

ANGELA FATIMA KINDLER

**AVALIAÇÃO DA CITOGENOTOXICIDADE DAS ÁGUAS DO ARROIO ARAÇÁ
(CANOAS –RS – BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA *Allium cepa***

Dissertação apresentada à banca examinadora do Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais do Centro Universitário La Salle – UNILASALLE, como exigência parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Rabaioli da Silva

CANOAS, 2016

RESUMO

O arroio Araçá, um dos principais arroios do município de Canoas, vem sendo utilizado como destino de esgoto sem tratamento, carregando consigo enorme quantidade de resíduos sólidos e poluentes diversos, como esgotos domésticos, industriais, agrícolas e detritos animais. Com este altíssimo grau de contaminação, o arroio Araçá despeja suas águas no arroio das Garças, modificando a qualidade das águas que abastecem as cidades de Canoas e Alvorada, Rio Grande do Sul. A partir disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citogenotoxicidade de amostras das águas do arroio Araçá, exposto a descargas de efluentes urbanos, através do sistema teste *Allium cepa*. As amostras de água foram coletadas no final do verão de 2015. Os pontos de coletas foram: (1) Ponto 1: próximo à principal nascente do arroio Araçá, com acesso pela Avenida Nazário; (2) Ponto 2: próximo ao Hospital Nossa Senhora das Graças, com acesso pelo Bairro Cidade Nova e (3) Ponto 3: próximo à BR116, com acesso pelo Bairro Mato Grande. Assim, as sementes da espécie *Allium cepa* foram expostas a diferentes concentrações das amostras (25%, 50% e 100% v/v). Água de poço do município de Canoas foi utilizada como controle negativo enquanto solução de sulfato de cobre (0,0012 g/L) foi utilizada como controle positivo. Foram contadas 500 células por lâmina, para um total de 5000 células por amostras. O parâmetro para avaliação do efeito mutagênico foi representado pela frequência de micronúcleo. A atividade citotóxica das amostras foi analisada a partir da frequência do índice mitótico e índice de germinação. Não foi observada diferença estatística na avaliação do índice de germinação, porém em relação ao índice mitótico, a exposição às amostras nas concentrações mais diluídas resultou em um aumento da divisão celular. Em relação ao efeito mutagênico foi observado que as concentrações mais diluídas (25 e 50 % v/v) das amostras do ponto 1 e 2 apresentaram um aumento na frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo controle negativo. Já na amostra do ponto 3 esse aumento foi observado nas diluições de 50 e 100 % v/v. Em todos os pontos a demanda bioquímica de oxigênio esteve acima do valor de referência. Concentrações aumentadas de metais como alumínio (Al), silício (Si), titânio (Ti), manganês (Mn), ferro (Fe) e cobre (Cu) foram encontradas nas amostras do ponto 1 e 2 quando comparadas à amostra do ponto 3. Assim, as águas do Arroio Araçá, coletadas nos três pontos, apresentaram potencial genotóxico e mutagênico ao sistema *Allium cepa* devido, possivelmente, à presença de substâncias e materiais poluentes derivados da contaminação urbana.

Palavras-chave: Citogenotoxicidade. Efluentes urbanos. *Allium cepa*.

ABSTRACT

The Araçá stream, one of the main streams of Canoas, has been used as sewage destination without treatment, carrying with it enormous amount of solid waste and various pollutants such as domestic sewage, industrial, agricultural and animal waste. With this high degree of contamination, the Araçá stream pours its waters into the stream of Egrets, modifying the quality of the water that supplies the cities of Canoas and Alvorada, Rio Grande do Sul. From that, the objective of this study was to evaluate the citogenotoxicidade of samples of stream waters Araçá, exposed to urban effluent discharges through *Allium cepa* test strain system. Water samples were collected in late summer 2015. The collection points were: (1) Point 1: close to the main source of Araçá stream, with access from Avenue Nazario; (2) Item 2: close to Our Lady of Grace Hospital, with access to the New Town neighborhood and (3) Point 3: near BR116, with access to the neighborhood Mato Grande. Thus, the seeds of the species *Allium cepa* were exposed to different concentrations of samples (25%, 50% and 100% v / v). Canoas water well was used as a negative control while copper sulfate solution (0.0012 g / L) was used as positive control. 500 cells were counted per slide for a total of 5000 cells per sample. The parameter to evaluate the mutagenic effect was represented by the frequency of micronuclei. Cytotoxic activity of the samples was analyzed from the frequency of mitotic index and germination index. There was no statistical difference in the evaluation of germination index, but in relation to the mitotic index, exposing the samples in the more dilute concentrations resulted in increased cell division. Regarding the mutagenic effect has been observed that the more dilute concentrations (25 and 50 % v / v) of point 1 and 2 samples showed an increase in the frequency of micronuclei compared to the negative control group. In the sample point 3, this increase was observed in dilutions of 50 to 100% v/v. In all of the biochemical oxygen demand points were above the reference value. Increased concentrations of metals such as aluminum (Al), silicon (Si), titanium (Ti), manganese (Mn), iron (Fe) and copper (Cu) were found in samples of point 1 and 2 when compared to point 3 sample. Thus, the Stream waters Araçá, collected the three points, showed potential genotoxic and mutagenic to *Allium cepa* system strain, possibly due to the presence of substances and materials derived pollutants from urban pollution.

Keywords: Citogenotoxicidade. Urban Effluents. *Allium cepa*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	7
1.1 Canoas e o Arroio Araçá.....	7
1.2 Contaminação do ambiente aquático.....	8
1.3 Padrões referentes à qualidade da água doce superficial.....	11
1.4 Avaliação da toxicidade genética em ambientes aquáticos.....	13
1.4.1 O teste <i>Allium cepa</i>	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivo Específico.....	16
ARTIGO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO	
ARROIO ARAÇÁ (CANOAS –RS – BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA <i>Allium</i>	
<i>cepa</i>.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
2.1. Local de coleta das amostras.....	20
2.2. Procedimentos utilizados para a realização da coleta das amostras de água.....	21
2.3. Teste <i>Allium cepa</i>.....	21
2.4 Análises físico-químicas.....	22
2.5. Quantificação dos elementos químicos inorgânicos.....	22
2.6 Análise estatística.....	23
3 RESULTADOS.....	23
4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	30
3 CONCLUSÕES GERAIS.....	33
REFERÊNCIAS GERAIS.....	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da cidade de Canoas e percurso do Arroio Araçá	8
Figura 2. Célula de <i>Allium cepa</i> na interfase apresentando micronúcleos.....	15
ARTIGO	
Figura 1. Mapa da cidade de Canoas com localização dos pontos de coleta.....	20
Figura 2: Índice de germinação (%) das sementes de <i>Allium cepa</i> expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS).....	23
Figura 3: Índice mitótico em células de raiz de <i>Allium cepa</i> expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS).....	24
Figura 4: Frequência de micronúcleos observada em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físico-químico dos diferentes locais de amostragem do arroio Araçá, Canoas (RS).....	25
Tabela 2: Conteúdo de elementos inorgânicos (ng/cm ²) analisados pelo PIXE em diferentes amostras coletados em pontos distintos do arroio Araçá, Canoas (RS) (médio ± desvio padrão).....	26

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1. Canoas e o Arroio Araçá

Canoas é um dos 31 municípios da Região Metropolitana de Porto Alegre (que reúne 36 % da população do estado, conforme o Censo de 2000), Rio Grande do Sul (RS). Distante 13,5 quilômetros da capital gaúcha, Canoas tem área de 131 quilômetros quadrados e população de 339.979 habitantes, conforme Censo do IBGE de 2011 (CANOAS, 2016). Fundado em 1939, o município é um dos polos industriais mais importantes do Brasil, com o segundo maior PIB do Rio Grande do Sul, atrás apenas de Porto Alegre, e 25º entre todas as cidades brasileiras. É sede de grandes empresas nacionais e multinacionais, como a Refinaria Alberto Pasqualini (REFAP), Springer Carrier e AGCO do Brasil, além de nomes fortes nos ramos de gás, metal-mecânico e elétrico. A educação desponta como novo setor. A cidade tem a segunda maior rede de ensino do estado. São escolas públicas, particulares e três universidades. A economia canoense baseia-se em serviços, comércio, indústria da transformação e logística. Não há uma zona rural típica, apenas algumas zonas de produção agrícola dentro da área urbana (CANOAS, 2016).

O município de Canoas está inserido nas bacias dos Rios dos Sinos e Gravataí e seus limites são definidos principalmente por cursos d'água. A oeste do município localiza-se o Arroio das Garças que cruza o Parque Estadual Delta do Jacuí, ligando os Rios Gravataí e Jacuí, demarcando, deste modo, a ilha das Garças. Ao norte, localiza-se o Arroio Sapucaia, que limita o município com a cidade de Esteio; a leste, o Arroio da Brigadeira, faz limite com o município de Cachoeirinha; o Rio dos Sinos é o limite com Nova Santa Rita, a oeste; e o Rio Gravataí é o limite com Porto Alegre, ao sul (CANOAS, 2016). Dentre os cursos d'água deste município, destaca-se o Arroio Araçá que vem sendo utilizado como destino de esgoto sem tratamento, carregando consigo enorme quantidade de resíduos sólidos e poluentes diversos, como esgotos domésticos, industriais, agrícolas e, também, detritos animais (Prochnow et al., 2009).

A porção final do arroio Araçá sofreu modificações com as recorrentes dragagens realizadas para sua limpeza, assim como pela construção de dique para contenção de cheias. Nesta região houve o estabelecimento de uma população invasora que vive principalmente da cata e venda do lixo urbano e da criação ilegal de animais, causando bloqueio parcial deste trecho do arroio, dificultando a vazão regular de suas águas. Com este altíssimo grau de contaminação, o arroio Araçá despeja suas águas no arroio das Garças, formando uma película negra, modificando a qualidade das águas do mais importante manancial para o

município de Canoas, também utilizado para abastecer parcialmente o município de Alvorada (Prochnow et al., 2009).

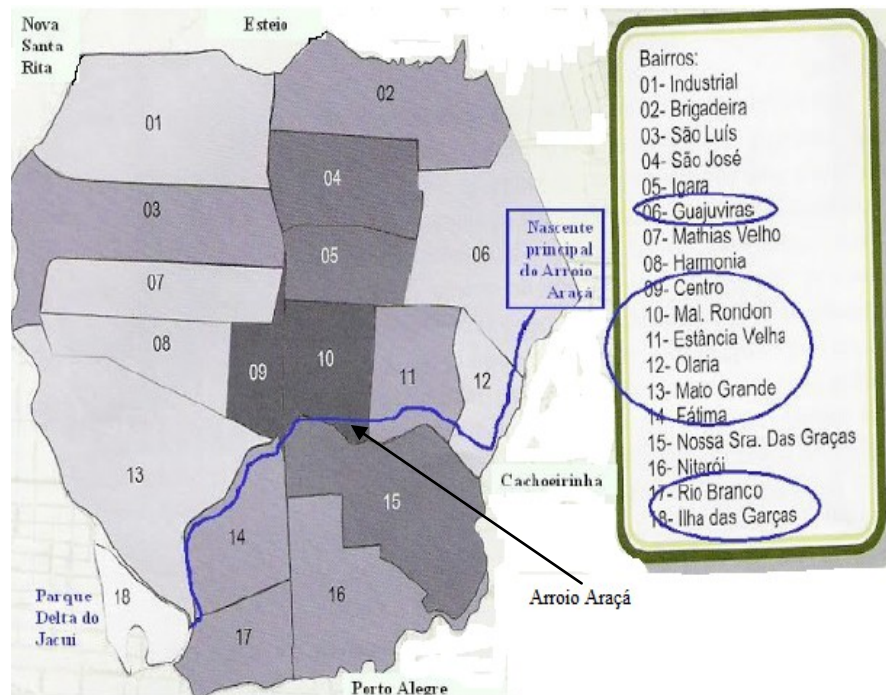


Figura 1: Mapa da cidade de Canoas e percurso do Arroio Araçá entre os bairros.

Fonte: arroioaraca.blogspot.com.br

1.2. Contaminação do ambiente aquático

Durante muito tempo, os recursos hídricos foram considerados como inesgotáveis e abundantes, sendo assim desperdiçados e poluídos pelo mau uso. A quantidade e a qualidade da água disponível para o abastecimento da população, da indústria, do comércio, da agropecuária e para o lazer podem atuar como determinantes no desenvolvimento econômico e social das cidades, podendo limitar o crescimento populacional (Oliveira et al., 2012a).

A água doce é um recurso natural finito, cuja qualidade vem piorando devido ao crescimento populacional e inexistência de políticas públicas voltadas para a sua preservação. Estima-se que cerca de doze milhões de pessoas morrem anualmente por problemas relacionados com a qualidade da água (Merten; Minella, 2002). Segundo Kunz et al. (2002), devido a ação antrópica, a poluição tem atingido dimensões catastróficas, podendo ser observadas através de alterações na característica do solo, ar e água. Deste modo, a contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade atual. Para Moraes; Jordão (2002), a ação do homem causa impacto ou pelo consumo de recursos naturais em ritmo mais acelerado do que a natureza necessita para sua renovação ou pela

geração de resíduos em quantidades maiores do que podem ser integrados no ciclo natural de nutrientes. Além desses impactos, o homem insere materiais tóxicos no sistema ecológico que bloqueiam e destroem as energias naturais e são levados pelas águas para longe do local de descarga degradando seriamente o ecossistema aquático e outros que se utilizam dele.

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a utilização é para o consumo humano. O mercúrio (Hg), um dos metais pesados mais tóxicos, ainda é lançado em grandes quantidades na natureza por atividades em vários processos industriais, resultando em danos importantes para o ambiente. As conseqüências da contaminação ambiental e humana em Minamata, no Japão, em 1956, chamaram a atenção dos cientistas para o metal. Naquela baía japonesa, o metilmercúrio (MeHg), forma mais tóxica do metal, foi liberado no efluente líquido de uma indústria química e acumulou-se nos peixes, consumidos pela população local, resultando em diversas pessoas com alterações neurológicas graves, fetos com malformações e mortes (Mauro et al, 1999).

Dentre os resíduos industriais perigosos encontram-se ainda outros elementos altamente poluentes como o metal pesado cádmio (Cd). Este se destaca pela elevada toxicidade e grande capacidade de acumulação nos tecidos, podendo sua meia vida chegar a quarenta anos. Também pode ser considerado causador de vários males a saúde humana, ocupando o sétimo lugar nas substâncias tóxicas com maior risco de causar danos ao homem, segundo pesquisas realizadas em 2005 pelas Agências Americanas ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e EPA (*Environmental Protection Agency*). Alguns trabalhos relacionam alguns tipos de câncer que podem estar associados com a exposição ao cádmio, como o câncer nos rins e no trato urinário, no fígado e no estômago e câncer de próstata (Fernandez et al., 2012).

Prochnow et al. (2009), em seu estudo na micro bacia do Arroio Araçá em Canoas, RS, observou que as concentrações dos metais alcalinos sódio, potássio e lítio foram alteradas em todos os compartimentos abióticos devido à interferência das atividades antrópicas características dessa região. Foram observadas mudanças nas concentrações relacionadas tanto com a utilização de compostos de metais alcalinos em áreas urbanas, como em atividades rurais. Estas alterações repercutem em tecidos vegetais, que podem, ou não, tolerar alterações de concentrações de metais. A autora afirma também que como no trecho rural a água é utilizada para a irrigação de culturas, principalmente em períodos de baixa pluviosidade, esta ação pode contribuir com um incremento de concentração de íons alcalinos no solo, introduzindo um processo de salinização que pode interferir na cultura de espécies mais sensíveis.

A água e o solo são particularmente vulneráveis à contaminação por vários descartes industriais, inclusive contendo agrotóxicos e metais pesados (Sharma, 2006). A presença de metais como chumbo, mercúrio, cromo e cádmio está associada aos centros urbanos pelo acúmulo dos resíduos industriais e às áreas rurais pelo fato de alguns agrotóxicos conterem metais pesados em sua composição química. Os metais pesados são absorvidos com facilidade pelos organismos, se acumulam nos resíduos e persistem na natureza. Alguns metais contaminam os seres vivos em decorrência de seu poder bioacumulativo, por meio da poluição do solo, água e do ar atingindo toda cadeia alimentar (Corbi et al., 2006). Os efeitos sobre a saúde decorrente do consumo de água contaminada por agrotóxicos são variáveis, destacando-se problemas no fígado, sistema nervoso central, sistemas cardiovascular, reprodutivo, com algumas evidências de desregulação endócrina e problemas nos olhos, rins, baço, anemia e aumento do risco de desenvolver câncer (Fernandes Neto; Sarcinelli, 2009).

Os esgotos e dejetos humanos são causas importantes dessa degradação da qualidade da água em países em desenvolvimento. Tais efluentes contêm substâncias tóxicas diversas que se forem manuseados e depositados inadequadamente, atingem a saúde humana e a ambiental podendo ter graves conseqüências. A exposição humana (ocupacional ou não ocupacional) a despejos industriais tem acarretado a efeitos na saúde que compreendem desde afecções mais simples como indisposições gastrointestinais e irritações de pele, até sérias reduções das funções neurológicas e hepáticas. Evidências dos efeitos genotóxicos à saúde, como câncer, defeitos congênitos e anomalias reprodutivas, também têm sido mencionadas em populações que vivem próximas a perigosos depósitos de despejo (Moraes; Jordão, 2002).

Oliveira et al. (2012a), em seu estudo no arroio Dilúvio em Porto Alegre, RS, observou que as bactérias do gênero *Escherichia* predominaram nas amostras de água deste arroio, comprovando, com isso, que a contaminação ocorre com esgoto doméstico e fezes, sendo verificada uma água de baixa qualidade, de acordo com a contagem de bactérias heterotróficas e a colimetria, exceto na nascente, onde a água se encontra mais preservada da ação antrópica, certamente por esta se encontrar no interior do Parque Saint' Hilaire sob mata fechada e a alguns quilômetros do pórtico de entrada do Parque, que fica na divisa dos municípios de Porto Alegre e Viamão, RS.

Lucas et al., 2014, analisou a qualidade da água para consumo humano no município de Maruim, Sergipe, coletando amostras de água do Rio Ganhamoroba e de fontes naturais para análises físico-químicas e microbiológicas. As amostras de águas superficiais e subterrâneas apresentaram Coliformes Fecais (CF) e *Escherichia coli* (EC) em 100% das

amostras de águas analisadas. Observou-se que o local das fontes é um ambiente insalubre, sem cobertura, com exposição da água ao sol e as chuvas.

Oliveira et al (2012b) analisando amostras de água do Rio dos Sinos dos municípios de São Leopoldo e Novo Hamburgo, RS, encontrou resultados indicativos de que este rio apresentava substâncias com potencial tóxico e genotóxico como o cromo, variável de acordo com a estação e local estudado e que a concentração de cromo hexavalente encontrada nas amostras, poderia induzir a genotoxicidade.

1.3. Padrões referentes à qualidade da água doce superficial

Para garantir a sobrevivência do ecossistema dos rios e garantir o consumo de uma substância que não seja prejudicial à saúde da população, a qualidade da água é avaliada pela análise de alguns parâmetros de características físicas, químicas e biológicas (Silva et al., 2008). Segundo Merten; Minella (2002) é necessário compreender que "qualidade de água" não se refere, essencialmente, a um estado de pureza, mas meramente às características químicas, físicas e biológicas, que variam dependendo das diferentes finalidades do uso da água. O enquadramento dos corpos de água em classes, segundo seus usos preponderantes, visa assegurar às águas, qualidade compatível com os diferentes usos a que forem destinadas e diminuir os custos de combate à poluição das águas, mediante ações preventivas permanentes (Frieiria, 2007).

A Resolução número 357, de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Nesta resolução são desdobradas 27 definições de qualidade da água. As águas doces, salobras e salinas do território nacional são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes, em treze classes de qualidade e ainda separadas em 4 classes cada uma delas, de acordo com a finalidade de uso (CONAMA, 2005). De acordo com o plano da Bacia do Lago Guaíba, o arroio Araçá é enquadrado como classe 2 tendo possível uso para abastecimento doméstico após tratamento convencional.

De acordo com o CONAMA (2005), algumas condições e padrões são avaliados em águas doces de classe 2. No Artigo 15, da Sessão II Das Águas Doces, aplicam-se às águas doces de classe 2 as condições e padrões da classe 1 previstos no Artigo 14, à exceção do seguinte:

- I - não será permitida a presença de corantes provenientes de fontes antrópicas que não sejam removíveis por processo de coagulação, sedimentação e filtração convencionais;
- II - coliformes termotolerantes: para uso de recreação de contato primário deverá ser obedecida a Resolução CONAMA n. 274, de 2000. Para os demais usos, não deverá ser excedido um limite de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. A *E. coli* poderá ser determinada em substituição ao parâmetro coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente;
- III - cor verdadeira: até 75 mg Pt/L; IV - turbidez: até 100 UNT;
- V - DBO 5 dias a 20°C até 5 mg/L O₂;
- VI - OD, em qualquer amostra, não inferior a 5 mg/L O₂;
- VII - clorofila a: até 30 µg/L;
- VIII - densidade de cianobactérias: até 50000 cel/mL ou 5 mm³/L; e, 10
- IX - fósforo total: a) até 0,030 mg/L, em ambientes lênticos; e, b) até 0,050 mg/L, em ambientes intermediários, com tempo de residência entre 2 e 40 dias, e tributários diretos de ambiente lêntico.

O relatório de qualidade das águas interiores no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2009) descreve os seguintes parâmetros:

- pH (potencial hidrogeniônico): é a medida de concentração relativa dos íons de hidrogênio em uma solução; esse valor indica a acidez ou a alcalinidade da solução. A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos naturais está relacionada aos efeitos sobre a fisiologia das diferentes espécies. Vale ressaltar o efeito indireto de determinadas condições de pH que podem influenciar: (1) a precipitação de elementos químicos tóxicos como metais pesados e (2) a solubilidade de nutrientes. Os critérios de proteção à biota aquática fixam o pH entre 6 e 9.
- Sólidos suspensos totais: matéria orgânica e inorgânica com diâmetro $\geq 0,45 \mu\text{m}$. Para o recurso hídrico, os sólidos podem causar danos à biota aquática, quando sedimentam no leito dos rios destruindo organismos que fornecem alimentos ou, quando danificam os leitos de desova de peixes. Além disso, os sólidos podem reter bactérias e resíduos orgânicos no fundo dos rios, promovendo decomposição anaeróbia.
- Cloreto: o cloreto é o ânion Cl⁻ que se apresenta nas águas subterrâneas, oriundo da percolação da água através de solos e rochas. Nas águas superficiais, são fontes importantes de cloreto as descargas de esgotos sanitários, sendo que cada pessoa expele

através da urina cerca 4 g de cloreto por dia, que representam cerca de 90 a 95% dos excretos humanos.

- Turbidez: a turbidez de uma amostra de água é o grau de atenuação de intensidade que um feixe de luz sofre ao atravessá-la, devido à presença de sólidos em suspensão (partículas inorgânicas e detritos orgânicos). Os esgotos domésticos e diversos efluentes industriais também provocam elevações na turbidez das águas.
- Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO): é a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica por decomposição microbiana aeróbia para uma forma inorgânica estável. Os maiores aumentos em termos de DBO, num corpo d'água, são provocados por despejos de origem predominantemente orgânica. Esta matéria orgânica pode induzir o completo esgotamento do oxigênio na água, provocando o desaparecimento da vida aquática.
- Demanda Química de Oxigênio (DQO): é a quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica de uma amostra por meio de um agente químico, como o dicromato de potássio. Os valores da DQO normalmente são maiores que os da DBO. O aumento da concentração de DQO deve-se principalmente a despejos de origem industrial.

1.4. Avaliação da toxicidade genética em ambientes aquáticos

Para Galvão et al. (2015), avaliar a toxicidade de águas é fundamental para evitar danos à saúde humana e animal. Muitos contaminantes são lançados ao meio por falta de conhecimento dos efeitos nocivos que estes podem causar, sendo uma preocupação crescente nos estudos em relação à presença de agentes genotóxicos e/ou cancerígenos em rios e lagos. Se estas alterações forem observadas com antecedência, pode ser possível identificar problemas ambientais antes que todo ecossistema seja afetado. Esse é o conceito principal que ampara a utilização de bioindicadores de poluição ambiental.

As substâncias genotóxicas são aquelas que interagem com o DNA, alterando a sua estrutura ou função. Quando essas alterações se perpetuam e adquirem a capacidade de serem transmitidas, passam a ser denominadas de mutações. As mutações são a origem de toda a diversidade genética, sendo fundamentais para a manutenção das espécies. Sem a mutação, a vida seria impossível, porém ela também possui um potencial danoso, isto é, embora ocorram mutações espontâneas, algumas são induzidas pela exposição dos organismos a diversos agentes. Alguns estudos epidemiológicos têm relacionado à elevada frequência de alterações

cromossômicas, na população humana, ao risco significativo de desenvolvimento de neoplasias (Christofolletti, 2008).

A exposição a substâncias mutagênicas pode causar alterações celulares. Estas alterações podem ser induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, assim como alterações cromossômicas, levando a processos carcinogênicos e morte celular. Pelo fato de causarem danos no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (Bagatini et al., 2007).

Estudos em plantas e animais de ambientes aquáticos prejudicados por despejos perigosos ou efluentes industriais proporcionam evidência dos efeitos genotóxicos, sendo a detecção destes produtos poluentes e seus prováveis efeitos nos organismos, importantes no estudo do impacto que eles podem trazer às populações animal, vegetal e, principalmente, humana (Peron et al., 2009).

Atualmente está muito bem estabelecido que diversos efluentes industriais possuem substâncias que podem não ter efeito agudo, mas que a longo prazo, alteram a sobrevivência de um organismo via danos no genoma de células somáticas e germinativas. Tais danos genéticos têm sido relacionados a desordens genéticas hereditárias e ao câncer (Moraes; Jordão, 2002).

Por causa da importância da qualidade da água para a saúde, existem inúmeros testes de genotoxicidade para avaliar a qualidade da água e do ambiente (Egito et al., 2007). O uso de bioensaios permite estudar os efeitos tóxicos de determinados contaminantes de forma isolada ou associados, minimizando a influência de diferentes variáveis ambientais. Os resultados obtidos através de bioensaios não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente, mas podem cooperar para a obtenção de dados que venham contribuir no entendimento dos fatores que estão interferindo na saúde dos organismos.

1.4.1. O teste *Allium cepa*

Os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados desde a década de 70 para avaliação, monitoramento e detecção de genotóxicos no ambiente. A espécie mais utilizada como sistema-teste tem sido a *Allium cepa* (a cebola comum), constituindo-se numa valiosa ferramenta de monitoramento ambiental para a detecção do potencial genotóxico das substâncias lançadas no ambiente (Oliveira et al., 2011). Alguns autores descrevem a indução

de alterações cromossômicas em células de *A. cepa* tratadas com águas de rios, solos e efluentes industriais (Grippa et al., 2010).

As células meristemáticas das raízes de *A. cepa* podem quantificar vários parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a determinação do índice mitótico, assim como a indução de micronúcleos e de anormalidades no ciclo celular de células meristemáticas das raízes deste vegetal, como anáfases iniciais, C-metáfases, aderências cromossômicas, pontes e fragmentações cromossômicas. Estas alterações podem demonstrar ou até servirem como indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético celular (Christofoletti, 2008).

O micronúcleo (MN), uma das alterações verificadas no teste *A. cepa*, é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, formado por cromossomos ou fragmento de cromossomos que não são adicionados no núcleo principal durante a mitose (Figura 2). Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, eliminado do novo núcleo formado na telófase (Carrard et al., 2007). Este teste, comparado a outros, demonstra ser um método simples e de baixo-custo, que pode ser utilizado como um instrumento ou marcador biológico para detecção dos efeitos clastogênicos e aneugênicos e na detecção de exposição a agentes genotóxicos.

Embora os mecanismos de reparo celular sejam extremamente eficientes, a sensibilidade da estrutura cromossômica permite que agentes clastogênicos e aneugênicos atuem durante a mitose e a meiose. Agentes clastogênicos são aqueles capazes de provocar quebra cromossômica, enquanto aneugênicos são aqueles que podem interferir no fuso mitótico. A ação desses agentes, dentre outras formas, é responsável pelo surgimento das alterações cromossômicas estruturais e numéricas. Quando essas alterações ocorrem em células somáticas, podem levar à formação de uma neoplasia (Carrard et al., 2007).

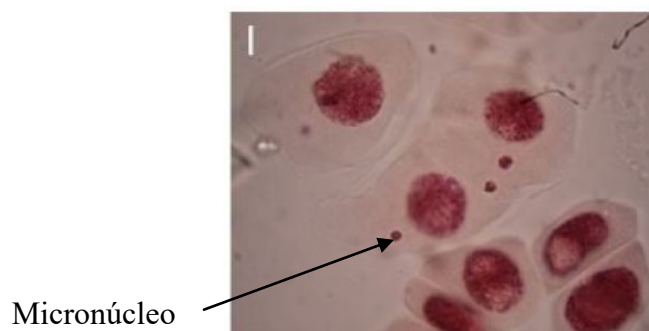


Figura 2: Célula de *Allium cepa* na interfase apresentando micronúcleos

Fonte: Gomes et al (2015)

Segundo Carrard et al. (2007), os MNs podem ser únicos ou múltiplos e tem algumas características específicas: (1) estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal; (2) borda evidente, sugerindo membrana nuclear; (3) formato arredondado; (4) localização intracitoplasmática; (5) diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal.

Além da mutagenicidade, o teste *A. cepa* é efetivo à avaliação da citotoxicidade. Os testes de citotoxicidade utilizando sistema teste vegetal *in vivo*, como o da cebola, estão validados por vários pesquisadores que realizam de forma conjunta teste animal *in vitro* e os resultados obtidos são similares (Fachinetto et al., 2007). O índice mitótico (IM) e o índice de germinação foram utilizados como parâmetros para avaliar a citotoxicidade das amostras do arroio Araçá (RS).

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a variação local da citogenotoxicidade de amostras das águas do Arroio Araçá – Canoas, Rio Grande do Sul, através do sistema teste *Allium cepa*.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar efeitos tóxicos e mutagênicos em *Allium cepa* expostos a amostras de água coletada no arroio Araçá (RS) em diferentes pontos do curso do arroio;
- Realizar análise das variações físico-químicas das amostras das águas coletadas no arroio Araçá (RS) em diferentes pontos do curso do arroio;
- Quantificar os componentes inorgânicos (metais), através da técnica de Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (PIXE) nos diferentes pontos do arroio Araçá (RS).

ARTIGO: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO DAS ÁGUAS DO ARROIO ARAÇÁ (CANOAS –RS – BRASIL) ATRAVÉS DO SISTEMA *Allium cepa*

Angela Fátima Kindler^a, Malu Siqueira^a, Karina Soares^a, Adriane Perachi Nordin^{a,b}, Letícia Garcia^b, Juliana da Silva^b, Claudia Telles^c, Johnny Dias Ferraz^c e Fernanda Rabaioli da Silva^a

^aLaboratório de Biologia celular e Molecular, Mestrado em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle, Canoas, Brasil.

^bLaboratório de Genética Toxicológica, PPGBioSaúde e PPGGTA, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, Brasil.

^cLaboratório de Implantação Iônica, Instituto de Física, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.

E-mail: fernanda.silva@unilasalle.edu.br

ABSTRACT

The Araçá stream, one of the main streams of Canoas, has been used as sewage destination without treatment, carrying with it enormous amount of solid waste and various pollutants such as domestic sewage, industrial, agricultural and animal waste. With this high degree of contamination, the Araçá stream pours its waters into the stream of Egrets, modifying the quality of the water that supplies the cities of Canoas and Alvorada, Rio Grande do Sul. From that, the objective of this study was to evaluate the citogenotoxicidade of samples of stream waters Araçá, exposed to urban effluent discharges through *Allium cepa* test strain system. Water samples were collected in late summer 2015. The collection points were: (1) Point 1: close to the main source of Araçá stream, with access from Avenue Nazario; (2) Item 2: close to Our Lady of Grace Hospital, with access to the New Town neighborhood and (3) Point 3: near BR116, with access to the neighborhood Mato Grande. Thus, the seeds of the species *Allium cepa* were exposed to different concentrations of samples (25%, 50% and 100% v / v). Canoas water well was used as a negative control while copper sulfate solution (0.0012 g / L) was used as positive control. 500 cells were counted per slide for a total of 5000 cells per sample. The parameter to evaluate the mutagenic effect was represented by the frequency of micronuclei. Cytotoxic activity of the samples was analyzed from the frequency of mitotic index and germination index. There was no statistical difference in the evaluation of germination index, but in relation to the mitotic index, exposing the samples in the more dilute concentrations resulted in increased cell division. Regarding the mutagenic effect has been observed that the more dilute concentrations (25 and 50 % v / v) of point 1 and 2 samples showed an increase in the frequency of micronuclei compared to the negative control group. In the sample point 3, this increase was observed in dilutions of 50 to 100% v/v. In all of the biochemical oxygen demand points were above the reference value. Increased concentrations of metals such as aluminum (Al), silicon (Si), titanium (Ti), manganese (Mn), iron (Fe) and copper (Cu) were found in samples of point 1 and 2 when compared to point 3 sample. Thus, the Stream waters Araçá, collected the three points, showed potential

genotoxic and mutagenic to *Allium cepa* system strain, possibly due to the presence of substances and materials derived pollutants from urban pollution.

Keywords: Citogenotoxicidade. Urban Effluents. *Allium cepa*.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos agem como integradores dos processos biológicos e geoquímicos, sendo necessários à manutenção dos organismos vivos. Além disso, os ambientes aquáticos são utilizados em todo o mundo como fonte de abastecimento, higiene, geração de energia, transporte, agricultura, pecuária e paisagística.

Em relação aos ambientes aquáticos urbanos, destacam-se os arroios como uma valiosa parte da área verde urbana providenciando um importante papel ao ecossistema. O benefício dos córregos urbanos inclui sua função como um corredor ecológico. Corredores formados por córregos urbanos têm sido pensados como áreas verdes entre ou dentro de áreas urbanas contruídas que abrigam fauna e flora local (Asakawa et al., 2004). Yli-Pelkonen et al. (2003) em um estudo na Cidade de Vantaa, sul da Finlândia, relatam a importância do arroio Rekolanoja à biodiversidade urbana bem como para a saúde humana e bem-estar social.

No entanto, estes ambientes, e seres vivos em geral, vêm sendo ameaçados nas últimas décadas por agentes poluentes lançados diretamente na natureza gerando um desequilíbrio ecológico de difícil controle. Entre os significativos problemas ambientais, está a poluição das águas doces superficiais, onde sua deterioração se dá em função das atividades antrópicas. A poluição aquática é um dos mais preocupantes problemas, por ser um bem mineral essencial às funções vitais dos organismos (Leme; Marin-Morales, 2007). As atividades industriais, as práticas agrícolas, a erosão e a contaminação hospitalar contribuem para aumentar a carga orgânica e inorgânica, e comprometem a qualidade dos mananciais. Além disso, as interações no ambiente aquático são muito complexas, pois as substâncias acabam interagindo tanto com os fatores abióticos, como os bióticos (Egito, 2007).

Oliveira et al. (2010) destaca a problemática do Arroio Dilúvio, na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), em que grande parte da poluição gerada é proveniente do lançamento irregular de esgotos domiciliares na rede pluvial, fazendo a população das proximidades ou do entorno padecer com o mau aspecto das águas e os odores desagradáveis.

Existem muitos métodos de avaliação das alterações ocorridas nos cursos hídricos, dentre as quais se destacam as medidas de bioindicação e as técnicas empregadas na determinação de índices de qualidade da água (IQAs) com base em características físico-químicas e microbiológicas (Strider et al., 2006). Além destas medidas, é relevante a detecção

dos riscos genotóxicos associados com a poluição da água. Segundo Zenkner (2013), no final dos anos 70 novos métodos foram desenvolvidos para monitorar a presença de produtos danosos ao DNA no ambiente aquático. Esses testes revelaram lesões no DNA corrigíveis e sem maiores implicações ao organismo quando reparadas de forma correta. Entretanto, caso isso não aconteça, há chances de desenvolver alterações cromossômicas, que podem ocasionar morte celular, ou levar a condições fisiopatológicas severas.

Para a avaliação, controle e identificação de contaminantes no ambiente aquático, os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados. O teste de *Allium cepa* (cebola comum), desenvolvido por Albert Levan em 1938, é considerado um instrumento vantajoso para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos, substâncias complexas como extratos de plantas, dejetos industriais e, principalmente, águas contaminadas (Cuchiara et al., 2012).

A utilização de *A. cepa* tem sido recomendada para análises de genotoxicidade em efluentes devido a sua elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e da utilização de amostras sem tratamento prévio, determinando-se a redução do índice mitótico e a formação de alterações cromossômicas. Continua sendo utilizado rotineiramente em todo o mundo em laboratórios que trabalham com testes de genética toxicológica, considerado uma ferramenta valiosa quanto à determinação da contaminação ambiental, havendo vasto banco de dados de substâncias químicas já testadas (Leme; Marin-Morales, 2009).

Assim, o conhecimento do potencial citogenotóxico de efluentes, como por exemplo, efluente urbano do Arroio Araçá é importante para o estabelecimento de ações que minimizem danos à saúde humana e ao meio ambiente (Moraes; Jordão, 2002). A liberação de efluentes contaminados por elementos tóxicos no meio tem impactado de maneira significativa os ecossistemas aquáticos, limitando a utilização de recursos hídricos e refletindo negativamente na saúde humana (Moraes; Jordão 2002).

O Arroio Araçá, localizado no município de Canoas, Rio Grande do Sul (RS), tem a sua principal nascente na Fazenda Guajuviras e desemboca no Arroio das Garças. Cruza vários bairros da cidade, a céu aberto ainda em sua maior parte do curso, porém, está sendo canalizado à medida que o desenvolvimento urbano vem se impondo. Em algumas partes o arroio conserva a natureza original sendo que, tanto a flora como a fauna, vem sendo agredida pela poluição e pelos resíduos sólidos urbanos (Prochnow et al., 2009).

Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a variação local da citogenotoxicidade de amostras das águas do Arroio Araçá através do sistema teste *A. cepa*,

bem como avaliar os parâmetros físico-químicos e quantificar os elementos inorgânicos destas amostras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas em diferentes locais do Arroio Araçá localizado no município de Canoas, RS no final do verão de 2015. O arroio Araçá tem sua nascente localizada a leste da cidade, em área de característica rurais em alteração. Na maior parte do seu curso, este arroio sofre contaminação de origem urbana. Já no seu trecho final percorre um pequeno cinturão de produção de hortigranjeiros, correndo a céu aberto. Sua foz, localizada a oeste do município integra área do Parque Estadual do Delta do Jacuí (Prochnow et al., 2009).

Os pontos de coletas foram os seguintes: (1) Ponto 1: próximo à principal nascente do Arroio Araçá, com acesso pela Avenida Nazário; (2) Ponto 2: próximo ao hospital Nossa Senhora das Graças, com acesso pelo Bairro Cidade Nova e; (3) Ponto 3: próximo à BR116, com acesso pelo Bairro Mato Grande. Os pontos de coleta são apresentados na Figura 1.

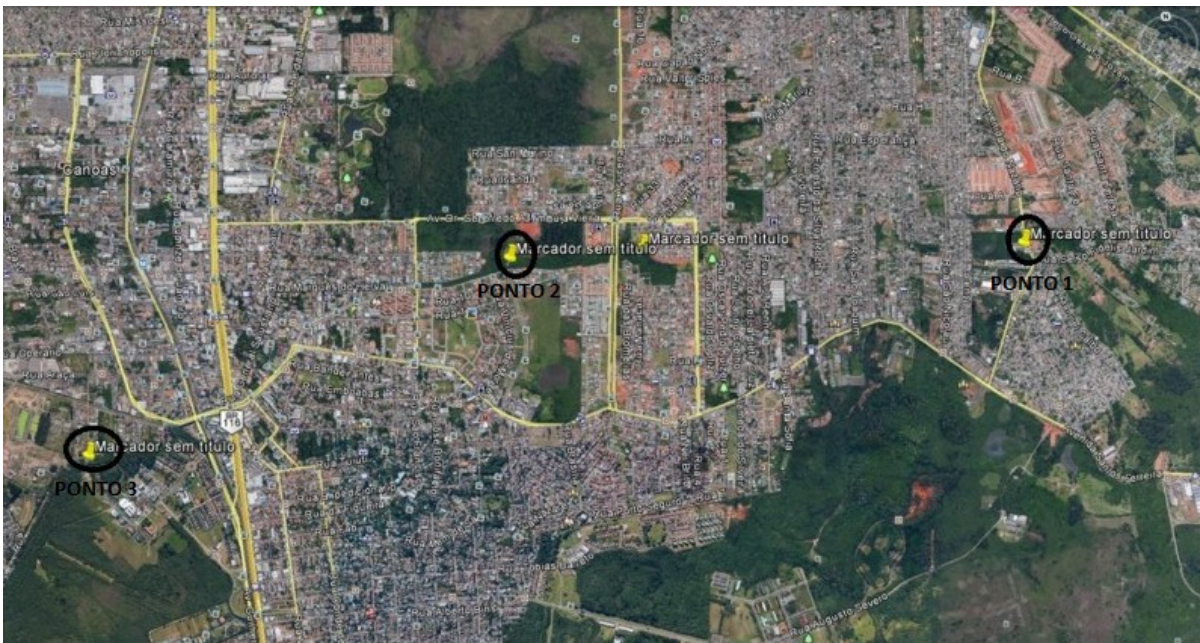


Figura 1: Mapa da Cidade de Canoas com a localização dos pontos de coleta

(Fonte: Google maps)

2.2. Procedimentos utilizados para a realização da coleta das amostras de água

A coleta das amostras de água foi realizada com o uso de frascos plásticos de 2.000 ml (2L) e vidros âmbar 1.000 ml (1L), sendo as preservações específicas para cada tipo de análise, conforme segue: (1) os frascos de plástico e vidro âmbar (devidamente higienizados) foram submergidos nas águas do local de coleta, para uma lavagem prévia do mesmo com a água do ponto a ser coletado; (2) após este procedimento, os recipientes foram, novamente, submergidos nas águas dos respectivos pontos;

Após a coleta das amostras de águas, os frascos foram imediatamente lacrados e refrigerados a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, para o transporte, mantendo-os sob refrigeração e protegidos da luz até o momento dos testes físico-químicos e biológicos. Para a análise de elementos inorgânicos as amostras de água foram armazenadas posteriormente no *freezer*, em temperatura $\leq -18^\circ\text{C}$.

2.3. Teste *Allium cepa*

O teste com sementes de *Allium cepa* foi realizado de acordo com Caritá; Marin-Morales (2008). As sementes da espécie *Allium cepa* L. var. baia periforme foram expostas a diferentes concentrações das amostras (25%, 50% e 100%) em placas de petri. Em cada placa de petri foram colocadas cinquenta sementes sobre papel filtro, sendo usadas duas placas para cada concentração, totalizando cem sementes. As placas de petri com as sementes foram cobertas e armazenadas desprovidas da luz durante o período de germinação até o crescimento da raiz. Para o controle negativo foi utilizada água de poço artesiano do município de Canoas e para o controle positivo as sementes foram submetidas à solução de sulfato de cobre (0,0012 g/L).

As sementes ficaram armazenadas por um período de cinco dias, posteriormente foi efetuada a contagem das sementes que germinaram para a avaliação da toxicidade. As raízes foram coletadas e fixadas em solução na proporção de três partes de etanol para uma parte de ácido acético (3:1) por 24 horas. Depois deste período as lâminas foram confeccionadas da seguinte forma: as raízes foram lavadas com água destilada e colocadas em HCl 4N para hidrólise, por 25 minutos à temperatura ambiente; após hidrólise, foram lavadas novamente com água destilada e coradas com Giemsa, por aproximadamente 15 minutos; após lavadas com água destilada, a raiz foi colocada sobre uma lâmina junto a 1 gota de ácido acético 45%, e ali picotada; a seguir foi realizado *squashing* suavemente com a lamínula e a lamínula foi retirada. Ao final, as lâminas foram deixadas *overnight* para secagem e então a lamínula foi fixada sobre a lâmina com Entellan[®]. A análise foi realizada em microscópio óptico no

aumento de 100X com óleo de imersão. Foram contadas 500 células por lâmina, para um total de 5000 células por amostras.

A atividade citotóxica das amostras foi analisada a partir da frequência do índice mitótico, através da razão entre o número de células em divisão (metáfase, anáfase e telófase) e o número total de células analisadas (TCA). Através de parâmetros macroscópicos foi realizada a análise da toxicidade através da contagem das sementes que germinaram, a avaliação foi dada por meio do índice de germinação a partir do cálculo da razão entre o número de sementes germinadas e o número total de sementes por placa. O parâmetro para avaliação do efeito mutagênico foi representado pela frequência de micronúcleos (MN).

2.4 Análises físico-químicas

Os parâmetros físico-químicos analisados foram: pH, alcalinidade, dureza, cloretos, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), matéria orgânica, turbidez e sólidos totais. As análises foram realizadas de acordo com a metodologia apresentada nos métodos padrão do exame de água e de águas residuais sugeridos pela APHA (*American Public Health Association, 1998*) no laboratório de Genética Toxicológica (ULBRA) com exceção dos parâmetros de DBO e DQO que foram realizados pela empresa Bioensaios[®].

2.5. Quantificação dos elementos químicos inorgânicos

A identificação e a quantificação dos elementos inorgânicos foram realizadas através do método de Emissão de Raios-X Induzida por Partículas (PIXE) (Fittschen; Falkenberg, 2011) no Instituto de Física (UFRGS) e para a análise quantitativa dos elementos inorgânicos utilizou-se o programa GUPIX. Com este propósito, 1 l de água foi filtrada em bomba a vácuo, sendo utilizado papel filtro quantitativo. A técnica de PIXE se destaca por exigir uma pequena quantidade de material para análise e oferecer resultados muito rápidos e precisos. Um feixe de íons (prótons) é aplicado sobre a amostra (pulverizada) e provoca a remoção de elétrons de orbitais internos (elétrons de alta energia de ligação) deixando o átomo instável. Para retomar a estabilidade, ocorre a transição de elétrons de um orbital mais externo para um interno. Este processo libera energia na forma de raios-X característico de cada átomo, que são detectados por detectores apropriados. Os eventos foram coletados e digitalizados em computador.

2.6. Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste Kolmogorov-Smirnov. Nas variáveis com distribuição paramétrica foi realizada a ANOVA com teste de Tukey e para as variáveis não-paramétricas foi utilizada o teste de Kruskal-Wallis associado ao teste de Dunn para múltiplas comparações. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas no software Graph Pad Prism versão 5.0 para as diferentes comparações.

3. RESULTADOS

Para a avaliação de efeitos citotóxicos, os parâmetros analisados foram o índice de germinação da semente (IG) e o índice mitótico (IM). Conforme Figura 2 é possível observar que as amostras induziram um aumento no índice de germinação comparado ao grupo controle negativo, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

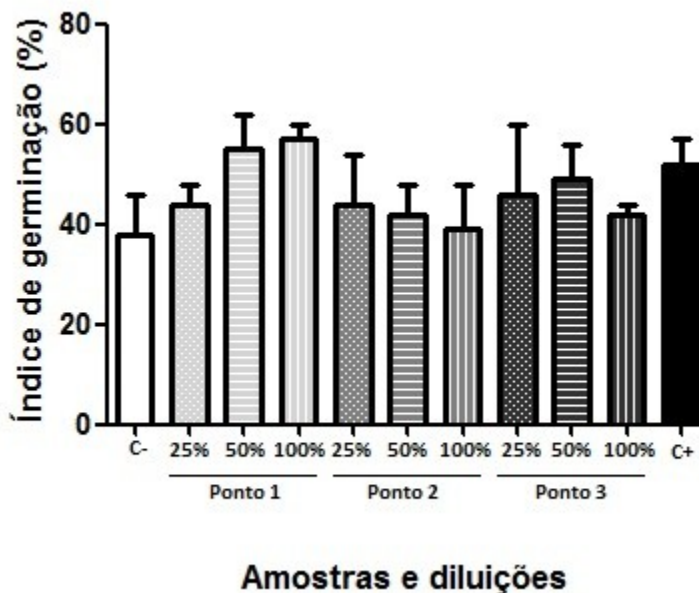


Figura 2: Índice de germinação (%) das sementes de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS) (Teste de Kruskal- Wallis).

Já em relação ao índice mitótico, apresentado na Figura 3, a exposição às amostras nas concentrações mais diluídas resultou em um aumento da divisão celular nos diferentes pontos.

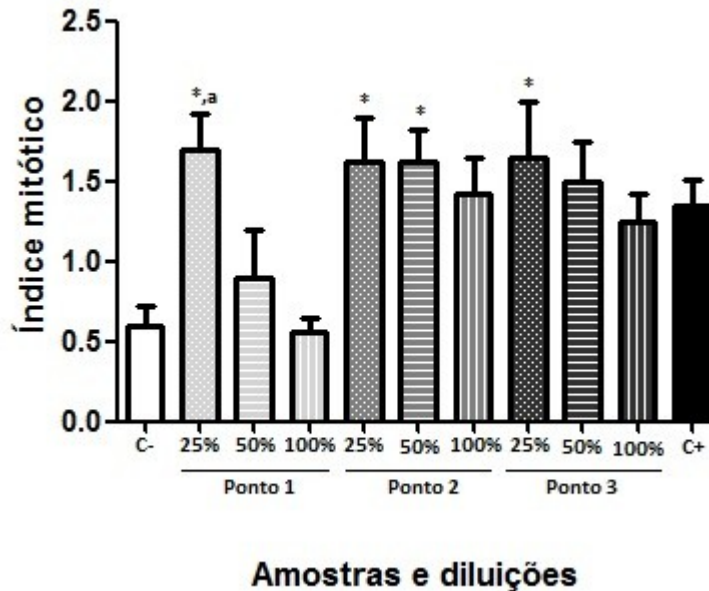


Figura 3: Índice mitótico em células de raiz de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS). *Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo; ^aDiferença significativa em relação à amostra bruta (100 % v/v) do mesmo ponto (Teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$).

Em relação ao efeito genotóxico e mutagênico foi analisada a frequência de micronúcleos (MN) nas células de *A. cepa* (Figura 4). Nas concentrações mais diluídas (25 e 50 % v/v) das amostras do ponto 1 e 2 houve um aumento na frequência de MNs quando comparado ao grupo controle negativo. Já na amostra do ponto 3 esse aumento foi observado nas concentrações de 50 e 100 % v/v.

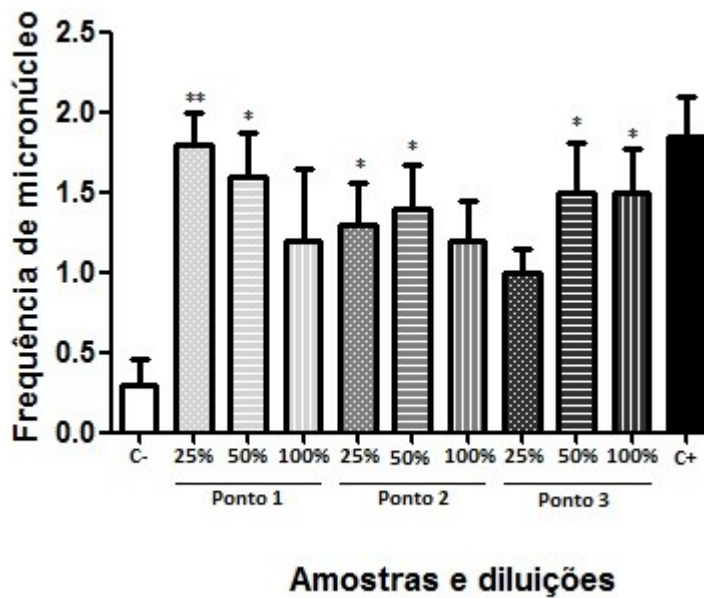


Figura 4: Frequência de micronúcleos observada em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações das amostras dos diferentes pontos do arroio Araçá (RS). *Diferença significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Teste de Kruskal-Wallis).

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises físico-químico realizadas nos diferentes pontos de coleta. Com exceção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), todos os parâmetros analisados estão abaixo dos valores de referência apresentados na Resolução CONAMA 357/2005 e 430/2011. A Resolução CONAMA não estabelece limites para alcalinidade, matéria orgânica e demanda química de oxigênio.

Tabela 1: Parâmetros físico-químico dos diferentes locais de amostragem do arroio Araçá, Canoas (RS).

Parâmetros físico-químico				
Análise	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Reference ^a
pH	7,13	7,08	7,38	6,0-9,0
Alcalinidade (mg/L)	130,59	129,54	157,55	ND
Sólidos totais (mg/L)	255	202	265	500
Dureza (mg/L)	57,12	63,24	73,44	0-75
Matéria orgânica (mg/L ⁻¹ O ²)	43,01	23,73	31,81	ND
Cloreto (mg/L Cl ⁻)	17,73	33,68	52,11	≤250
Turbidez (NTU)	25,00	27,00	21,00	<100
Demanda Bioquímica de Oxigênio (mg/L)	6,00	8,00	8,00	5,00
Demanda Química de Oxigênio (mg/L)	38,00	49,00	58,00	ND

^aValores de referência de acordo com o estabelecido pela Resolução do CONAMA 357/2005 e 430/2011. ND = não determinado.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados referentes à análise do material inorgânico nas amostras realizadas através da análise de PIXE. Concentrações aumentadas de metais como alumínio (Al), silício (Si), titânio (Ti), manganês (Mn), ferro (Fe) e cobre (Cu) foram encontradas nas amostras do ponto 1 e 2 quando comparadas à amostra do ponto 3.

Tabela 2: Conteúdo de elementos inorgânicos (ng/cm²) analisados pelo PIXE em diferentes amostras coletados em pontos distintos do arroio Araçá, Canoas (RS) (médio ± desvio padrão).

Elementos inorgânicos			
Análise	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3
Mg	661,9 ± 580,0	362,6 ± 316,4	62,35 ± 55,60
Al	10482 ± 4959 ^a	3919 ± 3400	110,4 ± 95,67
Si	53972 ± 12895 ^{d,c}	31721 ± 6311 ^b	851,4 ± 203,1
P	4831 ± 963,0 ^c	6687 ± 485,1 ^c	745,3 ± 135,8
S	1756 ± 406,3 ^b	1244 ± 298,0 ^a	207,3 ± 6,97
Cl	823,7 ± 389,8 ^a	ND	210,3 ± 94,73
K	1789 ± 605,1 ^{d,b}	563,9 ± 258,5	270,3 ± 95,79
Ca	5138 ± 1416 ^b	5683 ± 159 ^c	608,5 ± 28,16
Ti	3672 ± 1261 ^b	2119 ± 541,9 ^a	20,81 ± 7,45
Mn	340,8 ± 89,61	3260 ± 2072 ^a	53,25 ± 17,83
Fe	43493 ± 12220 ^c	37692 ± 1110 ^b	864,3 ± 267,5
Cu	75,25 ± 21,53 ^b	55,87 ± 23,40 ^a	1,862 ± 1,87
Zn	504,9 ± 424,5	960,1 ± 151,9	ND

^aSignificante em relação ao ponto 3 (P<0,05); ^bSignificante em relação ao ponto 3 (P<0,01);

^cSignificante em relação ao ponto 3 (P<0,001); ^dSignificante em relação ao ponto 2 (P<0,05);

^eSignificante em relação ao ponto 1 (P<0,05) (ANOVA). ND = não determinado.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A citotoxicidade das amostras foi avaliada através do índice de germinação e índice mitótico. Nestes dois parâmetros não foi observado efeito citotóxico causado pela exposição às amostras do Arroio Araçá, pelo contrário, a frequência maior de sementes germinadas foi observada nas amostras do arroio quando comparadas ao controle negativo (embora sem diferença estatística). Autores afirmam que matéria orgânica presente no efluente e os macro nutrientes podem estimular o alongamento radicular, diminuindo a sensibilidade do teste e/ou mascarando um possível efeito tóxico (Rodrigues e Bianchini, 2007). Nesse contexto, os nutrientes presentes nessas amostras, detectados pelo PIXE (como por exemplo, fósforo,

cálcio, ferro e zinco), bem como a elevada carga de matéria orgânica, avaliado pela DBO, podem ter causado o efeito promotor do crescimento das sementes.

Almeida; Schwarzbald (2003) analisaram o Arroio da Cria situado em Montenegro, RS, a fim de determinar a qualidade da água. Ainda que não tenha sido possível identificar de maneira conclusiva a contribuição de cada uma das indústrias instaladas na área da bacia hidrográfica do arroio da Cria, ficou evidente a existência de uma carga orgânica oriunda destes estabelecimentos, demonstrada pelos valores da demanda biológica de oxigênio (DBO), bem como pelo esgoto doméstico, através dos valores elevados de coliformes fecais e fósforo total.

Além do índice de germinação, o índice mitótico (IM) também foi utilizado como parâmetro para avaliar a citotoxicidade das amostras. Índices mitóticos significativamente menores que aqueles do controle negativo podem indicar alterações provenientes da ação de substâncias químicas no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos e IM maiores que o controle negativo resultam do aumento na divisão celular, podendo ser prejudicial às células, levando a proliferação celular desordenada e, eventualmente, a formação de tumores (Leme; Marin-Morales, 2009). Assim, tanto o aumento como a redução de IMs podem indicar a poluição de ambientes aquáticos.

Todos os pontos de amostragem apresentaram, nas concentrações mais diluídas, um maior IM em relação ao controle negativo, indicando que esta água contém substâncias com capacidade mitogênica, tendo como efeito o aumento da taxa de divisão celular. Do mesmo modo como observado no IG, Vujošević et al. (2008) salienta que em alguns casos, a presença de poluição orgânica pode estimular o crescimento da raiz. Assim, o estímulo da mitose que foi observado neste teste pode ser devido aos contaminantes ricos em fósforo (quantificado pelo PIXE), que são abundantes em descargas domésticas (Amaral et al. 2007).

Alvim et al. (2011) realizando teste com *A. cepa* em efluente tratado e não tratado, verificou que ambos efluentes apresentaram, em todas as concentrações testadas, um maior IM em relação ao controle negativo, sendo os maiores valores encontrados nas concentrações 100% (v/v) de ambos os tipos de efluentes. Barbosa (2008) também observou um aumento no IM de *A. cepa* exposto as amostras de água da lagoa de Extremoz, localizada na região de Natal, Rio Grande do Norte, que recebe poluentes de origem urbana. O mesmo foi observado por Düsman et al. (2014) no Rio Quatorze no estado do Paraná, porém este aumento no IM foi associado à contaminantes rurais.

O potencial genotóxico e mutagênico das amostras do arroio Araçá foram avaliados a partir da frequência de MNs. Da mesma forma que o IM, as concentrações mais diluídas das

amostras do ponto 1 e 2 apresentaram aumento na frequência de MN enquanto as maiores concentrações do ponto 3 teve um maior número de células micronucleadas. Os pontos 1 e 2 também apresentaram maiores concentrações de elementos inorgânicos, principalmente metais quando comparados ao ponto 3. Provavelmente esta concentração aumentada de metais nestes dois pontos foi fitotóxica as células da cebola na concentração bruta (100 % v/v), não apresentando aumento da frequência de MNs quando comparado ao controle negativo.

Aumento na frequência de MNs a partir do sistema *A. cepa* tem sido observado por diferentes autores. Gomes et al. (2015) coletaram amostras das águas do Rio Guandu, no estado do Rio de Janeiro, em duas épocas distintas: na estação chuvosa (Janeiro e Fevereiro) e na estação de estiagem (Junho e Julho). As análises realizadas em 5000 células por tratamento demonstraram que todos os pontos estudados apresentaram algum nível de genotoxicidade. Oliveira et al. (2011) avaliou o potencial mutagênico dos poluentes presentes na água do rio Paraíba do Sul, cidade de Tremembé – SP, analisando alterações cromossômicas em células meristemáticas de *A. cepa*. Neste estudo, no mês de abril, os poluentes exerceram alto potencial mutagênico a partir do aumento da frequência de MNs.

Além disso, a análise da mutagenicidade de amostras de água de diferentes arroios do município de Santa Cruz do Sul, RS, Brasil, indicou um aumento das alterações cromossômicas em sementes de *A. cepa*, demonstrando a genotoxicidade das amostras e o potencial para causar dano ao DNA, comprometendo a qualidade da água e a saúde humana (Athanasio et al., 2014). Galvão et al. (2015) analisaram a mutagenicidade de águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de Alta Floresta, no estado do Mato Grosso (esgoto de laticínio, estação de tratamento de esgoto, córrego próximo à estação de tratamento de esgoto e esgoto de frigorífico). Os testes com bioensaios com o *A. cepa* mostraram-se eficientes, pois todos os tratamentos com água poluída por dejetos químicos apresentaram algum tipo de anomalia, menos o tratamento testemunha, o qual foi usado somente para comparação, não usado para obter o índice genotóxico. Os tratamentos com águas poluídas causaram genotoxicidade nas células meristemáticas de *A. cepa* indicando a presença de substâncias químicas capazes de causarem alterações em organismos vivos.

A quantificação dos elementos inorgânicos realizados a partir do PIXE demonstrou uma aumento nas concentrações dos metais Al, Si, Ti, Mn, Fe e Cu nos pontos 1 e 2 quando comparadas ao ponto 3. Segundo Christofolletti (2008), os metais pesados são potencialmente mutagênicos e estão seriamente relacionados com a poluição ambiental, podendo desta forma,

justificar o aumento da frequência de MNs nas amostras mais diluídas do ponto 1 e 2 do nosso estudo.

O dano aumentado no DNA pode ser associado aos elementos inorgânicos encontrado na água contaminada. É bem descrito que os metais têm o potencial de causar efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (Walker et al., 2006). Em geral, a genotoxicidade dos elementos inorgânicos é provocada por mecanismos indiretos, uma das mais importantes vias envolve a interferência na regulação redox celular e na indução do estresse oxidativo (geração de espécies reativas de oxigênio), o que pode causar danos ao DNA oxidativo (Beyersmann; Hartwig, 2008); (Lima et al., 2011).

Maceda et al. (2015) avaliaram a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade de amostras de água provenientes do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, Mato Grosso do Sul, Brasil. A presença de metais acima dos níveis permitidos nas amostras de água analisadas do Córrego Arara indica possíveis potenciais mutagênicos, genotóxicos e citotóxicos aos organismos devido a esses poluentes derivados ou não de ações antrópicas. Silva et al. (2013) observou altos níveis de metais pesados nas amostras de água da cidade de Vazante, no estado de Minas Gerais, que foi diretamente relacionado aos eventos genotóxicos observados em raízes de *A. cepa*.

Assim, o presente estudo demonstrou que as amostras de água do Arroio Araçá, coletadas e analisadas em diversos pontos, apresentaram possível potencial mitogênico, genotóxico e mutagênico no sistema *A. cepa*, devido à presença de substâncias e materiais poluentes derivados provavelmente de contaminação urbana. Considerando-se a utilização e a importância das águas deste arroio para o município de Canoas, RS/BR, esse trabalho pode contribuir para outros estudos e como ferramenta de suporte ao controle da qualidade da água a fim de auxiliar em ações e medidas para futura recuperação.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, Marco Antônio Bettine de; SCHWARZBOLD, Albano. Avaliação Sazonal da Qualidade das Águas do Arroio da Cria Montenegro, RS com Aplicação de um Índice de Qualidade de Água (IQA). RBRH – **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 8, n.1, p. 81–97, 2003.
2. ALVIM, Luige Biciati; KUMMROW, Fábio; BEIJO, Luiz Alberto; LIMA, Cláudio Antônio de Andrade; BARBOSA, Sandro. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa*.L. **Revista Ambiente & Água- a Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, 2011.
3. AMARAL, Alexandre de Moraes; VOLTOLINI, Júlio Cesar; BARROS, Layra; BARBÉRIO, Agnes. Avaliação Preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium*(*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.20, n.1 p. 65-72, 2007.
4. ASAKAWA, Shoichiro; YOSHIDA, Keisuke; YABE, Kazuo. “Perceptions of urban stream corridors within the greenway system of Sapporo”. **Landscape and Urban Planning**, Japan, v. 68, p. 167-82, 2004.
5. ATHANÁSIO, Camila Gonçalves; Prá, Daniel; RIEGER, Alexandre. Water quality of urban streams: the *Allium cepa* seeds/seedlings test as a tool for surface water monitoring. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 391367, 7 p. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/391367>.
6. BARBOSA, Jefferson da Silva. **Análise da genotoxicidade das águas da Lagoa de Extremoz-RN**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
7. BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol**, n. 82, p. 493–512, 2008.
8. **CANOAS**; <<http://www.canoas.rs.gov.br/site>>, acessada em julho, 2016.
9. CARITÁ, Renata; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72(5): 722-5, 2008.
10. CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 129p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2008.
11. CUCHIARA, Cristina Copstein; BORGES, Clarissa; BOBROWSKI, Vera Lúcia. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, v.6, n.1, p. 33-38, 2012.
12. DÜSMAN, Elisângela; LUZZA, Michel; SAVEGNAGO, Leoberto; LAUXEN,

- Daiana; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta; TONIAL, Ivane Benedetti; SAUER, Ticiane Pokrywiecki. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Springer Science**. Published online: 27 October 2013. Assess (2014) 186:1793–1800.
13. EGITO, Lucila Carmen Monte; MEDEIROS, Maria da Graça; MEDEIROS, Silvia Regina Batistuzzo de; AGNEZ-LIMA, Lucymara Fassarella. Cytotoxic and genotoxic potencial os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p.425-441, 2007.
 14. FITTSCHEN, Ursula Elisabeth Adriane; FALKENBERG, Gerald. Trends in environmental science using microscopic X-ray fluorescences. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 66, p. 567–580, 2001.
 15. GALVÃO, Messias; MIRANDA, Daniel Pereira; COSTA, Gerlane de Medeiros; SILVA, Angelita Benevuti da; KARSBURG, Isane Vera. Potencial mutagenico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de Alta Floresta – MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia. v. 11, n.2, p. 2373, 2015.
 16. GOMES, Jeniffer Vieira; TEIXEIRA, Jéssica Tamara dos Santos; LIMA, Viviane Moreira de; BORBA, Hélcio Resende. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Rev. Ambient. Água**, v.10, 2015.
 17. LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALLES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
 18. LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALLES, Maria Aparecida. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso**. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4º DPETRO, Campinas, SP, p. 21-24, 2007.
 19. LIMA, P.D.; VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; BAHIA, M.O.; COSTA, E.T.; ANTUNES, L.M.; BURBANO, R.R. Genotoxic effects of Aluminum, Iron and Manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. **Human & Experimental Toxicology**, n.30, p.1435-1444, 2011.
 20. MACEDA, Elisangela Bortoluci; GRISOLIA, Alexéia Barufatti; VAINI, Jussara Oliveira; CANDIDO, Liliam Silvia. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no Município de Rio Brilhante, MS, Brasil, **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 10, n. 1, Jan. / Mar. 2015.
 21. MORAES, Danielle Serra de Lima; JORDÃO, Berenice Quinzane. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 370-374, 2002.
 22. OLIVEIRA, Leonardo Maurer de; VOLTOLINI, Júlio Cesar; BARBÉRIO, Agnes. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011.

23. OLIVEIRA, Othon Fialho de; MENDES, Carlos André Bulhões; SOUZA, Francisco Carlos Bragança de. Utilização da Simulação Dinâmica como Ferramenta de Apoio à Gestão de Bacias Hidrográficas: O Caso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, RS. RBRH — **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, n.4, p. 17-29, 2010.
24. PROCHNOW, Tania Renata; PROCHNOW, Emerson Alberto; LIBERMAN, Bernardo. Efeitos antrópicos sobre concentrações de metais alcalinos na região da Microbacia do Arroio Araçá, Canoas – Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1782-1786, 2009.
25. RODRIGUES, S. C.; BIANCHINI, A. Extraction and concentration of freshwater – and- seawater – derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 3, p. 275-281, 2007.
26. SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo, Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem**. São Paulo, 2009, 44p. (Série Manuais).
27. SILVA, Regildo Márcio Gonçalves da; AMARAL, Eni Aparecida do; MORAES, Vanessa Marques de Oliveira; SILVA, Luciana Pereira. Determination of heavy metals and genotoxicity of water from an artesian well in the city of Vazante MG, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(50), p. 6938-6943, 11 December, 2013.
28. STRIEDER, Milton Norberto; RONCHI, Luiz Henrique; STENERT, Cristina; SCHERER, Ricardo Thormann; NEISS, Ulisses Gaspar. Medidas biológicas e índices de qualidade da água de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. **Acta Biologica Leopoldensia**, v. 28, n. 1, p. 17-24, 2006.
29. VUJOSEVIC, M; ANDELKOVIC, S; SAVIC, G; BLAGOJEVIC, J. Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using the Allium anaphase-telophase test. *Environ Monit Assess.* Dec; 14791-30:75-81. Epub2007 Dec 15.2008.
30. WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. 3 ed. v. 30, 2006.
31. YLI-PELKONEN, Vesa; PISPA, Karoliina; HELLE, Inari. The role of stream ecosystems in urban planning: A case study from the stream Rekolanoja in Finland. **Management of Environmental Quality: An International Journal**, v. 17, p.6, 2003.
32. ZENKNER, Fernanda Fleig; AQUINO, Tabiane de; ABLING, Fernando; DALLEMOLE, Danieli Rosane; KÖHLER, Andreas; PRÁ, Daniel; RIEGER, Alexandre. Avaliação da genotoxicidade do Rio Pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanax fasciatus Cuvier*, 1819. **Caderno de Pesquisa**, série Biologia, v. 25, n. 3, p. 79-93, 2013.

CONCLUSÕES GERAIS

A partir dos resultados obtidos neste estudo nos três locais de coleta no arroio Araçá/RS de amostras de águas coletadas no verão, concluímos que:

- Não foi observado efeito citotóxico nas sementes de *Allium cepa* expostas as amostras de águas do Arroio Araçá. Ao contrário, um aumento (embora não significativo) no índice de germinação (IG) foi observado quando comparado ao controle negativo;
- Todas as amostras coletadas apresentaram uma indução do índice mitótico (IM) nas células de *A. cepa* em relação ao controle negativo;
- As amostras indicaram uma capacidade mitogênica nas células, tendo como efeito o aumento da taxa de divisão celular, possivelmente relacionado com a presença aumentada de matéria orgânica (avaliado pela DBO) e nutrientes presentes nessas amostras, detectados pelo PIXE (como por exemplo, fósforo, cálcio, ferro e zinco);
- Foi observado um aumento na frequência de micronúcleos nas células expostas as amostras, indicando um efeito genotóxico e mutagênico das águas do arroio Araçá;
- A quantificação dos elementos inorgânicos realizados a partir do PIXE demonstrou uma aumento nas concentrações dos metais Al, Si, Ti, Mn, Fe e Cu nos pontos 1 e 2 quando comparadas ao ponto 3;
- Com exceção da demanda bioquímica de oxigênio (DBO), todos os parâmetros analisados estão de acordo com o estabelecido na Resolução CONAMA 357/2005 e 430/201;
- As amostras, coletadas e analisadas nos diversos pontos, apresentaram possível potencial mitogênico, genotóxico e mutagênico no sistema *A. cepa*, evidenciado pela frequência de Micronúcleos (MN), devido à presença de substâncias e materiais poluentes derivados provavelmente de contaminação urbana.

REFERÊNCIAS GERAIS

1. ALMEIDA, Marco Antônio Bettine de; SCHWARZBOLD, Albano. Avaliação Sazonal da Qualidade das Águas do Arroio da Cria Montenegro, RS com Aplicação de um Índice de Qualidade de Água (IQA). RBRH – **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 8, n.1, p. 81–97, 2003.
2. ALVIM, Luige Biciati; KUMMROW, Fábio; BEIJO, Luiz Alberto; LIMA, Cláudio Antônio de Andrade; BARBOSA, Sandro. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa*. L. **Revista Ambiente & Água- a Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 6, n. 2, 2011.
3. AMARAL, Alexandre de Moraes; VOLTOLINI, Júlio Cesar; BARROS, Layra; BARBÉRIO, Agnes. Avaliação Preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste *Allium*(*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 20, n.1 p. 65-72, 2007.
4. Arroio Araçá-Nosso Rio Guri. <http://arroioaraca.blogspot.com.br>. Acesso em Julho de 2016.
5. ASAKAWA, Shoichiro; YOSHIDA, Keisuke; YABE, Kazuo. “Perceptions of urban stream corridors within the greenway system of Sapporo”. **Landscape and Urban Planning**, Japan, v. 68, p. 167-82, 2004.
6. ATHANÁSIO, Camila Gonçalves; Prá, Daniel; RIEGER, Alexandre. Water quality of urban streams: the *Allium cepa* seeds/seedlings test as a tool for surface water monitoring. **The Scientific World Journal**, v. 2014, Article ID 391367, 7 p. 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/391367>.
7. BAGATINI, Margarete Dulce; SILVA, Antônio Carlos Ferreira da; TEDESCO, Solange Bósio. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 444-447, 2007.
8. BARBOSA, Jefferson da Silva. **Análise da genotoxicidade das águas da Lagoa de Extremoz-RN**. 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
9. BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol**, n. 82, p. 493–512, 2008.
10. **CANOAS**; <<http://www.canoas.rs.gov.br/site>>, acessada em julho, 2016.
11. CARITÁ, Renata; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, 72(5): 722-5, 2008.
12. CARRARD, Vinicius Coelho; COSTA, Cynthia Hernandez; FERREIRA, Luciana Adolfo; LAUXEN, Isabel da Silva; RADOS, Pantelis Varvaki. Teste dos Micronúcleos – Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **R. Fac. Odontol.**

Porto Alegre, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, jan./dez. 2007.

13. CHRISTOFOLETTI, Cintya Aparecida. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lêntico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 129p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, 2008.
14. **CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA**. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005, Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, p. 58-63, Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011.
15. CORBI, Juliano José; STRIXINO, Susana Trivinho; SANTOS, Ademir dos; DEL GRANDE, Marcelo. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 61-65, 2006.
16. CUCHIARA, Cristina Copstein; BORGES, Clarissa; BOBROWSKI, Vera Lúcia. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia & Ciências Agropecuárias**, v.6, n.1, p. 33-38, 2012.
17. DÜSMAN, Elisângela; LUZZA, Michel; SAVEGNAGO, Leoberto; LAUXEN, Daiana; VICENTINI, Veronica Elisa Pimenta; TONIAL, Ivane Benedetti; SAUER, Ticiane Pokrywiecki. *Allium cepa L.* as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. **Springer Science**. Published online: 27 October 2013. Assess (2014) 186:1793–1800.
18. EGITO, Lucila Carmen Monte; MEDEIROS, Maria da Graça; MEDEIROS, Silvia Regina Batistuzzo de; AGNEZ-LIMA, Lucymara Fassarella. Cytotoxic and genotoxic potencial os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 425-441, 2007.
19. FACHINETTO, Juliana M.; BAGATINI, Margarete D.; DURIGON, Jaqueline; SILVA, Antonio C.F. da; TEDESCO, Solange B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, 17(1): Jan./Mar. 2007.
20. FERNANDES, Luiz Henrique; MAINIER, Fernando Benedicto; MONTEIRO, Luciane Pimentel Costa. Remoção de íons Cádmiu de efluentes líquidos através de técnicas eletroquímicas utilizando telas de aço-Carbono como catodo. **Engevista**, v. 14, n. 1. p. 34-41, 2012.
21. FERNANDES NETO, Maria de Lourdes; SARCINELLI, Paula de Novaes. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n.1, p. 69-78, 2009.
22. FITTSCHEN, Ursula Elisabeth Adriane; FALKENBERG, Gerald. Trends in environmental science using microscopic X-ray fluorescences. **Spectrochim. Acta Part B**, v. 66, p. 567–580, 2001.

23. FREIRIA, Rafael Costa. Direito das Águas: Aspectos legais e institucionais na perspectiva da qualidade. In: **Âmbito Jurídico**, Rio Grande, n. 40, abr. 2007.
Disponível em: < <http://www.a-juridico.com.br/site> >. Acesso em jul 2016.
24. GALVÃO, Messias; MIRANDA, Daniel Pereira; COSTA, Gerlane de Medeiros; SILVA, Angelita Benevuti da; KARSBURG, Isane Vera. Potencial mutagenico em águas coletadas em diferentes pontos no perímetro urbano no município de Alta Floresta – MT através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v. 11, n.2, p. 2373, 2015.
25. GOMES, Jeniffer Vieira; TEIXEIRA, Jéssica Tamara dos Santos; LIMA, Viviane Moreira de; BORBA, Hélcio Resende. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Rev. Ambient. Água**, v.10, 2015.
26. GRIPPA, Gabriela de Almeida; MOROZESK, Mariana; NATI, Natália; MATSUMOTO, Sílvia Tamie. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, Espírito Santo, v. 23, n.1-2, p.11-16, 2010.
27. **IBGE**; [http:// WWW.ibge.gov.br/cidadesat/](http://WWW.ibge.gov.br/cidadesat/), acessada em setembro, 2014.
28. KUNZ, Airton; PERALTA-ZAMORA, Patricio; MORAES, Sandra Gomes de; DURÁN, Nelson. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, 2002.
29. LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALLES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
30. LEME, Daniela Moraes; MARIN-MORALLES, Maria Aparecida. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso**. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4º PDPETRO, Campinas, SP, p. 21-24, 2007.
31. LIMA, P.D.; VASCONCELLOS, M.C.; MONTENEGRO, R.C.; BAHIA, M.O.; COSTA, E.T.; ANTUNES, L.M.; BURBANO, R.R. Genotoxic effects of Aluminum, Iron and Manganese in human cells and experimental systems: a review of the literature. **Human & Experimental Toxicology**, n.30, p.1435-1444, 2011.
32. LUCAS, Ariovaldo Antonio Tadeu; SILVA, Maria do Socorro Ferreira da; BARROS, Itamar Prado; AGUIAR NETTO, Antenor de Oliveira; FACCIOLLI, Gregorio Guirado; SOUSA, Inajá Francisco de. Qualidade da água para consumo humano na sub-bacia hidrografica do rio Ganhamoroba – Sergipe. **II inovagri International Meeting**, fortaleza, BR, 2014.
33. MACEDA, Elisangela Bortoluci; GRISOLIA, Alexéia Barufatti; VAINI, Jussara Oliveira; CANDIDO, Liliam Silvia. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no Município de Rio Brillhante, MS, Brasil, **Rev. Ambient. Água**, Taubaté, v. 10, n. 1, Jan. / Mar. 2015.
34. MAURO, Jane B. Narvaez; GUIMARÃES, Jean Remy D.; MELAMED, Ricardo. Aguapé

- agrava contaminação por mercúrio. **Ciência Hoje**, v. 25, n. 150, p. 68-71, 1999.
35. MERTEN, Gustavo H.; MINELLA, Jean P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável**, v.3, n.4, 2002.
 36. MORAES, Danielle Serra de Lima; JORDÃO, Berenice Quinzane. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 370-374, 2002.
 37. OLIVEIRA, Daniele; SILVA, Tiele Carvalho da; ZANIN, Julie Graziela; NACHTIGALL, Gisele; MEDEIROS, Aline Weber; FRAZZON, Ana Paula Guedes; VAN DER SAND, Sueli Terezinha. Qualidade da água e identificação de bactérias Gram-Negativas isoladas do Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. **Evidência**, v. 12, n. 1, p. 51-62, 2012(a).
 38. OLIVEIRA, Joana Paula Wagner; SANTOS, Raissa Nunes dos; BOEIRA, Jane Marli. 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(b).
 39. OLIVEIRA, Leonardo Maurer de; VOLTOLINI, Júlio Cesar; BARBÉRIO, Agnes. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2011.
 40. OLIVEIRA, Othon Fialho de; MENDES, Carlos André Bulhões; SOUZA, Francisco Carlos Bragança de. Utilização da Simulação Dinâmica como Ferramenta de Apoio à Gestão de Bacias Hidrográficas: O Caso do Arroio Dilúvio em Porto Alegre, RS. RBRH — **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 15, n.4, p. 17-29, 2010.
 41. PERON, Ana Paula; CANESIN, Edmilson Antônio; CARDOSO, Cristiano Marcelo Viana. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista brasileira Bioci**, Porto Alegre. v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.
 42. PROCHNOW, Tania Renata; PROCHNOW, Emerson Alberto; LIBERMAN, Bernardo. Efeitos antrópicos sobre concentrações de metais alcalinos na região da Microbacia do Arroio Araçá, Canoas – Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1782-1786, 2009.
 43. RODRIGUES, S. C.; BIANCHINI, A. Extraction and concentration of freshwater – and-seawater – derived dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 3, p. 275-281, 2007.
 44. SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo, Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem**. São Paulo, 2009, 44p. (Série Manuais).
 45. SHARMA, Parul; SRIVASTAVA, M.M.; SRIVASTAVA, Shalini. Removal of cadmium from

- aqueous system by shelled *Moringa oleifera* Lam. seed powder. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 2, p. 299-305, 2006.
46. SILVA, Ana Elisa Pereira; ANGELIS, Carlos Frederico; MACHADO, Luiz Augusto Toledo; WAICHAMAN, Andrea Viviana. Influência da precipitação na qualidade da água do Rio Purus. **Acta Amazonica**, v. 38 (4) 2008: 733 – 742.
47. SILVA, Regildo Márcio Gonçalves da; AMARAL, Eni Aparecida do; MORAES, Vanessa Marques de Oliveira; SILVA, Luciana Pereira. Determination of heavy metals and genotoxicity of water from an artesian well in the city of Vazante MG, Brazil. **African Journal of Biotechnology**, v. 12(50), p. 6938-6943, 11 December, 2013.
48. STRIEDER, Milton Norberto; RONCHI, Luiz Henrique; STENERT, Cristina; SCHERER, Ricardo Thormann; NEISS, Ulisses Gaspar. Medidas biológicas e índices de qualidade da água de uma microbacia com poluição urbana e de curtumes no sul do Brasil. **Acta Biologica Leopondensia**, v. 28, n. 1, p. 17-24, 2006.
49. VUJOSEVIC, M; ANDELKOVIC, S; SAVIC, G; BLAGOJEVIC, J. Genotoxicity screening of the river Rasina in Serbia using the *Allium* anaphase-telophase test. *Environ Monit Assess.* Dec; 14791-30:75-81. Epub 2007 Dec 15. 2008.
50. WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of ecotoxicology**. 3 ed. v. 30, 2006.
51. YLI-PELKONEN, Vesa; PISPA, Karoliina; HELLE, Inari. The role of stream ecosystems in urban planning: A case study from the stream Rekolanoja in Finland. **Management of Environmental Quality: An International Journal**, v. 17, p.6, 2003.
52. ZENKNER, Fernanda Fleig; AQUINO, Tabiane de; ABLING, Fernando; DALLEMOLE, Danieli Rosane; KÖHLER, Andreas; PRÁ, Daniel; RIEGER, Alexandre. Avaliação da genotoxicidade do Rio Pardinho utilizando o ensaio cometa em *Astyanax fasciatus* Cuvier, 1819. **Caderno de Pesquisa**, série Biologia, v. 25, n. 3, p. 79-93, 2013.