



Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador

doi: 10.4136/ambi-agua.1459

Received: 09 Jul. 2014; Accepted: 06 Nov. 2014

Jacqueline Ramos Machado Braga* ; Diêgo Menezes Lopes

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Cruz das Almas, Bahia, Brasil

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas

Setor de Biologia, Laboratório IMUNOBIO

* Autor correspondente: e-mail: jacquebraga@globo.com,

dmlopes-gen@hotmail.com

RESUMO

Ao longo dos anos, o rio Subaé na Bahia tem sido impactado por atividade industrial pelo lançamento de efluentes tóxicos em suas águas. O presente estudo analisou os efeitos citotóxicos e genotóxicos provocados pela água do trecho deste rio que banha o município de Humildes-BA, utilizando o teste do *Allium cepa*. Amostras de água foram obtidas em três pontos de coleta (PI, PII e PIII) para as análises de parâmetros físico-químicos. Bulbos de *A. cepa* foram colocados por 72 h para germinação nas amostras de água em triplicata. As radículas foram submetidas por 12-h a 4 °C, fixadas em Carnoy por 12-h e coradas com técnica de Feulgen. Foram analisadas 6.500 células/tratamento. A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM) e a genotoxicidade, por anormalidades cromossômicas (AC). Os testes físico-químicos revelaram que PI e PIII apresentavam valores de OD, DBO₅ e DQO alterados. O teste de toxicidade indicou que houve inibição do crescimento das raízes nos pontos PI (10,3 %) e PII (10,6 %), quando comparados ao controle negativo (11,9 %). No PI, foram encontrados 6,2 % de ACs, 6 % em PII e 5,4 % em PIII, valores acima do controle positivo (3 %), evidenciando o efeito genotóxico nos pontos estudados. A partir dos resultados, pode-se inferir que as águas do Rio Subaé podem conter substâncias que provavelmente estão afetando o ciclo celular do *A. cepa*, sendo importante que outras análises sejam realizadas em diferentes estações do ano, para melhor monitoramento das condições ambientais locais.

Palavras-chave: anormalidades cromossômicas, ecotoxicologia, índice mitótico, monitoramento ambiental.

Cytotoxicity and genotoxicity in water of the Subaé River (Humildes, Bahia, Brazil) using *Allium cepa* L. as a bioindicator

ABSTRACT

Over the years, the Subaé River in Bahia has been polluted by the discharge of toxic industrial waste into its waters. This study used the *Allium cepa* test to investigate the cytotoxic and genotoxic effects caused by the river water that that runs through the city of Humildes-BA. Water samples were collected in three points (PI, PII and PIII) for physical and

chemical analysis. Onions bulbs were immersed in triplicate water samples for 72 h to induce germination. The root tips were kept at 4 °C for 12-h, then fixed in Carnoy for 12-h and stained using the Feulgen technique. We analyzed 6500 cells of each treatment. Cytotoxicity was assessed by the mitotic index (MI) and genotoxicity by chromosomal abnormalities (CA). The tests revealed that PI and PIII had DO values, BOD₅ and COD changed. The toxicity test indicated that root growth was inhibited by the water drawn from PI (10.3%) and PII (10.6%) compared to the negative control (11.9%). CAs were found in 6.2% of the cells relating to PI, 6.0% relating to PII, and 5.4% relating to PIII, respectively. These values were higher than those found in the positive control (3%), indicating a genotoxic effect at the points studied. From the results, it can be inferred that the waters of the Rio Subaé may contain substances that are probably affecting the cell cycle of *A. cepa*. It is important that other analyses be conducted in different seasons, in order to better monitor local environmental conditions.

Keywords: chromosomal abnormalities, ecotoxicology, environmental monitoring, mitotic index.

1. INTRODUÇÃO

A água é um elemento de extrema importância para a dinâmica de sobrevivência do planeta. No entanto, diversos setores da indústria lançam nos rios resíduos oriundos de suas atividades que são considerados tóxicos por afetarem o equilíbrio do meio ambiente, prejudicando não somente a saúde humana, mas também de animais e plantas (Ferreira et al., 2012).

Em 1960, a Companhia Brasileira de Chumbo (COBRAC/Plumbum) estabeleceu-se na periferia da cidade de Santo Amaro da Purificação, região do Recôncavo da Bahia. A Usina Plumbum localiza-se a 300 metros da margem do rio Subaé, principal rio da bacia hidrográfica do Subaé (Carvalho et al., 1984). Segundo ensaios realizados conforme a NBR 10.004 (ABNT, 2004), da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, na escória deixada pela fundição, desativada desde 1993, predominam os metais traço chumbo (Pb) e cádmio (Cd). Os dados ambientais existentes sobre a área onde se localizam as instalações da usina, desativada no ano de 1993, indicam que as águas superficiais também estão contaminadas por estes metais traço na área denominada “zona alagadiça” (Anjos, 2003), os solos apresentam elevadas concentrações destes metais nos locais onde ocorre a deposição da escória, e as águas subterrâneas apresentam concentrações de Pb e Cd acima dos limites determinados pela legislação vigente (Adorno et al., 2013).

Moulis e Thevénod (2010) sugerem que a bioacumulação de metais traço em organismos vivos é um dos efeitos mais sérios de contaminação ambiental porque tanto animais quanto plantas podem concentrar estes elementos em níveis muito superiores aos encontrados no meio ambiente, promovendo o transporte nos vários níveis da cadeia alimentar.

O Rio Subaé é vizinho do Centro Industrial do Subaé, implantado em 1970. Atualmente as residências avançaram sobre a área industrial, aumentando a poluição e prejudicando a vazão do rio. O problema da contaminação do rio Subaé não se restringe apenas à degradação da fauna e flora local ou à contaminação por metais traço. A saúde humana também é afetada pela carga de efluentes líquidos, lançados por fábricas de beneficiamento de frutas, e hidrocarbonetos de petróleo (Andrade e Moraes, 2013). Um exemplo da extensão da contaminação do Subaé é o município de Humildes, distrito de Feira de Santana-BA, onde em junho de 2010 surgiram milhares de peixes mortos. Entre as possíveis causas da mortandade dos peixes, levantadas pela Secretaria do Meio Ambiente (IMA), estão a contaminação por produtos químicos, a diminuição do oxigênio pela redução do fluxo de água por falta de chuva ou o acúmulo de matéria orgânica (Feira de Santana, 2011).

Ainda segundo o SEMMAM (Feira de Santana, 2011), o prejuízo para os produtores é grande, visto que muitos utilizam as águas do rio para irrigar plantações de hortaliças.

Conforme relatos, a água já vinha escurecendo há algum tempo, o odor é muito forte e os dados coletados no local indicam que a contaminação pode advir do lançamento de efluentes líquidos de uma fábrica de polpas de frutas. Como o rio Subaé sofreu severas interferências em decorrência da influência antrópica, é de suma importância a avaliação do comprometimento ambiental gerado.

Inúmeros testes toxicológicos são utilizados para avaliar as concentrações e o tempo de exposição necessário para que os agentes tóxicos possam produzir efeitos adversos sobre os organismos. Carneiro Jr. (2010) sugere que dentre estes testes, o cultivo direto de bulbos, em soluções preparadas com químicos diversos ou em amostras de águas naturais contaminadas, caracteriza-se como um interessante teste de toxicidade, pois permite avaliar os efeitos de compostos químicos, além de monitorar ambientes com suspeita de contaminação.

Plantas superiores são reconhecidas como excelentes modelos para detectar mutágenos ambientais, sendo por isso frequentemente utilizadas em estudos de monitoramento. Dentre as espécies de plantas, a cebola (*Allium cepa*) tem sido usada para avaliar danos ao DNA, como anormalidades cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico. O teste genotóxico que utiliza o *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (Grippa et al., 2010). O teste do *A. cepa* é caracterizado como padrão ouro para avaliação de anormalidades cromossômicas, índice mitótico, formação de micronúcleos e anormalidades nucleares na detecção de contaminantes, além de permitir a avaliação da ação de um agente e seus efeitos clastogênicos ou aneugênicos sobre o material genético (Auib e Felzenswalb, 2011; Feretti et al., 2007).

A partir de ensaios de biomonitoramento e genotoxicidade será possível avaliar as consequências do impacto gerado no trecho do rio Subaé no município de Humildes-BA, promovendo um delineamento mais específico das ações que futuramente poderão ser realizadas no sentido de minimizar os efeitos da poluição para a população local.

2. METODOLOGIA

As amostras de água foram coletadas ao longo do rio Subaé, no trecho que passa pelo município de Humildes, distrito de Feira de Santana, Bahia, Brasil (Figura 1). Foram estabelecidos três pontos de coleta, com três repetições cada, realizadas entre os meses de junho a agosto de 2013. Todas as amostras tiveram dados físico-químicos avaliados *in loco* através de sonda multiparâmetros. As amostras foram armazenadas em garrafas estéreis e mantidas a 4 °C até o momento de realização dos testes.

Com relação às características dos pontos de coleta, verificou-se que o ponto PI, localizado nas proximidades de uma fábrica de polpas de frutas, apresentava uma grande quantidade de taboás, plantas indicadoras de poluição, o que dificultava a visualização do leito do rio. Os pontos PII e PIII estavam cada um, distantes cerca de 6 km do PI e também apresentavam ao longo das margens lixo e indícios de influência antrópica.

A avaliação da toxicidade foi realizada seguindo os procedimentos descritos por Fiskesjö (1985) e de acordo com protocolo de Barbério et al. (2011), com adaptações. Para cada ponto de coleta, foram selecionados três bulbos de tamanho semelhante, ausência de traumas, deformidades naturais ou contaminação por fungos. O anel radicular foi lavado em água corrente e água destilada antes do início do teste. Os bulbos foram transferidos para recipientes com 200 mL de cada amostra de água coletada e mantidos à temperatura ambiente para germinação. A água era trocada após 24-h, 48-h e 72-h. Os controles foram realizados em água destilada (controle negativo) e 25 mg L⁻¹ de solução de sulfato de cobre (controle positivo). As radículas foram medidas (cm) após 72-h de germinação. O sulfato de cobre, usado como controle positivo, além de atuar no ciclo redox, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem a peroxidação de lipídios, e alterações no sistema de reparo do

DNA, pode ser tóxico para plantas e animais, sendo comprovadamente genotóxico para a amostra testada (Prá et al., 2006).

As radículas retiradas foram submetidas ao “choque frio” em banho de gelo por 12-h sob refrigeração. Para a fixação foi utilizado o fixador Carnoy à temperatura ambiente (12-h), sendo trocado o fixador após 6-h. Após isso, o material foi estocado em etanol (70%) sob refrigeração.

As radículas foram retiradas do fixador, enxutas e submetidas à hidrólise ácida em HCl (1N a 60 °C) de 10 a 12-min em banho-maria, sendo depois lavadas em água destilada. Foi realizada a reação de Feulgen e coloração com o Reativo de Schiff. O meristema e a região F1 foram cortados e colocados numa lâmina limpa onde foi seccionada apenas a região do meristema apical. O fragmento foi recoberto com uma gota de carmin acético (2%), esmagado com lamínula e submetido à microscopia de luz.

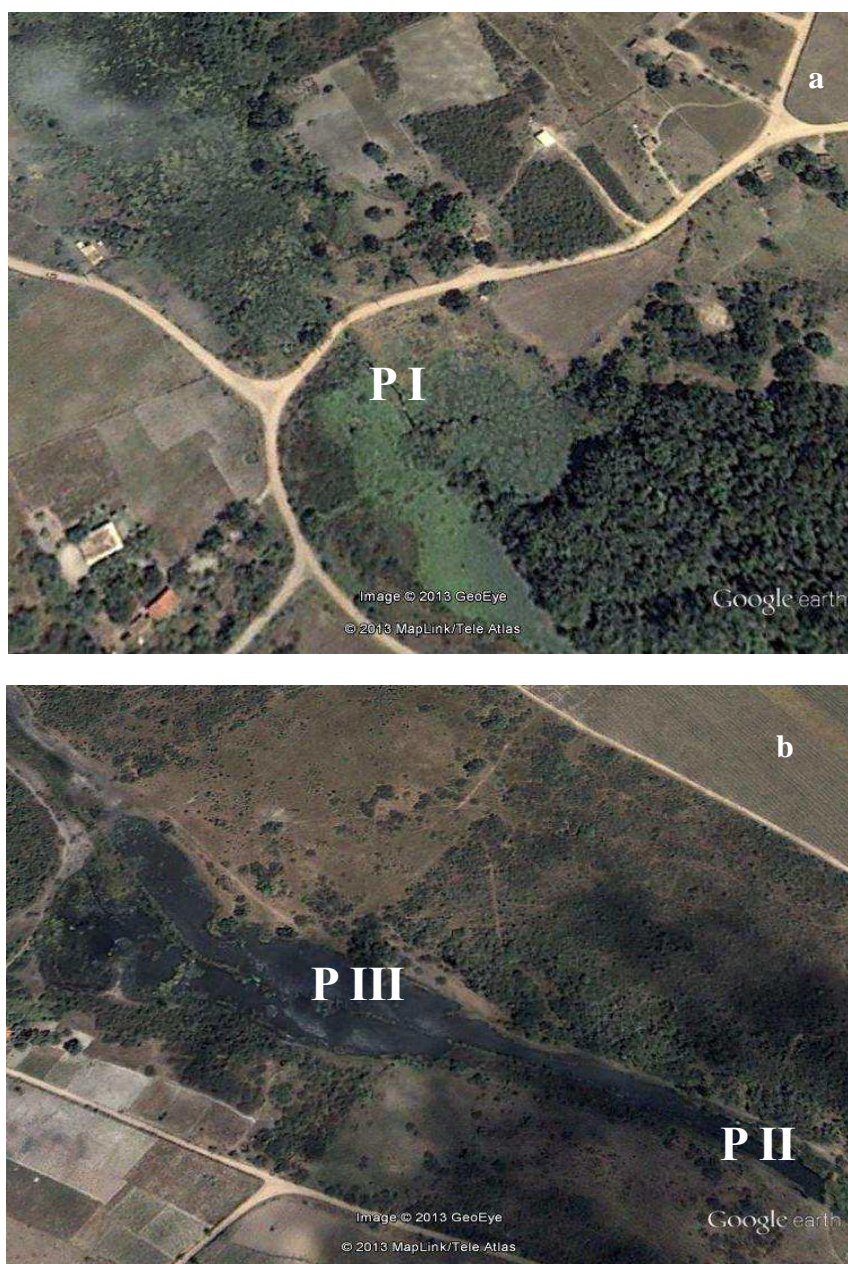


Figura 1. Pontos de coleta de água I (a), II e III (b) no Rio Subaé, Município de Humildes, Bahia, Brasil.

Fonte: Google Earth.

Foram confeccionadas três lâminas/bulbo/amostra de água. De cada lâmina, foram analisadas em “teste cego” 500 células, perfazendo um total de 1500 células/bulbo/amostra. Para a avaliação dos efeitos citotóxicos, foram verificadas as alterações no Índice Mitótico (IM), calculado pelo número de células em divisão dividido pela soma do número das células em interfase e das células em divisão. Os efeitos genotóxicos foram analisados pelas anormalidades cromossômicas (AC) encontradas, considerando a porcentagem de irregularidades em metáfases, anáfases e presença de células com fragmentos cromossômicos e binucleações. As AC foram então fotodocumentadas e o tratamento estatístico foi realizado por pelo Teste do Qui-Quadrado ($\alpha=0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise físico-química

Estudos de monitoramento da qualidade da água requerem dados preliminares sobre condições da água a ser estudada. Temperatura, pH, salinidade, Oxigênio Dissolvido (OD), Demanda Química de Oxigênio (DQO), Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) dentre outros, são rotineiramente utilizados para o monitoramento da qualidade em amostras de águas, fornecendo dados importantes sobre o objeto de estudo (Oliveira et al., 2012). A DQO é um parâmetro que estima o potencial poluidor (consumidor de oxigênio) dos efluentes domésticos e industriais, assim como o impacto dos mesmos sobre os ecossistemas aquáticos (Zuccari et al., 2005).

Segundo a Resolução 357/2005 (Brasil, 2005), que classifica as águas de acordo com os valores de salinidade, as amostras dos pontos I e II (Tabela 1) são classificadas como sendo água salobra (acima de 0,5 ‰). Entretanto, o ponto III foi classificado com água doce (inferior a 0,5 ‰).

Os dados físico-químicos da Tabela 1, revelaram ainda alterações em todos os pontos coletados, considerando os valores de referência estabelecidos para OD (mg L^{-1}). O índice de OD é um dos parâmetros mais importantes para avaliar a capacidade de um corpo hídrico em suportar a atividade biológica de organismos aquáticos. Índices de 5 a 6 mg L^{-1} já suportam uma variada população de peixes. De acordo com o CONAMA (Resolução 357/2005) a quantidade ideal de OD (mg L^{-1}) em águas de rio salobra de classe 2 não pode ser inferior a 4 mg L^{-1} . No presente estudo, os valores de OD registrados nos pontos coletados não se enquadram de acordo com a resolução do órgão regulador.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos em média \pm desvio padrão das amostras de água coletadas nos pontos I, II e III do Rio Subaé, Município de Humildes – BA, Brasil, 2013.

| Parâmetros | Ponto I | Ponto II | Ponto III | Referência* |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|
| Salinidade (‰) | 0,75 \pm 0,15 | 0,74 \pm 0,11 | 0,11 \pm 0,07 | 0,5 |
| Temperatura (°C) | 25,0 \pm 1,02 | 26,3 \pm 1,15 | 26,1 \pm 1,11 | - |
| pH | 6,6 \pm 0,2 | 7,3 \pm 0,4 | 7,3 \pm 0,3 | 6,0 - 9,0 |
| OD (mgL^{-1}) | 1,4 \pm 0,3 | 3,45 \pm 0,86 | 1,8 \pm 0,44 | Não < 5 |
| DBO ₅ (mgL^{-1}) | 4,35 \pm 0,4 | 3,2 \pm 0,7 | 4,0 \pm 0,9 | Não > 5 |
| DQO (mgL^{-1}) | 15,4 \pm 2,3 | 10,3 \pm 1,2 | 13,2 \pm 1,4 | 3,0 – 5,0 |

* Segundo Resolução 357/2005 do CONAMA.

A DBO₅ correlaciona-se à quantificação indireta de matéria orgânica presente no corpo hídrico, associada à carga poluidora orgânica antrópica, enquanto que a DQO seria a

quantidade de O₂ necessária para a oxidação da matéria orgânica através de um agente químico (Naime e Nascimento, 2009). No presente estudo, apesar dos dados de OD não estarem dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA, os valores referentes à DBO₅, encontram-se dentro do limite de referência. Segundo Ferreira et al. (2012), a DBO₅ revela a quantidade de oxigênio para que os microorganismos biodegradem a matéria orgânica, o que resulta no decréscimo da concentração de OD no meio hídrico, como confirmam nossos achados.

Os dados do presente estudo revelam ainda que, considerando a relação DQO/DBO₅, verificou-se que em PI, esta relação foi de 3,54, seguida de 3,21 (PII) e 3,3 (PIII). Nesta relação DQO/DBO₅, Ferreira et al. (2012) sugerem que valores entre 1,7 e 2,4 indicam poluição por esgoto doméstico, enquanto que dejetos industriais mostram variação mais ampla. Se for considerado ainda que o aumento de DBO₅ está relacionado a despejos de origem orgânica, e DQO a despejos de origem industrial, nossos achados indicam que a água do Rio Subaé, no trecho que passa pelo município de Humildes-BA está sofrendo a influência de efluentes de origem industrial.

3.2. Teste de citotoxicidade

Os resultados da Tabela 2 demonstram que no ponto PI não houve crescimento de raízes dentro das 72-h. A germinação desta amostra só iniciou uma semana após a montagem do experimento. De acordo com Leme e Marin-Morales (2008) e Souza et al. (2014), em estudo realizado com células meristemáticas de *A. cepa*, expostas às amostras de água e sedimento do Rio Corumbataí – SP, os contaminantes presentes em algumas amostras podem ter uma ação persistente, enquanto que em outras, a depender do tipo de contaminante ou da quantidade presente na amostra, as células meristemáticas podem ter capacidade de recuperação dos efeitos dos agentes mutagênicos. Nos pontos PII e PIII, as raízes cresceram dentro das 72h previstas, entretanto todas as amostras mostraram inibição em seu crescimento e conseqüente redução do IM.

Tabela 2. Resultados dos valores médios de Índice Mitótico (IM), crescimento e percentual de inibição de crescimento das raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos com a água do Rio Subaé.

| Tratamentos | IM (%) | Crescimento (cm) | % Inibição |
|-------------|--------|------------------|------------|
| Ponto I | - | 0,0 | 100 |
| Ponto II | 10,6 | 2,06 ± 0,6 | 22,6 |
| Ponto III | 9,8 | 1,63 ± 0,2 | 38,7 |
| Controle | 11,9 | 2,66 ± 0,5 | 0,0 |

Nota: IM (%) de 6.500 células por ponto.

O Índice Mitótico (IM) é um dado expresso em porcentagem que é utilizado para avaliar a taxa de divisão celular. Ele tem se mostrado um parâmetro importante para se avaliar os efeitos que agentes químicos causam no ciclo celular (Smaka-Kincl et al., 1996; Sobral et al., 2013). Alvin et al. (2011) relatam que qualquer mudança nas condições ambientais, principalmente por causa da poluição, pode ser observada nas plantas pela redução do crescimento radicular. Isto levanta a suspeita que algum ou vários poluentes possam estar presentes na área de estudo.

Os valores obtidos no teste de toxicidade nos três pontos, por meio da visualização das fases da divisão celular, indicaram que houve inibição do crescimento das raízes e consequente redução do IM. Segundo Circunvis et al. (2012), a análise do IM constitui uma ferramenta confiável para estudos de monitoramento de águas superficiais, pois o nível de citotoxicidade de águas poluídas pode ser determinado pela taxa de redução deste índice. No presente estudo, a análise dos índices de divisão das células de *A. cepa* mostrou que os resultados obtidos mostraram relevância estatística entre os grupos tratados com amostras de água do Rio Subaé ($p < 0,05$), ou seja, a água apresentou ação citotóxica.

3.3. Teste de genotoxicidade

Estudo anterior de genotoxicidade, realizado na região, revelou elevada frequência de anormalidades cromossômicas em sangue periférico de bovinos expostos ao Pb e Cd da escória da fábrica Plumbum (Braga, 2013). No presente estudo, anormalidades cromossômicas foram verificadas em todas as amostras ($p < 0,05$), indicando a presença de substâncias clastogênicas (indutoras de quebras) sobre o DNA. A Tabela 3 revela o resultado do teste de genotoxicidade, onde foram encontradas anormalidades cromossômicas dos tipos binucleação, *stickness* (cromossomos pegajosos), pontes anafásicas e metáfases com cromossomos atrasados, indicando também alterações em nível de fuso mitótico (Figuras 2 e 3).

Tabela 3. Número total de Anormalidades Cromossômicas, e frequência de cada tipo de alteração, nas raízes de *A. cepa* submetidas aos diferentes tratamentos com a água do Rio Subaé.

| Tratamentos | Total de AC | BN (%) | Sn (%) | PA (%) | Ca (%) |
|--------------|-------------|--------|--------|--------|--------|
| Ponto I | 62 | 16,1 | 12,9 | 25,8 | 45,2 |
| Ponto II | 60 | - | 10,0 | 35,0 | 55,0 |
| Ponto III | 54 | 11,1 | 16,7 | 46,3 | 25,9 |
| Controle (+) | 30 | 16,7 | 16,7 | 33,3 | 33,3 |
| Controle (-) | 0 | - | - | - | - |

Nota: AC (Anormalidades Cromossômicas); BN (Binucleação); Sn (*Stickness*); PA (Ponte Anafásica); Ca (Cromossomo atrasado).

De acordo com Galindo et al. (2012), substâncias contaminantes tóxicas liberadas na água podem não mostrar efeitos agudos em organismos expostos, porém podem causar redução de sobrevivência, danos teciduais, danos genéticos de células somáticas e germinativas, acumulação de contaminantes persistentes e neoplasias. O estudo de Peron et al. (2009) indica que em geral, alterações no índice de divisão celular e do material genético podem ser deletérias para o organismo e indutoras de consequências severas e irreversíveis à saúde humana ou animal.

Os resultados sugerem que no trecho do Rio Subaé que banha o município de Humildes Ba, existem substâncias indutoras de efeito citotóxico e genotóxico que promoveram alterações no organismo-teste. Entretanto, fazem-se necessários estudos na região em outras épocas do ano, principalmente no verão, haja vista que em estações mais secas existe uma maior potencialização da ação tóxica de poluentes nos corpos hídricos. Estudos anteriores revelaram que as diferenças na genotoxicidade entre os pontos de coleta em um rio podem ter relação com o volume de água, devido à influência das diferenças

sazonais de precipitação pluviométrica, da concentração das substâncias tóxicas, do local e da época das amostragens (Scalon, 2009; Oliveira et al., 2012).

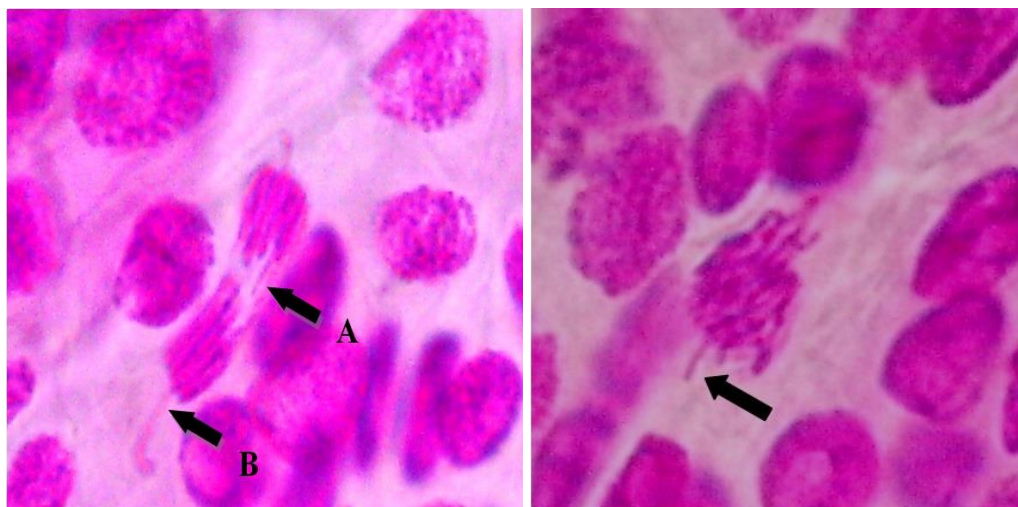


Figura 2. Ponte anafásica (A) e Stickness (B). Aumento 1000X.

Figura 3. Metáfase com cromossomo atrasado em *A. cepa*. Aumento 1000X.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados observados neste estudo, pode-se inferir que a avaliação dos parâmetros físicoquímicos e citogenotóxicos da água do Rio Subaé, indicam que o este rio pode conter possíveis contaminantes de origem industrial, que podem estar afetando o ciclo celular, a morfologia cromossômica e o crescimento das raízes de *A. cepa*. Nesse sentido, é relevante que estudos de sazonalidade adicionais sejam realizados, para um monitoramento periódico das condições ambientais do local, no intuito de garantir água de qualidade à população ribeirinha, do município de Humildes, e monitorar o equilíbrio ambiental do Rio Subaé.

5. REFERÊNCIAS

- ADORNO, E. V.; SANTOS, E. S. dos; JESUS, T. B. SIG e agressão linear para avaliação ambiental das nascentes do rio Subaé em Feira de Santana-BA. **Boletim Goiano de Geografia**, Goiânia, v. 33, n. 2, p. 63-80, 2013.
- AIUB, C. A. F.; FELZENSVALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Revista Genética na Escola**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2011.
- ALVIN, L. B.; KUMMROW, F.; BEIJO, L. A.; LIMA, C. A. de A.; BARBOSA, S. Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. **Rev. Ambient. Água**, v. 6, n.2, p. 255-265, 2011. <http://dx.doi.org/10.41368/ambi-agua.198>
- ANDRADE, M. F.; MORAES, L. R. S. Contaminação por chumbo em santo amaro desafia décadas de pesquisas e a morosidade do poder público. **Ambiente & Sociedade**, v. 16, n. 2, p. 63-80, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-753X2013000200005>

- ANJOS, J. Â. S. A. **Avaliação da eficiência de uma zona alagadiça (wetland) no controle da poluição por metais pesados: o caso da Plumbum em Santo Amaro da Purificação/BA.** 2003. 130f. Tese (Doutorado em Engenharia Mineral) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/3/3134/tde-28042004-094552/>>. Acesso em: 8 dez. 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Nbr 10.004:** resíduos sólidos – Classificação. Rio de Janeiro, 2004. 71p.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-011-0602-8>
- BRAGA, J. R. M. Efeito genotóxico de metais-traço em área contaminada na Bahia. In: CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE, 10, Poços de Caldas-MG. **Anais...** 2013. 1 CD-ROM.
- BRASIL. Conselho Nacional Do Meio Ambiente - CONAMA. **Resolução nr. 357, de 17 de março de 2005.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.
- CARVALHO, F.; TAVARES, T. M.; SOUZA, S. P.; LINHARES, P. Lead and cadmium concentrations in the hair of fisherman from the Subaé River basin, Brazil. **Environmental Research**, v. 33, n. 2, p. 300-306, 1984. [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351\(84\)90027-6](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351(84)90027-6)
- CARNEIRO JR., I. N. **Relatório do Grupo de Trabalho / Justiça Ambiental.** GT Justiça Ambiental – Frente Parlamentar Ambientalista. Santo Amaro da Purificação: AVICCA, 2010. 74p.
- CIRCUNVIS, B. C.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. Investigação do potencial citotóxico das águas superficiais do Ribeirão Atlântico (Madagaçu-PR) em *Allium cepa* L. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 7-14, 2012.
- FEIRA DE SANTANA. Secretaria Municipal De Meio Ambiente. **A Secretaria de Municipal de Meio Ambiente está investigando poluição de um riacho no distrito de Humildes.** 2011. Disponível em: <<http://semmamfeiradesantana.blogspot.com.br/2011/12/secretaria-de-municipal-de-meio.html>> Acesso em: 04 jul. 2014.
- FERETTI, D.; ZERBINI, I.; ZANI, C.; CERETTI, E.; MORETTI, M.; MONARCA, S. *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, n. 6, p. 561-572, 2007. <http://dx.doi.org/10.1080/02652030601113602>
- FERREIRA, C. F.; FRUEH, A. B.; DÜSMAN, E.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia – PR) e Tabatinga (Mandaguari – PR) em *Allium cepa* L. **Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 2, p. 46-54, 2012.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

- GALINDO, T.; SILVA, E.; ROSÁRIO, I. Indução de micronúcleos e toxicidade por efluente doméstico em duas populações de *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae) no Litoral de Salvador (BA), Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.14210/bjast.v16n1.p1-7>
- GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.
- 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**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.10.006>
- MOULIS, J. M.; THEVÉNOD, F. New perspectives in cadmium toxicity: an introduction. **Biometals**, v. 23, n. 5, p. 763-768, 2010. <http://dx.doi.org/10.1007/s10534-010-9365-6>
- NAIME, R.; NASCIMENTO, C. A. Monitoramento de pH, temperatura, OD, DBO e condições microbiológicas das águas do arroio Pampa em Novo Hamburgo (RS). **Estudos Tecnológicos**, v. 5, p. 228-246, 2009.
- OLIVEIRA, J. P. W.; DOS SANTOS, R. N.; PIBERNAT, C. C.; BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e análises físico-químicas das águas do rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012. <http://dx.doi.org/10.5433/2316-5200.2012v1n1p15>
- PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.
- PRÁ, D.; GUECHEVA, T.; FRANKE, I. R.; KNAKIEVICZ, T.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. Toxicidade e genotoxicidade do sulfato de cobre em planárias de água doce e camundongos. **Journal of the Brazilian Society Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 171-175, 2006.
- SCALON, M. C. S. **Avaliação dos efeitos genotóxicos da água do rio dos Sinos sobre peixes e vegetais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, 2009.
- SMAKA-KINCL, V.; STEGNARB, P.; LOVKAC, M.; TOMAND, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, n. 3-4, p. 171-179, 1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90059-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90059-2)
- SOBRAL, O.; MARIN-MORALES, M. A.; RIBEIRO, R. Could contaminat induced mutations lead to a genetic diversity overestimulation? **Ecotoxicology**, v. 22, p. 838-846, 2013.
- SOUZA, L. L.; ROCHA, P. S.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação in vivo e in vitro do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e sedimento do rio Corumbataí (São Paulo – Brasil)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNESP, Rio Claro, 2014.

ZUCCARI, M. L.; GRANER, C. A. F.; LEOPOLDO, P. F. Determinação da demanda química de oxigênio (DQO) em águas e efluentes por método colorimétrico alternativo. **Engenharia Agrícola**, v. 20, n. 4, p. 69-82, 2005.