos Ambientais*, 21(1), pág. 46-55, 2019.

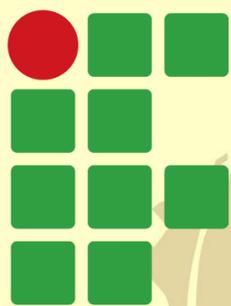
THOMAZ S. M & BINI L. M. Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios. *Acta Limnologica Brasiliensia* 10(1): 103-116, 1998.

TRINDADE, C. R., S. A. PEREIRA, E. F. ALBERTONI & C. P. SILVA. Caracterização e importância das macrófitas aquáticas com ênfase nos ambientes límnicos do campus Carreiros-FURG, Rio Grande, RS. *Cadernos de Ecologia Aquática* 5(2): 1-22, 2010.

TURKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat*, 626: pág. 4-14, 2007.

VAN BRUGGEN, A. H. C. et al., Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment*. 676 - 617: pág. 255-268, 2018.

ZAKERI, Z.; LOCKSHIN R. A. Cell death during development. *J Immunological Methods*. 265: pág. 3-20, 2002.



INSTITUTO FEDERAL

Goiano

Campus
Urutaí

