



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

ANA CAROLINA PRETO MALAMAN

**AVALIAÇÃO DA CITOGENOTOXICIDADE DE ÁGUAS FLUVIAIS NA ÁREA
URBANA DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE-SP ATRAVÉS DO TESTE
Allium cepa L.**

Presidente Prudente - SP

2019



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEIO
AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO REGIONAL**

ANA CAROLINA PRETO MALAMAN

**AVALIAÇÃO DA CITOGENOTOXICIDADE DE ÁGUAS FLUVIAIS NA ÁREA
URBANA DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE-SP ATRAVÉS DO TESTE
Allium cepa L.**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre – Área de concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Antonio da Silva

Presidente Prudente - SP

2019

577.6
P942a

Malaman, Ana Carolina Preto.

Avaliação da citogenotoxicidade de águas fluviais na área urbana do município de Presidente Prudente - SP, através do teste *Allium cepa* L. / Ana Carolina Preto Malaman. – Presidente Prudente, 2019.

74 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2019.

Bibliografia.

Orientador: Paulo Antonio da Silva

1. Citogenotoxicidade. 2. Biomonitoramento Ambiental. 3. Teste *Allium cepa*. I. Título

Catálogo na Fonte: Ivy Fini Rodrigues – CRB 8/7470

ANA CAROLINA PRETO MALAMAN

**AVALIAÇÃO DA CITOGENOTOXICIDADE DE ÁGUAS FLUVIAIS NA ÁREA
URBANA DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE PRUDENTE-SP ATRAVÉS DO TESTE
Allium cepa L.**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre - Área de Concentração: Meio Ambiente e Desenvolvimento Regional

Presidente Prudente, 19 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Antonio da Silva
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof^a. Dr^a. Dalita Gomes Silva Morais Cavalcante
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – UNESP
Faculdade de Ciências e Tecnologia - Campus Presidente Prudente

Prof^a. Dr^a. Leandra Ernst Kershe
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu planeta, pois esta é a forma que encontrei de contribuir, mesmo que modestamente, para sua preservação.

AGRADECIMENTOS

São tantas pessoas a agradecer pelo auxílio na conclusão deste trabalho. Primeiramente agradeço ao Prof. Antonio Fluminhan Jr. pois, apesar de todos os contratempos sofridos nesses últimos 2 anos, ele nunca deixou de me ajudar e orientar nessa jornada que foi cheia de percalços e indefinições.

Agradeço também ao Prof. Paulo Antonio da Silva, por ter tido paciência, boa vontade e compreensão ao me assumir como orientada, sempre me dando amparo em tudo que fosse necessário para o desenvolvimento das minhas atividades, além das oportunidades de participação em eventos e outros momentos que contribuíram muito no meu crescimento intelectual e profissional.

Agradeço os meus colegas, que na época em que iniciei os experimentos, eram graduandos ainda, Wellynton de Lima Silva (meu braço direito), Iago Fernandes Santos, André Carrion de Fares Pinto e Gabriela Araújo Lourenço, por toda a ajuda nos trabalhos de campo e no laboratório, e por me aturarem durante esse período todo. Ao final eles acabaram me ensinando muito mais do que eu à eles. Agradeço aos funcionários dos laboratórios e demais departamento da universidade que através de pequenos ou grandes gestos fizeram com que as coisas fossem indo em frente, ressaltando a Prof. Edna, Cida, Cris, Ivana, Géssica, Flávio e especialmente ao Daniel Ângelo Macena que, como é referenciado duas vezes em seu nome, foi um anjo na minha vida, me ajudando na realização das análises químicas e me divertindo com seu senso de humor inteligente e ácido nas horas de tensão, que não foram poucas.

Agradeço à Prof. Marjori Leiva Camparoto, ao Prof. Hermann Bremer Neto, ao Prof. Edson Mareco, à Fátima e a Sandra do laboratório de bioquímica, ao Bruno Carrino Suave, Ronaldo Otakara, e outras inúmeras pessoas que de alguma forma ajudaram no desenvolvimento da minha pesquisa.

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Dalita e Leandra, que foram as melhores que eu poderia ter. As críticas e sugestões foram essenciais na discussão dos meus resultado e me ajudaram muito chegar até aqui, mesmo sabendo que tenho muito a melhorar ainda.

Agradeço à Joice, secretária e anjo da guarda de todos os alunos do PPGMADRE. Agradeço a todos professores e coordenadores do PPGMADRE e aos meus colegas de pós-graduação, Antonio, Felipe, Larissa, Renata, Mayara, Jacqueline, Lucas, Rosana, Luciano, Lucilene, etc...

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (Brasil) CAPES”.

“Eu jamais iria para a fogueira por uma opinião minha, afinal, não tenho certeza alguma. Porém, eu iria pelo direito de ter e mudar de opinião, quantas vezes eu quisesse.”

FRIEDRICH W. NIETZSCHE

RESUMO

Avaliação da citogenotoxicidade de águas fluviais na área urbana do município de Presidente Prudente – SP, através do teste *Allium cepa* L.

Vários problemas de saúde podem surgir em decorrência da interação das pessoas com o meio ambiente poluído. Muitos dos contaminantes lançados no meio podem ter propriedades tóxicas e mutagênicas. A detecção desses agentes pode ser realizada através de bioensaios com plantas superiores, como a cebola comum (*Allium cepa*), que é amplamente utilizada devido ao seu baixo custo e sua alta sensibilidade. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade da água do córrego do Limoeiro em Presidente Prudente, através da análise do potencial citotóxico e mutagênico, por meio do sistema teste *Allium cepa* em cinco pontos diferentes do córrego e em dois períodos do ano (chuvoso e seco). Através do cálculo e comparação do índice mitótico, anomalias cromossômicas e micronúcleos com um controle negativo, observou-se que todos os pontos avaliados apresentaram algum nível de contaminação. Esses dados foram comparados aos resultados das análises físico-químicas e biológicas, que também foram realizadas nos mesmos locais e a partir destes dados, pôde-se inferir algumas correlações. A nascente foi o único local que não apresentou citotoxicidade ou genotoxicidade, mas alguns valores químicos foram relevantes. O Balneário da Amizade e o local de lançamento de ETE- Limoeiro foram os pontos que aparentemente foram mais impactados pela poluição, pois apresentaram valores significativos em vários parâmetros analisados e em ambos períodos do ano. Os demais pontos apresentaram valores significativos, porém, em menos parâmetros ou menor frequência. Outros fatores devem ser avaliados para que tenhamos melhor compreensão dos agentes causadores dessas alterações. É necessária a obtenção de mais dados sobre as fontes poluidoras e a identificação de outros compostos que possam ter influenciado os resultados obtidos.

Palavras-chave: Teste *Allium cepa*. Citogenotoxicidade. Biomonitoramento ambiental.

ABSTRACT

Evaluation of the cytogenotoxicity of fluvial waters from the urban area of Presidente Prudente - SP, using the *Allium cepa* test

Several health problems can arise from the interaction of people with polluted environment. Many of the contaminants thrown in the environment can have toxic and mutagenic properties. Detection of these agents can be performed through bioassays with higher plants, such as common onion (*Allium cepa*), which is widely used, because of its low cost and high sensitivity. This work evaluated the water quality of the Limoeiro stream in Presidente Prudente, by analyzing the cytotoxic and mutagenic potential, using the *Allium cepa* test system in five different points of the stream and in two periods of the year (rainy and dry). By calculating and comparing mitotic index, chromosomal abnormalities and micronuclei with a negative control, we observed that all the evaluated points presented some level of contamination. By comparing these data to the results of physical-chemical and biological analysis, which were performed in the same places and same date, it was possible to infer some correlations. The springs were the only place that did not present cytotoxicity or genotoxicity, but some chemical values were relevant. The Balneário da Amizade and the effluent place of ETE-Limoeiro were the points that were apparently most impacted by pollution, since they presented significant values in several analyzed parameters and in both periods of the year. The other points presented significant values, however, in less parameters or less frequency. Other factors should be evaluated so that we have a better understanding of the agents that cause these changes. It is necessary to obtain more data on pollutant sources and the identification of other compounds that may have influenced the results that were obtained in this work.

Keywords: *Allium cepa* test. Cytogenotoxicity. Environmental biomonitoring

LISTA DE SIGLAS

AMPA	– Ácido amino metil fosfônico
ANA	– Agência Nacional de Águas
APP	– Área de Preservação Permanente
AC	– Aberrações Cromossômicas
CAPES	– Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CETESB	– Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	– Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	– Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	– Demanda Química de Oxigênio
ETE	– Estação de Tratamento de Esgoto
FAAS	– Flame Atomic Absorption Spectrometry (Espectrômetro de Absorção Atômica de Chama)
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	– Índice Mitótico
IPCS	– International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional de Segurança Química)
MN	– Micronúcleo
NMP	– Número Mais Provável
OMS	– Organização Mundial da Saúde
SABESP	– Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo
TAMs	– Trihalometano
UGRHI 22	– Unidade Hidrográfica de Gestão dos Recursos Hídricos do Pontal do Paranapanema
NEP	– United Nations Environment Programme (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente)
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mapa da região de Presidente Prudente - SP, onde está situado o córrego do Limoeiro (representado pela linha azul), apresentando os cinco pontos de coleta. P1; P2; P3; P4 e P5. A linha amarela representa o curso do Córrego do Veado e a linha vermelha o curso do Rio Santo Anastácio.....	28
Figura 2 -	P1 - Ponto próximo à nascente do córrego	29
Figura 3 -	P2 - Ponto localizado à margem do Balneário da Amizade.....	29
Figura 4 -	P3 - Ponto localizado dentro do dentro do Campus II da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, e situado 1,5 Km à jusante da foz do córrego do Veado.....	30
Figura 5 -	P4 - Ponto que fica à margem oposta ao local de despejo da ETE Limoeiro.....	30
Figura 6 -	P5 – Região do córrego que cruza a estrada Vicinal Vereador José Molina.....	31
Figura 7 -	Esquema teste <i>Allium cepa</i>	33
Figura 8 -	Preparo e distribuição das cebolas para realização do teste <i>Allium cepa</i>	33
Figura 9 -	Crescimento das raízes após 72 horas (a). Raízes fixadas em solução Carnoy após coleta (b). Raízes armazenadas em etanol 70% (c).....	34
Figura 10 -	Recipiente com raízes sob hidrólise em banho-maria (a); Raízes coradas com o reagente de Schiff (b); Raízes já coradas, mantidas em água sulfurosa (c)	35
Figura 11 -	Raízes coradas sobre a lâmina de microscopia observadas através de lupa (a). Espalhamento das células coradas após separação da região meristemática (b). Lâminas prontas após técnica do esmagamento e aplicação de Bálsamo Canadá (c)	35
Figura 12 -	Microscópio de luz conectado ao computador, utilizado para contagem das células e captura de imagens fotográficas das lâminas	36
Figura 13 -	Local de coleta de P1.....	38
Figura 14 -	Local de coleta de P2 – Balneário da Amizade. Alta turbidez da água e presença de plantas daninhas aquáticas	39
Figura 15 -	Local de coleta de P3 – Campus II da Unoeste	39
Figura 16 -	Local de coleta de P4. A seta indica o local de despejo da ETE-Limoeiro	40
Figura 17 -	P5. Região do córrego que passa sob a Estrada Vicinal Vereador José Molina	41

Figura 18 - Índice mitótico dos grupos no período chuvoso.....	47
Figura 19 - Índice mitótico dos grupos no período seco.....	48
Figura 20 - Fases da mitose sem anomalias: Interfase (a); Prófase (b); Metáfase (c); Anáfase (d); Telófase (e)	49
Figura 21 - Principais tipos de anomalias cromossômicas identificadas: metáfase com fragmento cromossômico (a); anáfase com pontes cromossômicas (b); metáfase com perda cromossômica (c); anáfase com cromossomos pegajosos (d); metáfase poliploide (e); anáfase com ponte cromossômica (f); telófase com atraso cromossômico (g); telófase com quebra cromossômica (h); c- mitose (i, k); metáfase com cromossomos soltos (j); cromossomos atrasados (l).....	50
Figura 22 - Frequência de AC dos grupos no período chuvoso.....	51
Figura 23 - Frequência de AC dos grupos no período seco.....	52
Figura 24 - Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de chumbo no pontos de coleta durante o período chuvoso.....	52
Figura 25 - Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período seco.....	53
Figura 26 - Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de DBO no pontos de coleta durante o período seco.....	53
Figura 27 - Frequência de MN dos grupos no período chuvoso.....	57
Figura 28 - Frequência de MN dos grupos no período seco.....	57
Figura 29 - Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de cromo no pontos de coleta durante o período chuvoso.....	58
Figura 30 - Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período chuvoso.....	59
Figura 31 - Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de DBO no pontos de coleta durante o período seco.....	59
Figura 32 - Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período seco.....	60
Figura 33 - Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de cromo no pontos de coleta durante o período seco.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados pluviométrico registrados durante o período chuvoso de 2018.....	37
Tabela 2 -	Dados pluviométrico registrados durante o período seco de 2018	37
Tabela 3 -	Análises físico-químicas e microbiológicas referentes ao mês de fevereiro de 2018 (período chuvoso)	42
Tabela 4 -	Análises físico-químicas e microbiológicas referentes ao mês de setembro de 2018 (período seco).	44
Tabela 5 -	Índice mitótico dos meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> referentes ao mês de fevereiro de 2018 (período chuvoso)	46
Tabela 6 -	Índice mitótico dos meristemas radiculares de <i>A. cepa</i> referentes ao mês de Setembro de 2018 (período seco)	46
Tabela 7 -	Índice de Anomalias Cromossômicas referentes período chuvoso.....	49
Tabela 8 -	Índice de Anomalias Cromossômicas referentes período seco	50
Tabela 9 -	Índice de micronúcleos referentes ao período chuvoso	56
Tabela 10 -	Índice de micronúcleos referentes ao período seco	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Características da área de estudo	17
2.2	Mutagênese Ambiental	18
2.3	Bioensaios	19
2.4	O teste <i>Allium cepa</i>	19
2.5	Estudos de mutagenicidade em efluentes e cursos d'água no Brasil e no mundo	21
2.6	Resolução do CONAMA 357/2005	24
3	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivos Gerais	26
3.2	Objetivos Específicos	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Amostras e definição dos pontos	27
4.2	Determinação do parâmetros físico-químicos e microbiológicos	31
4.3	Teste <i>Allium cepa</i> L.	32
4.4	Análises Estatísticas	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Períodos das coletas	37
5.2	Característica do locais de coleta	38
5.3	Análises físico-químicas e microbiológicas	41
5.3.1	Período Chuvoso	42
5.3.2	Período seco	43
5.4	Análises citogenéticas em <i>Allium cepa</i> L.	45
5.4.1	Citotoxicidade	45
5.4.2	Genotoxicidade	49
5.4.3	Mutagenicidade	55
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Atualmente muitos problemas de saúde em seres humanos são atribuídos à contaminação do meio ambiente por resíduos decorrentes das atividades humanas (VANZELLA; MARTINEZ; CÓLUS, 2007). Alguns tipos de câncer podem estar associados à utilização de água contaminada por resíduos industriais que são lançados propositalmente nos cursos d'água, ou por resíduos urbanos e agrícolas que são carregados de forma difusa através do escoamento pluvial (VILLANUEVA *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2007)

A liberação de poluentes em corpos hídricos de forma inadequada é, muitas vezes, clandestina, principalmente em grandes centros urbanos cuja gestão ambiental dos resíduos e efluentes não acompanha de forma adequada o crescimento econômico e populacional (BOAVENTURA; OLIVEIRA; GARCIA, 2010).

Para a avaliação, detecção de contaminantes e biomonitoramento em ambientes de importância regional como o córrego do Limoeiro, os bioensaios com plantas superiores têm sido amplamente utilizados, sendo o teste *Allium cepa* L. um dos mais indicados, em conjuntos com as demais técnicas de monitoramento ambiental existentes (FISKESJÖ, 1985; EVSEEVA; GERASKIN; SHUKTOMOVA, 2003).

O teste de *Allium cepa* L. é considerado uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais, radiação eletromagnética e águas contaminadas (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; CHANDEL *et al.*, 2019).

O método tem sido recomendado para análises de efluentes contaminados e validado internacionalmente como bioindicador de amostras ambientais devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez e facilidade de manipulação, utilizando-se o índice mitótico e a formação de anomalias cromossômicas como parâmetros de avaliação da poluição ambiental (RANK; NIELSEN, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2017; BONCIU *et al.*, 2018).

Com o crescimento da população humana, aliado ao consequente aumento do consumo hídrico nas áreas urbanas e às notórias variações climáticas

observadas nos últimos anos, a realização de estudos com cursos d'água torna-se necessária para o monitoramento das condições ambientais dessas regiões.

A partir de dados observados em um grande número de estudos, pode-se concluir que o potencial citotóxico e mutagênico de corpos d'água depende do contexto ao qual ele está inserido. Locais com grande atividade industrial demonstram potencial mutagênico mais elevado em relação a locais com outros tipos de atividades econômicas, tais como: a agropecuária, lavouras ou mesmo as regiões urbanas (ANACLETO; ROBERTO; MARIN-MORALES, 2017; HARA; MARIN-MORALES, 2017; BOLLANI *et al.*, 2018; OGUNYEMI *et al.*, 2018; WIJEYARATNE; WADASINGHE, 2019).

O regime de chuvas e fatores climáticos também são variáveis que devem ser consideradas, pois estudos feitos em períodos de seca demonstraram maiores potenciais citotóxicos se comparados aos períodos de chuva, onde há maior diluição das amostras da água coletada (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012).

O monitoramento da qualidade das águas superficiais, e a realização dos bioensaios, são importantes ferramentas no estudo de impactos ambientais devido à complexidade e a relação entre os compostos poluidores, que muitas vezes não conseguem ser estimados através das avaliações físico-químicas apenas. Ambos devem ser aplicados, simultaneamente, como forma de avaliar a qualidade do corpo d'água e saúde dos ecossistemas ao qual os mesmos estão envolvidos.

O Art. 225 da Constituição Federal Brasileira prevê que: todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações (BRASIL, 2000), justificando a necessidade deste e outros estudos que possam avaliar a qualidade ambiental de nossos recursos hídricos.

Dessa forma esse trabalho possibilita avaliar a qualidade das águas do Córrego do Limoeiro através do seu potencial mutagênico, e assim estimar o impacto ambiental causado pelas atividades antropogênicas da região de Presidente Prudente – SP, considerada uma cidade de médio porte com grande desenvolvimento urbano industrial.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características da área de estudo

Presidente Prudente é considerada uma cidade de médio porte, sendo que a sua população registrada no censo de 2010 foi de 207.610 habitantes e a projeção para 2018 é de 227.072 habitantes (IBGE, 2019). A sua localização geográfica compreende o paralelo 22°07'57"S e o meridiano 51°22'57"W, sendo o seu clima do tipo tropical continental sub-úmido e caracterizado por um verão quente e chuvoso (AMORIM *et al.*, 2009).

Neste município existe um sistema hidrográfico constituído por pequenos cursos d'água, como o córrego do Botafogo e do Veado, formadores dos córregos do Cedro e do Limoeiro, respectivamente. Ambos são afluentes do rio Santo Anastácio, um importante rio do Oeste do Estado de São Paulo e que já foi o principal rio responsável pelo abastecimento público de água da cidade de Presidente Prudente (TEODORO; NUNES, 2011).

De acordo com Honda *et al.* (2015), a expansão territorial e a ocupação do solo urbano em Presidente Prudente – SP não se estabeleceu de forma planejada, assim, muitos cursos d'água formadores desta bacia hidrográfica atravessam área com grande desenvolvimento urbano industrial.

O córrego do Limoeiro é um corpo hídrico superficial que se encontra inserido na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Pontal do Paranapanema (UGRHI22) e que constitui, em parte, o limite geográfico dos municípios de Presidente Prudente e Álvares Machado e que também é receptor de efluentes da ETE (Estação de Tratamento de Esgoto) de ambos municípios (TAKENAKA *et al.*, 2013). Ele também constitui o Balneário da Amizade, uma área que, ultimamente, sofre um intenso processo de urbanização com alto índice de atividade antropogênica (BOAVENTURA; OLIVEIRA; GARCIA, 2010).

Apesar do córrego ser muito utilizado nas atividades humanas, muitos efluentes são lançados ao longo do seu percurso em área urbana, como é o caso da ETE Limoeiro, construída pela SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) em 1997, que despeja esgoto tratado com diversas substâncias químicas, além das águas pluviais oriundas do córrego do Veado, e de bairros

localizados às margens do Balneário da Amizade e da sua nascente, nos levando a supor que haja presença de substâncias poluidoras potencialmente mutagênicas e citotóxicas em seu percurso.

2.2 Mutagênese Ambiental

Alguns agentes químicos, físicos ou biológicos podem ter grande potencial tóxico para os seres vivos, causando muitas vezes efeitos fisiológicos, bioquímicos, patológicos e genéticos nos organismos (SISINNO; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Os agentes capazes de interagir com o material genético são definidos como agentes mutagênicos e vêm sendo estudados há décadas. O mecanismo de ação destes agentes tem grande importância ambiental. Embora as mutações ocorram no material genético espontaneamente e de forma natural, a maior parte delas é induzidas por agentes externos, aos quais os seres vivos são expostos o tempo todo (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004; SZYNKOWSKA; PAWLACZYK, 2014)

A maior parte dos erros ocorridos durante a replicação do material genético, são corrigidos naturalmente pelos mecanismos de reparos celulares. Entretanto, alguns erros podem persistir ou serem reparados de forma errada, dando origem a mutações de ponto ou alterações cromossômicas (GRIFFITHS *et al.*, 2009).

Os efeitos celulares e genéticos causados por agentes mutagênicos podem ser detectados pela inibição ou interrupção do processo de divisão celular e alterações cromossômicas numéricas e estruturais em organismos-teste, tais como plantas e animais. Atualmente, existem diversos testes, incluindo várias espécies de organismos que nos apresentam informações seguras e precisas, quanto à potencialidade de um agente causar lesão no DNA, tais como os testes de micronúcleo (MN), teste do cometa, entre outros (VANZELLA, 2006).

Alguns dos danos observados com mais frequência em células submetidas a agentes mutagênicos são a mitoinibição, que pode ser causada pelo bloqueio de uma das fases do ciclo celular, a mitoestimulação que ocorre quando os mitogênicos agem para superar os mecanismos de frenagem intracelulares e os danos clastogênicos, como perda de fragmentos cromossômicos e aneugênicos, como perda de um ou mais cromossomos inteiros (BONCIU *et al.*, 2018).

Fiskesjö (1993, 1994), ressaltou a importância dos testes em vegetais na avaliação da citogenotoxicidade de substâncias e enfatizou que apesar das

diferenças metabólicas entre plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem vegetais tratados com agentes químicos.

2.3 Bioensaios

Testes com plantas superiores são reconhecidos como excelentes indicadores de efeitos citotóxicos e mutagênicos de elementos químicos e são, portanto, aplicados para detecção de citogenotoxicidade (GRANT, 1994; BONCIU *et al.*, 2018). Dois ensaios que são considerados ideais para o monitoramento *in situ* e para testes de agentes mutagênicos atmosféricos ou aquosos, envolvem a análise dos pelos estaminais e micronúcleos em *Tradescantia*, sendo que ambos estudos podem ser utilizados em testes *in vivo* e *in vitro* (GRANT, 1994).

Outras plantas superiores que possuem grande número de marcadores genéticos são *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, e *Zea mays* (GRANT, 1999). Segundo o autor, esses ensaios são recomendados como um meio alternativo de detectar possíveis danos genéticos resultados da poluição ou do uso de substâncias químicas. Além disso, o autor menciona que, devido à facilidade de coleta de dados e baixa exigência de infraestrutura laboratorial, todos eles são considerados ideais para cientistas de países em desenvolvimento.

Os bioensaios com plantas têm sido considerados mais sensíveis e simples que as avaliações utilizando animais. Esses organismos-teste têm sido validados pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como eficientes testes para análise e monitoramento “*in situ*” da genotoxicidade de contaminantes ambientais (CABRERA; RODRIGUES, 1999).

2.4 O teste *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* é um método muito conveniente para estimar efeitos danosos de substâncias químicas e biológicas em organismo vivos. Devido à sua excelente caracterização genômica, com reduzido número de cromossomos e de grande dimensão, a cebola é amplamente utilizada para vários propósitos desde que foi introduzida pela primeira vez através do sistema de Levan em 1938.

Posteriormente, o teste se estendeu aos fatores de risco no monitoramento ambiental (GRANT, 1994; RANK; NIELSEN, 1994). O teste mostrou boa correlação com outros sistemas de testes, envolvendo toxicidade geral (crescimento da raiz), genotoxicidade (aberrações cromossômicas) e mutagenicidade (micronúcleos) (RANK; NIELSEN, 1994).

Através da análise do Índice Mitótico (IM) que representa o índice de células em divisão no meristema radicular da cebola, pode-se avaliar a citotoxicidade de diversas substâncias, como água poluída, extratos de plantas medicinais, e contaminantes ambientais (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012; CAMPAROTO *et al.*, 2002; MONARCA *et al.*, 2005; BOLLANI *et al.*, 2018). Usando um controle negativo como comparação, pode-se detectar a diminuição ou o aumento do IM, parâmetro importante na determinação da taxa de crescimento da raiz. Se houver diminuição do IM em relação ao controle negativo, pode ser indício de alteração derivada da ação química no desenvolvimento e crescimento radicular; por outro lado, quando o IM é maior que o controle negativo, pressupõe-se que há um aumento da divisão celular levando a desordens na proliferação celular e formação de tecidos tumorais (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

O teste *Allium cepa* é sugerido como um padrão no monitoramento ambiental, como parte da bateria de testes. Suas vantagens são: baixo custo, fácil manuseio, boa condição dos cromossomos para o estudo de danos cromossômicos durante a divisão celular incluindo a avaliação do risco de aneuploidia (FISKESJÖ, 1985). O uso de séries de cebolas para cada concentração de elementos químicos permite realizar considerações estatísticas e a partir das curvas de crescimento os efeitos das concentrações são obtidos (BARBÉRIO; VOLTOLINI; MELLO, 2011). Esse teste se mostrou muito sensível em relação a outros sistemas de testes. Os resultados positivos no teste *Allium cepa* devem ser considerados como alerta e também como indicação de que os químicos testados podem causar riscos à saúde humana e ambiental (RANK; NIELSEN, 1994).

Em um estudo realizado na Suécia, os resultados do teste *Allium cepa* foram admitidos como evidências em uma ação judicial contra a fábrica acusada de poluir um rio adjacente a ela. (FISKESJÖ, 1993).

Os protocolos experimentais do teste *Allium cepa* foram desenvolvidos para o uso das raízes provenientes dos bulbos ou das sementes para estudos citológicos. Mesmo assim, considera-se que ambos tipos de divisão (meiose e mitose)

podem ser igualmente utilizados, e possibilitam a avaliação dos efeitos genotóxicos das substâncias químicas (GRANT, 1982).

O teste pode fornecer dois parâmetros principais para análise de toxicidade. Os parâmetros macroscópicos podem ser observados através da formação de tumores, presença de raízes torcidas e crescimento anormal da raiz, e os parâmetros microscópicos, que podem ser avaliados através do índice mitótico, ocorrência de anomalias cromossômicas, como: cromossomos em anel, pontes cromossômicas, atraso na separação de cromátides-irmãs, que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase, e formação de micronúcleos como indicadores de anormalidades no DNA (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012; BARBÉRIO; VOLTOLINI; MELLO, 2011).

As substâncias químicas com potencial mutagênico são capazes de alterar o material genético em todas as fases do ciclo celular, porém, para se fixarem como alterações cromossômicas, necessitam de mecanismo de replicação do DNA, logo após a ocorrência dessas alterações (ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2005).

2.5 Estudos de mutagenicidade em efluentes e cursos d'água no Brasil e no mundo

A poluição do meio ambiente por produtos mutagênicos provoca uma elevação nas taxas de mutagênese ambiental e afeta todos os seres vivos, das gerações atuais, até as próximas gerações. Estudos realizados para avaliar o potencial mutagênico em cursos d'água já foram realizados em diversas localidades no Brasil e no mundo, como descritos a seguir.

Em 1994, Rank e Nielsen avaliaram a sensibilidade do teste de anáfase - telófase de *A. cepa*, em relação a outros dois testes em plantas superiores. Utilizando águas residuais das indústrias, demonstrou que a sensibilidade do teste *Allium cepa* foi calculada em 82%. Assim conclui-se que este teste é recomendado para triagem de águas residuais por sua alta sensibilidade, baixo custo, rapidez, e porque pode ser usada para testar águas sem pré-tratamento.

A partir de então, o teste começou ser empregado com grande frequência, principalmente em países em desenvolvimento (GRANT, 1994). Em uma pesquisa para a avaliação do potencial mutagênico de esgotos tratados, através do teste *Allium cepa*, foram comparadas amostras de onze efluentes tratados

provenientes de indústrias e despejados em um curso d'água. Os resultados revelaram um aumento da genotoxicidade e da citotoxicidade da água à medida que o ponto analisado se encontrava mais próximo à jusante do curso d'água. Tais resultados, conjuntamente com a análise química das amostras, revelaram que, mesmo após o tratamento do efluente proveniente das indústrias, substâncias com potencial citotóxico e genotóxico estão sendo despejadas no meio ambiente, comprometendo a qualidade do ambiente aquático (PEREIRA *et al.*, 2005).

Em outra pesquisa que avaliou os potenciais genotóxico e mutagênico de um rio impactado pelo vazamento de oleoduto em 2004 através do mesmo teste, realizou-se análises em dois períodos do ano posteriores à sua contaminação. Análises químicas de hidrocarbonetos totais de petróleo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foram realizadas simultaneamente, com a finalidade de dar suporte às investigações biológicas. Dos resultados obtidos, foi detectado potencial genotóxico e mutagênico somente para a amostra de água coletada na nascente do rio durante a estação seca, a qual corresponde ao local de afloramento do óleo vazado e a única amostra a apresentar hidrocarbonetos de petróleo nas avaliações químicas. Tais resultados levaram à conclusão que as águas impactadas por hidrocarbonetos de petróleo podem comprometer a biota associada a este recurso, porém os vazamentos de oleodutos em rios, se gerenciados corretamente, podem levar a uma recuperação da qualidade das águas (LEME; MARIN-MORALES, 2007).

Na cidade de Tremembé, também foi realizada avaliação do nível de poluição do Rio Paraíba do Sul através dos testes de citotoxicidade e mutagenicidade em diferentes estações do ano de 2008. Durante o período seco, foi observada elevada ação mutagênica das amostras quando comparadas ao controle negativo. No período chuvoso, a única alteração encontrada em nível significativo foram as anomalias cromossômicas. Segundo os autores, não houve alteração significativa para o índice mitótico para os dois períodos (OLIVEIRA; VOLTOLINI; BARBÉRIO, 2011).

Bianchi, Espindola e Marin-Morales (2011) avaliaram os efeitos citotóxicos e genotóxicos através do sistema *Allium cepa* em efluentes domésticos e industriais lançados no rio Monjolinho em diferentes estações do ano. No verão e estações intermediárias foram observadas aberrações cromossômicas, micronúcleos, morte celular e inibição do índice mitótico. No inverno, caracterizado por ser predominantemente chuvoso, não foram observadas alterações cromossômicas nem

celulares. Através das análises químicas da água, inferiu-se que o excesso de metais pesados como Chumbo, Cobre e Zinco podem ter sido responsáveis pelos efeitos observados no teste. Notou-se também que o rio tem alta capacidade autodepurativa no fim do seu curso.

Em outra investigação conduzida na região Sul do Brasil, foram analisados os efeitos tóxicos e genotóxicos das águas do Rio dos Sinos sujeitas às descargas industriais e urbanas, coletadas nos municípios de Novo Hamburgo-RS e São Leopoldo-RS em dois períodos do ano. Segundo os autores, os resultados mostraram que o potencial efeito genotóxico, dependente do período e local avaliado e que a presença de cromo hexavalente, detectado através das análises físico-químicas, poderia ser responsável pela toxicidade e genotoxicidade induzidas nas células meristemáticas de *A. cepa* (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Na Índia, um estudo utilizando as espécies *V. radiate* e *A. cepa* como bioindicadores para investigação de genotoxicidade e mutagenicidade de efluentes de uma fábrica de papel e celulose em Saharanpur, Uttar Pradesh, foram realizadas análises citogenéticas e físico-químicas. As plantas foram expostas à água do efluente e mostraram redução no comprimento das raízes e na biomassa da parte aérea, além de outros dados que indicaram a indução de citotoxicidade, sendo também possível observar aberrações cromossômicas (HAQ *et al.*, 2016).

Em um estudo conduzido no Sri Lanka utilizou-se amostras de água coletadas nas áreas urbana, industrial, abastecimento público e de agricultura, e apesar dos parâmetros de qualidade estarem de acordo com as normas de saúde para a vida aquática, pode-se observar diminuição dos índices mitóticos em todas as áreas se comparadas com o controle negativo e a maior parte das anomalias celulares encontradas estavam nas amostras das áreas industriais e de abastecimento público. (WIJEYARATNE; WADASINGHE, 2019)

Na zona rural de Buenos Aires (Argentina). Foram determinadas as concentrações de metais pesados, glifosato e um de seus metabolitos (AMPA) nas amostras de um rio no período seco e chuvoso. Não foi identificada citotoxicidade nessas águas, mas observou-se o aumento significativo da frequência de micronúcleos em relação ao controle, demonstrando o estado de deterioração da área rural de Buenos Aires. (BOLLANI *et al.*, 2018).

Um estudo referente à qualidade dos córregos do Veado e Limoeiro em Presidente Prudente - SP foi realizado em dois períodos do ano. Neste trabalho

avaliou-se a presença de compostos anti-inflamatórios não esteroides em águas naturais. Stelato *et al.*, (2016) avaliaram a presença de naproxeno, paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno ao longo dos córregos. Segundo os autores, o diclofenaco e o ibuprofeno foram os compostos que apresentaram maiores concentrações, indicando a contaminação por esgoto doméstico. Os maiores níveis de concentração foram observados nos períodos chuvosos, provavelmente devido à formação geológica do município ou a mecanismos de dessorção dos fármacos a partir dos sedimentos de rios.

2.6 Resolução do CONAMA 357/2005

Para que se possa realizar um monitoramento eficaz e fiscalização da qualidade dos corpos d'água do Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) criado pela Lei Federal nº 6.938/81 e responsável pelo estabelecimento de padrões de controle da poluição ambiental, por meio da Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2005), estabeleceu condições de qualidade para o enquadramento dos corpos hídricos em território nacional, de acordo com os seus usos preponderantes, e para o lançamento de efluentes. Essa resolução, como instrumento jurídico, fixou limites superiores ou inferiores para diversas variáveis em sistemas de água doce, salobra e salina e é utilizado como referência legal em grande parte dos trabalhos que avaliam a qualidade ambiental.

Entretanto, com as atuais mudanças climáticas que o planeta tem testemunhado e o aumento da população mundial, seguida do aumento das regiões urbanizadas e dos conflitos decorrentes da busca por recursos hídricos, observa-se a necessidade da revisão e atualização de muitos pontos da Resolução 357/2005.

Segundo o documento base do Projeto Legado, apresentado no 8º Fórum Mundial da Água em março de 2018, em Brasília, nos últimos vinte anos produziram-se muitos relatórios, diagnósticos, planos e propostas sobre a governança das águas no país. No entanto, há hoje um reconhecimento de que é necessário visitar o arcabouço legal e institucional com vistas ao seu aprimoramento. O documento apresenta-se, portanto, como ponto de partida um conjunto de reflexões iniciais da ANA (Agência Nacional das Águas) sobre os principais desafios à implementação da Política Nacional de Recursos Hídricos. Também são

apresentadas propostas para enfrentamento dos problemas identificados, bem como possíveis instrumentos normativos para sua execução.

Em relação à resolução 357/2005, o documento sugere soluções para corpos d'água que não se enquadram na resolução e por isso não estão protegidos adequadamente. Propõe-se proteger os corpos d'água de modo preventivo e integral, regulando os usos nas bacias hidrográficas, de forma que, enquanto não aprovados os enquadramentos, as águas doces sejam classificadas como classe 1.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade das águas coletadas no córrego do Limoeiro, situado na cidade de Presidente Prudente - SP, por meio do sistema teste *Allium cepa* como bioindicador de qualidade das águas fluviais.

3.2 Objetivos Específicos

Para se alcançar o objetivo geral, pretendeu-se:

- Investigar se há interferência de diferentes atividades humanas na qualidade da água do córrego, determinando 5 pontos amostrais inseridos em diferentes contextos locais ao longo do curso do córrego usando o teste *Allium cepa*.
- Avaliar se há sazonalidade das observações, através da análise em dois períodos do ano, sendo um caracterizado pela predominância de precipitação (verão) e o outro pelos baixos índices de chuva e umidade.
- Correlacionar os valores das análises físico-químicas e biológicas da água coletada nos diferentes pontos com os dados obtidos através das análises de citogenotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.
- Contribuir com informações sobre os potenciais efeitos da poluição ambiental sobre o córrego do Limoeiro, além de fornecer subsídios que possam servir de alerta para possíveis ações de preservação.
- Avaliar se os níveis máximos de chumbo, cádmio, cobre, cromo e zinco determinados pela resolução do CONAMA 357/2005 refletem os níveis de segurança para danos ao material genético dos seres vivos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras e definição dos pontos

O córrego do Limoeiro é um corpo hídrico superficial que se encontra inserido na (UGRHI22). De acordo com a resolução CONAMA no. 357/2005 (BRASIL, 2005) ele se enquadra na classe 4, o qual deve ser destinado à navegação, harmonia paisagística e a usos menos exigentes. Entretanto, apesar desta recomendação, verifica-se que o córrego é utilizado na irrigação de pomares e lavouras, dessedentação de animais, pesca amadora e recreação, atividades atribuídas à classe 3 da mesma resolução.

As amostras foram coletadas na superfície do córrego entre 15 e 30 centímetros de profundidade utilizando recipientes de vidro âmbar e mantidas em caixa térmica com gelo durante o período amostral e até serem transportadas para o laboratório, onde ficaram armazenadas no refrigerador a 4° C até aplicação dos métodos de análises, de acordo com as recomendações do Guia Nacional de coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011).

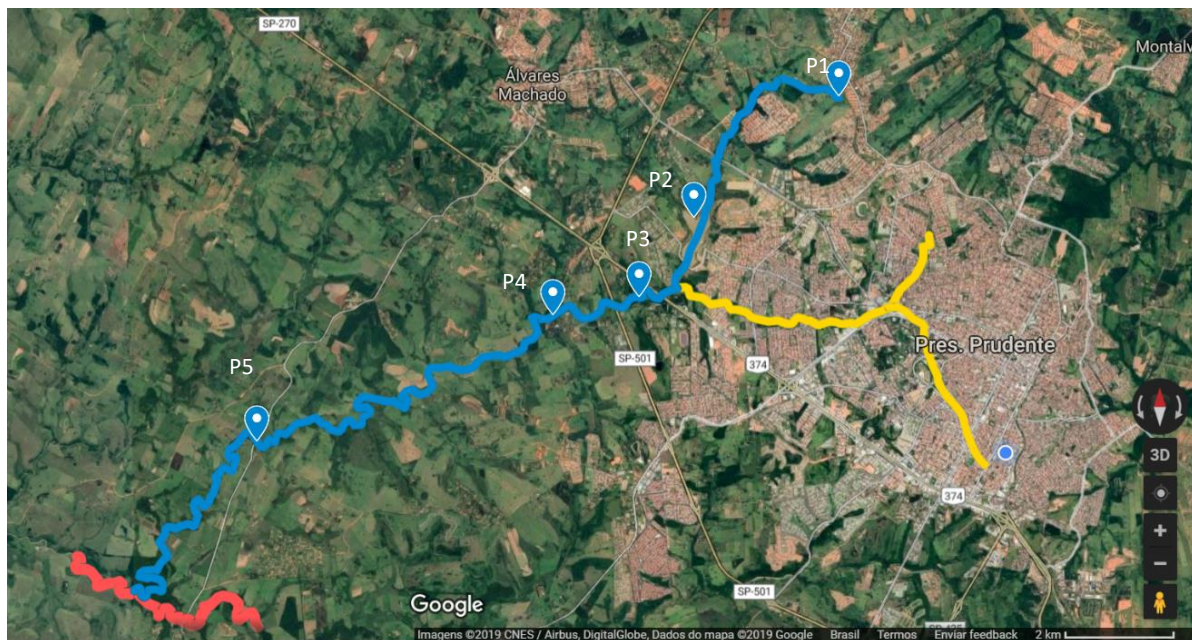
As coletas foram realizadas em dois períodos do ano, a fim de avaliar as influências das diferentes condições climáticas de cada período. A primeira coleta aconteceu no verão, período caracterizado pelas altas médias de precipitação e a segunda coleta no inverno, período caracterizado pelas baixas médias pluviométricas.

As datas das coletas das amostras de água também foram determinadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2011), que sugere um período de 24 horas sem ocorrência de chuvas precedendo a coleta, para que não ocorra alterações dos resultados. Seguindo essa orientação, as coletas foram realizadas nos dias 26 de fevereiro de 2018 (período chuvoso), e 10 de setembro de 2018 (período seco).

O mapa de satélite com as indicações dos pontos selecionados estão indicados na Figura 1. Os pontos representam cinco condições ambientais diferentes com contexto de atividades humanas distintas.

Nas figuras 2, 3, 4, 5 e 6 são apresentados os mapas com os pontos de coleta P1, P2, P3, P4 e P5 respectivamente, em escala maior para melhor visualização.

Figura 1 – Mapa da região de Presidente Prudente - SP, onde está situado o córrego do Limoeiro (representado pela linha azul), apresentando os cinco pontos de coleta. P1; P2; P3; P4 e P5..



Fonte: Google Maps, 2019^a

Nota: A linha amarela representa o curso do Córrego do Veado e a linha vermelha o curso do Rio Santo Anastácio.

P1 está localizado próximo à nascente do córrego (Figura 2) e foi escolhido por representar uma área preservada pela legislação, presumindo-se que sofra pouca interferência antrópica.

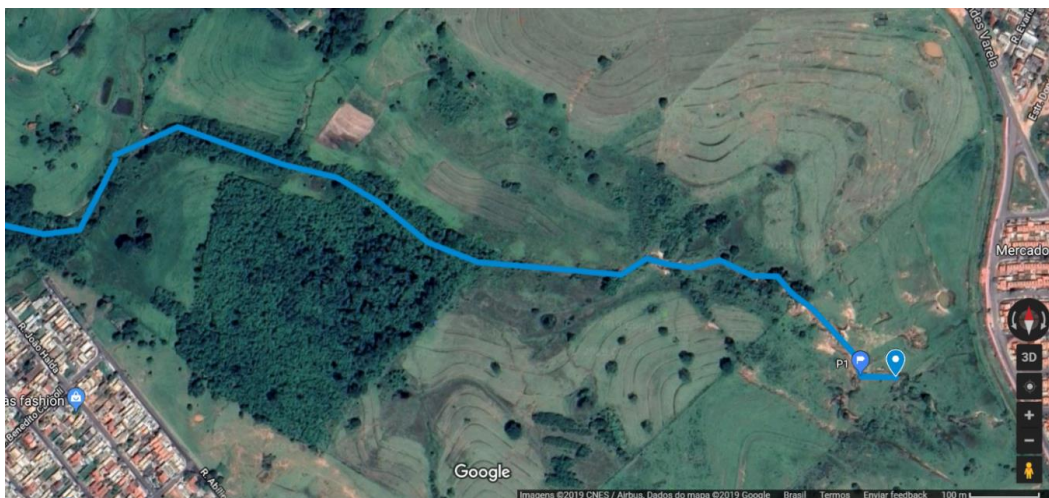
P2 localiza-se à margem do Balneário da Amizade (Figura 3), local onde foi realizado o represamento do córrego no final da década de 1970 através de uma iniciativa conjunta dos municípios de Presidente Prudente e Álvares Machado com fins recreativos, e posteriormente para o abastecimento urbano (SOARES; LEAL, 2011).

O Córrego do Veado que está representado por uma linha amarela na Figura 1, possui sua nascente dentro da área urbana de Presidente Prudente e percorre toda a cidade, carregando significativa parcela do escoamento pluvial e efluentes de várias indústrias da região (TAKENAKA *et al.*, 2013). Por este motivo P3, (Figura 4) foi posicionado à 1,5 Km à jusante da foz do córrego do Veado, para que pudessemos identificar contaminação proveniente da área urbana.

P4 (Figura 5) fica imediatamente após o local de despejo do esgoto tratado pela Estação de Tratamento de Esgoto do Limoeiro – ETE/SABESP, que atende aos municípios de Presidente Prudente e Álvares Machado.

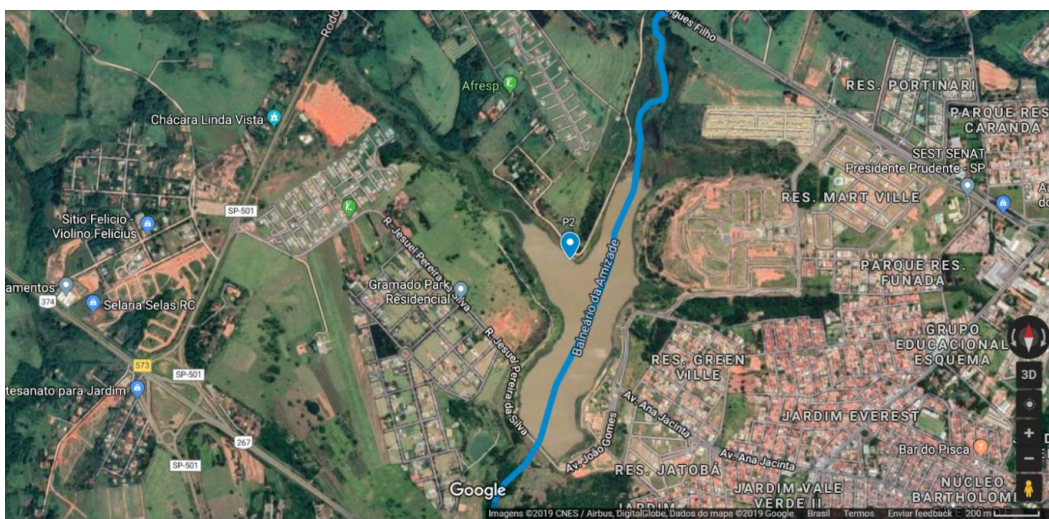
P5 (Figura 6) fica a cerca de seis quilômetros de distância do despejo do esgoto tratado pela ETE do Limoeiro, antes de sua confluência com o rio Santo Anastácio. Durante esse percurso, que está distante da região urbana, ocorre a autodepuração do córrego.

Figura 2 – P1 - Ponto próximo à nascente do córrego.



Fonte: Google Maps, 2019b

Figura 3 – P2 - Ponto localizado à margem do Balneário da Amizade.



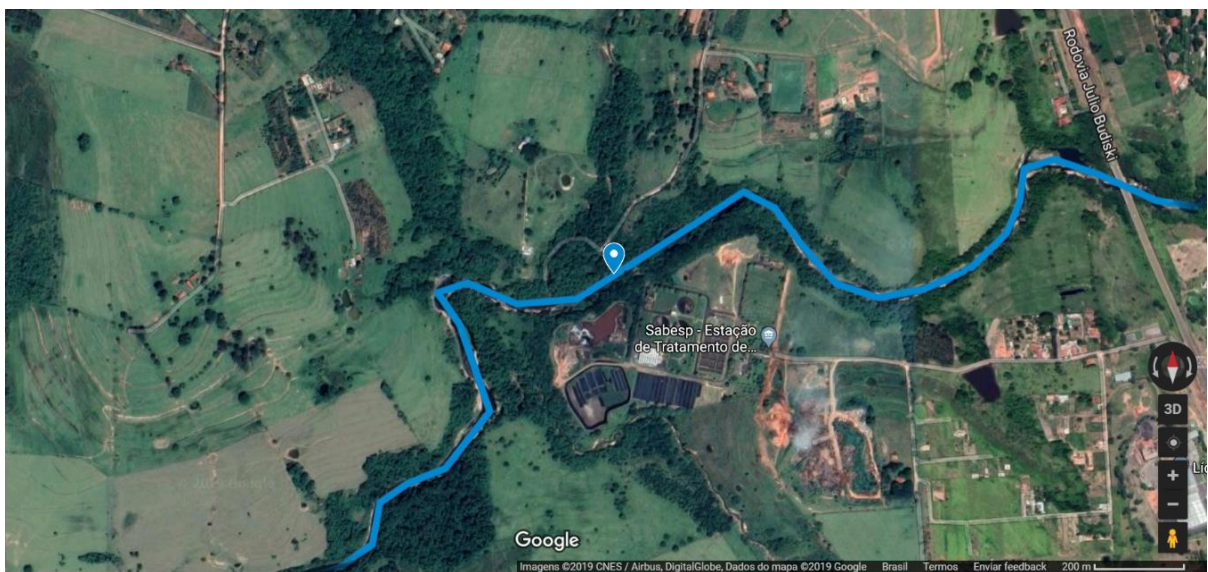
Fonte: Google Maps, 2019c

Figura 4 – **P3** - Ponto localizado dentro do dentro do Campus II da Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, e situado 1,5 Km à jusante da foz do córrego do Veado.



Fonte: Google Maps, 2019d

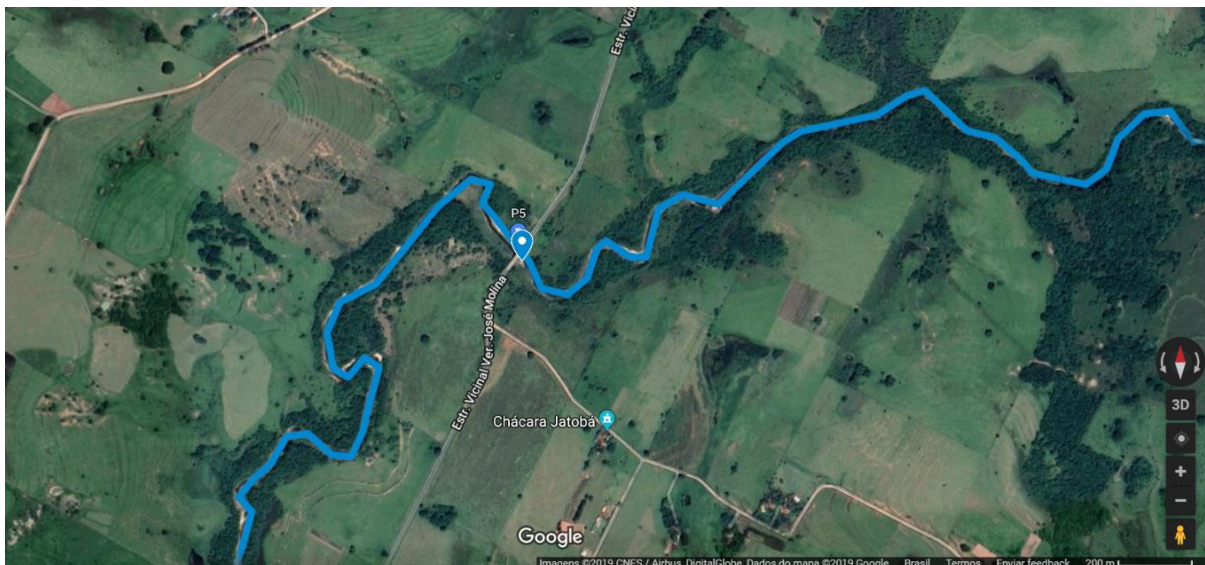
Figura 5 – **P4** - Ponto que fica à margem oposta ao local de despejo da ETE Limoeiro.



Fonte: Google Maps, 2019e

Todos os treinamentos, testes piloto, protocolos experimentos foram realizados nos laboratórios da UNOESTE, de abril de 2017 a janeiro de 2019.

Figura 6 – P5 – Região do córrego que cruza a estrada Vicinal Vereador José Molina



Fonte: Google Maps, 2019f.

4.2 Determinação do parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Após a coleta, as amostras de água foram encaminhadas para o laboratório de análises químicas da Unoeste, onde ficaram armazenadas sob refrigeração de 4°C até o preparo para as análises. Os métodos de preservação de amostras estão preconizados no Standard Methods for Examination of Water and WasteWater, 21ª Edition (APHA, 2012).

Foram determinados os parâmetros para DBO (demanda bioquímica de oxigênio) (mg.L^{-1}) através do método respirométrico simplificado; DQO (demanda química de oxigênio) (mg.L^{-1}) através do método colorimétrico; e a análise microbiológica de coliformes fecais (NMP/100mL) e coliformes totais (NMP/100mL) através da técnica da membrana filtrante em meio ágar seletivo.

Para preparo e análise de metais pesados, as amostras de água foram submetidas à digestão por via ácida e posteriormente filtradas e transferidas para recipiente de vidro âmbar, conservadas sob refrigeração até a leitura.

A leitura das concentrações dos metais pesados foram realizadas através do Espectrômetro de Absorção Atômica de Chama (FAAS), marca Perkin Elmer - Modelo AAnalyst 200 equipado com lâmpada de deutério como corretor de fundo e lâmpadas de cátodo-oco contendo analito. Para atomização dos metais usou-se o gás acetileno.

4.3 Teste *Allium cepa* L.

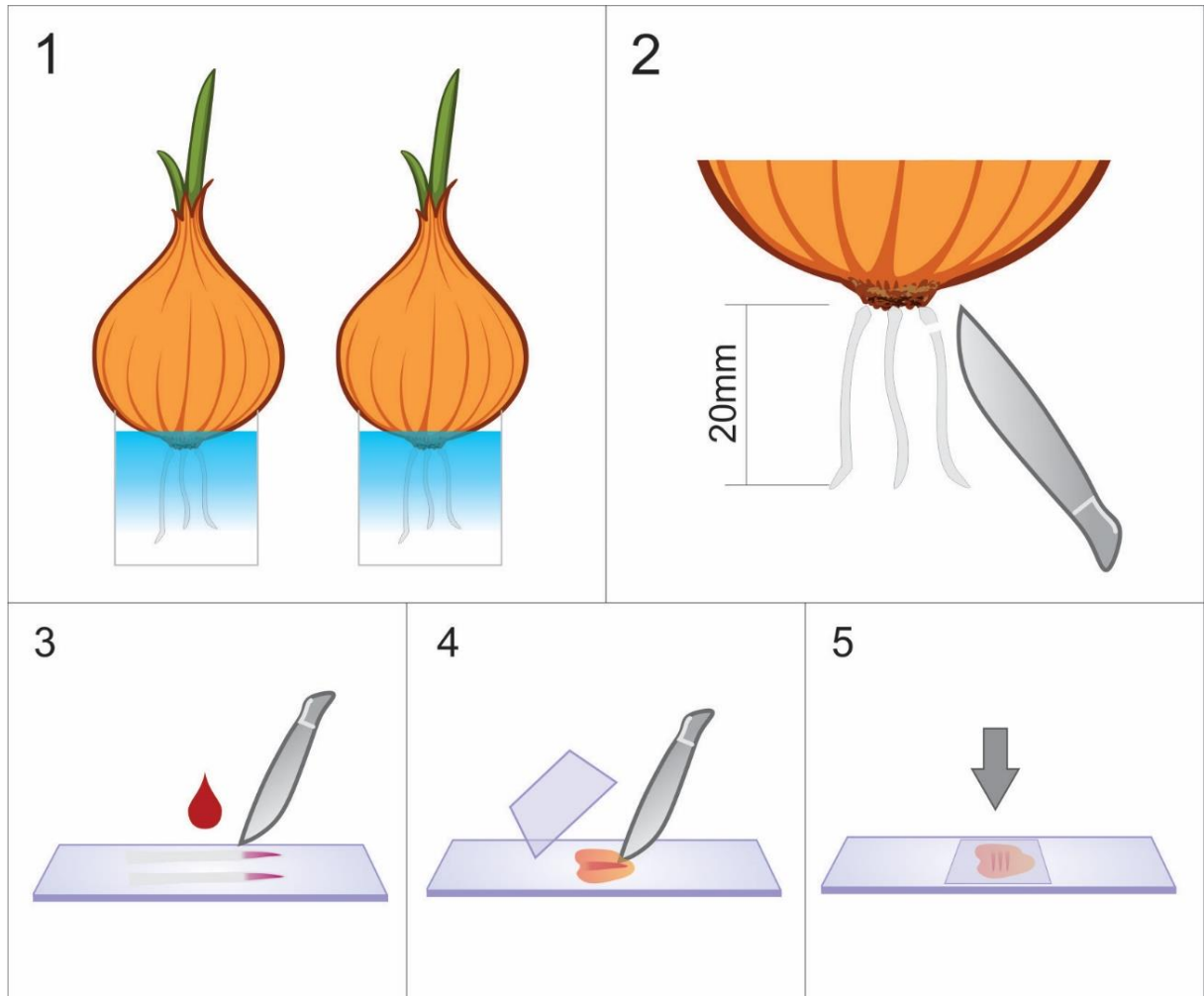
Foram utilizados seis bulbos de *Allium cepa* (cebola comum) para cada grupo tratamento e para os controles, onde P1, P2, P3, P4, P5 representavam os cinco pontos de coleta, CN o controle negativo (água mineral) e CP o controle positivo (solução de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 0,3 Molar). No total, foram utilizados 42 (quarenta e dois) bulbos para os testes realizados no período chuvoso e a mesma quantidade de bulbos para os testes realizados no período de estiagem. O número de amostras sugeridas por Barbério, Voltolini e Mello (2011) é de no mínimo três bulbos para que se tenha resultados estatísticos significativos.

Todos os bulbos foram adquiridos no mesmo estabelecimento comercial e de uma mesma remessa proveniente de uma única lavoura. Foram escolhidos bulbos jovens, com características morfológicas similares entre si, com diâmetro aproximado de 40mm, simétricos e sem sinais de danos, doenças ou malformações.

O teste com as células meristemáticas de *A. cepa* foi realizado com base no protocolo desenvolvido e estabilizado por Grant (1982) e adaptado de acordo com Vicentini *et al.* (2001) e Camparoto *et al.* (2002) com algumas modificações (Figura 7).

Os bulbos foram acondicionados em recipientes de vidro preenchidos com os controles e os tratamentos, de forma que apenas a região radicular da cebola ficasse submersa.

Os recipientes com os bulbos de *A. cepa* foram dispostos em ambiente com luz natural indireta (Figura 8). Os bulbos ficaram em contato com água mineral por 72 horas para estimular o início do crescimento de raízes e identificar a viabilidade dos bulbos. Estas raízes foram removidas logo após o término desse período. Realizou-se então, a substituição da água dos recipientes pela água coletada do Córrego do Limoeiro e dos controles em cada grupo. Ao final de mais 72h, as novas raízes dos bulbos que cresceram sob o tratamento, foram coletadas. O período de 72 horas é baseado no ciclo de divisão celular das células da cebola que é de aproximadamente 24 horas segundo González-Fernandes *et al.*, (1966). Desta forma, pode-se observar no mínimo três ciclos celulares e avaliar a presença de micronúcleos que ficam evidentes nas células filhas.

Figura 7 – Esquema do teste *Allium cepa*

Fonte: Autora (2019).

Figura 8 – Preparo e distribuição das cebolas para realização do teste *Allium cepa*.

Fonte: Autora (2019).

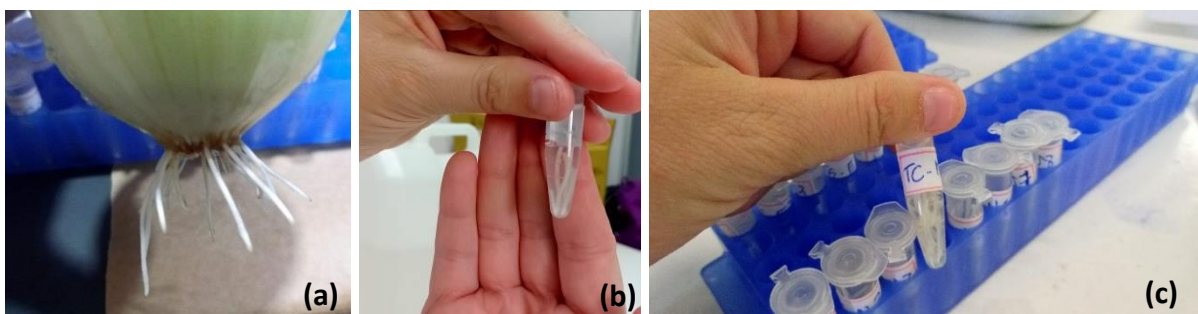
Para as análises citogenéticas, as raízes dos bulbos com comprimento inferior a 20 milímetros de comprimento foram retiradas com o auxílio de pinça e fixadas em solução Carnoy (3:1, álcool etílico absoluto: ácido acético glacial) em frascos devidamente etiquetados e identificados, por um período de 24h sob temperatura ambiente. Posteriormente foram transferidas para recipientes contendo solução de etanol 70% e conservadas sob refrigeração a 4°C até o preparo das lâminas (Figura 9).

Para o pré-preparo das lâminas, as raízes (Figura 10) foram hidrolisadas em solução de ácido clorídrico (HCl) 1N por 10 minutos em banho Maria a 60°C e lavadas com água destilada. Em seguida, as regiões meristemáticas das raízes foram coradas com reativo de Schiff, através da técnica de coloração de Feulgen, e intensificadas com solução de Carmim acético a 2% (MELLO; VIDAL, 2017).

As lâminas foram preparadas através da técnica de esmagamento (GUERRA; SOUZA, 2002) (Figura 11) e fotografadas em microscópio de luz, modelo *Leica ICC50 HD*, sob objetiva de 40x, através da técnica de varredura (Figura 12). Foram contadas 6000 (seis mil) células por ponto de coleta (1000 células por bulbo), observando-se e anotando o número de células em cada fase da mitose. Desta forma, o índice mitótico (IM) pode ser estabelecido através da divisão das células em mitose pelo número de células totais contadas como descrito na fórmula:

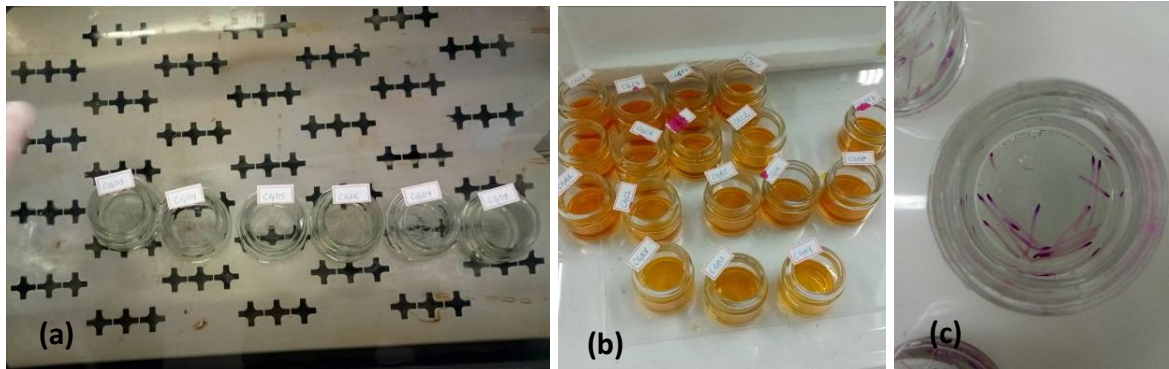
$$IM = \left(\frac{\text{nº total de células em divisão}}{\text{nº total de células analisadas}} \right) \times 100$$

Figura 9 – Crescimento das raízes após 72 horas (a). Raízes fixadas em solução Carnoy após coleta (b). Raízes armazenadas em etanol 70% (c).



Fonte: Autora (2019).

Figura 10 – Recipiente com raízes sob hidrólise em banho-maria (a); Raízes coradas com o reativo de Schiff (b); Raízes já coradas, mantidas em água sulfurosa (c).



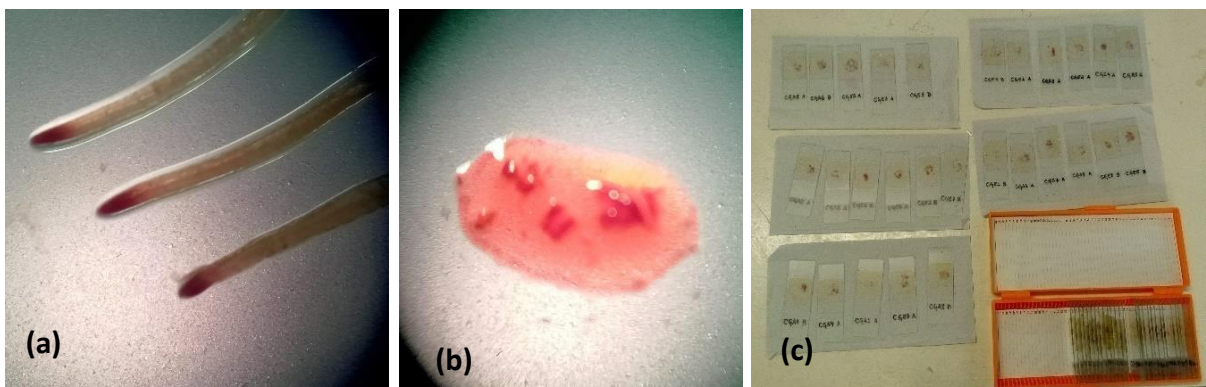
Fonte: Autora (2019).

A frequência de anomalias cromossômicas (AC) observáveis também foi determinada através da contagem de células normais em divisão e células que apresentavam anomalias durante a mitose. Foram consideradas anomalias as pontes cromossômicas durante a anáfase e a telófase, o atraso na separação de cromátides irmãos, cromossomos pegajosos, fragmentos cromossômicos, C-mitoses e poliploidia.

A fórmula utilizada para cálculo do AC foi:

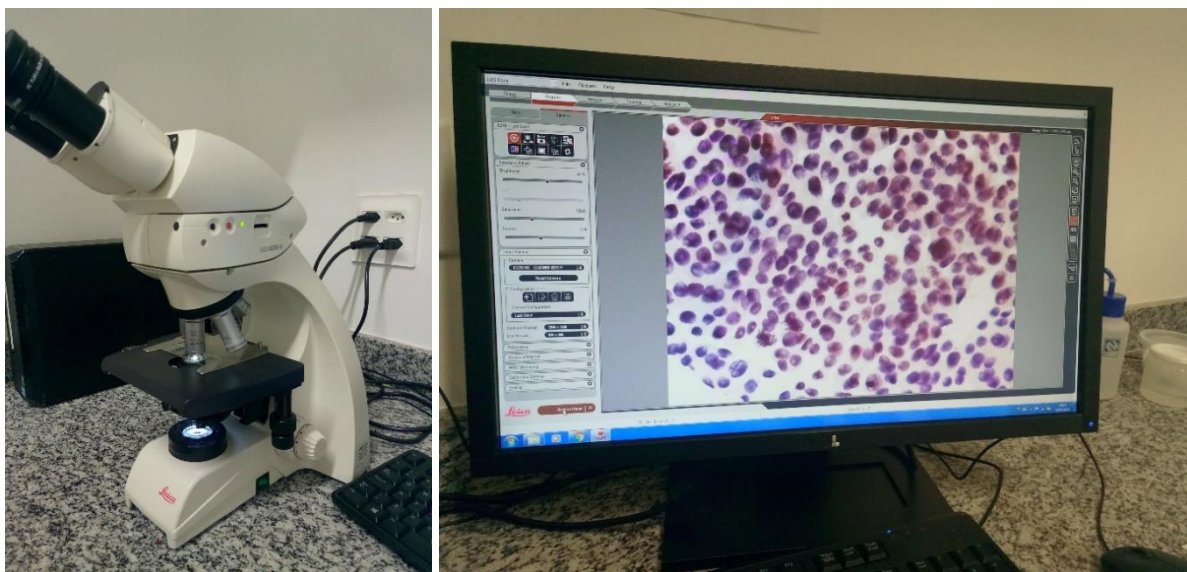
$$AC = \left(\frac{\text{nº total de células com anomalias cromossômicas}}{\text{nº total de células analisadas}} \right) \times 100$$

Figura 11 – Raízes coradas sobre a lâmina de microscopia observadas através de lupa (a). Espalhamento das células coradas após separação da região meristemática (b). Lâminas prontas após técnica do esmagamento e aplicação de Bálsamo Canadá (c).



Fonte: Autora (2019).

Figura 12 – Microscópio de luz conectado ao computador, utilizado para contagem das células e captura de imagens fotográficas das lâminas.



Fonte: Autora (2019).

4.4 Análises Estatísticas

Os dados foram anotados em planilhas individuais para cada um dos grupos de controle e tratamento. A análises estatísticas foram conduzidas usando o programa Graphpad Prism 7.0[®]. Os valores contabilizados foram tratados, excluindo os dados faltantes e substituindo os quocientes, cujo divisor era igual a zero pela média total do grupo. Os dados foram então submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos do teste de Dunnett para comparação dos grupos tratamento com o grupo controle e teste de Tukey para comparação dos grupos entre si e ao nível de 5% de probabilidade.

Foram realizadas correlações entre IM, AC e MN com os valores de cada parâmetro químico analisado através da correlação de Spearman com nível de significância de 0,01 num teste unilateral. Nos casos em que as correlações foram superiores a $r=0,810$, foram elaborados gráficos com interpolação da curva padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Períodos das coletas

Os dados referentes aos índices de precipitação dos meses das análises estão descritos na Tabela 1 e na Tabela 2. Através destes dados, observou-se que os períodos de coleta retrataram as condições climáticas esperadas para avaliação da influência da sazonalidade. Os valores acumulados nos 30 dias anteriores à coleta do período chuvoso foram de 229,7mm de chuva. O valor acumulado nos 30 dias anteriores à coleta do período seco foi consideravelmente menor, com 40,2mm de precipitação. Isso corresponde à pouco mais de 17% do valor total referente ao período chuvoso.

Tabela 1 – Dados pluviométrico registrados durante o período chuvoso de 2018.

Período Chuvoso		
	Data	Precipitação (mm)
Data da coleta	26/02/2018	0
10 dia anteriores	16/02 a 26/02	92,9
30 dias anteriores	26/01 à 26/02	229,7

Fonte: Somar Meteorologia (2019)

Tabela 2 – Dados pluviométrico registrados durante o período seco de 2018.

Período Seco		
	Data	Precipitação (mm)
Data da coleta	10/09/2018	0
10 dia anteriores	01/09 à 10/09	1,1
30 dias anteriores	10/08 à 10/09	40,2

Fonte: Somar Meteorologia (2019)

5.2 Característica do locais de coleta

Durante a visita aos pontos de coleta, fez-se anotações sobre o contexto ecológico ao redor de cada ponto. Em P1, observou-se que o local da nascente fica em meio a uma área de pastagem, abaixo de um bairro residencial recém loteado e por isso é uma região que sofre um grande impacto ambiental. Notou-se sinais de que o escoamento pluvial decorrente do bairro Jardim Panorâmico, que fica na parte mais alta desta região, segue em direção à nascente do córrego percorrendo todo trecho aberto de pastagem. Também foi observada a ausência de mata ciliar ao redor do ponto e a presença de muitas erosões e voçorocas como mostramos na Figura 13. Há presença de gado e animais domésticos, que utilizam este trecho do córrego para dessedentação.

Figura 13 – Local de coleta de P1.



Fonte: Autora (2019).

Em P2 foi observada alta turbidez da água em ambos períodos de coleta e presença de planta daninhas aquáticas (Figura 14). As estruturas recreativas do Balneário da Amizade que ficam na margem oposta ao local da nossa coleta, foram reformadas à pouco tempo e durante o período das coletas deste experimento a área destinada aos banhistas estava interdita por não atender às normas de qualidade para recreação estabelecidas pela Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental - CETESB (2010). Em outros pontos à margem do balneário e próximos

ao nosso ponto de coleta, foi identificada a presença de muito lixo, como móveis velhos e garrafas PET, além e entulhos e dejetos da construção civil.

Figura 14 – Local de coleta de P2 – Balneário da Amizade. Alta turbidez da água e presença de plantas daninhas aquáticas.



Fonte: Autora (2019).

Figura 15 – Local de coleta de P3 – Campus II da Unoeste.



Fonte: Autora (2019).

P3 é uma região que recebe a água despejada pelo córrego do Veado e está à 1,5 Km a jusante de sua foz. Este córrego atravessa toda região urbana de Presidente Prudente desde a Zona Leste da cidade, e apesar de estar canalizado subterraneamente na maior parte de seu curso, é o principal destino da água pluvial decorrente da precipitação nas regiões centrais da cidade. No local, apesar da presença de vegetação ciliar (Figura 15), esta não atende a delimitação mínima estipulada pela Lei nº 9.985/2000 estabelecida no Código Florestal (BRASIL, 1965) que é de 30 metros para os cursos d'água menores que 10 metros de largura. Também é nitidamente predominante a presença das Leucenas (*Leucaena leucocephala*), espécie arbórea que já foi apontada por alguns autores como uma espécie invasora (SCHERER *et al.*, 2005), mas tem relativa importância na manutenção da permeabilidade do solo e na estabilidade das encostas contra deslizamentos.

Figura 16 – Local de coleta de P4. A seta indica o local de despejo da ETE- Limoeiro.



Fonte: Autora (2019).

A coleta das amostras do P4 foram realizadas na margem oposta ao despejo de esgoto tratado pela ETE – Sabesp. Apesar da presença de aves aquáticas, como garças, ao redor de grande parte do curso do córrego do Limoeiro ao qual percorremos, nesta região não foi vista sua presença em nenhum dos períodos de

coleta, provavelmente devido à ausência de peixes dos quais estas aves se alimentam. Observou-se também a presença de espuma sobre a lâmina d'água (Figura 16) e odor desagradável. Como observado no ponto anterior, há presença de vegetação riparia às margens do córrego com predomínio das Leucenas.

Em P5 também observou-se a ausência de vegetação às margens do córrego, sabendo-se que se trata de uma APP (Área de Preservação Permanente) segundo o Código Florestal (BRASIL, 1965). O local é rodeado por pasto (Figura 17) e há presença de gado. A transparência da água no local é maior que a dos outros pontos e foi observada a presença de aves aquática se alimentando no seu curso.

Figura 17 – P5. Região do córrego que cruza a Estrada Vicinal Vereador José Molina.



Fonte: Autora (2019).

5.3 Análises físico-químicas e microbiológicas

Os valores obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas de ambos períodos estão demonstrados na Tabela 3 e na Tabela 4. Apesar do córrego do Limoeiro ser classificado como Classe 4 de acordo com a resolução CONAMA no. 357/2005 (BRASIL, 2000), esse enquadramento não reflete a real atividade realizada no local, pois durante o trabalho de campo pode-se constatar que o rio é utilizado para dessedentação de animais nas áreas rurais, irrigação de pomares, atividades recreativas, lazer e pesca. Portanto, os valores de referência que utilizamos como parâmetros máximos foram correspondentes à Classe 3, que abrange todas as atividades supracitadas.

5.3.1 Período Chuvoso

Dos pontos analisados no período chuvoso (Tabela 3), os que apresentaram menor quantidade das bactérias *E. coli* foram P1 (nascente) e P4 (ETE). P3, que recebe descarga do córrego do Veado, foi o único local os valores ficaram acima dos valores de referência do CONAMA que é de 1000 NMP/100mL.

P2 (Balneário da Amizade) e P4 (ETE) tiveram valores de DBO (demanda bioquímica de oxigênio) superiores ao limite, sendo que P2 apresentou valor muito superior ao exigido. O valor DBO é utilizado para estimar a carga orgânica dos recursos hídricos, e valores muito altos indicam que a matéria orgânica presente utiliza grande parte o oxigênio dissolvido disponível para sua oxidação no processo de degradação.

As concentrações de cobre, cádmio e cromo apresentaram valores superiores aos limites determinados pelo CONAMA em todos os pontos, enquanto o zinco ficou abaixo em todos os pontos, mesmo com P3 apresentando valor bem maior que os demais. Os valores de chumbo, apesar de superiores ao recomendado em apenas dois pontos (P2 e P5), ficaram muito próximos do limite máximo nos demais pontos.

Tabela 3 – Análises físico-químicas e microbiológicas referentes ao mês de fevereiro de 2018 (período chuvoso).

Ponto	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100ml)	<i>Coliformes Totais</i> (NMP/100ml)	<i>DBO</i> (mg/L)	<i>DQO</i> (mg/L)	<i>Cu</i> (mg/L)	<i>Zn</i> (mg/L)	<i>Cd</i> (mg/L)	<i>Pb</i> (mg/L)	<i>Cr</i> (mg/L)
P1	5	220	0,05	16,22	0,29	0,07	0,14	0,03	0,09
P2	230	1340	55,24	78,92	0,19	0,36	0,09	0,04	0,11
P3	1500	5500	6,65	35,11	0,24	1,76	0,11	0,02	0,13
P4	0	4500	11,65	44,00	0,15	0,43	0,15	0,03	0,22
P5	230	880	3,65	10,67	0,28	0,32	0,11	0,06	0,14
Parâmetros máximos*	1000		10		0,013	5	0,01	0,033	0,05

Fonte: Autora (2019).

Nota: *De acordo com a resolução do CONAMA Nº 357/2005 para Classe 3/ Águas Doces
Cu = cobre; Zn = zinco; Cd = cádmio; Pb = chumbo; Cr = Cromo

A partir dessas informações sabemos que todos os pontos apresentaram algum grau de contaminação no período chuvoso, destacando P1 com altos níveis de

cobre e cádmio, P2 com grande presença de matéria orgânica, P3 com os maiores valores de coliformes fecais e zinco, P4 com maior concentração de cádmio e cromo, e P5 com valores de cobre e chumbo mais elevados.

5.3.2 Período Seco

No período seco, os dados obtidos (Tabela 4) para *E. coli*, demonstraram que P5 apresentou valor maior que o determinado pelo CONAMA, enquanto os outros pontos ficaram abaixo desse limite. Os valores de P1, P2 e P3 foram menores no período seco que no período chuvoso. P4 e P5 foram maiores no período seco.

Para DBO, o único ponto que extrapolou o limite legal foi P4, sendo maior que os valores do mesmo ponto no período chuvoso.

Nas análises de metais pesados, as concentrações de cobre foram superiores ao limite legal em todos os pontos, porém menores que as concentrações do período chuvoso em 4 pontos. Apenas P4 apresentou concentração maior que a do período chuvoso.

O zinco apresentou valores pequenos se comparados ao valores do período chuvoso e muito inferiores aos determinados pelo CONAMA.

A concentração de cromo foi superior ao limite legal em quatro dos cinco pontos, somente P1 não apresentou traços detectáveis deste metal e em relação ao período anterior P3, P4 e P5 apresentaram concentrações maiores no período seco.

No caso do cádmio e chumbo, as quantidades presentes nas amostras não foram detectáveis pelo equipamento. Devido a improbabilidade da ausência desses metais nas amostras e tendo como base as análises do semestre anterior, consideramos que houve possível falha do equipamento durante a leitura, ou os concentrações eram menores que as concentrações detectáveis pelo equipamento. Portanto esses dados não foram considerados nas relações que fizemos posteriormente.

Resumindo, no período seco verificamos que todos os pontos apresentaram algum grau de contaminação também. P1 com nível de cobre superior ao limite, P2 e P3 com cobre e cromo acima dos limites, P4 apresentou DBO, cobre e cromo em valores acima do permitido e P5 com altos níveis de coliformes fecais, cobre e cromo extrapolando os valores determinados.

Tabela 4 – Análises físico-químicas e microbiológicas referentes ao mês de setembro de 2018 (período seco).

Ponto	<i>Escherichia coli</i> (NMP/100ml)	<i>Coliformes totais</i> (NMP/100ml)	<i>DBO</i> (mg/L)	<i>DQO</i> (mg/L)	<i>Cu</i> (mg/L)	<i>Zn</i> (mg/L)	<i>Cd</i> (mg/L)	<i>Pb</i> (mg/L)	<i>Cr</i> (mg/L)
P1	0	165	0,65	10,67	0,19	0,12	0*	0*	0
P2	20	140	3,65	17,33	0,16	0,16	0*	0*	0,11
P3	135	1450	7,21	97,33	0,23	0,16	0*	0*	0,26
P4	340	1200	27,21	90,67	0,24	0,17	0*	0*	0,44
P5	1500	5500	5,65	54	0,26	0,12	0*	0*	0,27
Parâmetros máximos**	1000		10		0,013	5	0,01	0,033	0,05

Fonte: Autora (2019).

Nota: *Devido a improbabilidade da ausência desses metais nas amostras e tendo como base análises do período anterior, consideramos possível falha do equipamento durante a leitura ou pouca sensibilidade de detecção dos traços desses metais. Portanto não validamos esses dados.

**De acordo com a resolução do CONAMA Nº 357/2005 para Classe 3/ Águas Doces
Cu = cobre; Zn = zinco; Cd = cádmio; Pb = chumbo; Cr = Cromo

Sabemos que a maioria dos metais pesados são encontrados naturalmente no ambiente natural em pequenas concentrações, porém em altas concentrações podem causar danos ao ecossistema, devido a bioacumulação, podendo causar mutação no material genético dos organismos vivos (FLOREA; BUSSELBERG, 2006).

O chumbo é o único metal que parece ter apenas efeitos tóxicos e nenhuma função essencial ao organismo dos seres vivos. Ele está presente principalmente nas baterias elétricas, em alguns pigmentos e tintas e principalmente nos produtos industrializados e na gasolina como um aditivo, sendo as atividades relacionadas à esses produtos as principais fontes de contaminação ambiental (GERBER; LÉONARD; JACQUET, 1980). Em concentrações intermediárias tem capacidade de inibir o crescimento celular em raízes de *A. cepa* e em concentrações acima de 50ppm bloqueiam a divisão celular (LERDA, 1992)

O cádmio é carcinogênico e atua como um mutágeno muito potente, devido sua meia-vida extremamente longa. Essa propriedade faz com que se acumule com facilidade no meio ambiente. Naturalmente, ele é produzido pela atividade vulcânica e transportado pelos ventos, mas suas principais fontes de contaminação estão relacionadas à produção de PVC onde atua como estabilizante, pigmentos, baterias recarregáveis e até mesmo o cigarro (FILIPIC, 2012).

O cromo é um elemento essencial à atividade metabólica da glicose nos animais. Sua forma hexavalente é facilmente absorvida pela membrana celular e reduzida para a forma trivalente. Entretanto, o cromo hexavalente é a única forma do metal que geralmente causa efeitos tóxicos à indivíduos expostos (MATSUMOTO; MARIN-MORALES, 2004). Os processos industriais, como curtimento de couro e produção de aço inoxidável, são as principais fontes de poluição.

O cobre também é um metal essencial, porém, em altos níveis, pode ser perigoso devido à formação de espécies reativas de oxigênio (PRÁ *et al.*, 2008). É frequentemente utilizado nas atividades agrícolas, estando presentes em diversos produtos, incluindo agrotóxicos (BENITES *et al.*, 2014).

Dentre os metais avaliados neste trabalho, o zinco é que possui menor toxicidade, além de não ser mutagênico em si. Entretanto, é necessário na proliferação celular. A falta desse elemento em plantas, por exemplo, leva à repressão de seu crescimento.

5.4 Análises citogenéticas em *Allium cepa* L.

5.4.1 Citotoxicidade

Ao avaliar as células meristemáticas de *A. cepa* em processo de divisão celular, foi possível determinar o índice mitótico (IM) para cada grupo. Os valores encontrados estão descritos nas Tabela 5 (período chuvoso) e na Tabela 6 (período seco).

Na primeira fase do experimento (período chuvoso) foi realizada avaliação do controle positivo (H_2O_2 a 0,3M) como forma de avaliar a sensibilidade do teste, juntamente com a avaliação do controle negativo e dos pontos de coleta selecionados. Através da análise variância ANOVA e do teste de Dunnett verificamos que o procedimento experimental foi eficaz, com valores significativos ao nível de 1%.

Estatisticamente, os pontos P2 e P4 tiveram redução significativa do IM se comparados ao controle negativo, revelando que estes pontos apresentam contaminação por substâncias citotóxicas (Tabela 5).

Tabela 5 – Índice mitótico dos meristemas radiculares de *A. cepa* referentes ao mês de fevereiro de 2018 (período chuvoso).

Grupos	Índice Mitótico (%)	Número de células nas diferentes fases				
		Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Controle Negativo	6.89	6435	181	93	77	125
Controle Positivo	2.95**	6354	88	58	19	28
P1	5.14	5742	127	24	61	99
P2	4.56*	6259	90	45	55	109
P3	5.73	6521	148	69	44	135
P4	4.67**	6041	130	45	32	89
P5	5.36	6019	115	49	48	129

Fonte: Autora (2019).

* Significativo ao nível de 5% ($p \leq 0.05$), ** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle negativo.

Tabela 6 – Índice mitótico dos meristemas radiculares das cebolas referentes ao mês de Setembro de 2018 (período seco)

Grupos	Índice Mitótico (%)	Número de células nas diferentes fases				
		Interfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase
Controle Negativo	8.78	6141	267	89	113	122
Ponto 1	9.75	6038	284	134	107	127
Ponto 2	6.72**	6403	201	81	72	106
Ponto 3	6.15**	5810	158	65	46	112
Ponto 4	8.27	6143	248	82	83	141
Ponto 5	7.11**	5957	216	70	73	97

Fonte: Autora (2019).

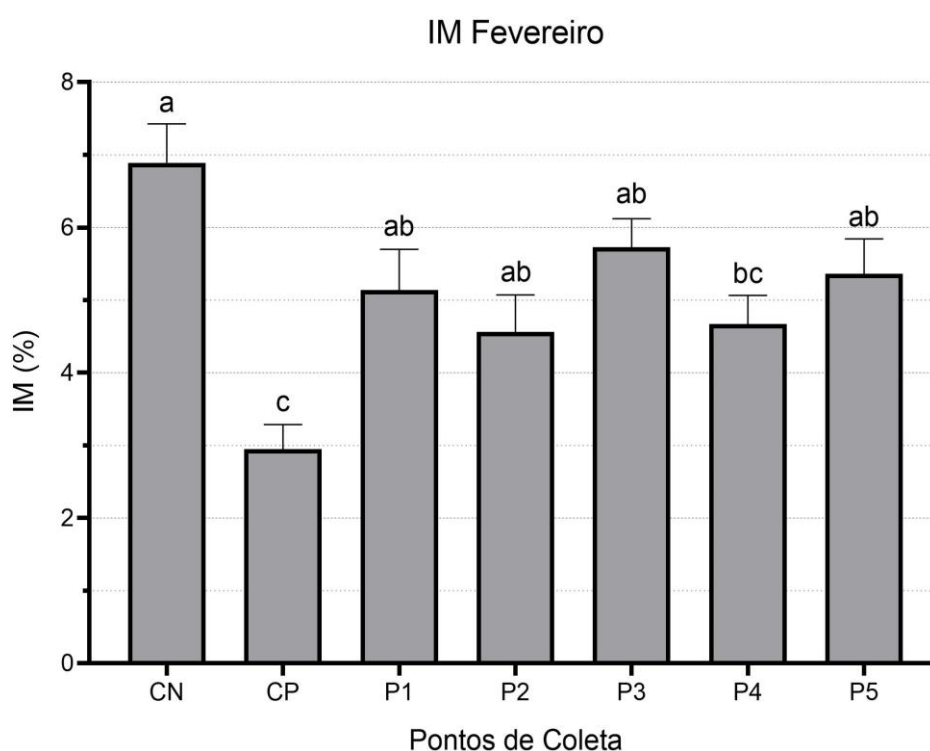
* Significativo ao nível de 5% ($p \leq 0.05$), ** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle negativo

No período seco, os pontos que sofreram variação significativa foram P2, P3 e P5 se comparados ao controle negativo como demonstrado na Tabela 6. Nos gráficos da Figura 18 e 19 pode-se observar também a diferença estatística entre todos os grupos através de agrupamento pelo teste de Tukey.

Através da análise do IM pode-se avaliar a citotoxicidade de diversas substâncias, como água poluída ou contaminada (CUCHIARA; BORGES; BOBROWSKI, 2012). Tanto o aumento quanto a diminuição do IM são importantes indicadores no monitoramento da poluição ambiental.

Dos valores de IM obtidos neste experimento, podemos inferir o potencial citotóxico dos diferentes pontos de coleta de água do córrego do Limoeiro, usando o controle negativo como comparação. Smaka-Kincl *et al.* (1996) mostrou que a diminuição do IM em células meristemáticas de *A. cepa* pode ser considerada um método confiável para determinar a presença de agentes citotóxicos no ambiente e, portanto, pode ser considerado como um teste sensível para estimar os níveis de poluição.

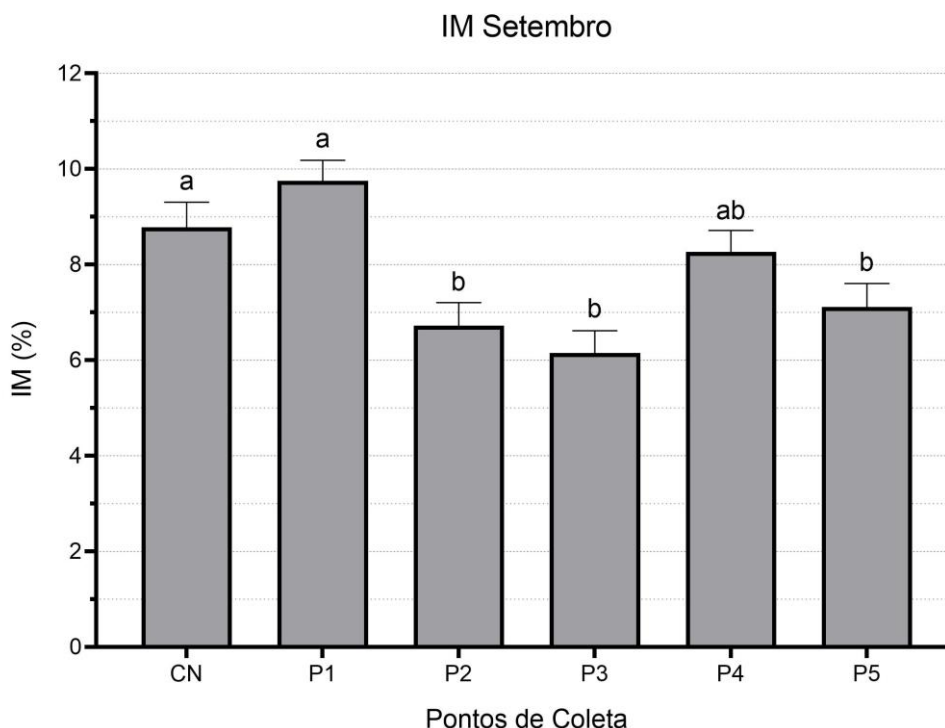
Figura 18 – Índice mitótico dos grupos no período chuvoso.



Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

O IM em todos os grupos tratados do período chuvoso foi inferior ao IM do controle negativo, mas somente em P2 e P4 essa redução foi significativa. Nos grupos tratados do período seco o IM de P1 foi o único superior ao controle negativo. Os demais pontos tiveram o IM inferior ao controle, mas somente em P2, P3 e P5 essa variação foi significativa.

Figura 19 – Índice mitótico dos grupos no período seco.



Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

Através da correlação de Spearman comparamos os dados de IM obtidos e os dados físico-químicos e biológicos avaliados nos dois períodos. Em nenhum dos períodos observou-se resultados significativos para as substâncias avaliadas.

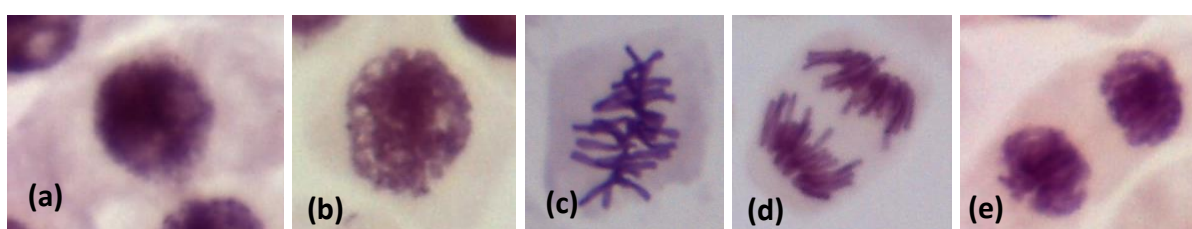
A diminuição do IM dos grupos tratados em relação ao controle negativo, pode ser indício da presença de substâncias que provocam ações químicas no crescimento e no desenvolvimento do organismo exposto. Além dos metais pesados outras substâncias já testadas são capazes de inibir a divisão celular no estágio anterior à mitose (LERDA, 1992).

Mesmo sendo aceito como um ótimo mecanismo de biomonitoramento ambiental, o teste *Allium cepa* apresenta restrições nas avaliações de algumas classes de substâncias (UHL *et al.*, 2003) devido às grandes diferenças metabólicas entre os organismos vegetais e animais. Os resultados obtidos através deste trabalho podem ser extrapolados para muitos outros organismo que são expostos diariamente ao contato com as águas contaminadas do córrego do Limoeiro, mas servem principalmente como sinal de alerta para os riscos provenientes da exposição contínua de outros organismo, incluindo seres humanos, aos seus efeitos citotóxicos.

5.4.2 Genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade do Córrego do Limoeiro foi feita através da comparação dos índices de anomalias cromossômicas. Utilizamos como parâmetro para determinação das células normais e células anormais as seguintes imagens (Figura 20) que demonstram células em divisão sem anomalias.

Figura 20 – Fases da mitose sem anomalias: Interfase (a); Prófase (b); Metáfase (c); Anáfase (d); Telófase (e).



Fonte: Autora (2019).

Após a contagem total das células em divisão, calculamos o índice de Anomalias Cromossômicas (AC). Os resultados estão apresentados na Tabela 7 e 8. Foram consideradas anomalias as pontes cromossômicas durante a anáfase e a telófase, o atraso na separação de cromátides irmãs, cromossomos pegajosos, fragmentos cromossômicos, C-mitoses e poliploidia. Alguns exemplos estão demonstrados na Figura 21.

Tabela 7 – Índice de Anomalias Cromossômicas referentes período chuvoso.

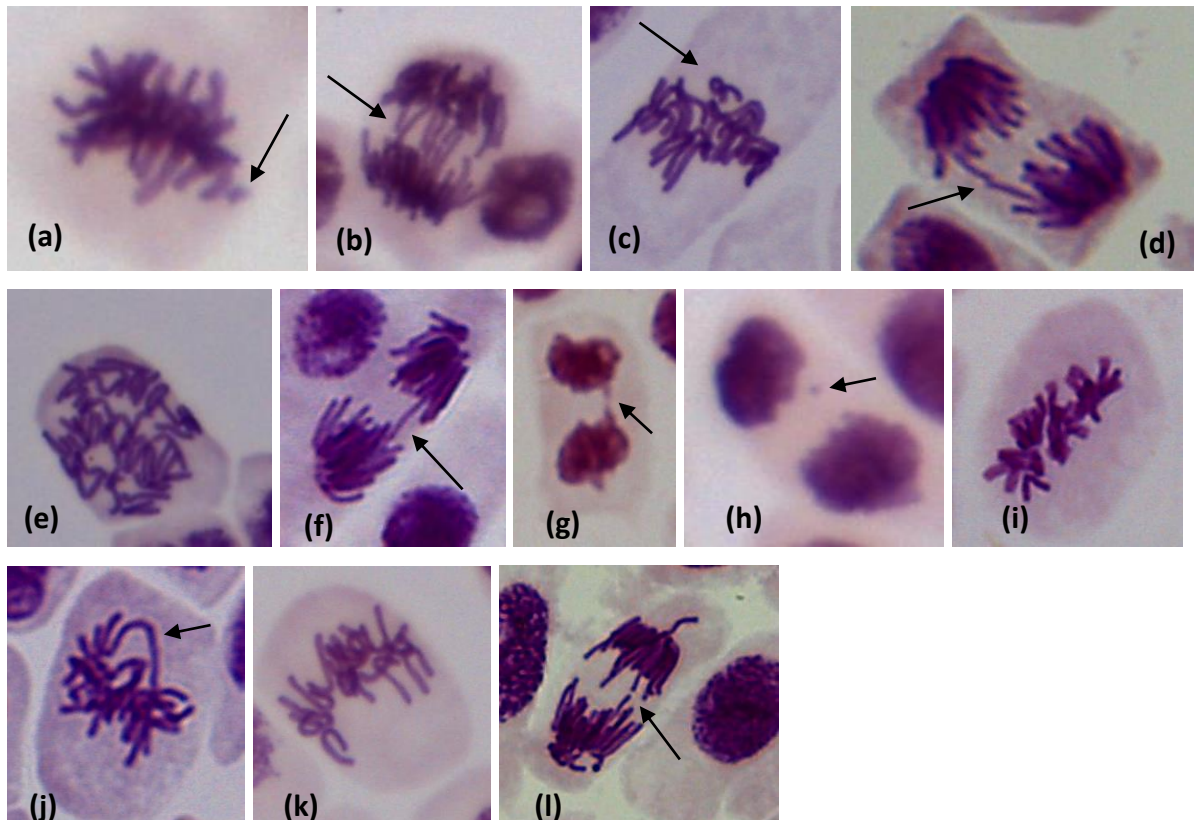
Grupos	P	AC	M	AC	A	AC	T	AC	Total Mitoses	Total AC	Frequência AC (%)
CN	125	0	109	4	87	6	92	1	413	11	2,66%
CP	28	1	33	3	19	3	15	4	95	11	11,58%**
P1	88	1	28	1	43	5	38	0	197	7	3,55%
P2	65	2	44	3	41	5	34	1	184	11	5,98%
P3	101	1	76	7	49	4	45	0	271	12	4,43%
P4	67	0	58	1	41	6	41	3	207	10	4,83%
P5	66	0	79	7	54	12	49	1	248	20	8,06%**

Fonte: Autora (2019).

P = prófase; M = metáfase; A= anáfase; T = telófase; AC = anomalias cromossômicas.

* Significativo ao nível de 5% ($p \leq 0.05$), ** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle

Figura 21 – Principais tipos de anomalias cromossômicas identificadas: metáfase com fragmento cromossômico (a); anáfase com pontes cromossômicas (b); metáfase com perda cromossômica (c); anáfase com cromossomos pegajosos (d); metáfase poliploide (e); anáfase com ponte cromossômica (f); telófase com atraso cromossômico (g); telófase com quebra cromossômica (h); c-mitose (i, k); metáfase com cromossomos soltos (j); cromossomos atrasados (l).



Fonte: Autora (2019).

Tabela 8 – Índice de Anomalias Cromossômicas eferentes ao período seco.

Grupos	P	AC	M	AC	A	AC	T	AC	Total Mitoses	Total AC	Frequência AC (%)
CN	259	0	122	1	174	10	110	2	665	13	1,95
P1	186	0	124	6	140	9	120	0	570	15	2,63
P2	129	0	81	2	96	10	79	2	385	14	3,63*
P3	122	0	76	5	93	5	70	2	361	12	3,32
P4	66	0	105	3	137	15	135	2	443	20	4,51**
P5	94	0	97	6	116	6	89	0	396	12	3,03

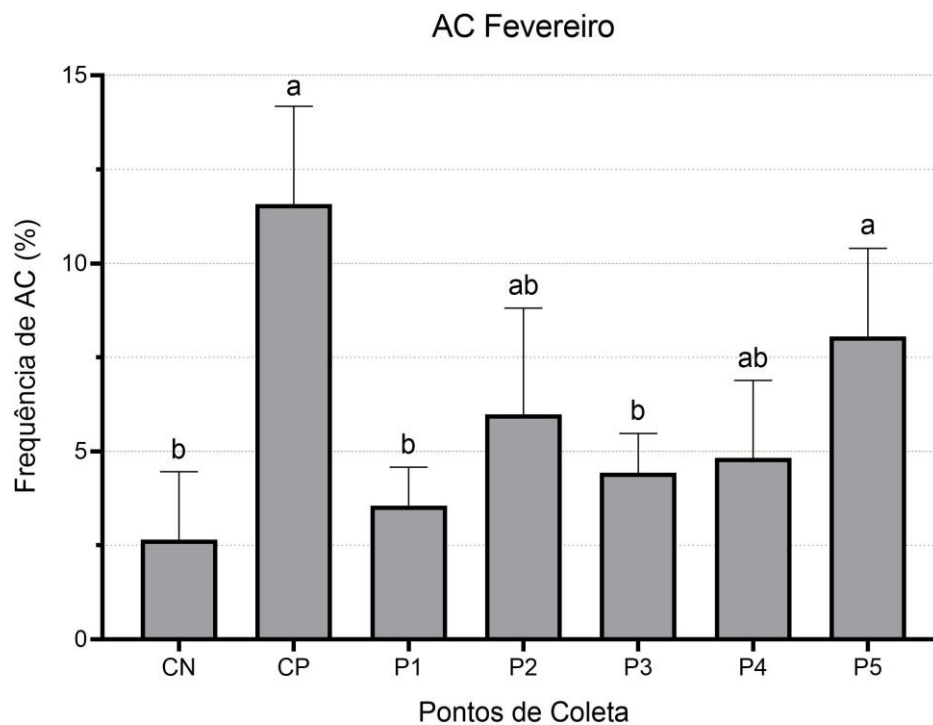
Fonte: Autora (2019).

P = prófase; M = metáfase; A= anáfase; T = telófase; AC = anomalias cromossômicas.

* Significativo ao nível de 5% ($p \leq 0.05$), ** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle

No período chuvoso somente P5 apresentou potencial genotóxico significativo em comparação ao controle negativo. Na Figura 22 é possível observar o índice de anomalia para cada ponto e o agrupamento realizado pelo teste de Tukey. No período seco os pontos P2 e P4 apresentaram valores significativos em relação ao controle e o gráfico pode ser observado na Figura 23.

Figura 22 – Frequência de AC dos grupos no período chuvoso.

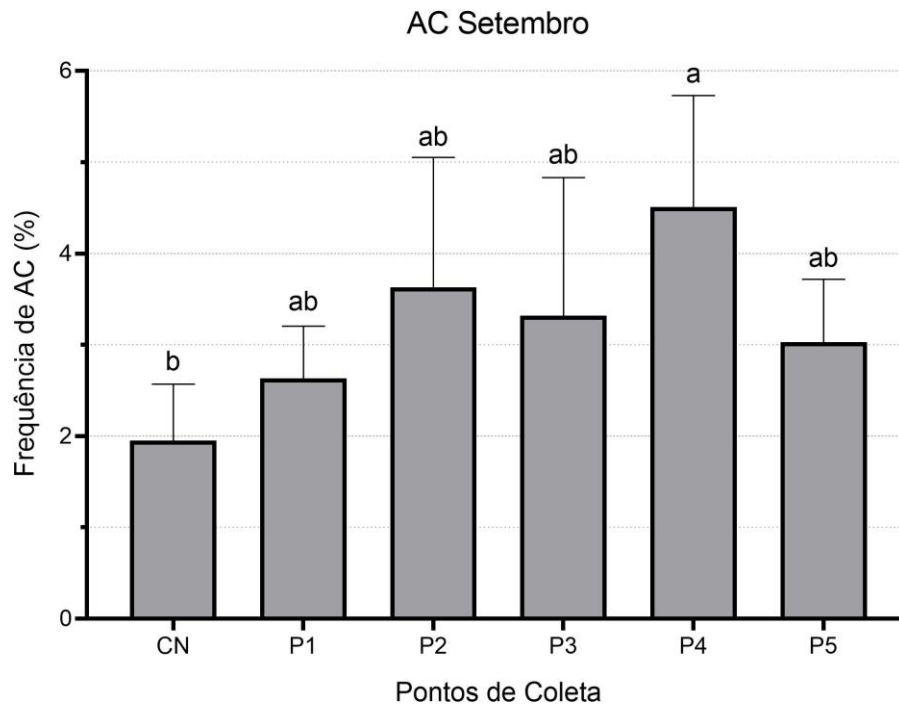


Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

De acordo com Natarajan (2002), alterações cromossômicas são reconhecidas como consequência das ações genotóxicas de agentes químicos.

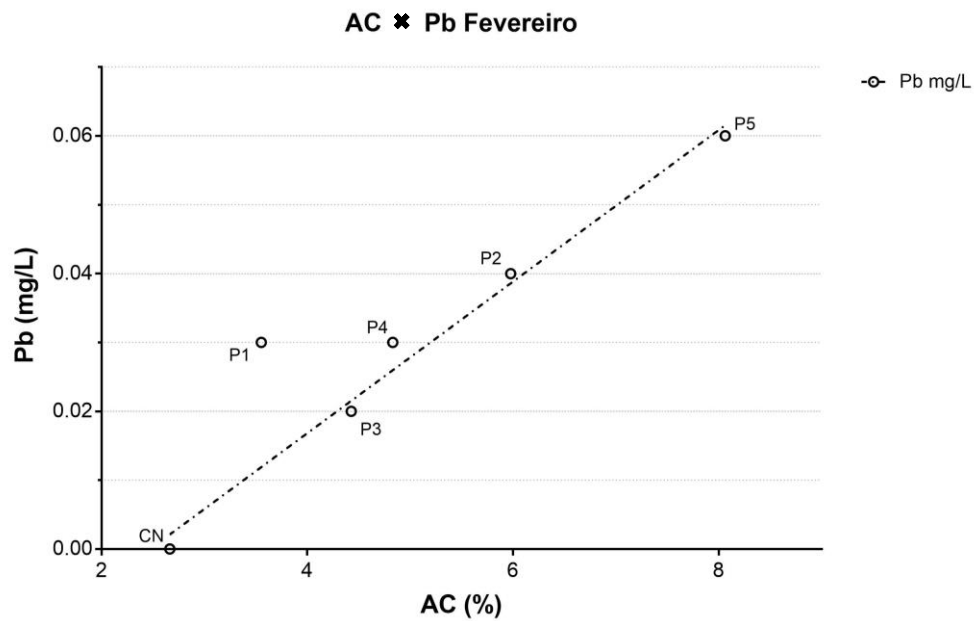
As diferenças de genotoxicidade entre os vários pontos de coleta em um rio podem estar relacionadas ao volume de água (variação na concentração dos agentes genotóxicos) e/ou ao efeito cumulativo de diferentes fontes (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Por este motivo foram escolhidos 5 pontos amostrais nesta pesquisa, considerando lugares com diferentes tipos de atividade onde fosse possível fazer correlações entre os resultados e as atividades.

Figura 23 – Frequência de AC dos grupos no período seco.



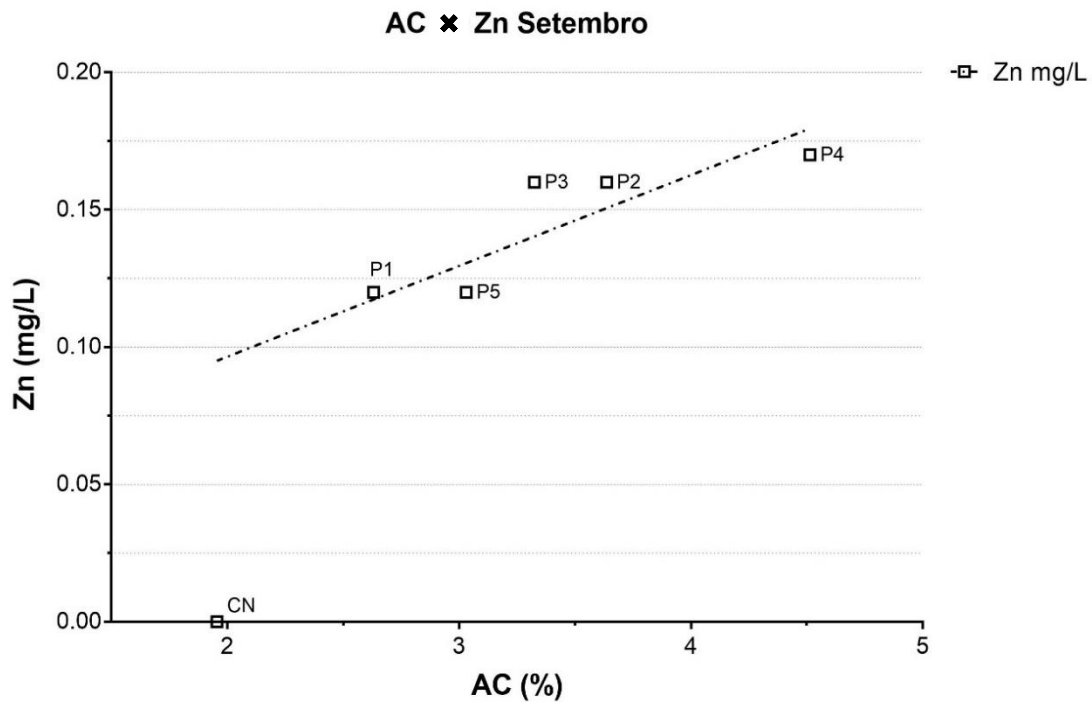
Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

Figura 24 – Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de chumbo no pontos de coleta durante o período chuvoso.



Correlação de Spearman $r=0,899$; $p < 0,05$
 Fonte: Autora (2019).

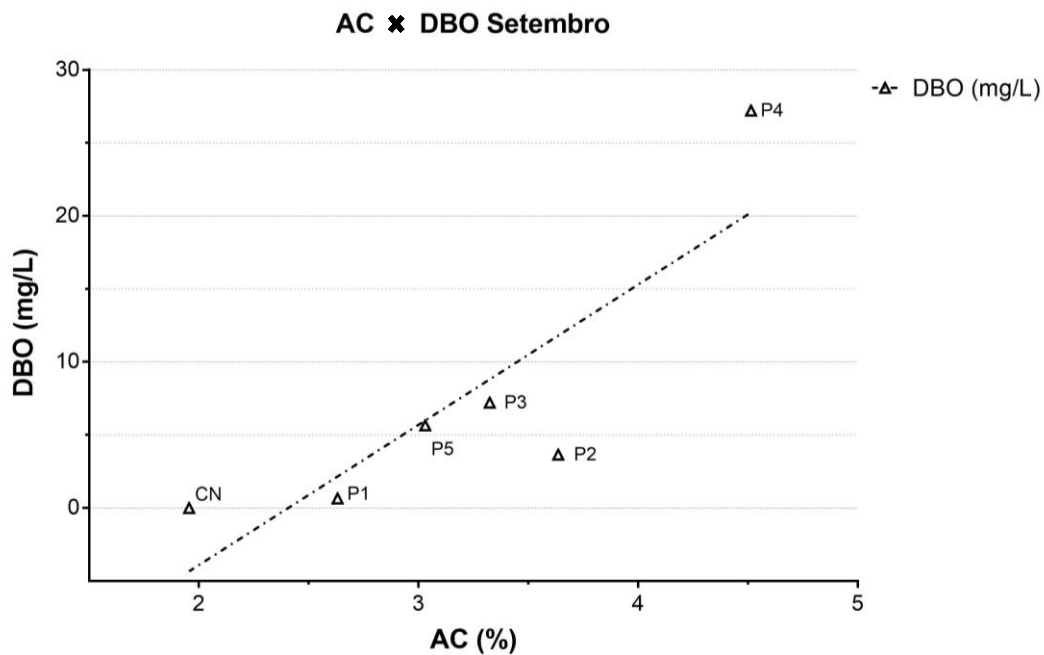
Figura 25 – Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período seco.



Correlação de Spearman $r=0,971$; $p < 0,01$

Fonte: Autora (2019).

Figura 26 – Gráfico de correlação entre AC e as concentrações de DBO no pontos de coleta durante o período seco.



Correlação de Spearman $r=0,829$; $p < 0,05$

Fonte: Autora (2019).

A sazonalidade também foi avaliada devido ao efeito de diluição que ocorre nos períodos de chuva. Resultados encontrados por Scalon *et al.* (2010), mostraram que a genotoxicidade do Rio dos Sinos, avaliada através de *A. cepa*, foi mais significativa durante a primavera e o verão, e menor no outono e inverno, sugerindo influência das diferenças sazonais de precipitação pluviométrica.

Neste trabalho essa variação não foi constatada de forma clara, pois os pontos que apresentaram valores de AC significativos foram diferentes para os dois períodos. Entretanto, as correlações entre as análises físico-químicas e os índices de AC, nos ajudaram a entender melhor quais as possíveis causas podem estar relacionadas ao aumento da genotoxicidade nos pontos em ambos períodos.

A presença de chumbo parece ter sido um dos fatores que influenciaram o aumento dos índices de AC no período chuvoso (Figura 24). P5 apresentou os maiores valores para AC e maior concentração de chumbo. Sabendo que uma das principais fontes de contaminação é a gasolina, por utilizar este metal como um aditivo, e que o P5 é o ponto mais exposto e próximo à rodovia, podemos supor que a presença do chumbo é em decorrência do escoamento pluvial que transporta as partículas de chumbo, liberadas pelo tráfego de veículos, para o córrego.

O zinco apresentou uma correlação muito forte com os valores de AC para o período seco (Figura 25). Os pontos P2, P3 e P4 que apresentaram concentração elevada, em relação aos demais pontos, são os locais que recebem influência maior das atividades urbana. P2 está muito próximo de vários bairros residenciais, P3 recebe toda a água do Córrego do Veado que cruza a cidade de Presidente Prudente e P4 recebe o esgoto tratado que é produzido por Presidente Prudente e Álvares Machado. Esses dados divergem muito dos dados obtidos por Evseeva, Geraskin e Shuktomova, 2003. Neste estudo a correlação entre as concentrações de zinco e a genotoxicidade foi fraca. As principais fontes de contaminação de zinco pelo homem são os produtos utilizados contra a corrosão de peças de metal, a indústria automobilística, ferramentas, aparelhos elétricos e fabricação de hardwares (LEONARD; GERBER; LEONARD, 1986).

A presença de matéria orgânica na água, indicada pelos valores de DBO também mostram correlação com a genotoxicidade (Figura 26). P4, que apresentou o maior valor de DBO no período seco, foi o ponto a apresentar maior genotoxicidade neste período. Monarca *et al.* (2005) e Ferreti *et al.* (2008) avaliaram a genotoxicidade de diversos desinfetantes utilizados no tratamento de água e encontraram valores

significativos. Na ETE – Limoeiro que fica em frente a P4, são acrescentados desinfetantes à base de cloro ao efluente que, segundo os autores supracitados, ao reagirem com a matéria orgânica geram subprodutos com alto potencial de danos do material genético, como os trihalometanos (TAMs). Quanto maior for a presença de matéria orgânica presente na água tratada, maiores são os danos genéticos, sendo a forma gasosa do desinfetante (gás cloro) mais genotóxico que o hipoclorito. Considerando que no período seco, o fluxo do córrego no local de despejo da ETE, seja menor e a quantidade de lançamento de esgoto tratado continue a mesma, a concentração de matéria orgânica deve ser maior também, explicando o fato deste período apresentar potencial genotóxico.

Lankoff *et al.*, (2006), explicam que atividades originadas de fontes naturais, como a presença de cianobactérias, também podem liberar substâncias genotóxicas na água e interferir nos resultados finais.

De certa forma o impacto genotóxico das águas residuais sobre o meio ambiente e para a saúde humana são difíceis de prever, devido as misturas complexas de substâncias químicas, e uma interpretação completa de seu efeito requer mais que análises químicas. (ODEIGAH *et al.*,1997).

5.4.3 Mutagenicidade

A avaliação de mutagenicidade foi obtida através da comparação dos índices de frequência de micronúcleos (MN) presentes nas células meristemáticas de *A. cepa*. Os resultados dos grupos tratados foram comparados aos do controle negativo e estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

A presença dos MN pode ser causada por efeitos tanto clastogênicos (perda de fragmentos cromossômicos ou de cromátide) quanto por efeitos aneugênicos (perda dos cromossomos inteiros). Isso ocorre porque durante a mitose eles não se ligam adequadamente ao fuso durante o processo de segregação. Esses cromossomos deslocados ou fragmentos são então envolvidos por uma membrana nuclear e, com exceção de seu tamanho menor, são morfologicamente similares aos núcleos após a coloração nuclear convencional. Mas isso só ocorre quando a carga de dano ao DNA excede a capacidade de reparo da célula dentro de um período de tempo especificado (FENECH *et al.*, 2011).

Portanto, se a velocidade do ciclo celular é aumentada, a capacidade de reparo celular pode ser comprometida levando à formação de MN (EVSEEVA; GERASKIN; SHUKTOMOVA, 2003).

No período chuvoso (Tabela 9) nenhum dos pontos avaliados apresentou frequência significativa de MN em suas células. Apenas o controle positivo apresentou variação significativa, validando a confiabilidade do método. O gráfico pode ser observado na Figura 27.

Tabela 9 – Índice de micronúcleos referentes ao período chuvoso.

Grupos	Interfase	MN	Frequência MN (%)
CN	6435	8	0,12
CP	6354	15	0,24**
P1	5742	6	0,10
P2	6259	5	0,08
P3	6521	4	0,06
P4	6041	4	0,07
P5	6019	4	0,07

Fonte: Autora (2019).

MN = micronúcleo.

** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle

No período seco (Tabela 10), em P2, P3 e P4 a variação da frequência foi significativamente maior que a frequência no grupo controle. Estes grupos foram também os que apresentaram os maiores valores para zinco. Na Figura 28 é possível observar o gráfico com os valores agrupados através do teste de Tukey.

Tabela 10 – Índice de micronúcleos referentes ao período seco.

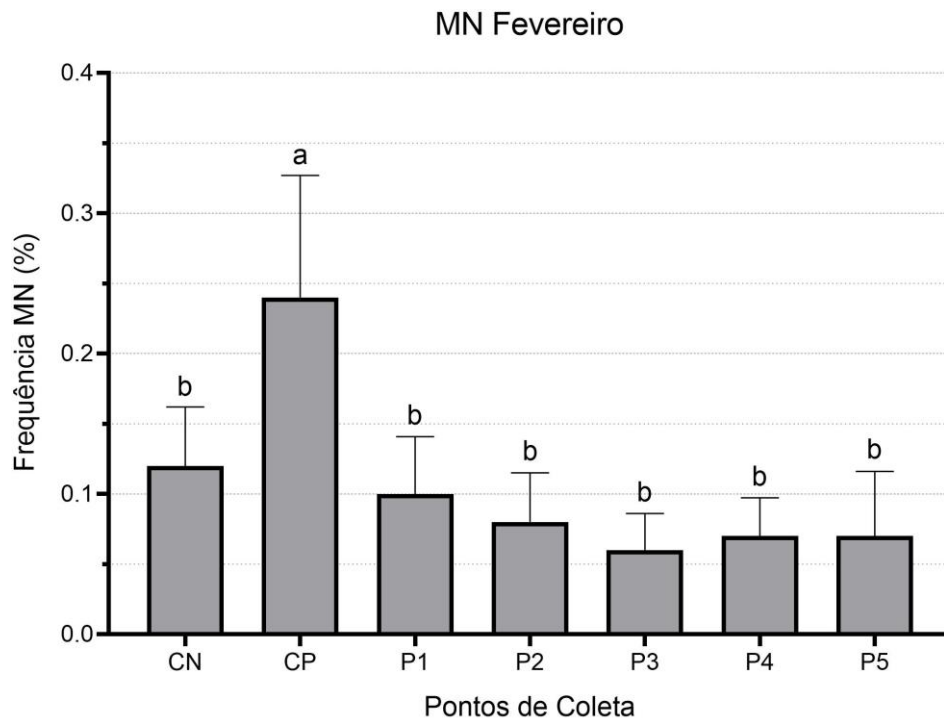
Grupos	Interfase	MN	Frequência MN (%)
CN	6141	6	0,06
P1	6038	7	0,12
P2	6403	10	0,16**
P3	5810	11	0,19**
P4	6143	13	0,21**
P5	5957	8	0,13

Fonte: Autora (2019).

MN = micronúcleo.

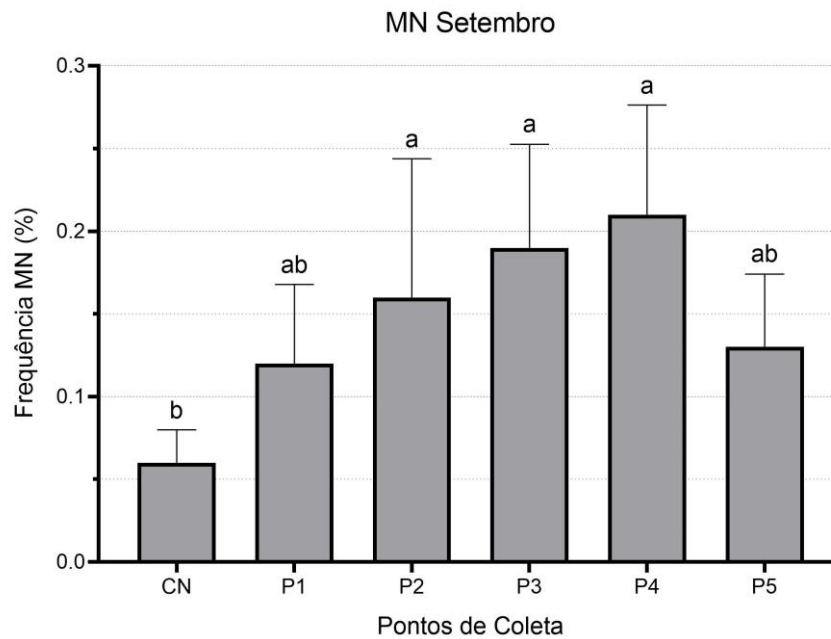
** Significativo ao nível de 1% ($p \leq 0.01$) se comparados ao controle

Figura 27 – Frequência de MN dos grupos no período chuvoso.



Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

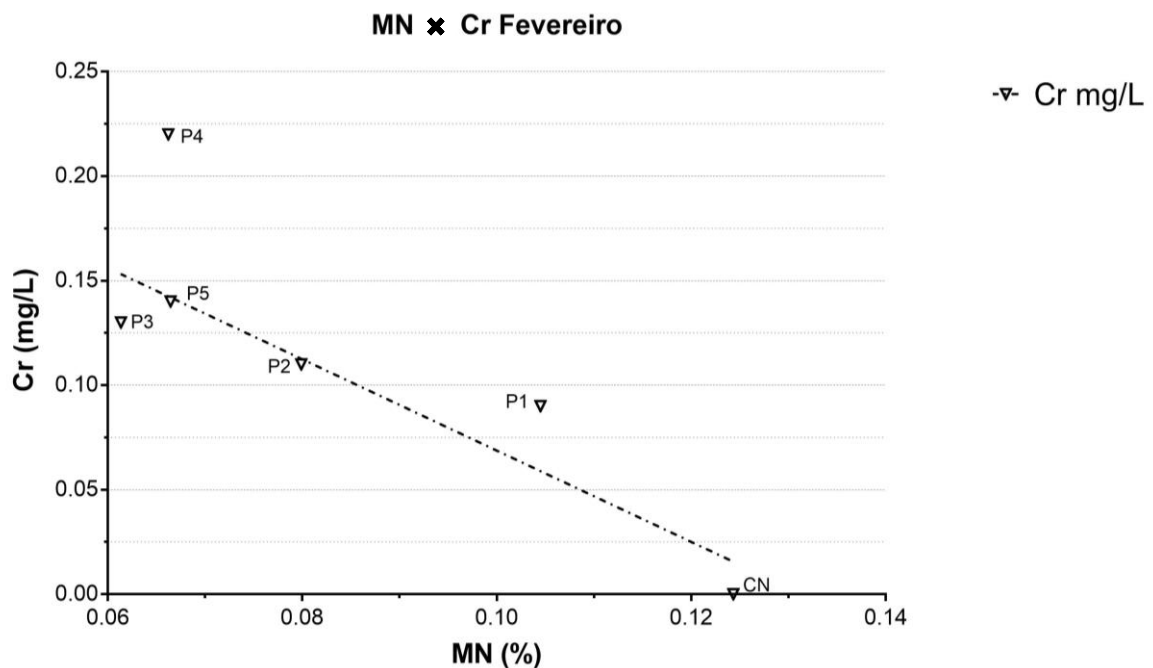
Figura 28 – Frequência de MN dos grupos no período seco



Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (Teste Tukey; $p < 0,05$)
 Fonte: Autora (2019).

Apesar do período chuvoso não apresentar variação significativa de MN entre os grupos, os testes de correlação realizados entre MN e o dados físico-químicos do período apresentaram relação negativa e foram significativas apenas para cromo e zinco, como pode ser observado nas Figuras 29 e 30.

Figura 29 – Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de cromo no pontos de coleta durante o período chuvoso

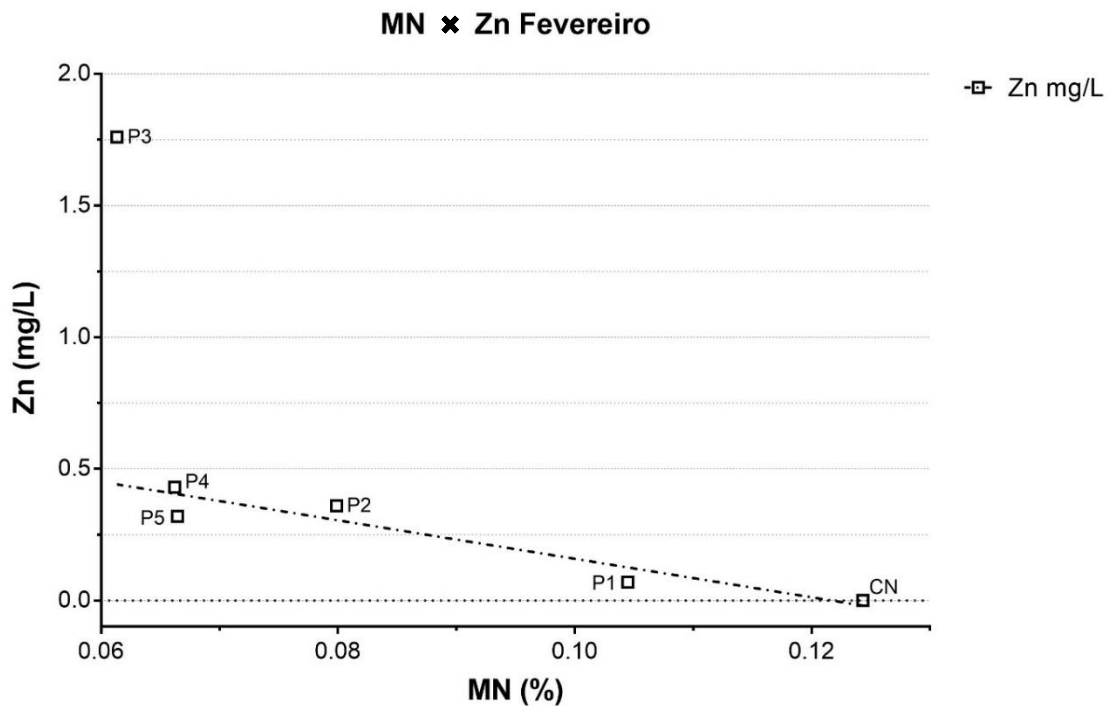


Correlação de Spearman $r=-0,829$; $p < 0,05$
 Fonte: Autora (2019).

Uma possível explicação para esse resultado (Figura 29) é que as concentrações mais elevadas do cromo tenham inibido a replicação celular e desta forma a quantidade de ciclos no período do experimento não foram suficientes para fixação da mutação (GRANT, 1982). Leonard e Lauwerys (1980) demonstraram que os testes de mutagenicidade do cromo em plantas não apresentaram resultados significativos.

No caso do zinco (Figura 30), as baixas concentrações podem ter agido da mesma maneira, retardando o processo de divisão celular e diminuindo a quantidade de ciclos durante o período de 72 horas. O zinco também tem capacidade de interagir com outros compostos inibindo seus efeitos e assim pode ter protegido as células de danos causados por outros compostos não avaliados (LEONARD; GERBER; LEONARD, 1986).

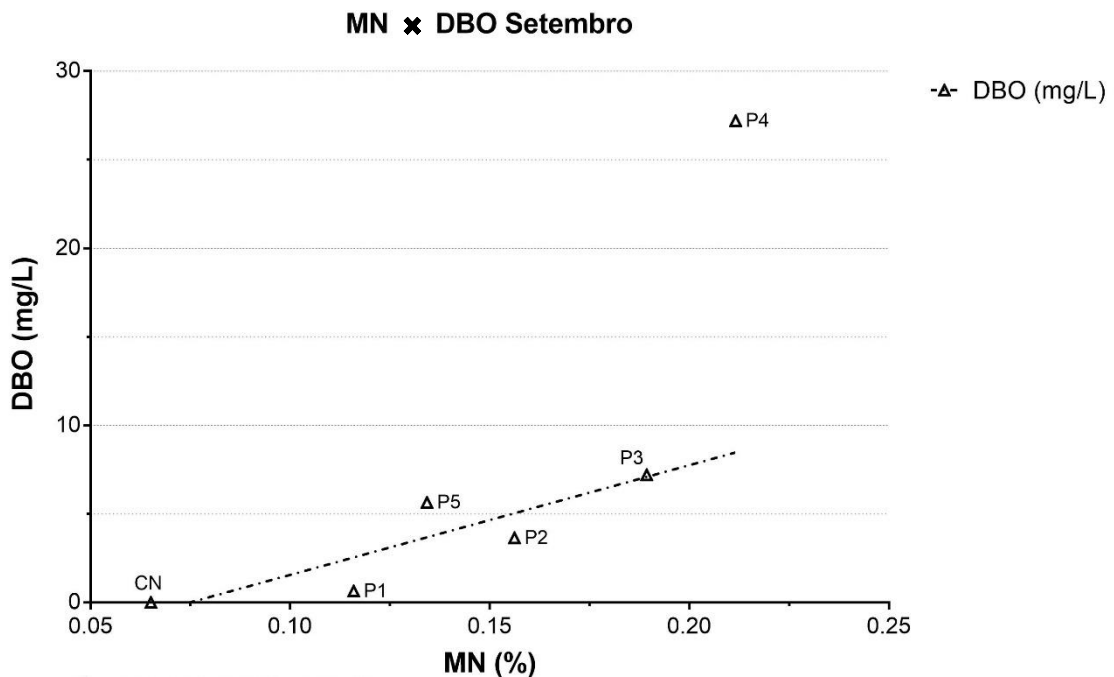
Figura 30 – Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período chuvoso.



Correlação de Spearman $r=-0,943$; $p < 0,01$

Fonte: Autora (2019).

Figura 31 – Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de DBO no pontos de coleta durante o período seco.



Correlação de Spearman $r=0,943$; $p < 0,05$

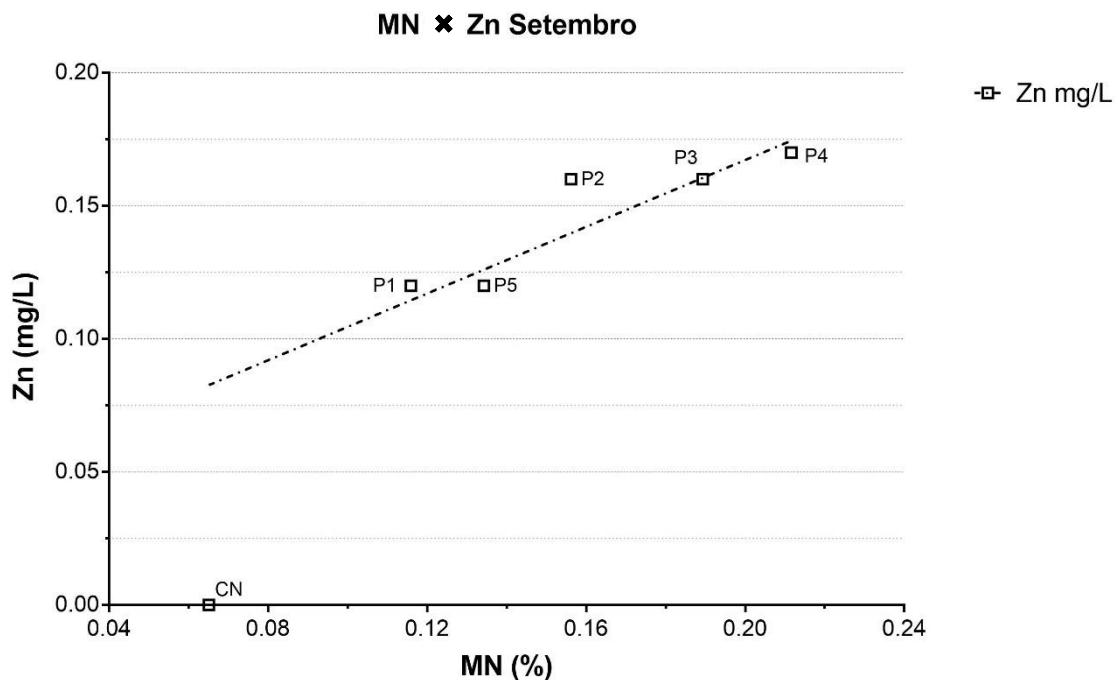
Fonte: Autora (2019).

No período seco, a frequência de MN foi mais evidente nos pontos P2, P3 e P4, dado que coincide com os valores elevados de zinco no mesmo período e em comparação com o período chuvoso. Nos testes de correlação, valores significativos foram apresentados para DBO, zinco e cromo.

Em relação a DBO (Figura 31), os resultados são similares aos apresentado para AC no mesmo período. P4 foi o local com maior índice de MN que pode também estar relacionado à presença de TAMs produzidos pela alta carga de matéria orgânica despejada no local.

A correlação de MN com o zinco neste período (Figura 32) foi extremamente forte segundo os testes estatísticos e ao contrário do período chuvoso, a correlação foi positiva. Entretanto o zinco não tem propriedades mutagênicas segundo Leonard, Gerber e Leonard (1986) nas concentrações descritas. Talvez sejam necessários outros estudos para identificar se há existência de alguma outra substância mutagênica que esteja relacionada diretamente à presença de zinco nos pontos de coleta estudados.

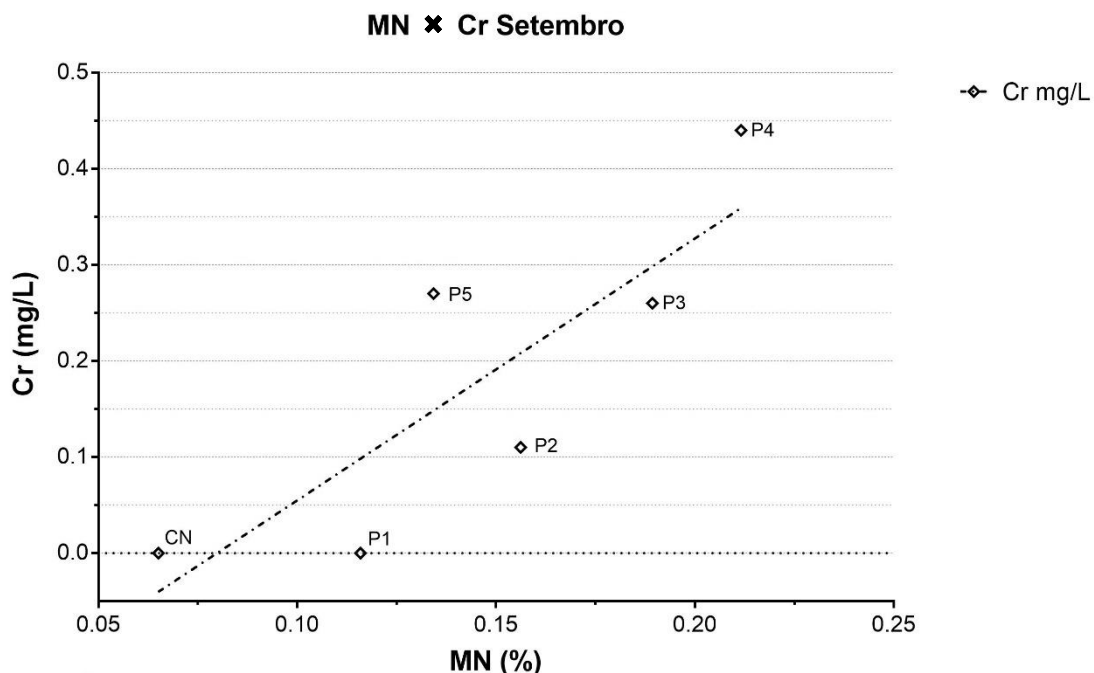
Figura 32 – Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de zinco no pontos de coleta durante o período seco.



Correlação de Spearman $r=0,971$; $p < 0,01$
 Fonte: Autora (2019).

O cromo (Figura 33) também apresentou forte correlação com a frequência de MN, confirmando os efeitos mutagênicos do metal observados por Matsumoto e Marin-Morales (2004). Anormalidades cromossômicas semelhantes foram observadas por Liu *et al.* (1992) e Smaka-Kincl (1996), ao submeter raízes de *A. cepa* a diferentes concentrações do metal.

Figura 33 – Gráfico de correlação entre MN e as concentrações de cromo no pontos de coleta durante o período seco.



Correlação de Spearman $r=0,812$; $p < 0,05$
 Fonte: Autora (2019).

O fato, é que maiores informações sobre outras substâncias com potencial mutagênico devem ser levantadas em futuros estudos. A caracterização de agentes contaminantes através de testes isolados podem nos dar referencial dos principais agentes mutagênicos encontrados nos pontos amostrais, mas deve-se levar em consideração que a interação entre duas ou mais substâncias com baixo potencial tóxico podem levar a produção de outros compostos que podem ser nocivos aos organismos vivos (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

Por estas questões, muitos efluentes que atendem os padrões físicos químicos estabelecidos pela legislação, podem causar distúrbios no ecossistema e essa é a grande vantagem dos bioensaios. Eles têm maior preocupação em

caracterizar os efeitos adversos causados por uma amostra sem necessariamente identificar os agentes tóxicos isoladamente. (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

6 CONCLUSÃO

Esta pesquisa demonstra a necessidade da realização bioensaios no biomonitoramento ambiental juntamente com as outras análises de qualidade de água. Desta forma é possível determinar a saúde ambiental de locais com importância social e econômica.

Em muitos casos não é viável avaliar o impacto ambiental de um corpo d'água apenas através das avaliações físico-químicos. A interação entre substâncias já conhecidas no local e a presença de substâncias que ainda não foram avaliadas pode refletir a necessidade de ações de conservação ambiental que não são detectáveis por estes métodos. Por isso é de extrema importância a realização de testes de citogenotoxicidade e mutagenicidade juntamente aos demais testes.

O teste *Allium cepa*, confirmou neste trabalho, ser bastante sensível aos diferentes tipos de poluição. Ficou demonstrado que diferentes atividades antrópicas podem interferir de forma diferente na qualidade de um mesmo curso d'água. Isso ficou evidente através dos dados apurados na região da ETE. Através das correlações estabelecidas supõe-se que a presença de matéria orgânica, juntamente ao zinco e o cromo, foram as substâncias que, possivelmente, atuaram de forma danosa às células e ao material genético. Entretanto deve-se levar em consideração que a presença de outras substâncias não avaliadas neste estudo podem, também, estar relacionadas aos dados obtidos, de forma direta ou sinergicamente.

Os valores dos limites do CONAMA, devem ser revisados e atualizados periodicamente, conforme novos estudos são publicados.

Impactos ambientais em pequenos corpos d'água, como o Córrego do Limoeiro, são muitas vezes subestimados por sua discreta importância perante os grandes rios de abastecimento urbano e aos grandes impactos ambientais. Entretanto, os dados obtidos por esse estudo reforçam a necessidade de conservação dos pequenos afluentes, pois estes são objetos importantes na identificação de impactos ambientais causados pela ação humana e servem de alerta para que se faça um monitoramento mais criterioso em relação às substâncias que são lançadas no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. C. C. T.; DUBREUIL, V.; QUENO, H.; SANT'ANA-NETO, J. L.. Características das ilhas de calor em cidades de porte médio: exemplos de Presidente Prudente (Brasil) e Rennes (França). **Revista franco-brasileira de geografia**, Confins, n.7, 2009. Disponível em: <http://journals.openedition.org/confins/6070> . Acesso em: 18 jan. 2019. DOI : 10.4000/confins.6070
- ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653517300358?via%3Dihub> Acesso em: 15 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.033
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. Washington, DC, New York: American Public Health Association, 2012. v. 22.
- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; MELLO, M. L. S. Standardization of bulb and root sample sizes for the *Allium cepa* test. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 927-935, 2011. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10646-011-0602-8> Acesso em: 15 nov. 2018. DOI: 10.1007/s10646-011-0602-8
- BENITES, L. M.; DONCATO, K.; PERAZZO, G.; MINHO, T.S. Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 107-113, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaenatura/article/view/13610> Acesso em: 22 fev. 2019. DOI: 10.5902/2179460X13610
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651310003787> Acesso em: 15 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2010.11.006
- BOAVENTURA, D.T.C.; OLIVEIRA, A.G.C.; GARCIA, R. M. Diagnóstico ambiental nas áreas de cabeceiras de drenagem da Bacia Hidrográfica do Balneário da Amizade–Álvares Machado e Presidente Prudente–SP. *In*: ENCONTRO NACIONAL DOS GEÓGRAFOS, 16., 2010, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: AGB, 2010.
- BOLLANI, S.; DE CABO, L.; CHAGAS, C.; *et al.* Genotoxicity of water samples from an area of the Pampean region (Argentina) impacted by agricultural and livestock activities. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-9, 2018. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-018-3263-9> Acesso em: 15 nov. 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-3263-9

BONCIU, E. *et al.* An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. **Caryologia**, v. 71, n. 3, p. 191-209, 2018.

Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00087114.2018.1503496> Acesso em: 15 nov. 2018. DOI: 10.1080/00087114.2018.1503496

BRASIL. **Código Florestal Brasileiro (Revogado): Lei nº 4.771/65**. Brasília, 1965.

Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1960-1969/lei-4771-15-setembro-1965-369026-publicacaooriginal-1-pl.html> Acesso em: 18 abr. 2019

BRASIL. **Lei Federal Nº 9.985**, de 18 de julho de 2000. Regulamenta o art. 225, § 1o, incisos I, II, III e VII da Constituição Federal, institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza e dá outras providências. Brasília, 2000.

Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9985.htm Acesso em: 18 abr. 2019.

BRASIL. **Resolução CONAMA 357**, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705

Acesso em: 18 abr. 2019.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 211-214, 1999.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510799000706>

Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00070-6

CAMPAROTO, M. L.; TEIXEIRA, R. O.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P.. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 85-89, 2002. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572002000100016&lng=en&tling=en)

[47572002000100016&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572002000100016&lng=en&tling=en) Acesso em: 12 fev. 2018. DOI:

10.1590/S1415-47572002000100016

ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S.. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic Toxicology**, v. 74, n. 3, p. 264-271, 2005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X05001773?via%3Dihub>

Acesso em: 18 abr. 2019. DOI: 10.1016/j.aquatox.2005.06.001

CETESB - Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo. **Variáveis de qualidade das águas**. São Paulo: CETESB, 2010. 300 p

CETESB - Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB; Brasília; ANA, 2011.

CHANDEL, S.; KAUR, S.; ISSA, M.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K..

Exposure to mobile phone radiations at 2350 MHz incites cyto- and genotoxic effects

in root meristems of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 17, n. 1, p. 97-104, 2019. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40201-018-00330-1> Acesso em: 5 fev. 2019. DOI: 10.1007/s40201-018-00330-1

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. D. S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnol. & Ciên. Agropec**, João Pessoa, v. 6, n. 1, p. 33-38, 2012.

DÜSMAN, E.; GONÇALVES, L.; REUSING, A. F.; MARTIN, P. G.; MARIUCCI, R. G.; VICENTINI, V. E. P.. Cytotoxic potential of waters of the streams Mandacaru, Maringá, Miosótis and Nazareth in the urban area of Maringá, Paraná State, Brazil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 34, n. 3, p. 311-318, 2012.

Disponível em:

<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/8275> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.4025/actascibiols.v34i3.8275

EVSEEVA, T. I.; GERASKIN, S. A.; SHUKTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, n. 3, p. 235-248, 2003. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0265931X03000547> Acesso em: 13 fev. 2018. DOI: 10.1016/S0265-931X(03)00054-7

FENECH, M.; KIRSCH-VOLDERS, M.; NATARAJAN, A. T.; SURRALLE, J.; CROTT, J. W.; PARRY, J.; NORPPA, H.; EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D.; THOMAS P.. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011. Disponível em:

<https://academic.oup.com/mutage/article/26/1/125/1054873> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1093/mutage/geq052

FERETTI, D.; ZERBINI, I.; CERETTI, E.; VILLARINI, M.; ZANI, C.; MORETTI, M.; FATIGONI, C.; ORIZIO, G.; DONATO, F.; MONARCA, S.. Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. **Water Research**, v. 42, n. 15, p. 4075-4082, 2008. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0043135408002662> Acesso em: 16 mar. 2018. DOI: 10.1016/j.watres.2008.06.018

FILIPÍČ, M. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 733, n. 1–2, p. 69-77, 2012. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510711002478> Acesso em: 10 mar. 2019. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2011.09.002

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99–112, 1985. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x> Acesso em: 6 mar. 2017. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x

FISKESJÖ, G. *Allium* test I: A 2–3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). **Environmental Toxicology & Water Quality**, v. 8, n. 4, p. 461-470, 1993. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.2530080410> Acesso em: 6 mar. 2017. DOI: 10.1002/tox.2530080306

FISKESJÖ, G. *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 9, n. 3, p. 235-241, 1994. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/tox.2530090311> Acesso em: 6 mar. 2017. DOI: 10.1002/tox.2530090311

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. **Biometals**, v. 19, n. 4, p. 419-427, 2006. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10534-005-4451-x> Acesso em: 10 mar. 2019. DOI: 10.1007/s10534-005-4451-x

GERBER, G. B.; LÉONARD, A.; JACQUET, P. Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 115-141, 1980. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165111080900068> Acesso em: 10 mar. 2019. DOI: 10.1016/0165-1110(80)90006-8

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A.; LÓPEZ-SÁEZ, J. F.; GIMÉNEZ-MARTÍN, G. Duration of the division cycle in binucleate and mononucleate cells. **Experimental Cell Research**, v. 43, n. 2, p. 255-267, 1966. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001448276690053X> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/0014-4827(66)90053-X

GOOGLE MAPS. **22°06'47.5"S 51°27'16.0"W**, 2019a. Disponível em: [https://www.google.com.br/maps/place/22°06'47.5"S+51°27'16.0"W/@-22.0997138,-51.4697093,5888](https://www.google.com.br/maps/place/22°06'47.5). Acesso em: 10 mar. 2019.

GOOGLE MAPS. **22°04'48.6"S 51°25'11.2"W**, 2019b. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/22%C2%B004'48.6%22S+51%C2%B025'11.2%22W/@-22.0801667,-51.4219665,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-22.0801667!4d-51.4197778.4697093,5888>. Acesso em: 10 mar. 2019

GOOGLE MAPS. **22°05'59.5"S 51°26'42.3"W**, 2019c. Disponível em: [https://www.google.com.br/maps/place/22°05'59.5"S+51°26'42.3"W/@-22.0998659,-51.4472687,595](https://www.google.com.br/maps/place/22°05'59.5). Acesso em: 10 mar. 2019.

GOOGLE MAPS. **22°07'00.2"S 51°28'18.5"W**, 2019d. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/22%C2%B007'00.2%22S+51%C2%B028'18.5%22W/@-22.1167222,-51.4739943,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-22.1167222!4d-51.4718056>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GOOGLE MAPS. **22°07'00.2"S 51°28'18.5"W**, 2019e. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/22%C2%B007'00.2%22S+51%C2%B028'18.5%22W/@-22.1167222,-51.4739943,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-22.1167222!4d-51.4718056>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GOOGLE MAPS. **22°08'13.4"S 51°31'24.9"W**, 2019f. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/22%C2%B008'13.4%22S+51%C2%B031'24.9%22W/@-22.1370556,-51.525772,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-22.1370556!4d-51.5235833>. Acesso em: 10 mar. 2019.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium* - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.99, n.1, p. 273-291, 1982. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7177154>. Acesso em: 22 mar. 2017. DOI: 10.1016/0165-1110(82)90046-X

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175–185, 1994. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0027510794901120>. Acesso em: 22 mar. 2017. DOI: 10.1016/0027-5107(94)90112-0

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations - a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510799000500>. Acesso em: 22 mar. 2017. DOI: 10.1016/S0027-5107(99)00050-0

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução a Genética**. 9. ed. Tradução: P. A. Motta. Rio de Janeiro: Guanabara, 2009.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. De. **Como Observar Cromossomos: Um Guia de Técnicas em Citogenética Vegetal, Animal e Humana**. Ribeirão Preto, SP: Fundação de Pesquisas Científicas de Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_52172.pdf. Acesso em: 9 fev. 2018.

HAQ, I. *et al.* Evaluation of the phytotoxic and genotoxic potential of pulp and paper mill effluent using *Vigna radiata* and *Allium cepa*. **Advances in Biology**, v. 2016, p. 1-10, August, 2016. Disponível em: <https://www.hindawi.com/archive/2016/8065736/>. Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1155/2016/8065736

HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. In vitro and in vivo investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, n. february, p. 321-330, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653517301583>. Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.142

HONDA, S. C. A. L. *et al.* Planejamento ambiental e ocupação do solo urbano em Presidente Prudente (SP). **Urbe. Revista Brasileira de Gestão Urbana**, v. 7, n. 1, p. 62-73, 2015. Disponível em:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2175-33692015000100062&lng=pt&tlng=pt)

33692015000100062&lng=pt&tlng=pt Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1590/2175-3369.007.001.AO04

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n.8, p. 2090-2095, 2009. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651309001420> Acesso em: 27 nov. 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2009.07.002

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Cidades@**. 2017. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=354140> . Acesso em: 30 mar. 2019.

LANKOFF, A. *et al.* Nodularin-induced genotoxicity following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells. **Toxicology Letters**, v. 164, n. 3, p. 239-248, 2006.

Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427406000129>

Acesso em: 9 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.01.003

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574209000404> Acesso em: 9 fev.

2018. DOI: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Avaliação da qualidade de águas impactadas por petróleo por meio de sistema-teste biológico (*Allium cepa*) - um estudo de caso. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO EM PETRÓLEO, GÁS E BIOCOMBUSTÍVEIS, 4., 2007, Campinas. **Anais...**Campinas, SP:ABPG, 2007. p. 21-24.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – A case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357180700294X> Acesso em: 10 fev.

2018. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009 Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383574209000404> Acesso em: 10 fev.

2018. DOI: 10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LEONARD, A.; GERBER, G. B.; LEONARD, F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 168,

n. 3, p. 343-353, 1986. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165111086900266> Acesso em: 10 mar.
2019. DOI: 10.1016/0165-1110(86)90026-6

LEONARD, A.; LAUWERYS, R. R. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 227-239, 1980. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165111080900184> Acesso em: 10 mar. 2019. DOI: 10.1016/0165-1110(80)90018-4

LERDA, D. The effect of lead on *Allium cepa* L. **Mutation Research Letters**, v. 281, n. 2, p. 89-92, 1992. Disponível em:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016579929290041F> Acesso em: 10 mar.
2019. DOI: 10.1016/0165-7992(92)90041-F

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x> Acesso em: 22 mar. 2017. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x

LIU, D.; JIANG, W.; LI, M. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, n. 1, p. 23-29, 1992. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1601-5223.1992.tb00003.x> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1111/j.1601-5223.1992.tb00003.x

MACEDA, E. B. *et al.* Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, p. 117-129, 2015. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1980-993X2015000100117&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.4136/ambi-agua.1500

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 03, p. 355-381, 2008 Disponível em: <https://revistas.ufrj.br/index.php/oa/article/view/5732> Acesso em: 14 fev. 2018.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONCECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572006000100028&lng=en&tlng=en Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1590/S1415-47572006000100028

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic Potential Evaluation of the Water of a River That Receives Tannery Effluent Using the *Allium cepa* Test System. **Cytologia**, v. 69, n. 4, p. 399-408, 2004. Disponível em: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/cytologia/69.399?from=CrossRef> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1508/cytologia.69.399

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. de C. The Feulgen reaction: A brief review and new perspectives, **Acta histochemica**, v. 119, n. 6, p. 603-609, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065128117301617> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.acthis.2017.07.002

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZANI, C.; RIZZONI, M.; CASARELLA, S.; GUSTAVINO, B.. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 46, n. 2, p. 96-103, 2005. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/em.10161> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1002/em.10161

NATARAJAN, A. T. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 504, n. 1-2, p. 3-16, 2002. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0027510702000751> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/S0027-5107(02)00075-1

ODEIGAH, P. G. *et al.* Genotoxicity Screening of Leachates from Solid Industrial Wastes Evaluated with the *Allium* Test. **ATLA Alternatives to Laboratory Animals**, Nigeria, 1997, v. 25 p. 311-321.

OGUNYEMI, A. K. *et al.* Toxicity evaluation of waste effluent from cassava-processing factory in lagos state, nigeria using the *Allium cepa* assay. **Ife Journal of Science**, v. 20, n. 2, p. 305-315, 2018. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ijjs/article/view/175988> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.4314/ijjs.v20i2.11

OLIVEIRA, J. M.; YAMASHITA, M.; MENEGUETTI, D. U. O. Análise do Potencial Mutagênico em Afluentes do Rio Boa Vista Influenciados Pela Emissão de Rejeitos de Uma Indústria de Laticínios no Município de Ouro Preto do Oeste RO, Brasil. IN: JORNADA CIENTÍFICA CENTRO DE ESTUDOS INTERDISCIPLINAR EM DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DA AMAZÔNIA, 8., Porto Velho. **E-book...**, Porto Velho: CEDSA.2013. v. 8, p. 73-88. Disponível em: http://www.jornadacedsa.unir.br/uploads/43434343/arquivos/Ebook_2013_VIII_Jornada_CEDSA_1578587325.pdf. Acesso em: 12 fev. 2018.

OLIVEIRA, J. P. W. *et al.* Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012. Disponível em: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/bbr/article/view/13186> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.5433/2316-5200.2012v1n1p15

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011. Disponível em: http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/article/view/476/pdf_422 Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.4136/ambi-agua.176

PEREIRA, F. C.; VILANOVA-COSTA, C.A.S.T.; RODRIGUES, L.O.; DA SILVA, C.C.; DA CRUZ, A.D.. Avaliação. Avaliação do potencial mutagênico de esgotos tratados através do teste em células meristemáticas de *Allium cepa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia: SBG, 2005. p. 120. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/262144538> Acesso em: 12 fev. 2018.

PRÁ, D. *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **BioMetals**, v. 21, n. 3, p. 289-297, 2008. Disponível em:

<http://link.springer.com/10.1007/s10534-007-9118-3> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1007/s10534-007-9118-3

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 312, n. 1, p. 17-24, 1994. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0165116194900043> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/0165-1161(94)90004-3

RICHARDSON, S.D.; PLEWA, M.J.; WAGNER, E.D.; SCHOENY, R.; De MARINI, D.M.. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research.

Mutation Research/Reviews in Mutation Research, v. 636, n. 1-3, p. 178-242, 2007. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357420700035X> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.mrrev.2007.09.001

SCALON, M. C. S. *et al.* Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian journal of biology = Revista brasileira de biologia**, v. 70, n. 4, p. 1217-1222, 2010. Disponível em:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21225163> Acesso em: 12 fev. 2018. PMID: 21225163

SCHERER, L. M. *et al.* Alelopathic effect of aqueous extracts of leucena (*Leucaena leucocephala* Wit) leave and fruit on germination and root growth of canafistula (*Peltophorum dubium* Spreng). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 2, p.161-166, 2005. Disponível em:

<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/2288> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.5433/1679-0359.2005v26n2p161

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.. **Princípios de toxicologia ambiental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 2013.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J.. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, 1996. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165121896900592> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/S0165-1218(96)90059-2

SOARES, F. B.; LEAL, A. C. Planejamento ambiental da bacia do Balneário da Amizade nos municípios de Álvares Machado e Presidente Prudente – São Paulo. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, 2011. Disponível em: http://amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/105 Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.17271/19800827722011105

SOMAR METEOROLOGIA. **Dados registrados no mês de Agosto de 2019 em Presidente Prudente-SP** Presidente Prudente, 2019. Disponível em: http://somarmeteorologia.com.br/security/defesa_civil/mapas.php?cid=PresidentePrudente-SP Acesso em: 15 mar. 2019.

STELATO, E. S. *et al.* Avaliação da presença de resíduos de anti-inflamatórios não esteroides nos córregos veado e cedro do município de Presidente Prudente (SP), Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais (Online)**, n. 39, p. 97-113, 2016. Disponível em: http://abes-dn.org.br/publicacoes/rbciamb/Ed39/RBCIAMB_n39_97-113.pdf Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.5327/Z2176-947820160050

SZYNKOWSKA, M. I.; PAWLACZYK, A. **Environmental Toxicology: Encyclopedia of Toxicology**. 30. ed. Amsterdã: Elsevier, 2014. v. 2. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864543010137> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-386454-3.01013-7

TAKENAKA, E. *et al.* Águas residuais industriais: o caso de um frigorífico no município de Presidente Prudente - SP. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 11, p. 167-176, 2013. Disponível em: http://amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/669 Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.17271/198008279112013669

TEODORO, P. H. M.; NUNES, J. O. R. Os alagamentos em Presidente Prudente-sp: um trabalho interdisciplinar embasado no mapeamento geomorfológico. **Revista Formação**, v. 2, n. 17, p. 81-102, 2011. Disponível em: <http://revista.fct.unesp.br/index.php/formacao/article/view/456%5Cnpapers2://publication/uuid/18141BFE-17E6-4FF6-AD10-83B4167A4E05> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.33081/formacao.v2i17.456>

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S.. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: Maluszynska J and Plewa M (eds) **Bioassays in Plant Cells for Improvement of Ecosystem and human Health: A course manual**. Katowice, Poland, pp 11-30

VANUCHI, V. C. F. *et al.* Análise do potencial mutagênico em afluentes do rio Ji-Paraná influenciados pela emissão de rejeitos de uma indústria de laticínios e um curtume no município de Presidente Médici-RO – Brasil. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 2, n. 1, p. 68-73, 2015. Disponível em: <https://periodicos.ufac.br/revista/index.php/SAJEBTT/article/view/236> Acesso em: 12 fev. 2018.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, n. 1, p.

36-43, 2007. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1383571807001027> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2007.04.004

VANZELLA, T.P. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina/PR, Londrina. 2006.

VICENTINI, V. E. P. *et al.* S. Averrhoa carambola L., Syzygium cumini (L.) Skeels and Cissus sicyoides L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 23, n. 2, p. 593-598, 2001. Disponível em:

<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/viewFile/2716/2036>
Acesso em: 12 fev. 2018.

VILLANUEVA, C.M.; CANTOR, K.P.; GRIMALT, J.O.; MALATS, N.; SILVERMAN, D.; TARDON, A.; GARCIA-CLOSAS, R.; SERRA, C.; CARRATO, A.; CASTAÑO-VINYALS, G.; MARCOS, R.; ROTHMAN, N.; REAL, FX.; DOSEMECI, M.; KOGEVINAS, M.. Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming in pools. **Am. J. Epidemiol.**, v.165, p. 148-156, 2007. Disponível em: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwj364> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1093/aje/kwj364

WIJEYARATNE, W. M. D. N.; WADASINGHE, L. G. Y. J. G. *Allium cepa* bio assay to assess the water and sediment cytogenotoxicity in a tropical stream subjected to multiple point and nonpoint source pollutants. **Journal of Toxicology**, v. 2019, p.1-10, 2019. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/jt/2019/5420124/> Acesso em: 15 mar. 2019. DOI: 10.1155/2019/5420124

SILVEIRA, G. L., LIMA, M. G. F., REIS, G. B. DOS, PALMIERI M. J., ANDRADE-VIERIA, L. F.. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359–367, jul. 2017. Disponível em:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653517304113> Acesso em: 12 fev. 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.048