Análise de águas destinadas à recreação de contato primário (cachoeira Guaxinduva) utilizando *Tradescantia pallida* como bioindicador de genotoxicidade.

Aline Spasiani Ferreira[1], Gustavo Henrique Gonçalves[1], Luciana Bizeto[1], Claudia Moura[1], Ana Beatriz Carollo Rocha-Lima[1*].

1 – Instituto de Ciências da Saúde – Universidade Paulista – UNIP (*Campus* Jundiaí).
*Autor de Correspondência: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima - E-mail: abeatrizcrl@gmail.com Os autores declaram não haver conflito de interesses.
Trabalho desenvolvido na área de Toxicologia e Saneamento Ambiental
Endereço: Universidade Paulista - UNIP, *campus* Jundiaí, Instituto de Ciências da Saúde. Avenida Armando Giassetti, 577 - Vila Hortolândia - Trevo Itu/Itatiba - Jundiaí – SP, CEP 13214-525, Tel.: (11) 4815-2333.

Resumo

O presente trabalho objetivou analisar a toxicidade de amostras de água coletadas na Cachoeira do Vale de Guaxinduva da cidade de Cabreúva-SP em relação aos controles branco, positivo e negativo, utilizando o vegetal da espécie *Tradescantia pallida purpurea* como bioindicador da qualidade de água. Para isso, foram coletadas aproximadamente 80 a 100 hastes da espécie *Tradescantia pallida purpurea* (Trad-MCN), que passaram por etapas do processo de intoxicação com a amostra da água coletada; posteriormente realizou-se a confecção de lâminas extraindo e macerando os botões de hastes jovens que foram coradas, após este processo foi realizado a leitura microscópica de 300 tétrades para cada amostra. Houve média prevalência de micronúcleos na amostragem das águas coletadas para o estudo em relação ao controle positivo, e ainda que moderado o número é superior ao controle negativo. Entende-se que a média prevalência de micronúcleos encontrados na amostra experimental indica valores intermediários de substâncias tóxicas na água analisada, de maneira que esta não deve ser considerada inócua à recreação de contato.

Palavras-chave: Mutagênese, bioindicador, Trad-MCN, monitoramento ambiental, toxicologia.

Analysis of recreation of primary contact water (Guaxinduva waterfall) using *Tradescantia pallida* as a genotoxicity bioindicator.

Abstract

The objective of the present work was to analyze the toxicity of water samples collected at the Caburava Valley waterfall in the city of Cabreúva in relation to white, positive and negative controls using the plant of Tradescantia pallida purpurea as a bioindicator of water quality. For this, approximately 80 to 100 stems of the species Tradescantia pallida purpurea (Trad-MCN) were collected, which went through stages of the intoxication process with the collected water sample; afterwards the preparation of slides was extracted and macerated the buds of young stems that were stained, after this process was performed the microscopic reading of 300 tetrad for each sample. There was a mean prevalence of micronuclei in the sampling of the waters collected for the study in relation to the positive control, and although moderate the number is higher than the negative control. It is understood that the average prevalence of micronuclei

found in the experimental sample indicates intermediate values of toxic substances in the analyzed water, so that it should not be considered innocuous to recreation of contact.

Keywords: Mutagenesis, bioindicator, Trad-MCN, environmental monitoring, toxicology.

Introdução

Nota-se que a procura por atividades de lazer ao ar livre em cenários naturais, como parques e destinos hídricos como cachoeiras e praias, tem crescido cada vez mais. Isto se deve principalmente à carência que se evidencia hoje em dia de atividades em contato com a natureza, em consequência do cotidiano da vida urbana, cada vez mais moderna e tecnológica[1].

A cidade de Cabreúva, interior de São Paulo, é conhecida por sua riqueza em recursos hídricos, oferecendo condições e atividades propícias para recreação aquática em meios naturais como rios, lagos e cachoeiras, assim como a cachoeira do Vale Guaxinduva, foco do estudo presente. Este contato primário com a água requer atenção quanto à sua qualidade devido ao risco à saúde humana através do contato direto com possíveis agentes causadores de patogenias, além de óleos, graxas e metais pesados[2].

Em contrapartida aos grandes centros urbanos, ocupando uma área de um pouco mais de 1500 hectares, o Vale do Guaxinduva – foco do presente estudo – é rota do ecoturismo da região por suas cachoeiras. O Vale faz parte do complexo da Serra do Japi e conta com 75% da sua área preservada. Sua extensão em grande maioria encontra-se em propriedade particular, aberta ao público sob uma taxa de entrada para os usuários, resguardando a preservação do local, porém há trechos que abrangem sua extensão, mas que são de acesso em via pública, portanto não se paga nenhuma taxa nesses trechos, sendo utilizada por banhistas de forma livre e constante[3].

Entretanto, o desenvolvimento dessas atividades turísticas, somado aos demais fatores urbanos de poluição industrial e doméstica, aumentam progressivamente o impacto ambiental e por sua vez, a qualidade da agua é comprometida, o que ressalta a importância de ações de biomonitoramento[1,4].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que 25 milhões de pessoas morrem por ano, em todo o mundo devido a doenças relacionadas à água[5]. As grandes concentrações de poluentes tornam-se um risco eminente para a saúde humana e para a vida aquática, dentre outros organismos presentes[6].

A água pode ter suas características alteradas de diversas formas, entre elas: alterações de forma biológica, contendo agentes patogênicos como bactérias, dentre elas as mais importantes pertencentes à família Enterobacteriaceae e os cocos Gram–negativos responsáveis por infecções intestinais; alterações de forma química por agentes não biodegradáveis como detergentes, petróleo, etc. e alterações de forma física através de resíduos sólidos[7].

Os níveis determinados pelo Índice de Qualidade da Água (IQA) foram estabelecidos aqui no Brasil pela Resolução 357/2005 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) e leva em consideração a temperatura, o odor, turbidez, presença de espumas, lixo, peixes, larvas e vermes brancos ou

vermelhos, coliformes totais, oxigênio, potencial hidrogeniônico, níveis de nitrato e níveis de fosfato[5,8].

A água utilizada para recreação é classificada através do tipo de contato que o usuário faz com a mesma. Atividades classificadas de contato primário são aquelas em que o usuário pode ingerir eventualmente uma grande quantidade de água, como no mergulho, natação, surfe, windsurfe, esqui-aquático, canoagem entre outras, o que exige que estas águas sejam de boa qualidade e balneabilidade para não ser uma ameaça à saúde humana. Já no contato secundário são listadas atividades como pesca e navegação em que o risco de ingestão volumoso de água é baixo[9].

A água qualificada como balneável é aquela propícia para atividades esportivas ou banho, ou seja, balneabilidade refere-se à qualidade das águas de contato primário[10].

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA determina que as águas de classe II são destinadas às atividades de recreação de contato primário, entre outras finalidades, e estabelece que nesta classe não seja permitido a presença de corantes artificiais não removíveis por processos convencionais; a cor deve ser até 75mg Pt/l, a turbidez de até 100 UNT, e terão sua condição classificadas em categorias: excelente, muito boa, satisfatória e imprópria, sendo:

- Excelente: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas no mesmo local, obtiver no máximo 1.250 coliformes totais por 100 mililitros;
- Muito boas: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas no mesmo local, obtiver no máximo 2.500 coliformes totais por 100 mililitros;
- Satisfatórias: quando em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas no mesmo local, obtiver no máximo 5.000 coliformes totais por 100 mililitros;
- Impróprias: quando as condições não se enquadrarem em nenhuma das categorias anteriores, presença de despejo de resíduos ou sinais de poluição por esgoto, enfermidade na região transmitida por via hídrica, pH maior que 8,5 e menor que 5 e qualquer outro fator que preconiza o a atividade recreação de contato primário[11].

O Biomonitoramento é um recurso útil, seguro e vantajoso para analisar o equilíbrio das comunidades bióticas e fatores abióticos que atingem essas comunidades. No Biomonitoramento faz-se o uso da resposta do organismo, o indicador biológico[4]. O tipo do bioindicador é definido por sua característica de sensibilidade a vários fatores de interesse do determinado estudo, como poluição por exemplo[12].

Para o estudo da qualidade da água, existem diversos tipos de análises que podem ser realizadas empregando vegetais como bioindicadores de substâncias tóxicas, como por exemplo, a *Tradescantia pallida purpurea* (método Trad-MCN). O bioindicador de uma forma geral é um organismo vivo que sofre uma alteração como forma de resposta à desordem que algum elemento causa no ambiente. Portanto a análise é feita através de como esse organismo vai reagir e no decorrer do processo é possível identificar mutações de forma molecular, bioquímica, fisiológica e morfológica[7]. A vantagem desse método de análise consiste basicamente por ter baixo custo, confiabilidade no resultado e técnica fácil[6].

A *Tradescantia pallida purpurea*, chamada popularmente de coração-roxo, trata-se de uma planta de coloração arroxeada e de porte pequeno que se desenvolve facilmente em qualquer ambiente durante qualquer

período do ano em qualquer região, tornando a viabilidade de seu uso ainda maior. Possui seis pares de cromossomos, e no caso de espécie diploide possui 24, dois conjuntos de pares de cromossomos; e apenas um cotilédone (folha que se forma no embrião essencial para o desenvolvimento e nutrição da planta)[13].

Durante o processo e manuseio da Trad-MCN para o estudo, ela é intoxicada em certo momento com a água de amostragem coletada do local de interesse a fim de avaliar sua genotoxicidade, ou seja, a alteração na base genética por elementos toxicológicos, alterando os micronúcleos [11].

A análise dos micronúcleos da *Tradescantia pallida* é apontada como uma das mais sensíveis para detectar agentes toxicológicos na água; esses micronúcleos se formam em células-mãe do grão de pólen que constituem os botões florais jovens da planta, e não completam a migração anafásica da divisão celular se houver a presença de tóxicos por terem sofrido a lesão pelo agente mutagênico, e não conseguirem se reparar na meiose[14].

Desta forma, a quantidade de micronúcleos que são encontrados na análise microscópica no final do processo, denota diretamente a genotoxicidade da água do local que foi realizado a coletada da amostra[15].

Materias e métodos

A análise da agua foi realizada através da utilização de vegetais bioindicadores genotóxicos *Tradescantia pallida purpurea*, coletados no município de Jundiaí-SP. Utilizando-se o método da Trad-MCN ou ensaio do micronúcleo, como também é chamado, que permite detectar se houve variações cromossômicas durante a meiose.

1. Coleta

A amostra de água foi coletada no mês de abril de 2017 aproximadamente às 10 horas da manhã, em um ponto da Cachoeira do Vale Guaxinduva conhecido por receber inúmeros banhistas, localizado no município de Cabreúva-SP, próximo às coordenadas do mapa: -23.295281, -47.009644.



Figura 1 – Coleta de água no ponto escolhido na extensão da cachoeira do vale Guaxinduva – Cabreúva-SP
Fonte: Do Autor.

As hastes da espécie *Tradescantia pallida purpurea* foram coletadas na redondeza do parque ecológico Jardim Botânico de Jundiaí-SP (Av. Navarro de Andrade, 120 - Vila Hortolândia, Jundiaí - SP, 13214-010 próximo ás coordenadas -23.170926, -46.901461). Foram coletadas cerca de 80 a 100 hastes com medidas variando de 10 a 15 cm. Para o sucesso do bioensaio as hastes foram colhidas em sua fase púbere, desta forma as mesmas compõem-se de um botão pré-inflorescente em fase de tétrade (quatro células circundadas em uma mesma membrana).



Figura 2 – Coleta das hastes da *Tradescantia* nas redondezas do parque ecológico Jardim Botânico- Jundiaí-SP
Fonte: Do autor.

2. Intoxicação

As hastes foram submetidas a uma série de etapas conforme estabelecido o protocolo da metodologia da Trad-MCN, necessário para o êxito deste ensaio, sendo:

1. **Fase de Adaptação:** Inicialmente as hastes foram colocadas em água de torneira por 24 horas para a fase adaptativa;
2. **Fase de Intoxicação:** Posteriormente, as hastes foram distribuídas entre os controles positivo (formol), negativo (água da torneira), branco (água destilada) e na amostra de água coletada (Cachoeira Guaxinduva), e permaneceram por 8 horas em cada recipiente para sofrerem a intoxicação.
3. **Fase de Recuperação:** Após este período, foram deslocadas novamente para água de torneira e permaneceram por mais 24 horas, sendo este o período de recuperação;
4. **Fase de Fixação:** Após o procedimento acima citado, as inflorescências foram colocadas no denominado fixador, que consiste em 1 parte de ácido acético para 3 de álcool etílico a 98°, e permaneceram por 48 horas. Por fim, foram retiradas e deu-se o início a confecção das lâminas para leitura[17].

3. Preparo de lâminas

Foram preparadas cerca de 80 lâminas, nas quais se utilizou botões de tamanho médio a grande, que após serem picados com bisturi estéril e amassados, foram corados com Carmin e Orceína acética nesta ordem, já na lâmina. Logo após a adição dos corantes, foram recolhidos com uma pinça os detritos dos botões amassados

(debris), acrescentando uma lamínula no liquido residual, que em seguida foi aquecido com um fogareiro na temperatura de morno a quente para selar este líquido, e então se realizou a leitura microscópica[18,19].

4. Análise microscópica

A análise microscópica foi realizada em lentes de aumento de 40 e 100 vezes a fim de observar tétrades com ou sem micronúcleos nas lâminas preparadas. Foi realizada a leitura de 300 tétrades em cada amostra analisada (somando o total de 1200 tétrades) e foi feita a contagem dos micronúcleos presentes em cada amostra.

Resultados

No controle positivo em formol foram encontrados 18 micronúcleos; no controle negativo com água de torneira foram encontrados 3 micronúcleos; no controle branco com água destilada apenas 1 micronúcleo foi localizado, e na amostra coletada na cachoeira Guaxinduva foram encontrados 8 micronúcleos, indicando assim um valor intermediário de substâncias tóxicas na água analisada, como demonstra na tabela I e no gráfico I:

Tabela I - Resultados amostrais absolutos e em percentual
Fonte: Do autor

Resultados amostrais		
Controle	Valor absoluto	% de micronúcleos
Amostra- cachoeira Guaxinduva	8	2,7%
Positivo- formol	18	6,0%
Negativo- água de torneira	3	1,0%
Branca- água destilada	1	0,3%

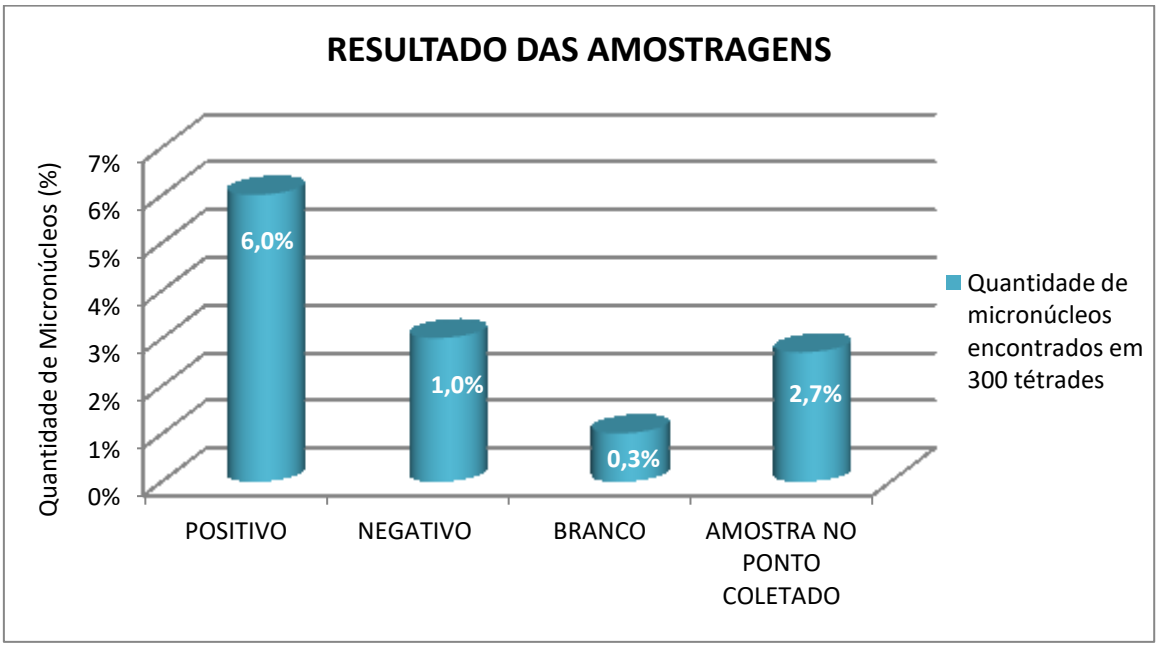

Gráfico 1 – Quantificação dos micronúcleos existentes nas tétrades analisadas.
Fonte: Do Autor.

Discussão

A quantidade de micronúcleos encontrados na amostra experimental indica um grau de toxicidade intermediário das águas da cachoeira coletada, de maneira que esta não pode ser considerada inócua, embora apresente características visuais de boa balneabilidade.

Elementos físicos e químicos são capazes de gerar mutações nas células de um organismo e a planta utilizada neste estudo - *Tradescantia pallida purpurea* - desempenha atualmente o papel de bioindicador mais aplicado em pesquisas de monitoramento de qualidade do meio, como o ar, solo e água[16]. Estudos como este têm sido cada vez mais conduzidos com enorme importância, uma vez que as atividades urbanas e industriais têm aumentado extensivamente, refletindo de modo direto na qualidade das águas em consequência ao depósito incorreto de resíduos no meio ambiente[20].

O descarte de lixos e resíduos em meio ambiente configura-se crime ambiental, prática prevista em lei como crime inafiançável[21]. Autoridades registraram em 2015 um boletim de ocorrência ao se depararem com uma grande quantidade de lixo que foi descartada em uma área de proteção ambiental próximo ao rio Piraí, localizado na cidade de Cabreúva-SP, responsável por abastecer o município e cidades vizinhas. Foram encontrados diversos copos plásticos, banco de carro, pneus, entre outros tipos de resíduos. Não se trata de um evento isolado, dado que na região já foram flagrados outros casos de crime ambiental[22].

Um estudo realizado na Faculdade de Tecnologia-FATEC, de Sorocaba avaliou o potencial genotóxico da água de um riacho localizado no próprio *campus*, bastante visitado. O estudo também utilizou o método Trad-MCN e o resultado obtido mostrou valores da amostra igualados ao controle positivo e superiores ao controle negativo, o que evidencia a genotoxicidade, provavelmente devido a resíduos originários de indústrias circunvizinha ao *campus*[23].

Conclusão

O presente estudo obteve êxito em evidenciar a sensibilidade do método Trad-MCN na análise de alterações do ambiente capazes de causar mutagênese. Torna-se sólido através deste, a precisão e competência da espécie *Tradescantia pallida purpurea* atuando como bioindicador de genotoxicidade nas análises de água realizada neste contexto.

A média prevalência de micronúcleos obtida no presente estudo indica a presença de agentes tóxicos encontrados nas águas da cachoeira do Vale Guaxinduva, frequentemente visitada por turistas que a adentram, de maneira que esta não deve ser considerada inócua à recreação de contato.

Deste modo, a quantidade de micronúcleos encontrados na amostra experimental presume uma qualidade intermediária da água a um ideal para a recreação de contato, provavelmente devido à prática de descarte irregular de lixos e resíduos de indústrias da região que fazem uso dessas áreas afastadas dos centros urbanos para esse crime ambiental, nas proximidades de nascentes, riachos, córregos e cachoeiras, contaminando assim as águas; porém análises complementares se fazem necessárias a fim de reforçar os resultados aqui obtidos.

Referências bibliográficas

1. Lopes FWA. Avaliação da qualidade das aguas e condições de balneabilidade na bacia do Ribeirão de Carrancas-MG. Universidade Federal de Lavras. 96p. 2007.
2. Companhia De Tecnologia De Sanamento Ambiental-Cetesb. Relatório de balneabilidade das praias paulistas 2002. [internet]. 2003 [citado 2017 out 1] Disponível em: http://cetesb.sp.gov.br/praias/publicacoes-relatorios/2002
3. Fazenda Guaxinduva. Ecoturismo e Aventura. [internet]. [citado 2017 mai 03] Disponível em http://www.fazendaguaxinduva.com.br/trilhas_1.html.
4. Pereira RS. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. Revista Eletrônica de Recursos Hidricos. IPH-UFRGS. 2004; 1(1):120-36
5. Organização Mundial da Saúde. Perguntas e respostas sobre qualidade da água de recreação no Rio de Janeiro, Brasil. [internet] 2014 mar 21 [citado 04 out 2017]. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5202:perguntas-e-respostas-sobre-qualidade-da-agua-de-recreacao-no-rio-de-janeiro-brasil&Itemid=875
6. Hara RV. Lopes BPV, Rodrigo FPS, Oliveira J. Aplicabilidade de ensaios da genética toxicológica no biomonitoramento de ambientes aquáticos e promoção da saúde humana. Terra e Cultura.2009; 1(1): 20-24.
7. Richter CA. Água: Métodos e tecnologia de tratamento. São Paulo: Edgard Blücher. 359p. 2009.
8. SOS Rio Cachoeira. Pesquisa mostra que qualidade da água do Cachoeira é ruim. [internet] 2010 ago 11. [citado 2017 mai 03]. Disponível em: https://sosrio.wordpress.com/2010/08/11/pesquisa-mostra-que-qualidade-da-agua-do-cachoeira-e-ruim/.
9. Lopes FWA, Junior APM. Avaliação da qualidade das águas para recreação de contato primário na bacia do alto rio das velhas –MG. Hygeia. 2010 nov 30; 6(11):133 – 149.
10. Berg CS, Guercio MJ, Ulbricht VR. Indicadores de balneabilidade: a situação brasileira e as recomendações da world health organization. Int. J. Knowl. Eng. Manag. 2013; 6(2): 83-101.
11. Conama. Resolução Conama nº20/1986. [internet]. 2015 jun 18. [citado 2017 out 04]. Disponível em: http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=43
12. Washington HG. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems**.** Water Research**.** 1984; 18(6): 653-694.
13. Patro R. Trapoeraba-Roxa– Tradescantia pallida purpúrea. Jardineiro.net [Internet]. 2013 ago 12 [citado 2017 abr de 27]. Disponível em: http://www.jardineiro.net/plantas/trapoeraba-roxa-tradescantia-pallidapurpurea.html.
14. Kiryu HS. Estudo das Condições de Balneabilidade de Praias do Lago de Ilha Solteira.Universidade Estadual Paulista: Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. 2001.

15. Savaiola EJL. Potencial de Tradescantia Pallida cv. Purpurea para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André – São Paulo, por meio de bioensaio Trad- MCN e do acúmulo foliar de elementos tóxicos. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.
16. Biasseti L, Rossin CK, Houssaini MLTS. Morfologia Vegetal Tradescantia Pallida Purpurea. Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. p. 8. 2014.
17. Guimarães ET, Carluci NN; Fogagnolli SEI, Pereira FAC. Micronúcleo em Tradescantia pallida como proposta metodológica para avaliação da presença de contaminantes mutagênicos no solo. Revista Eletrônica de Tecnologia e Cultura. 2014; 2(2).
18. Lobo DJA. Manual prático para utilização de *Tradescantia* como biomonitor e bioacumulador, Allium cepa L. (cebola) e pollen abortion. Instituto Nacional de Análise Integrada do Risco Ambiental. [internet]. [citado 2017 out. 29]. Disponível em: http://www.inaira.org/avisofile/ARQ323-Manual_prtico_para_utilizao_de_Tradescantia_como_biomonitor__bioacumulador_Allium_cepa_L_20091.pdf.
19. Barbério A. Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality. Water Treatment. 2013 jan 16. [citado 2017 out 1]. Disponível em: https://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/41948.pdf
20. Jeremias ACDF, Silva LC, Ogusucu R. Biomonitoramento da qualidade da água do IFC-Campus Camboriú com cebola (*Allium Cepa*) e Trapoeraba (*Tradescantia pallida*). Instituto Federal Catarinense. 2014.
21. Fumas - Fundação Municipal De Ação Social. Descarte irregular de lixo é crime ambiental e gera multa. 2017 jul 20. [citado 2017 out 04]. Disponível em: http://fumas.jundiai.sp.gov.br/2017/07/descarte-irregular-de-lixo-e-crime-ambiental-e-gera-multa/.
22. G1. Montanha de lixo é descartada em área ambiental em Cabreúva. [internet]. 2015 ago. 04 [citado 2017 out. 17]. Disponível em: http://g1.globo.com/sao-paulo/sorocaba-jundiai/noticia/2015/08/montanha-de-lixo-e-descartada-em-area-ambiental-em-cabreuva.html
23. Bregagnolo L, Silva LF, Batalim M, Azeredo T V, Irazusta SP. Aplicação do teste de genotoxicidade com *Tradescantia pallida* na avaliação da qualidade da água da nascente de um córrego do campus da Fatec em Sorocaba. Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais (NEPA) – Faculdade de Tecnologia de Sorocaba - CEETPS-SP. [20_?]