

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Verônica Aparecida Monteiro do Carmo

**RECURSOS HIDRICOS SOB INFLUÊNCIA
DE EFLUENTES INDUSTRIAIS DO POLO
INDUSTRIAL DE SANTA GERTRUDES**



Rio Claro
2013

Verônica Aparecida Monteiro do Carmo

**RECURSOS HIDRICOS SOB INFLUÊNCIA DE EFLUENTES
INDUSTRIAIS DO POLO INDUSTRIAL DE SANTA GERTRUDES**

Orientador: Maria Aparecida Marin Morales

Co-orientador: Bruna de Campos Ventura Camargo

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharela em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2013

575.1 Carmo, Verônica Aparecida Monteiro do
C287r Recursos hídricos sob influência de efluentes industriais do polo industrial de Santa Gertrudes / Verônica Aparecida Monteiro do Carmo. - Rio Claro, 2013
34 f. : il., figs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Marin Morales
Coorientador: Bruna de Campos Ventura Camargo

1. Genética. 2. Mutagênese ambiental. 3. Citotoxicidade. 3. Allium cepa. 4. Aberrações cromossômicas. I. Título.

*Dedico esta trabalho a minha mãe, que tanto
se empenhou para que eu conseguisse
estudar em uma boa faculdade.*

*E ao meu marido, que me
ensinou a acreditar no
meu potencial.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin Morales, por todo apoio e dedicação prestados para a realização desse trabalho, pela paciência na correria com que ele foi feito e principalmente pela receptividade na minha entrada no laboratório.

À minha co-orientadora Dr^a Bruna de Campos Ventura Camargo, minha chefinha, pela paciência e dedicação em me ensinar a cada passo. Por todas as broncas que me fizeram crescer muito e por toda a calma e atenção no auxílio da realização desse trabalho. Bru, cresci muito trabalhando ao seu lado.

A todos os mutagênicos (Bruna, Nádia, Raquel, Maria Tereza, Leonardo, Laís, Michelle, Lívia, Dânia, Matheus, Márcia, Jaque, Thais, Yali e Paula) que além do suporte no trabalho (Nadica e Raquel que o digam) me ensinaram muito sobre amizade e apoio; sem vocês esse trabalho nunca poderia ser concluído. Obrigada pelas muitas risadas e comidas! Em especial à Laís, por ter me ensinado tudo no começo com toda a paciência de uma princesa; à Raquel, que muitas vezes foi de extrema importância para minhas tomadas de decisões; à Nadica, que mesmo sempre muito lotada de trabalho nunca hesitou em dar uma pausa em tudo e me ajudar no que quer que fosse.

Aos matogrossenses, Thays e Cleiton, que animavam o laboratório com seus jeitinhos especiais. Cleiton, obrigada por toda a ajuda no final do meu trabalho.

Às minhas companheiras de graduação e de vida, Poliana, Raquel e Michelle. À Poly por todos os gostos compartilhados, risadas, choros, comidas, cafés e principalmente por todo companherismo e apoio (das pós-cirurgias em casa às

festas em que nos divertíamos um monte) – minha amiga única. À Retchel por todas as grosserias fofas, por todos os trabalhos e por toda a diversão garantida – pequena: você é muito especial. À Mi, a primeira pessoa de quem fiquei amiga, por todas as idas embora da facu tão divertidíssimas, por todas as ajudas em todas as horas. Obrigada mesmo meninas, vocês foram a minha família aqui. Amo vocês!!!

Às minhas meninas Erica, Livia e Adriana. Por todo o apoio, por me acordarem de manhã (quando eu não conseguia), por me divertirem demais nos inúmeros almoços, por me suportarem cansada e chata, por me alimentarem (né Lí). Vocês foram mais que especias para mim, menininhas, obrigada por todo apoio e por todas as broncas – cresci demais com vocês e as amo muito.

E por fim, à pessoa com quem compartilhei toda essa jornada, ao meu marido lindo Luís, obrigada por todo o apoio, dedicação, paciência, incentivo, ajuda, carinho e amor. Pelos finais de semana comigo no laboratório, por me entender, me dar suporte e estar ao meu lado SEMPRE. Não tenho palavras para agradecer a sua, contribuição não só nesse trabalho, mas em minha vida. Sem você, eu nunca teria dado o meu melhor e não acreditaria tanto em mim. Enfim, obrigada por existir em minha vida e me fazer tão feliz. Meu pequeno, te amo demais!

“O ser humano descobre-se a si mesmo quando se defronta com os obstáculos”
Antoine Saint Exupery

RESUMO

Efluentes industriais e domésticos podem conter agentes químicos e biológicos que, em elevadas concentrações, causam danos aos ecossistemas aquáticos e à saúde ambiental. Um dos efeitos mais nocivos desses agentes poluidores é a sua capacidade de induzir alterações celulares. O uso de testes específicos capazes de detectar o potencial tóxico de substâncias químicas caracteriza-se em uma importante estratégia para avaliação ambiental. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico de amostras de água de recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes-SP, relacionada com recebimento de efluentes de atividade ceramista, por meio de ensaios realizados com o sistema-teste de *Allium cepa*. Foram realizados testes com amostras de água coletadas no córrego Itaqui, após despejos de efluente de indústria cerâmica e em duas nascentes, tanto em período chuvoso como de seca. Para a análise dos parâmetros de toxicidade descritos acima, sementes de *A. cepa* foram expostas à germinação nas amostras das águas coletadas. Quando as radículas atingiram 2 cm de comprimento, os meristemas foram fixados em solução de Carnoy 3:1, para serem utilizadas nas avaliações das possíveis alterações dos índices de germinação e mitóticos, bem como de indução de aberrações nucleares e cromossômicas. Além disso, também foram avaliadas, como outro parâmetro indicativo de mutagenicidade, as frequências de micronúcleos em células F_1 de *A. cepa*. O controle negativo foi realizado em água (osmose reversa) e o controle positivo em metilmetanosulfonato (MMS). O material fixado foi corado pela reação de Feulgen e as lâminas foram preparadas, utilizando as porções meristemática e F_1 das raízes de *A. cepa*. As análises foram realizadas em microscópio de luz, por meio da contagem de alterações nucleares (micronúcleos e brotos) e de aberrações cromossômicas (perdas, quebras, pontes cromossômicas, entre outras) em células meristemáticas, e da contagem de micronúcleos (MN) em células F_1 . A comparação dos resultados foi feita pelo teste estatístico de Mann-Whitney. A avaliação dos possíveis contaminantes presentes nos recursos hídricos foi realizada através da análise química, na qual foram investigadas as concentrações de amônia, nitrito, nitrato, fósforo, fluoretos, fosfatos e os metais pesados alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel e zinco. Pelos resultados obtidos na primeira coleta, foi possível observar que todos os pontos

analisados apresentam compostos citotóxicos. As águas coletadas no ponto P1 também apresentam potencial genotóxico e as águas dos pontos P3 e P4 potencial mutagênico. Após o tratamento de recuperação por 48h, foi observada a perda dos potenciais citotóxico e genotóxico, o que não ocorreu para o potencial de mutagenicidade (para P1 e P3). Já na segunda coleta, as amostras apresentaram potencial citotóxico para todos os pontos analisadas e a recuperação não foi efetiva em nenhum dos casos. A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos inferir que os efluentes lançados pelas indústrias cerâmicas nos recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes causam grandes impactos no ambiente, principalmente pelo efeito citotóxico observado.

Palavras chave : citotoxicidade, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	9
1.1 Poluição e mutagênese ambiental.....	9
1.2 Poluição aquática de recursos hídricos de Santa Gertrudes-SP.....	11
1.3 Análise química da água	12
1.4 Bioensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade com o organismo teste <i>A. Cepa</i>	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Material.....	15
3.1.1 Ponto de coleta das amostras.....	15
3.1.2 Material biológico	15
3.2 Métodos	15
3.2.1 Bioensaio com sementes de <i>A. Cepa</i>	15
3.2.2 Análises químicas da água	16
4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	17
4.1 Ensaio com <i>A. cepa</i>	17
4.1.1 Análise dos efeitos citotóxicos	17
4.1.2 Análise dos efeitos genotóxicos	17
4.1.3 Análise dos efeitos mutagênicos.....	18
5. RESULTADOS	18
5.1 Resultados da coleta verão.....	18
5.1.1 Análises químicas	19
5.1.2 Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em ensaio com sementes de <i>Allium cepa</i>	20
5.2 Resultados coleta inverno.....	24
5.2.1 Análises físico-químicas.....	24
5.2.2 Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em ensaio com sementes de <i>Allium cepa</i>	24
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	29
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Atualmente é crescente a preocupação com a poluição ambiental, devido ao fato de que as atividades humanas têm provocado, ao longo dos anos, grandes impactos nos ecossistemas. O crescimento desenfreado da atividade industrial colaborou de maneira significativa para o aumento da poluição, principalmente a dos ambientes aquáticos, devido aos descartes de efluentes. Quando os resíduos industriais não são tratados adequadamente, ou quando não são tratados, eles podem conter compostos poluidores perigosos capazes de induzir efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos à biota local exposta (CLAXTON et al., 1998; RANK; NIELSEN, 1998).

De acordo com Caritá (2007), em muitos casos, os efeitos tóxicos não podem ser observados e medidos diretamente nos organismos, já que muitas mutações não implicam em mudanças detectáveis de imediato nas atividades celulares ou metabólicas do organismo, passando assim despercebidas. Por esse motivo, é indicado o uso de testes que sejam capazes de avaliar se os agentes tóxicos podem induzir efeitos danosos nos organismos expostos, para se estimar e comparar os impactos destes agentes no ambiente como um todo (SILVA; FONSECA, 2003). Esses testes seguem padrões exequíveis e reprodutíveis para se obter, além de resultados rápidos, a garantia da integridade destes e a certificação de possíveis impactos no ambiente estudado (FISKEJÖ, 1985).

Sabe-se que a espécie *Allium cepa* (Alliaceae) é considerada um organismo teste eficiente para estudos de citotoxicidade e genotoxicidade (MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES, 2008; LEME et al., 2008), sendo muito utilizada para avaliação toxicológica de amostras ambientais diversas, o que a torna indicada para ser usada no presente estudo.

1.1 Poluição e mutagênese ambiental

As mutações no material genético são eventos normais que ocorrem em todos os seres vivos, consideradas como uma das bases da diversidade biológica, sendo, portanto, fundamentais no processo de evolução. As mutações que ocorrem

naturalmente nos organismos, geralmente em baixa frequência, são denominadas de mutações intrínsecas ou espontâneas que, na maioria das vezes, são resultados de erros no processo de replicação do material genético, que podem ser facilmente corrigidos pelo mecanismo de reparo. Diferentemente das mutações espontâneas, existem as mutações induzidas, que podem aparecer devido à exposição de organismos a agentes químicos, físicos e biológicos, denominados agentes mutagênicos. Os agentes mutagênicos químicos são os de maior predominância no meio ambiente e, conseqüentemente, os que induzem um maior impacto sobre os organismos vivos (MARIN-MORALES, 2009).

Os agentes mutagênicos químicos são encontrados em alimentos, fármacos, agrotóxicos, efluentes domésticos e industriais. Quando os organismos vivos são expostos a estes compostos, eles podem sofrer mudanças (induzidas) no seu material genético, que podem não se expressar imediatamente e, portanto, caracterizar uma mudança de difícil detecção (VOGEL, 1982).

Entre os contaminantes ambientais mais prejudiciais, principalmente os dos ambientes aquáticos, estão os efluentes industriais, que podem, possuir moléculas metálicas bioativas. Os metais, segundo Pascalicchio (2002), induzem alterações na estrutura dos cromossomos, o que pode promover mutações pontuais, tanto em procariontes quanto em eucariontes.

Embora muitos metais sejam essenciais à vida por participarem de processos fisiológicos, a sua requisição é sempre em pequena quantidade. Quando esses compostos se apresentam em excesso no ambiente, eles acabam interferindo nas atividades biológicas e prejudicando os organismos a eles expostos (PATRA et al., 2004). Com o advento da indústria moderna, houve um aumento significativo da contaminação por íons e componentes metálicos (STEINKELLNER et al., 1998).

Como estas substâncias podem ser bioacumuladas nos organismos, quando incorporadas à cadeia trófica, elas podem se acumular nos organismos em níveis tróficos extremamente superiores àqueles aos quais foram diretamente expostos (PAPAGIANNIS et al., 2004).

1.2 Poluição aquática de recursos hídricos de Santa Gertrudes-SP

A área de estudo do presente trabalho está localizada na sub-bacia do córrego Itaqui, região dos lagos do município de Santa Gertrudes-SP, onde se encontra o maior pólo cerâmico do país. Ferreira (2000) afirma que este pólo cerâmico é responsável por 50% da produção nacional de materiais cerâmicos, gerando 144 t/mês de resíduos que, de acordo com a NBR 10004 da ABNT, pertencem à classe I de periculosidade.

De acordo com o artigo 24 da Resolução CONAMA 357, o lançamento de cargas poluidoras nos corpos de água somente poderá ser realizado se o efluente for devidamente tratado, segundo as condições pré-estabelecidas presentes nessa mesma resolução (BRASIL, 2005). No entanto, a região de estudo vem sofrendo uma intensa degradação ambiental, devido ao lançamento de efluentes líquidos e de disposição inadequada de resíduos sólidos derivados das linhas de esmaltação do processo produtivo das cerâmicas (OLIVEIRA, 2008).

Segundo Bernardin (2006), os efluentes líquidos provenientes das indústrias ceramistas são compostos basicamente de substâncias como corantes que contêm óxidos de Al, Co, Zr, Si, Cr, Zn, Ni, Ca e Sn; esmaltes com SiO₂, B₂O₃, Na₂O e PbO; compostos orgânicos de resinas sintéticas; tintas contendo Pb, Ca, Si, Al, Fe, Cr e Mn, além de sólidos em suspensão, como argilas e silicatos. Estudos realizados por Silva (2001) detectaram uma contaminação por metais no solo, nos sedimentos e nas águas superficiais e subterrâneas dos recursos hídricos da região.

De acordo com um estudo realizado por Caritá (2007), a presença de compostos químicos detectados em alguns pontos de amostragem de água da região de Santa Gertrudes-SP contribuiu para as atividades tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica observadas para os organismos-teste *Oreochromis niloticus* e *A. cepa*. Esses resultados alertam para os riscos de despejos de efluentes domésticos e industriais nos corpos hídricos, já que, de acordo com a Cetesb (1997), 35% da população do município é abastecida com a água subterrânea coletada no local.

1.3 Análise química da água

Para uma melhor caracterização da água, além das análises dos parâmetros biológicos, é importante que também seja realizada uma avaliação dos parâmetros químicos, já que esses parâmetros são regulamentados por normas e padrões definidos nas portarias do Ministério da Saúde (RICHTER; NETTO, 1999).

As análises químicas da água consistem, basicamente, na quantificação dos elementos e espécies iônicas presentes na água, o que permite o estabelecimento de uma associação dos efeitos que cada um desses compostos pode induzir nos organismos eventualmente expostos. Devido à grande quantidade de contaminantes despejados no sistema hídrico da região, é de extrema importância a realização da análise química de amostras de água dos seus recursos hídricos, uma vez que concentrações alteradas de determinado elemento podem causar prejuízos ao meio ambiente e à saúde pública (CLESCERLL et al., 2003).

1.4 Bioensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade com o organismo teste *A. cepa*

Os testes de toxicidade realizados com vegetais superiores são considerados sensíveis e simples, por isso são comumente utilizados para avaliação de poluentes ambientais. Muitos vegetais são reconhecidos como bons indicadores de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de ambientes contaminados com agentes químicos (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008).

Dentre os vegetais superiores, a espécie *A. cepa* apresenta características importantes para um organismo teste, tais como sua cinética de proliferação, crescimento rápido de suas raízes, o grande número de células em divisão, a sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante todo o ano, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n=16$) e de tamanho grande (GRANT, 1982; FISKEJÖ, 1985, RANK-NIELSEN, 1994). Assim, este organismo é utilizado por muitos pesquisadores para a avaliação de efeitos biológicos de poluentes ambientais.

A ação citotóxica é a capacidade de uma substância alterar a cinética de proliferação celular ou de induzir morte celular. Assim, para essa avaliação, podem

ser analisados parâmetros como o Índice Mitótico (IM) e o Índice de Morte Celular (IMC). Os efeitos genotóxicos podem ser analisados por ensaios capazes de estimar o potencial de um agente induzir lesões no material genético. Estes efeitos podem ser quantificados, por exemplo, pelo ensaio do Índice de Aberrações Cromossômicas (IAC). Os danos mutagênicos podem representar outras alterações no material genético, que são quantificadas pela frequência de micronúcleos e de quebras cromossômicas (MARIN-MORALES, 2009).

A diferença entre os efeitos genotóxicos e mutagênicos reside no fato de que os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, ou seja, passíveis de serem corrigidos pelo sistema de reparo, ou altamente deletérios, que podem levar a célula à morte, não transmitindo o efeito para outras gerações celulares; enquanto os efeitos mutagênicos são persistentes, constituindo alterações permanentes que podem ser repassadas entre as gerações celulares (DEARFIELD et al., 2002).

De acordo com Hoshina e Marin Morales (2009), ensaios realizados com *A. cepa* são eficientes e confiáveis na avaliação de qualidade da água de rios. Estudos realizados por essas autoras, com água do Rio Atibaia, antes e após o descarte de efluentes de uma refinaria de petróleo, detectaram ação citotóxica, além de efeitos aneugênicos e clastogênicos dessas águas. Caritá e Marin Morales (2008) realizaram ensaios com amostras de água do Ribeirão dos Cristais impactadas com efluentes de indústrias têxteis. As autoras observaram que estes efluentes possuíam potencial de induzir aberrações em células meristemáticas de *A. cepa*, devido, provavelmente, ao potencial genotóxico de azocorantes presentes neste efluente.

Estudos realizados por Caritá (2010), com bulbos de *A. cepa* submetidos à água de rios da bacia de Santa Gertrudes, impactados por efluentes industriais de um polo ceramista, mostraram uma diminuição no índice mitótico das células meristemáticas desses organismos, o que indicou um alto potencial tóxico. As análises químicas realizadas com amostras de águas desses efluentes mostraram a presença de metais tóxicos para plantas, como o mercúrio (Hg), o cobre (Cu), o níquel (Ni), o chumbo (Pb), o cobalto (Co) e o cádmio (Cd) (KABATAPENDIAS; PENDIAS, 1984).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar, por meio de ensaio com *A. cepa*, a citotoxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade de amostras de água de recursos hídricos da região ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP, para assim estimar os possíveis impactos desta atividade industrial nos rios da região.

2.2 Objetivos específicos

Para a avaliação do potencial tóxico das águas dos recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes, foram avaliados parâmetros químicos e biológicos, conforme descrito abaixo.

- Análise das características químicas de amostras de águas coletadas em recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes, sob a influência de atividades ceramistas;

- Análise do potencial citotóxico das amostras de água coletadas em recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes, pela análise de alterações nos IM e de IMC das células meristemáticas de *A. cepa* expostas a estas amostras, antes e após tratamento de recuperação;

- Análise dos potenciais genotóxico e mutagênico das amostras de água coletadas em recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes, por meio da análise de aberrações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas, e de micronúcleos de células meristemáticas e F_1 de *A. cepa*, expostas às amostras de água, antes e após tratamento de recuperação;

- Por fim, este trabalho pretende contribuir com informações sobre os potenciais efeitos danosos que os efluentes industriais ceramistas podem acarretar nos recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Ponto de coleta das amostras

Para a avaliação da qualidade da água de recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes que estão sob a influência de atividades ceramistas, foram escolhidos quatro pontos específicos de seus recursos hídricos. O primeiro ponto (P1) situa-se na saída de uma tubulação de águas fluviais, que também transporta efluentes industriais, que lança suas águas no rio Itaqui; o segundo ponto (P2) está localizado no córrego Itaqui; o terceiro ponto (P3), um possível controle ambiental, situado em uma nascente cuja água é utilizada para atividade de irrigação; e o quarto ponto (P4), escolhido inicialmente como controle ambiental, está localizado em uma nascente da região chamada de Hilário Gaspar.

3.1.2 Material biológico

Os testes biológicos foram realizados com sementes do sistema teste de *A. cepa* (cebola), de um mesmo lote, da variedade Baia Periforme. Elas foram submetidas, separadamente, à germinação nas diversas amostras de água coletadas, para estimar sua potencialidade citotóxica, genotóxica e mutagênica. O teste controle negativo (CN) foi realizado com água ultra-pura e o teste controle positivo (CP) foi realizado com metilmetanosulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS Nº 66-27-3), na concentração de 9×10^{-5} M.

3.2 Métodos

3.2.1 Bioensaio com sementes de *A. Cepa*

As sementes de *A. cepa* foram dispostas em placas de Petri, sobre papel de filtro embebido com as amostras de água dos recursos hídricos de Santa Gertrudes, com água (CN) e com o MMS (CP). A germinação ocorreu à temperatura ambiente

(aproximadamente 21° C), até que as sementes atingissem, aproximadamente, 1,5 cm de comprimento. Após atingirem o comprimento mencionado, metade das raízes germinadas, de cada placa, foram coletadas e fixadas, para posterior confecção de lâminas (tratamento contínuo). O restante das raízes foi transferido para placas cobertas com papel de filtro embebido em água ultrapura, para o tratamento de recuperação, por um período de 48 horas, sendo, após este período, todas as raízes coletadas e fixadas em solução de Carnoy (Álcool-Ácido Acético 3:1 -v/v), por 18 horas, em temperatura ambiente (T.A.). Após a fixação, as raízes foram transferidas para uma nova solução de Carnoy e mantidas em refrigerador, até a sua utilização na confecção de lâminas.

As raízes fixadas foram coradas pela reação de Feulgen, conforme descrito por Feulgen e Rossenbeck, apud Mello e Vidal (1978). Após a coloração, as regiões meristemáticas das raízes, foram seccionadas, cobertas com lamínula e, cuidadosamente, esmagadas em uma gota de solução de carmim acético a 2%. As lamínulas foram removidas com nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética (Mounting Media, Permount®, Fisher Scientific). Também foram confeccionadas lâminas das regiões não meristemáticas (células F₁) das raízes de *A. cepa*, por meio do protocolo descrito por Ma et al. (1995), para a verificação das frequências de MN destas células. Para o preparo das lâminas com a região F₁, foi seccionada uma porção do tecido situado acima (1 mm) da região meristemática, que corresponde exatamente à região F₁ das raízes. A coloração deste material seguiu o mesmo protocolo descrito para a região meristemática. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.2.2 Análises químicas da água

Para a realização das análises químicas das amostras de água, primeiramente, o material coletado foi submetido à filtração em membrana de 0,45 µm e armazenado em geladeira. Foram realizados, em parceria com o Laboratório de Estudos de Bacias (LEBAC), testes com amônia, nitrito, nitrato, fósforo, fluoretos, fosfatos e os metais alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, níquel e zinco. Os resultados foram colocados em tabela e expressos em ppm.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Ensaio com *A. cepa*

Nos ensaios com a região meristemática, foi contabilizado um total de 5.000 células por amostra e por tratamento (exposição contínua e recuperação de 48h), sendo 500 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas analisadas (5 lâminas/bateria de experimentos). Já nos ensaios com a região não meristemática (F_1), foi contabilizado um total de 2.000 células por amostra e por tratamento, sendo 200 células por lâmina, compreendendo um total de 10 lâminas.

4.1.1 Análise dos efeitos citotóxicos

Os efeitos citotóxicos foram determinados pelas análises dos Índices Mitóticos (IM) e pelas análises dos Índices de Morte Celular (IMC), considerando para IMC tanto células apoptóticas como necróticas.

$$\text{IM} = \frac{\text{Número total de células em divisão} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

$$\text{IMC} = \frac{\text{Número total de células em morte} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

4.1.2 Análise dos efeitos genotóxicos

Para análise da genotoxicidade, foram avaliados diferentes tipos de aberrações cromossômicas (perda de material genético, aderência cromossômica, c-metáfase, ponte cromossômica, multipolaridade e poliploidia) e alterações nucleares (broto nuclear e célula binucleada), com os quais foram obtidos Índice de

Aberrações Cromossômicas (IAC), nas diferentes fases do ciclo celular das células meristemáticas.

$$\text{IAC} = \frac{\text{Número total de células alteradas} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

4.1.3 Análise dos efeitos mutagênicos

Pela análise dos efeitos mutagênicos, foi possível estabelecer o Índice de Mutagenicidade (IMt) determinado por meio da observação e contagem de células com a presença de micronúcleos e de quebras cromossômicas da região meristemática, e de células micronucleadas da região F₁ das raízes.

$$\text{IMt} = \frac{\text{Número de células com MN e quebras cromossômicas} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

$$\text{IMN-F1} = \frac{\text{Número de células F}_1 \text{ com MN} \times 100}{\text{Total de células observadas}}$$

As mais evidentes anormalidades observadas, para cada amostra, foram fotodocumentadas, para registro e comprovação dos resultados. Após a obtenção dos resultados de toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, foram realizadas as análises estatísticas pelo Teste de Mann-Whitney, com $p < 0,05$, para comparar as diferenças entre as amostras e o controle negativo.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados da coleta verão

5.1.1 Análises físico-químicas

As análises químicas realizadas para a detecção e quantificação de componentes presentes nas amostras de água dos quatro pontos estão apresentados na

Tabela 1 (análise física) e na Tabela 2 (análise química).

Tabela 1 - Análise física das águas coletadas em janeiro/2013

Coleta 1 (janeiro/2013)				
	Ponto P1	Ponto P2	Ponto P3	Ponto P4
Temperatura (°C)	21,57	23,52	23	23,19
pH	7,57	7,38	5,85	5,54
Oxigenio Dissolvido (mg/l)	5,37	6,3	4,15	4,31
Oxigenio Dissolvido (%)	62,5	75,8	49,5	51,5

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2 - Análise química das águas da coleta de janeiro/2013, realizada no LABEC UNESP-RC

Composto	Max.	P1	P2	P3	P4
Al	0,1	0,84*	0,11*	0,015	0,025
Ba	0,7	0,12	0,094	0,39	0,1
Cd	0,001	<0,005	<0,005	<0,005	<0,005
Pb	0,01	<0,005	0,006	<0,005	<0,005
Cl-	250	9,42	3,85	24,1	2,26
Co	0,05	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Cu	0,009	<0,004	<0,004	<0,004	0,013*
Cr	0,05	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
Fe	0,3	0,031	0,24	0,043	0,064
F-	1,4	0,54	0,18	<0,010	<0,010
P	0,025	0,99*	0,018	0,008	0,006
Li	2,5	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Mn	0,1	0,14*	0,18*	0,007	0,007
Ni	0,025	<0,003	<0,003	<0,003	<0,003
NO3-	10	15,8*	1,64	23,9*	2,29
NO2-	1	0,37	<0,02	<0,02	<0,02
SO4	250	22,8	2,57	5,03	0,74
Zn	0,18	0,045	0,027	0,015	0,072

**significancia*

Fonte: Elaborado pelo autor

A análise química da água indicou um índice superior ao permitido pela resolução nº 357 de 17 de março de 2005 (BRASIL,2005) para o Cu, no ponto P4; P, no ponto 1; Mn, no ponto P1 e P2 e NO₃, para os pontos P1 e P3; e índices elevados Al para P1 e P2.

5.1.2 Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em ensaio com sementes de *Allium cepa*

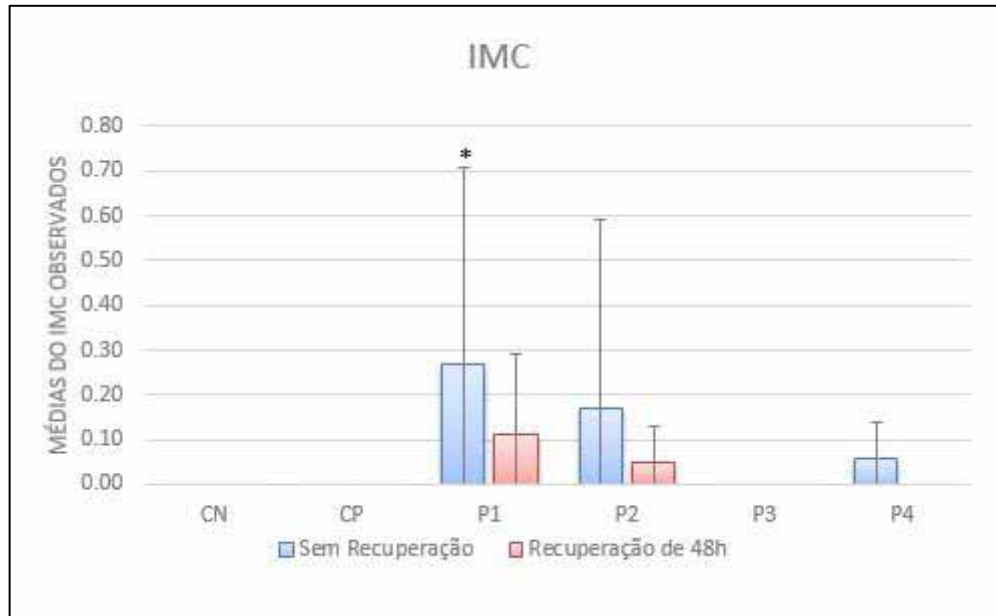
Os pré-testes realizados com as amostras de água coletadas nos recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes indicaram necessidade da realização de uma diluição (2:1) prévia dessas águas, para que fosse possível o desenvolvimento dos testes com esse material, devido ao alto grau de contaminação destas águas.

Os resultados obtidos pelo teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, realizadas com sementes de *Allium cepa* expostas à amostras de águas contaminadas por efluentes industriais, coletadas em janeiro de 2013, estão apresentados nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5. Os resultados para AC, MN e MN-F1 foram fotodocumentados e estão dispostos na Figura 6.

Figura 1 - Médias do IMC, sem e com recuperação, observados para as células meristematicas de *A. cepa* expostas às amostras de água (janeiro/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a

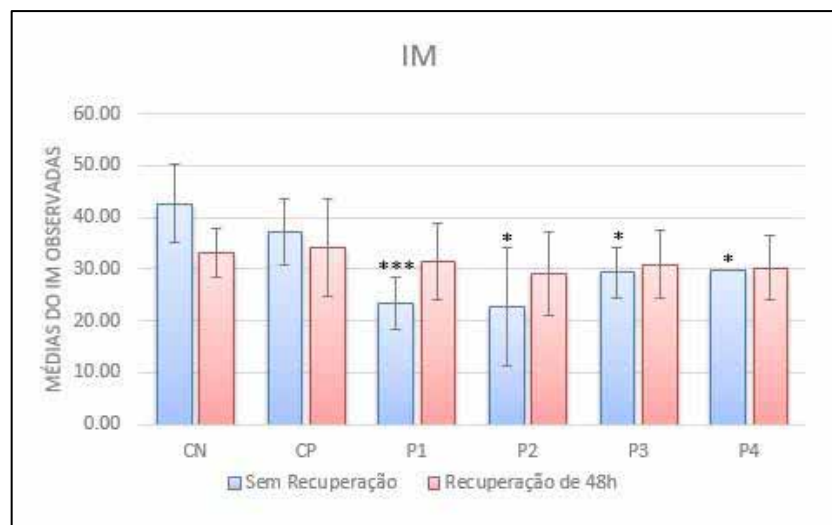
^a *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)¹

***significativo em relação ao CN ($p < 0,001$)¹



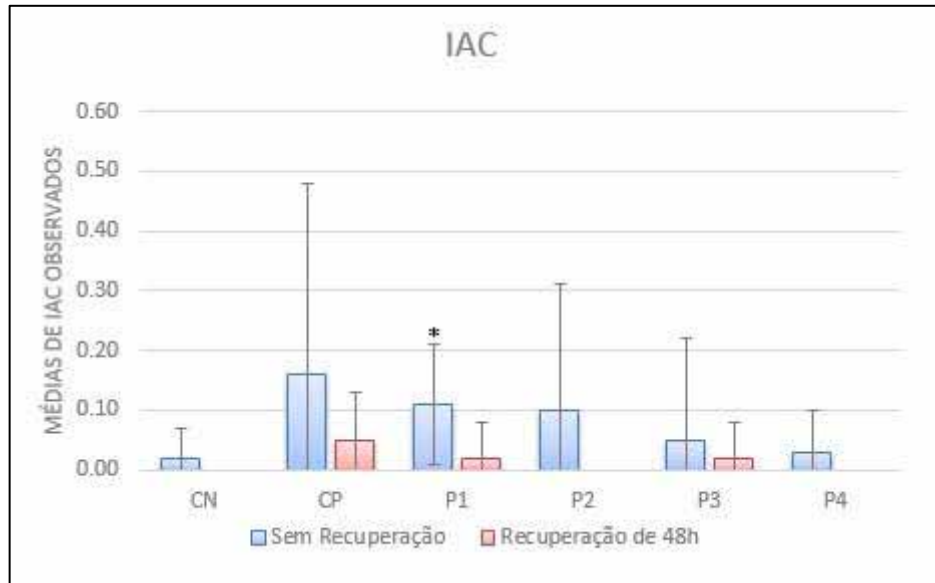
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 2 - Médias do IM, sem e com recuperação, observados para as células meristematicas de *A. cepa* expostas às amostras de água (janeiro/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a



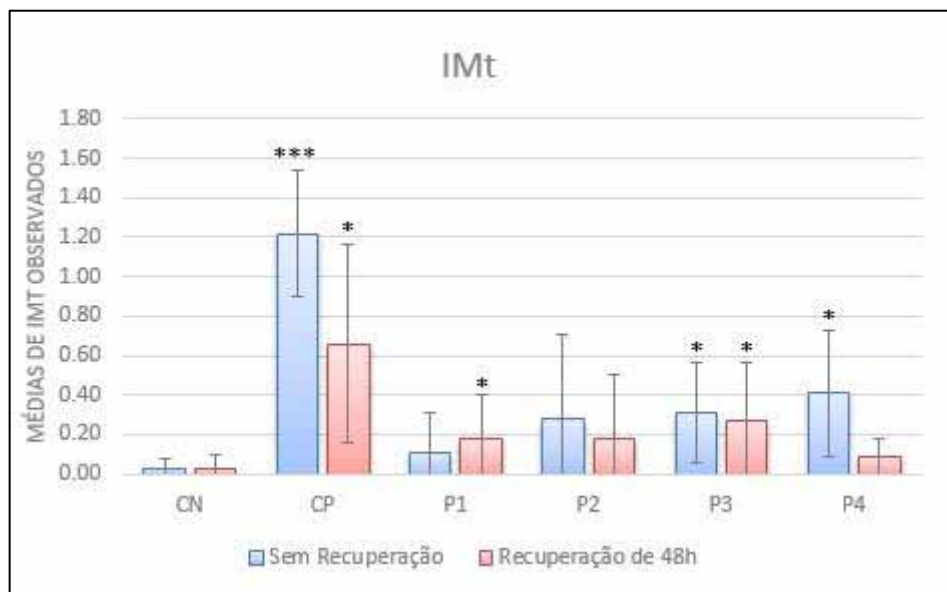
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 - Médias do IAC, sem e com recuperação, observados para as células meristematicas de *A. cepa* expostas às amostras de água (janeiro/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a



. Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4 - Médias do IMt, sem e com recuperação, observados para as células meristemáticas de *A. cepa* expostas às amostras de água (janeiro/2013), de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a

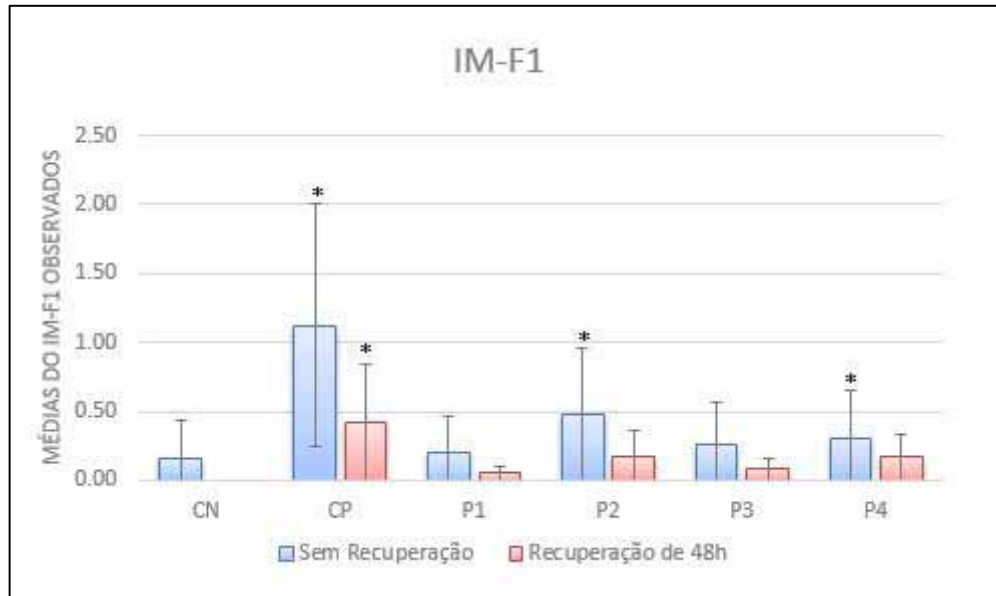


Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 5 - Médias do IMN-F1, sem e com recuperação, observados para as células região F1 de *A. cepa* expostas às amostras de água (janeiro/2013), de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a

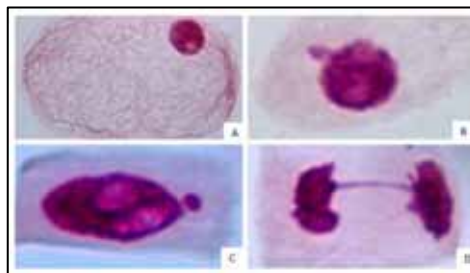
^a *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)¹

***significativo em relação ao CN ($p < 0,001$)¹



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6 - Alterações observadas nas células de *A. cepa* expostas aos tratamentos com as diferentes amostras testadas.



A-célula em morte celular; B-broto nuclear; C-micronúcleo; D-ponte cromossômica
Fonte: Elaborado pelo autor

Pelos resultados obtidos na coleta de verão, foi possível observar que os compostos presentes nas águas destes sistemas hídricos apresentam potencial citotóxico para todos os pontos, potencial genotóxico para o ponto P1 e potencial mutagênico para os pontos P3 e P4, considerando as células meristemáticas, e P2, considerando as células da região F₁. Após o tratamento de recuperação foi observada a ausência de potencial citotóxico e genotóxico, com exceção de potencial de mutagenicidade para os pontos P1 e P3.

^a *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)¹

^{***}significativo em relação ao CN ($p < 0,001$)¹

5.2 Resultados coleta inverno

5.2.1 Análises física

Tabela 3 - Análise física das águas coletadas em julho/2013

Coleta 2 (julho/2013)				
	Ponto P1	Ponto P2	Ponto P3	Ponto P4
Temperatura (°C)	19,52	21,16	22,45	22,61
pH	5,91	5,72	4,95	4,83
Oxigenio Dissolvido (mg/l)	10,15	9,61	9,41	9,74
Oxigenio Dissolvido (%)	113,9	110,2	111,1	115,3

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2.2 Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade por meio de ensaios com sementes de *Allium cepa*.

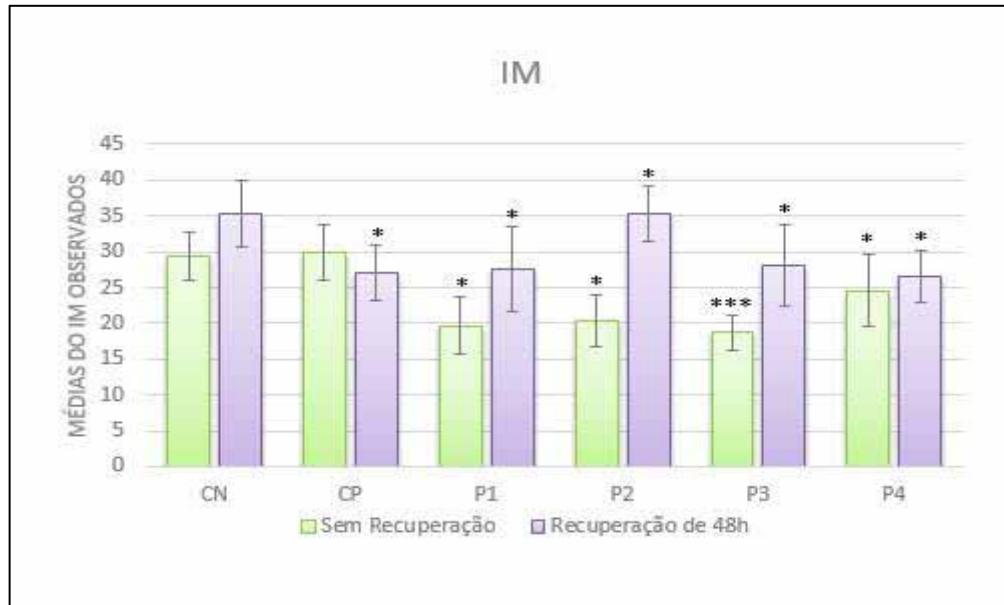
Os testes prévios realizados com as águas amostradas não indicaram a necessidade de diluição das amostras, para a realização dos ensaios.

Os resultados obtidos pelo teste de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de sementes expostas a amostras de águas, sem diluição, coletadas em julho de 2013, estão apresentados nas Figuras 7, 8, 9, e 10. O gráfico de IMC foi suprimido, já que nenhum dos pontos apresentou morte celular.

Figura 7 - Médias dos IM observados para as células meristemáticas de *A. cepa*, sem e com recuperação, expostas às amostras (julho/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a

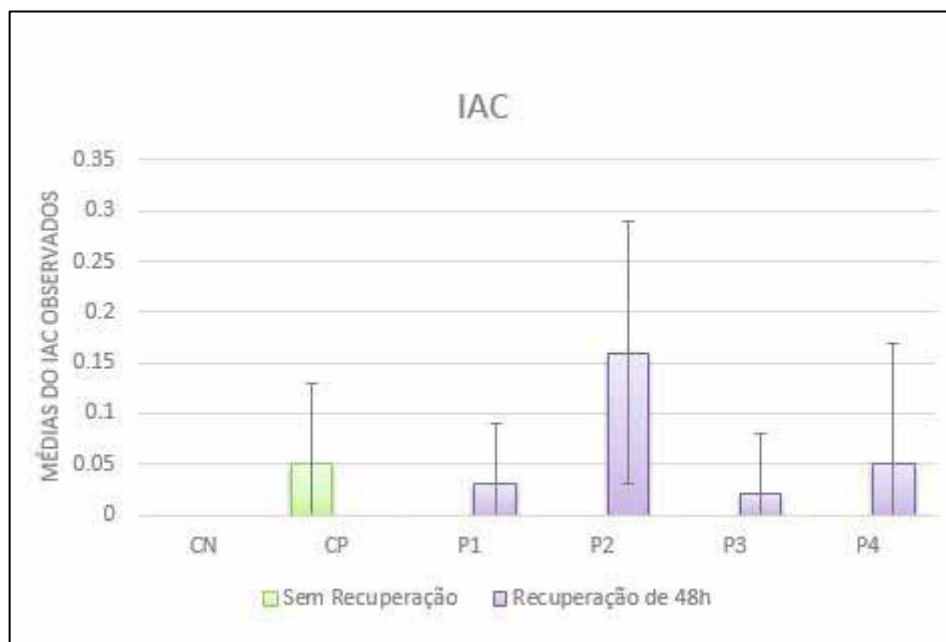
^a *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)¹

***significativo em relação ao CN ($p < 0,001$)¹



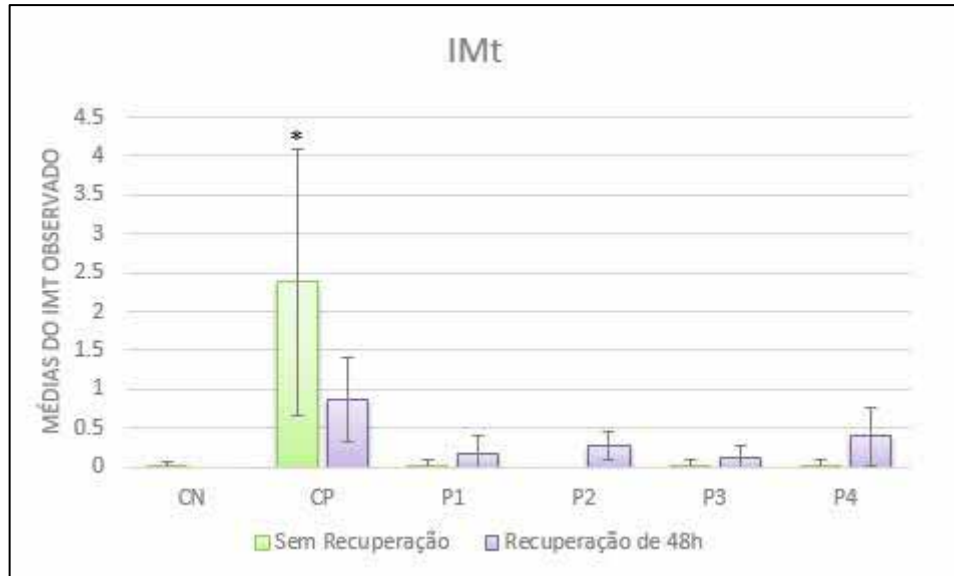
. Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 8 - Médias dos IAC observados para as células meristemáticas de *A. cepa*, sem e com recuperação, expostas às amostras (julho/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a



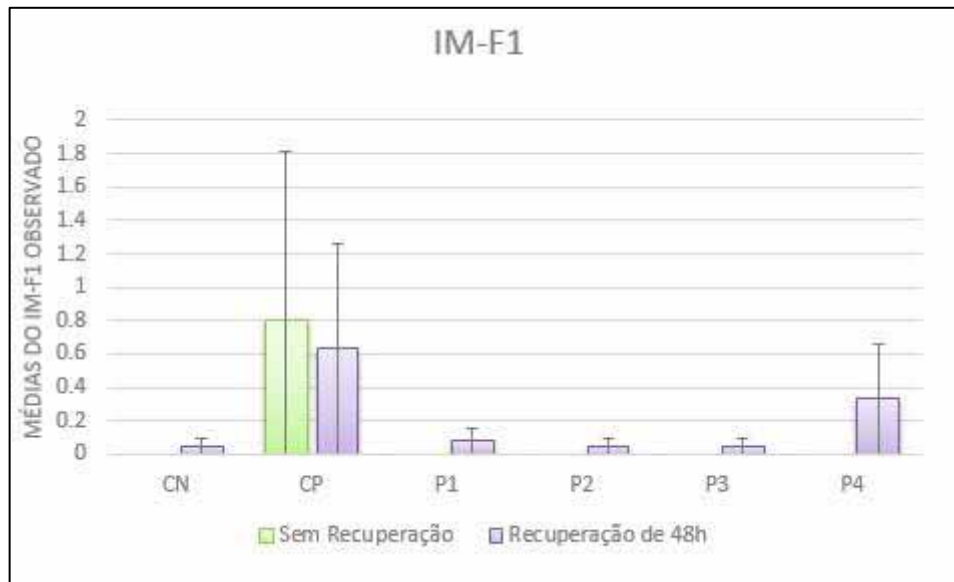
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9 - Médias dos IMt observados para as células meristemáticas de *A. cepa*, sem e com recuperação, expostas às amostras (julho/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - Médias dos IM-F1 observados para as células meristemáticas de *A. cepa*, sem e com recuperação, expostas às amostras (julho/2013) de recursos hídricos de Santa Gertrudes^a



Fonte: Elaborado pelo autor

^a *significativo em relação ao CN ($p < 0,05$)¹

***significativo em relação ao CN ($p < 0,001$)¹

Pelos resultados obtidos na coleta de inverno, foi possível observar que os compostos presentes nas amostras apresentam potencial citotóxico para todos os pontos e que a recuperação não foi efetiva para nenhum dos pontos. Foi também observado que, após a recuperação, os IM apresentaram valores mais altos.

6. DISCUSSÃO

As sementes de *A. cepa* expostas às águas coletadas nos quatro pontos no período verão (janeiro/2013), apresentaram uma queda significativa no índice mitótico, comparado com o controle negativo, o que indica um potencial citotóxico das amostras de água, devido à presença de agentes cuja ação tóxica compromete o crescimento e desenvolvimento dos organismos a eles expostos. De acordo com Smaka-Kincl (1996), a diminuição nos IM pode ser um importante indicador da ação de uma substância e pode ser usado para avaliar os níveis de poluição dos ambientes, especialmente por compostos tóxicos e citotóxicos presentes na área de estudo.

Nesta mesma coleta, foram observados índices significativos de AC para o ponto 1, ponto esse que, preliminarmente, foi considerado como controle ambiental. Porém pelos dados significativos obtidos para este ponto, de AC, IM e MN, ele não pode ser mais considerado como tal. Esse ponto apresentou, neste período estudado, um possível potencial genotóxico, já que aberrações cromossômicas (AC) são reconhecidas como importantes consequências de ações genotóxicas de agentes químicos (NATARAJAN, 2002).

Já nos pontos P3 e P4, foi observado um alto índice de micronúcleos para as células meristemáticas, o que é um indicativo de mutagenicidade. Segundo Hoshina et al (2008), os micronúcleos são considerados como decorrentes de ação mutagênica, pois como são observados também em células interfásicas que já passaram por um ciclo completo de divisão, confirmam a viabilidade celular, mesmo quando estas estão alteradas. Além disso, P2 apresentou valores significativos de MN nas células F_1 , o que reforça e indica mutagenicidade desta amostra, não sendo possível considerá-lo então como um eficiente controle ambiental, como inicialmente proposto.

Os potenciais citotóxicos e genotóxicos deixaram de ser evidentes, após o tratamento de recuperação de 48 horas com água ultrapura, porém isso não ocorreu para o potencial de mutagenicidade do ponto P3, indicando assim que, para essa coleta, a recuperação foi parcialmente efetiva.

Na coleta realizada no período de inverno (julho/2013), houve um predomínio de ação citotóxica para as amostras. Os resultados mostraram que a citotoxicidade foi significativa para todos os pontos, e que essa ação persistiu após o período de recuperação. Isso também pode ser evidenciado pelo pequeno tamanho das raízes da semente, se comparada ao tamanho das raízes do controle negativo.

Para essa mesma coleta, foi observado que, após o período de recuperação, houve um aumento do IM, porém o IAC não se mostrou significativo, se comparado ao controle negativo. Com isso, pôde-se concluir que o período de recuperação não foi efetivo para a normalização de nenhum dos índices e pontos considerados.

Com relação às análises químicas, foi detectada a presença de vários metais nas águas, tanto do correço quanto das nascentes, sendo algumas delas com registros acima do nível permitido pela legislação brasileira. Isso é preocupante, já que as águas das nascentes são usadas pela população local tanto para consumo próprio como em irrigação de uma horta que abastece a cidade. Além disso, existe um centro de pesca no córrego Itaqui, que acaba também transferindo, via cadeia trófica, a contaminação dessas águas para a população.

Os efluentes industriais encontrados na região de estudos possuem um alto potencial poluidor, por apresentarem substâncias tóxicas derivadas da lavagem dos tanques de esmaltação das indústrias cerâmicas, como íons Cu^{+2} , Cr^{+6} , Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} e U^{+6} (RUSSO, 1997). Essas indústrias também realizam o processo da queima de revestimentos cerâmicos contaminados com flúor, cujos resíduos acabam atingindo a atmosfera e, em períodos chuvosos, podem se transformar em fluoretos e contaminar os solos e rios, por meio de chuvas ácidas (FERRARI et al., 2003).

De acordo com Guerra (2009), contaminações dos organismos por misturas complexas de metais podem levar a respostas diferentes das contaminações por metais isolados. Isso ocorre pois há diversas interações entre os contaminantes, que podem ser independentes, antagonistas ou sinérgicas, promovendo, assim, respostas diferentes nos organismos (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992).

Um dos metais encontrados em níveis superiores aos indicados pela resolução nº 357 de 17 de março de 2005 (BRASIL,2005) foi o Cobre (Cu). Esse metal, quando presente em elevadas concentrações na água, é capaz de intoxicar organismos aquáticos (GROSSEL et al., 2002). Estudos com *A. cepa* tratados com sulfato de cobre (CuSO₄) indicam que esse metal provoca aderência cromossômica nas células e diminuição do índice mitótico (FISKESJÖ,1988), diminuição esta também evidenciada no presente estudo.

O alumínio, encontrado em níveis superiores aos indicados pela legislação, tanto para ponto P1 quanto para ponto P2, de acordo com Pejchar (2008), é altamente citotóxico para as plantas. O alumínio possui como principal consequência fisiológica a interrupção do crescimento das raízes e a mudança na morfologia radicular. Estas ações sugerem que o citoesqueleto seja a estrutura alvo deste metal, pois ele inibe a polimerização dos microtúbulos (VOUSINAS et al., 1997). Esse metal pode ser bioacumulado, podendo ser transferido via cadeia trófica e, portanto, prejudicial tanto para os ecossistemas quanto à saúde humana (KREWSKI et al., 2007; ACHARY et al., 2008). Isso indica que a ação citotóxica verificada nas águas do presente estudo pode ser causada por esse excesso de alumínio dos efluentes das indústrias da região.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nas coletas realizadas nos recursos hídricos da cidade de Santa Gertrudes, pode-se inferir que os efluentes industriais lançados pelas indústrias de cerâmica da região estão causando um impacto ao ambiente estudado, evidenciado, principalmente, pelos efeitos citotóxicos observados. Pode-se concluir também que em estações chuvosas o impacto dos componentes presentes nos efluentes industriais é menor, possivelmente devido à maior diluição dos poluentes pelas chuvas. No entanto, em estações secas, como a concentração dos contaminantes é maior, houve uma maior indução de alterações celulares, que, mesmo após tratamento de recuperação, não foram totalmente normalizadas. Assim, fica claro o impacto das indústrias ceramistas sobre os ambientes aquáticos, o que leva a necessidade de um maior controle das emissões de seus efluentes no ambiente, principalmente nos períodos de alta estiagem.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARY, V. M. et al. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 70, n. 2, p. 300-10, Jun 2008.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelos y Planta**, v.2, p.345-361, 1992.

BERNARDIN, A.M.; FELISBERTO, D.S.; DAROS, M.T.; RIELLA, H.G. Reaproveitamento de resíduos de polimento e de esmaltação para obtenção de cerâmica celular. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.11, p.31-34, 2006.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. 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. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 53, seção 1, p. 58-63.

CARITA, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. 2010. 190 (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgotos de grandes centros urbanos do estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em *Allium cepa***. 2007. 63p. Trabalho de Conclusão (Bacharel e Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2007.

CARITA, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosfera**, v. 72, n. 5, p. 722-5, Jun 2008.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 410, n. 3, p. 237-43, Jun 1998.

CLESCERLL, L. S.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater**. Washigton: EPA/APHA, 2003.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). **Uso das águas subterrâneas para abastecimento público no Estado de São Paulo**. Coord. CASARINI, D.C.P. e SILVA, M. F. B. São Paulo: CETESB, 1997. 46 p.

COTELLE, S.; MASFARAUD, J. F.; FERARD, J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 167-71, May 19 1999.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, Amsterdam, v.521, p.121-135, 2002.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.

FERRARI, K.R.; FIGUEIREDO FILHO, P.M.; ALMEIDA, E.B.; DEL ROVERI, C.; CARVALHO, S.G.; BOSCHI, A.O.; ALMEIDA, M.; FRADE, P.; SOUSA CORREA, A.M.; ZANARDO, A. Determinação das emissões de fluoreto durante a queima de amostras de massas cerâmicas. **Cerâmica Industrial**, Santa Gertrudes, v.8, n.5-6, 2003.

FERREIRA, J.A.C. Projeto piloto de prevenção à poluição (P2) nas indústrias cerâmicas da região de Santa Gertrudes. **Prevenção à poluição: Conceitos, técnicas e aplicabilidade**. São Paulo: CETESB, 2000.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, p. 99-112, 1985.

GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.281, p.89-92, 1982.

GRANT, W. The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v.310, n.2, p.175-185, 1994.

GUERRA, R.C. **Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP. visando sua disposição final**. 2009. 126p. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2009.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.656, p.44-48, 2008.

HOSHINA, M. M.; MARIN-MORALES, M. A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-5, Nov 2009.

JIANG, W.; LIU, D. Effects of Pb(2+) on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 65, n. 6, p. 786-93, Dec 2000.

KOVALCHUK, O. et al. The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. **Mutation Research**, v. 415, n. 1-2, p. 47-57, Jul 8 1998.

KREWSKI, D. et al. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. **Journal of toxicology and environmental health**, v. 10 Suppl 1, p. 1-269, 2007.

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**, Amsterdam, v.650, p.80-86, 2008.

LEME, D. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells, **Aquatic Toxicology**, New York, v.88, p.214-219, 2008.

MARIN-MORALES, M. M. **Mutagênese ambiental: revisão da produção científica**. 2009. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro/SP.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.29, p.148–158, 2006.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam, v.504, p.3-16, 2002.

OLIVEIRA, L. P., MORITA, D. Mi. Tratabilidade de solos tropicais contaminados por resíduos da indústria de revestimentos cerâmicos. *Eng. Sanit. Ambient.* [online]. 2008, vol.13, n.1, pp. 97-108. ISSN 1413-4152.

PAPAGIANNIS, I. et al. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v. 30, n. 3, p. 357-62, May 2004.

PASCALICCHIO, A. A. E. **Contaminação por metais pesados**. 1. São Paulo: Annablume, 2002. 132 p.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.52, p.199-223, 2004.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phospholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, London, v.32, p.554-556, 2008.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. Introduction. In: Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. (Eds.) **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1985. p.1-28.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 418, p.113-119, 1998.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v.312, p.17-24, 1994.

RICHTER, C. A.; NETTO, J. M. **Tratamento de água: Tecnologia atualizada**. São Paulo: Editora Edgar Blucher Ltda,1999.

RUSSO, I.L. **A bacia hidrográfica do córrego São Joaquim e o abastecimento urbano de água de Santa Gertrudes (SP)**. 1997. 121f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 1997.

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŻNY, A. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v.83, p.289–295, 2005.

SILVA, A.L.B. **Caracterização Ambiental e Estudo do Comportamento do Chumbo, Zinco e Boro em Área Degradada por Indústrias Cerâmicas – Região dos lagos de Santa Gertrudes, SP**. 229p. Dissertação (Mestrado), Instituto de Geociências, universidade de São Paulo. 2001.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana. In: SILVA, Juliana da; ERDTMANN, Bernardo; HENRIQUES, João Antonio Pegas. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

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

STEINKELLNER, H. et al. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 31, n. 2, p. 183-91, 1998.

VIDAKOVIC-CIFREK, Z. et al. Cytogenetic damage in shallot (*Allium cepa*) root meristems induced by oil industry "high-density brines". **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 43, n. 3, p. 284-91, Oct 2002.

VOGEL, E. W. Assesment of chemically-induced genotoxic events. In **Respectives and Limitions**. Leiden: Universitaire Pers Leiden, v.2,p.24, 1982.

VOUTSINAS, G. ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, London, v.21, n.7, p.411-418, 1997.

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v. 410, n. 3, p. 223-36, Jun 1998.

WIERZBICKA, M. Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. **Caryologia**, Firenze, v.41, p.143-160,1988.

ZHANG, Y.; XIAO, H. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. **Mutation Research**, v. 420, n. 1-3, p. 1-6, Dec 3 1998.