



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA-PR
CURSO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

Ana Maria Guidini Dall Agnol

Qualidade de fontes superficiais: Análise ecotoxicológica das águas de três nascentes na Comunidade de Linha Capanema, Realeza-PR, por meio do Sistema Teste *Allium cepa*

REALEZA-PR

2017

Ana Maria Guidini Dall Agnol

Qualidade de fontes superficiais: Análise ecotoxicológica das águas de três nascentes na Comunidade de Linha Capanema, Realeza-PR por meio do Sistema Teste *Allium cepa*

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao curso de Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas

Orientador: Prof.^a Dr.^a Izabel Aparecida Soares.

REALEZA-PR

2017

Ana Maria Guidini Dall Agnol

Qualidade de fontes superficiais: Análise ecotoxicológica das águas de três nascentes na Comunidade de Linha Capanema, Realeza-PR por meio do Sistema Teste *Allium cepa*

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao curso de Ciências Biológicas – Licenciatura, da Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.^a Dr.^a. Izabel Aparecida Soares.

Este trabalho de conclusão de curso II foi deferido e aprovado pela banca em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.^a Dr.^a. Izabel Aparecida Soares

Prof.^a Dr.^a. Vanessa Retucci

Prof.^a MSe. Gisele Arruda

Qualidade de fontes superficiais: Análise ecotoxicológica das águas de três nascentes na Comunidade de Linha Capanema, Realeza-PR, por meio do Sistema Teste *Allium cepa*

Ana Maria Guidini Dallagnol¹, Izabel Aparecida Soares²

Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

E-mail: ¹dallagnolverduras@gmail.com; ²izabel.soares@uffs.edu.br

RESUMO

Tendo em vista a crescente preocupação com a conservação dos recursos naturais, em especial a água, este trabalho teve o objetivo de analisar potenciais efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em água de nascentes superficiais no município de Realeza, Paraná. Para tanto, foram coletadas amostras de água de nascente recuperada, nascente degradada e nascente protegida no período de agosto de 2017. As amostras foram submetidas ao bioensaio com *Allium cepa*, para averiguação do índice mitótico, presença de micronúcleo, aberrações cromossômicas e alterações da mitose. Os bulbos e sementes de *Allium cepa* foram postos para germinar, na proporção de três para cada amostra dos pontos de coleta e três em água destilada para parâmetro de controle. Posteriormente, as raízes foram submetidas ao protocolo de Feulgen com modificações, para a confecção das lâminas. Foram observadas alterações nos valores de 'índice mitótico, alterações cromossômicas e alterações macroscópicas nas radículas da germinação das sementes de *Allium cepa*. Em todos os pontos de coleta foi possível evidenciar efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos nas células meristemáticas das radículas e raízes de *Allium cepa*.

Palavras chaves: água; ecogenotoxicidade; mutagênese ambiental; bioindicadores ambientais.

Quality of surface sources: Ecotoxicological analysis of the waters of three springs in the Community of Capanema Line, Realeza-PR, through the Test System *Allium cepa*.

ABSTRACT

Considering the growing concern with the conservation of natural resources, especially water, this work had the objective of analyzing potential cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in water from superficial springs in the municipality of Realeza, Paraná. In order to do so, samples of water of recovered spring, degraded nascent and protected nascent were collected in the period of August, 2017. The samples were submitted to the bioassay with *Allium cepa*, to verify the mitotic index, micronucleus presence, chromosomal aberrations and mitosis alterations. The bulbs and seeds of *Allium cepa* were germinated, in the proportion of three for each sample of collection points and three in distilled water for control parameter. Subsequently, the roots were submitted to the Feulgen protocol with modifications, for the preparation of the slides. Changes were observed in the values of mitotic index, chromosomal alterations and macroscopic changes in the radicles of

germination of *Allium cepa* seeds. At all points of collection it was possible to show toxic, cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects in the meristematic cells of *Allium cepa* roots and roots.

Key words: water; echogenotoxicity; environmental mutagenesis; environmental bioindicators.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos constituem um componente essencial e indispensável a todos os ecossistemas, quer sejam eles terrestres ou aquáticos. Sendo considerado como umas das condições indispensáveis para a vida, a água foi inserida na Declaração dos Direitos Humanos, no art. 30, como um dos direitos fundamentais do ser humano. Portanto, a vida na terra depende essencialmente da existência de água com qualidade, quantidade suficiente e prontamente disponível para uso direto e indireto (Moraes, Jordão, 2002).

Nesse contexto segundo a Resolução CONAMA(BRASIL, 2002) “a nascente é definida como afloramento natural de água subterrânea (mesmo de forma intermitente)”. No meio rural os principais recursos de abastecimento de água são fontes e poços rasos, sendo que estes estão sujeitos a possíveis contaminações se não estiverem adequadamente preservados (Amaral et al., 2003). Com a interferência do ser humano, os desmatamentos das encostas e das matas ciliares vêm contribuindo para a diminuição da quantidade e qualidade da água das nascentes (Amaral et al., 2003).

Para garantir a qualidade da água foram aprovadas leis federais que abordam a gestão de recursos hídricos. Entre as legislações cabe ressaltar o principal instrumento jurídico brasileiro que normatiza a proteção dos recursos ambientais, a Lei Federal 12.651/2012, denominada de Código Florestal (BRASIL, 2012). Nesta Lei consta que é proibido qualquer uso ou manejo com fins econômicos em Área de Preservação Permanente (APP) e se preconiza que a floresta ou outra forma de vegetação natural é considerada APP quando situada no entorno das nascentes, ao longo dos cursos d'água e nas bordas de tabuleiros.

Em relação às nascentes degradadas, a legislação vigente visa a recuperação de nascentes no Estado do Paraná, a Resolução 041/2010 (SEMA) Resolve: Artigo 1º, a implantação de ações com a finalidade de recuperar e preservar as condições ambientais das Áreas de Preservação Permanente – APP, no entorno de nascentes no Estado do Paraná, garantindo assim a melhoria de qualidade de vida e o aumento da disponibilidade de água, incentivando os proprietários rurais a recuperarem as nascentes existentes em suas propriedades.”

Neste contexto é relevante salientar que nas comunidades das zonas rurais a água é coletada de poços rasos para o consumo humano (Amaral et al., 2003). No entanto, a atividade agrícola interfere na qualidade da água, a localização geográfica das nascentes geralmente em áreas de desnível de terreno e acabam recebendo a contaminação das atividades agrícolas através da erosão, além de dejetos de animais e humanos que vivem próximo a nascente (Calheiros et al., 2004).

Assim, a análise ecotoxicológica tem por finalidade avaliar se, e em que nível, as substâncias químicas isoladas ou em forma de misturas, são prejudiciais aos sistemas vivos e de que forma são expressos os seus efeitos (Cunha, 2011). Para a caracterização adequada e controle desses processos de contaminação dos mananciais, a estratégia mais eficiente é o uso integrado de análises físicas, químicas e ecotoxicológicas para avaliação e previsão do risco ambiental, subsidiando projetos de proteção e recuperação ambiental (Zagatto; Bertoletti, 2006).

Segundo Arraes e Longhin (2012), o sistema de teste com *Allium cepa* identifica contaminação por substâncias químicas em ecossistemas aquáticos. Deste modo, a indicação de toxicidade pode ser observada pela inibição do crescimento das raízes e pelos efeitos adversos causados aos cromossomos.

Segundo Fiskesjo (1985) apud Arraes e Longhin (2012), através do teste de *Allium cepa* pode-se evidenciar no ecossistema aquático poluição ambiental e contaminação por substâncias químicas, onde essa contaminação por toxicidade é identificada através da inibição dos crescimentos das raízes causada pelos efeitos adversos dos cromossomos. Dessa forma, uma avaliação dos riscos dos poluentes para o ambiente precisa ser baseada no uso simultâneo de testes que evidenciam citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Segundo Smaka-kincl et al., (1996) um meio confiável para a determinação rápida da presença de substâncias tóxicas no meio ambiente, para o monitoramento dos níveis de poluição em ambientes naturais e para avaliação dos níveis de poluição da água, é quantificar a redução da divisão celular em meristema de raiz de *Allium cepa* (Smaka-Kincl et al.; 1996).

O sistema de meristema radicular de *Allium cepa* tem se mostrado eficiente e aceito devido a sua eficiência na detecção de danos genéticos quanto à avaliação de aberrações cromossômicas induzidas por poluentes ambientais (Matsumoto et al., 2006; Fatima; Ahmad, 2006; Migid et al., 2007); podendo indicar a presença de substâncias tóxicas, citotóxicas e até mutagênicas no ambiente, e que colocam em risco a sobrevivência dos organismos.

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial ecogenotoxicológico da água de três nascentes de uma propriedade rural do município de Realeza, Paraná, por meio do sistema-teste de *Allium cepa*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local de amostragem

O estudo realizado no componente curricular Projeto Integrador no período entre os anos 2013, 2014, 2015 e 2016 gerou interesse em analisar a qualidade das nascentes deste trabalho. O Projeto Integrador é uma atividade interdisciplinar, que possibilita o desenvolvimento de competências, diálogo com a comunidade e estabelecimento de metas para trabalhos acadêmicos.

O presente trabalho foi realizado na comunidade de Linha Capanema, zona rural do município de Realeza-PR, localizada no Sudoeste do Paraná, no período de agosto de 2017. A coleta das amostras de água foi realizada em pontos na propriedade (Tabela 1). Os pontos de coleta nas nascentes estão demonstrados na Figura 1. Em cada ponto foi feito a coleta em um recipiente plástico devidamente higienizado de 1.500 ml, mantidas sobre refrigeração e posteriormente levados ao Laboratório de Biologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus de Realeza-PR, onde as análises foram realizadas.

Tabela 1. Descrição e localização dos pontos de coleta dentro da Propriedade Rural na Comunidade de Linha Capanema no Município de Realeza, Paraná.

Pontos de Coleta	Localização	Descrição
Ponto 1 (P1)	25°45'30.97"S 53°34'11.16"O	nascente em processo de recuperação: com o plantio de mudas de árvores nativas, isolamento com circunferência de raio de 50 mts, há aproximadamente 24 meses. O processo de recuperação é decorrente de um projeto junto a Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS, denominado PI - Projeto Integrador.
Ponto 2 (P2)	25°45'25.61"S 53°34'13.01"O	nascente totalmente degradada, na área de pastagens da propriedade, onde é recoberta por capins gênero <i>Brachiaria</i> , onde são utilizados como fonte forrageira na alimentação do rebanho bovino.
Ponto 3 (P3)	25°45'24.08"S 53°34'5.70"O	nascente preservada, onde possui vegetação nativa diversificada, que desempenha sua função ambiental de preservar os recursos hídricos locais, possibilitando estabilidade geológica, a biodiversidade, fluxo gênico de fauna e flora, também proteção do solo contra as erosões.

Fonte: Google Mapas (2017).

Figura 1. Pontos de coletas nas nascentes da comunidade de Linha Capanema, zona rural do município de Realeza-PR.



Fonte: Google Mapas (2017).

2.2 Métodos

Os testes foram realizados no Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – campus Realeza-PR. Foi utilizada como indicador biológico a espécie *Allium cepa* adquirida no comércio local.

Os bulbos de *Allium cepa* foram expostos às amostras de água coletadas em frascos de garrafa pet previamente higienizado, estabeleceu-se coleta em triplicata e o controle em água destilada, por 72 h, em seguida, foram retiradas as raízes com a coifa, com um tamanho de aproximadamente 2 cm de comprimento. Assim que as raízes alcançaram o comprimento de 15 a 20 mm, após ocorrer a proliferação celular e atingindo uma cinética de equilíbrio dinâmico, os bulbos foram expostos às amostras das águas coletadas P1, P2 e P3 juntamente com o controle C.

Após foi medido a maior e a menor raiz de cada bulbo, para a obtenção do tamanho médio em cada série foi feita a observação de alterações morfológicas das raízes e assim observadas coletou-se aleatoriamente 03 raízes por bulbo. As raízes anteriormente coletadas foram acondicionadas em microtubos contendo fixador Carnoy por 24 horas. Posteriormente foram lavadas em água destilada e armazenadas em álcool 70 % sob-refrigeração por 24 horas até a confecção das lâminas. As lâminas foram confeccionadas seguindo o protocolo de Feulgen e observadas em Microscopia Óptica para a contagem das células em divisão mitótica e avaliação de danos cromossômicos. Foram contadas mil células por ponto de coleta e controle (P1, P2, P3, C), totalizando quatro mil células em todo o experimento.

Na avaliação macroscópica do crescimento radicular e morfologia foram utilizadas sementes de *Allium cepa*, adquiridas também no comercio local. Inicialmente separou-se 27 unidades de semente para cada ponto e controle (P1, P2, P3 e C). Foram acondicionadas em placas de petri com papel filtro previamente esterilizados. Para cada ponto de coleta e controle, umedeceu-se com a respectiva amostra de água, onde foram colocadas para germinar em ambiente claro e com temperatura ambiente. Diariamente era analisada e mantida a umidade e também a observação da germinação. Determinou-se um período para análise de 144 h e posterior de 192 h. Em cada momento já estabelecido era mensurado o crescimento e a sua morfologia e suas alterações macroscopicamente visíveis.

2.3 Análise dos possíveis efeitos ecotoxicológicos.

A avaliação dos efeitos citotóxicos foi realizada pelas análises do índice mitótico, de acordo com a fórmula a seguir:

$$IM = n^{\circ} \text{ de células em divisão} \times 100 / n^{\circ} \text{ total de células observadas}$$

Para a análise do efeito genotóxico, foram considerados os diferentes tipos de alterações cromossômicas AC (perdas, quebras, aderências e pontes cromossômicas), nas diferentes fases da divisão das células meristemáticas de *Allium cepa*. Para a avaliação do potencial genotóxico, foram observadas células portadoras de alterações cromossômicas, segundo a fórmula:

$$AC = n^{\circ} \text{ de células alteradas} \times 100 / n^{\circ} \text{ total de células observadas.}$$

Para a análise do potencial mutagênico foi registrada a ocorrência de células portadoras

de micronúcleos e quebras cromossômicas. O índice foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{IAC} = \text{n}^\circ \text{ de células alteradas} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de células observadas}$$

Os dados obtidos por meio do sistema *Allium cepa* quanto ao número de alterações cromossômicas, proveniente do teste de micronúcleo, IM e IAC provenientes do teste de *Allium cepa*, foram analisados quanto ao potencial ecotoxicológico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente pode-se notar que o IM dos Ponto 1, 2 e 3 (Tabela 1), ficaram abaixo do obtido no controle. De tal modo a fase em maior número de células identificadas foi para interfase, e para as outras fases: prófase, metáfase, anáfase e telófase ficaram com números equilibrados para cada estágio. No entanto ao identificar o efeito citotóxico nos tratamentos o aumento de IM para o controle demonstrou que está havendo uma divisão celular maior em relação aos outros tratamentos. Pois se os outros tratamentos estivessem demonstrando uma maior divisão celular, poderia estar ocorrendo um descontrole celular (Leme; Marin-Morales, 2009).

Tabela 1. Efeitos citotóxicos e genotóxicos identificados nas células de *Allium cepa* exposta as amostras das nascentes recuperada P1, degradada P2 e preservada P3 da comunidade de Linha Capanema, zona rural do município de Realeza-PR.

Amostras	nº cél. analis.	IM	AC	IAC	Total
Controle	1.000	995 (99,5 %)	04 (0,4 %)	1 (0,1%)	100%
Ponto 1 (recuperada)	1.000	929 (92,9 %)	27 (2,7 %)	42 (4,2%)	100%
Ponto 2 (degradada)	1.000	882 (88,2 %)	76 (7,6 %)	44 (4,4 %)	100%
Ponto 3 (preservada)	1.000	940 (94,0 %)	21 (2,1 %)	39 (3,9 %)	100%

Legenda: IM (índice mitótico), AC (células portadoras de perdas, quebras, aderências e pontes cromossômicas), IAC (células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas).

Os dados obtidos para a avaliação do potencial genotóxico, ou seja, observação de células portadoras de alterações cromossômicas (AC), indicaram que o Ponto 2, área degradada indicou o maior potencial de genotoxicidade com (7,6%), seguida por Ponto 1, área recuperada, (2,7%), e Ponto 3, área preservada apresentou (2,1%) e controle (0,4%), como o demonstrado na Tabela 3.

Para análise do potencial mutagênico foi analisada a ocorrência de células portadoras de micronúcleos e quebras cromossômicas (IAC) e foi identificado que o Ponto 2 apresentou o valor superior de potencial mutagênico com (4,4%), seguido por Ponto 1 com (4,2%) e o Ponto 3 apresentou (3,9%), o controle apresentou (0,1%), conforme dados indicados na Tabela 1.

As alterações cromossômicas (Figura 2a) conceituadas como mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podem ocorrer em qualquer fase do ciclo celular, sendo mais frequentes nas fases de metáfase e anáfase (Monarca, et al, 2000). Alterações cromossômicas estruturais podem ser induzidas por diversos fatores, como quebras no DNA, inibição da síntese de DNA e replicação alterada do DNA (Swierenga et al., 1991; Albertini et al., 2000; Feretti et al., 2008).

Já as aberrações cromossômicas numéricas, são consequências de segregações anormais de cromossomos, podendo ocorrer tanto espontaneamente como pela ação de um agente aneugênico

(Albertini et al., 2000). Algumas Alterações Cromossômicas (AC) mesmo causando danos genéticos permanentes em células somáticas ou germinativas, mantêm as células viáveis enquanto que para a maioria das células a AC é letal (Swierenga et al., 1991).

O acúmulo de dados obtidos com *Allium cepa*, pela ampla aplicação deste teste nos últimos anos, permitiram estabelecer uma correlação entre a mensuração de AC observadas com a potencialidade de desenvolvimento de câncer (Oliveira; Voltolini; Barbério, 2011), também a identificação de organismos com elevadas frequências de AC apresentam também um risco significativo de desenvolvimento de câncer (Obe et al., 2002).

Na análise das lâminas foram identificadas (Figura 2a) células com a presença de danos de anormalidades cromossômicas quando comparadas com células normais em seu ciclo de mitose.

Figura 2 a. Anomalias cromossômicas encontradas em células das raízes de *Allium cepa* tratadas com amostras de água de uma nascente recuperada P1, degradada P2 e preservada P3.

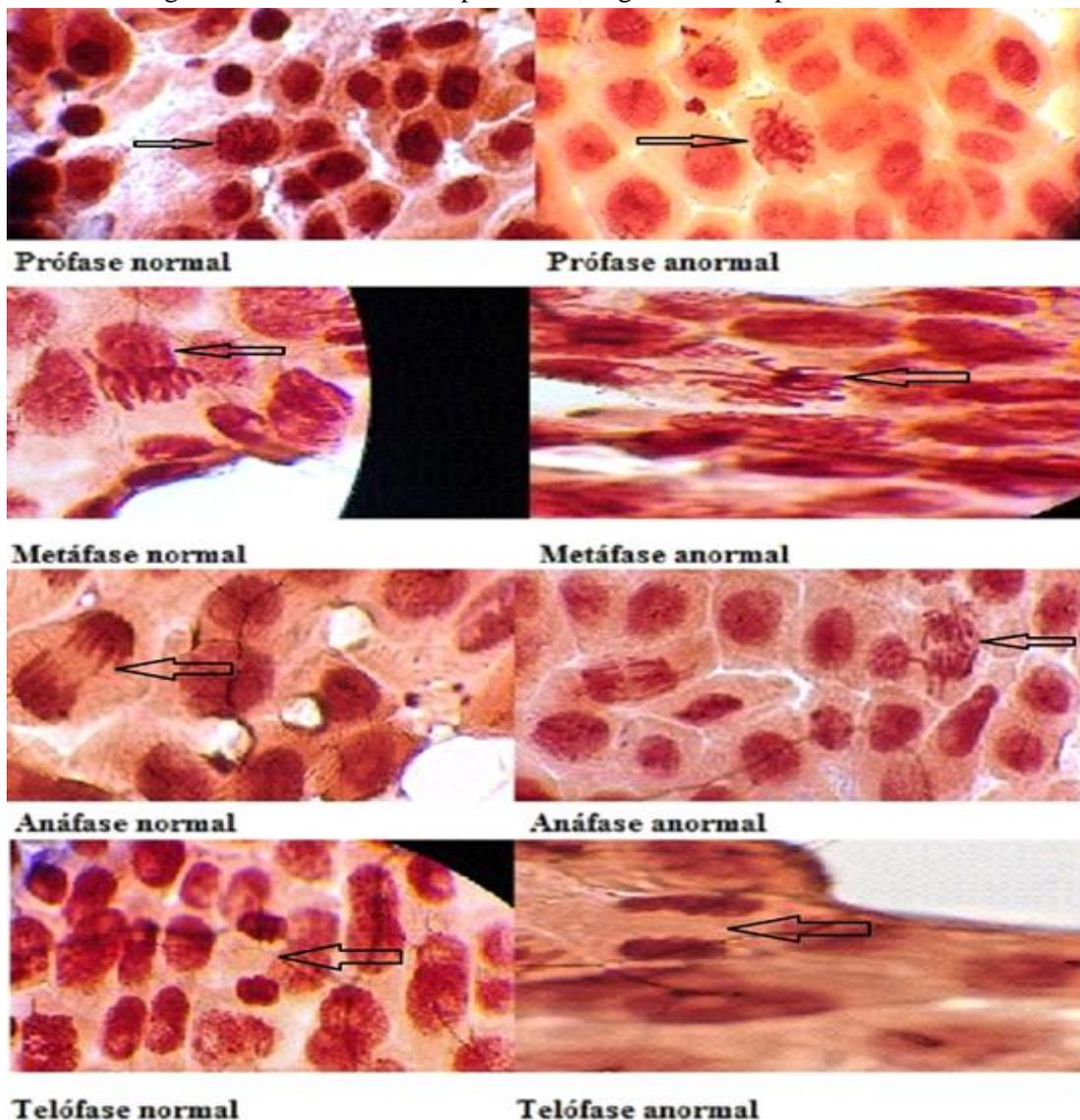
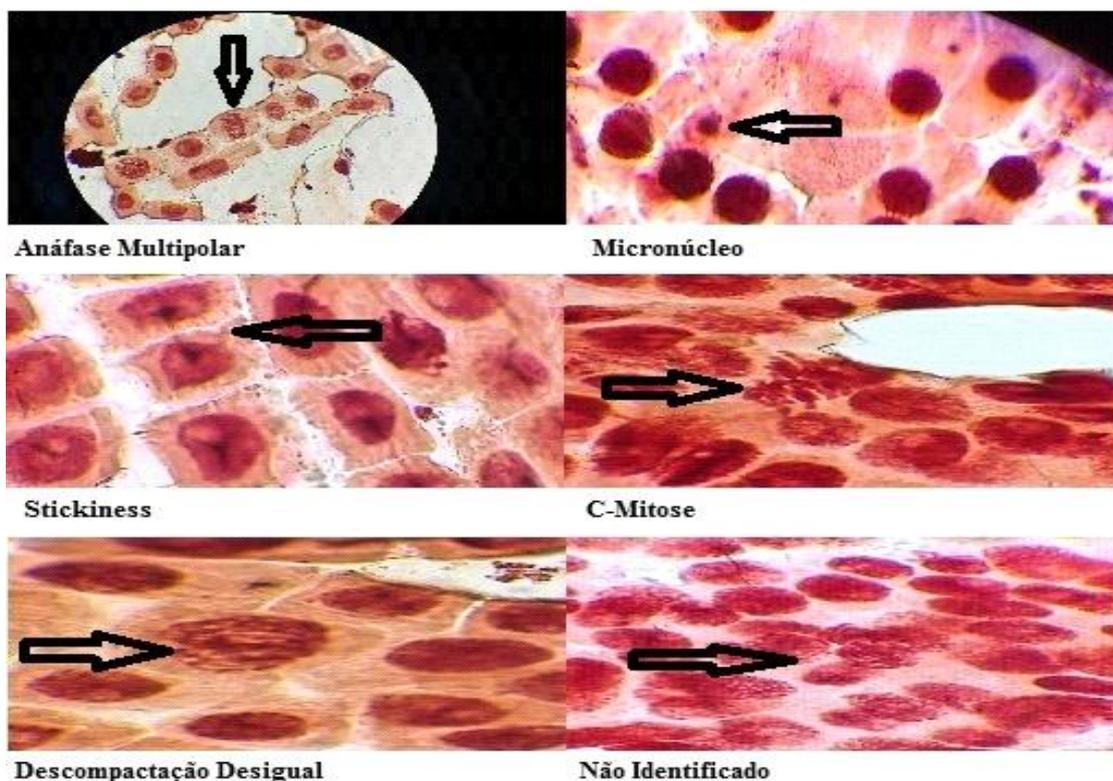


Figura 3 a. Anomalias cromossômicas encontradas em células das raízes de *Allium cepa* tratadas com amostras de água de uma nascente recuperada P1, degradada P2 e preservadas P3.



Agentotoxicidade pode ser identificada por alterações cromossômicas, resultando em anomalias nos cromossomos como: stickiness, micronúcleos, pontes cromossômicas, deformações do núcleo (FISKESJÖ, 1985). O primeiro mecanismo de ação dos agentes genotóxicos é promover lesões no DNA (OLIVEIRA et al., 2011), e ainda, segundo (MAJER, 2005) essas alterações podem provocar uma tentativa de reparo que nem sempre é bem-sucedida, fazendo com que as alterações se tornem irreversíveis, podendo trazer a morte celular.

Os danos como Micronúcleo (MN), pontes anafásicas, encontrados neste estudo, são indicativos da presença de substâncias clastogênicas nas amostras testadas. Outros achados neste estudo foram da forma stickiness (Figura 3a), que é determinada por falhas no processo de disjunção indicando a presença de substâncias aneugênicas, que interferem na formação do fuso acromático.

Os eventos de c-mitoses (Figura 3a) se originam quando há inativação do fuso de modo que, os cromossomos ficam dispersos na célula. Muitas substâncias químicas como as que estão presentes em pesticidas, podem promover esses eventos.

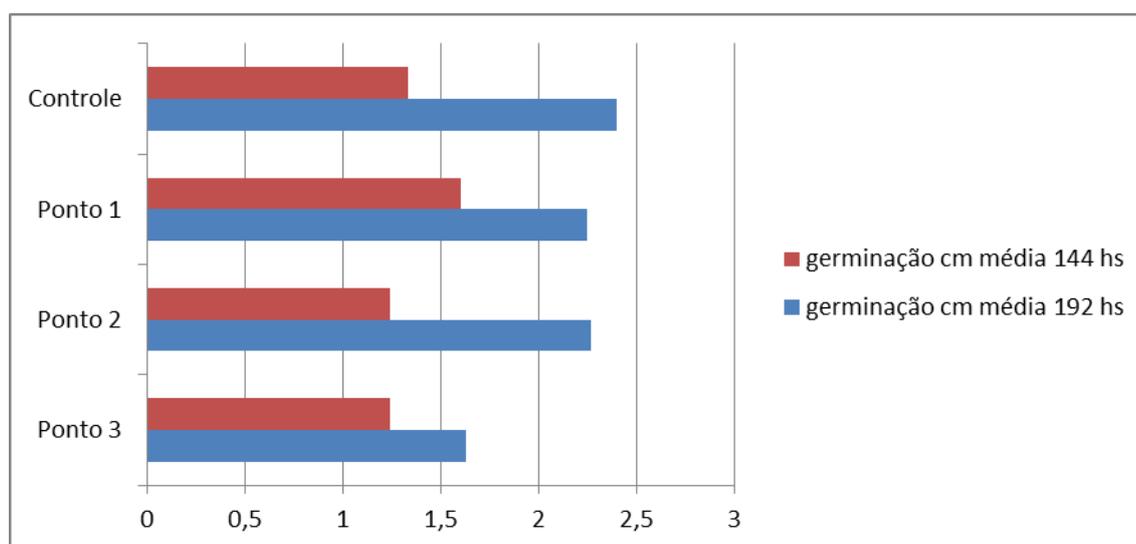
As análises da germinação das sementes *Allium cepa*, identificaram alterações quanto ao índice de germinação (Figura 4) nas amostras de água dos pontos Ponto 1 e Ponto 2, germinação semelhante, tanto para as 144 h e 192 horas. Já para o Ponto 3, ocorreram um crescimento menor em relação aos anteriores. O controle diferiu-se dos outros pontos, tendo maior índice de germinação em ambos os períodos.

Os resultados da germinação (Gráfico 1) demonstram que no período de 144 h a menor germinação em centímetros foi no Ponto 2 e Ponto 3 com média 1,24 cm, já a maior germinação em cm no mesmo período de 144 h foi no Ponto 1 com 1,60 cm. Para o período de 192 h a menor

germinação foi no Ponto 3, com média de 1,63 cm, e a maior germinação em cm para o mesmo período de 192 h foi para o Ponto 2, com média de 2,27 cm, nesta observação macroscópica pode destacar um feito tardio para todas as

Os resultados da germinação (Gráfico 1) demonstram que no período de 144 h a menor germinação em centímetros (cm) foi no Ponto 2 e Ponto 3 com média 1,24 cm, já a maior germinação em cm no mesmo período de 144 h foi no Ponto 1 com 1,60 cm. Para o período de 192 h a menor germinação foi no Ponto 3, com média de 1,63 cm, e a maior germinação em cm para o mesmo período de 192 h foi para o Ponto 2, com média de 2,27 cm, de tal modo resultando em um efeito tardio de germinação. O controle teve germinação no período de 144 h a média 1,33 cm e no período de 192 h a a média de 2,40 cm.

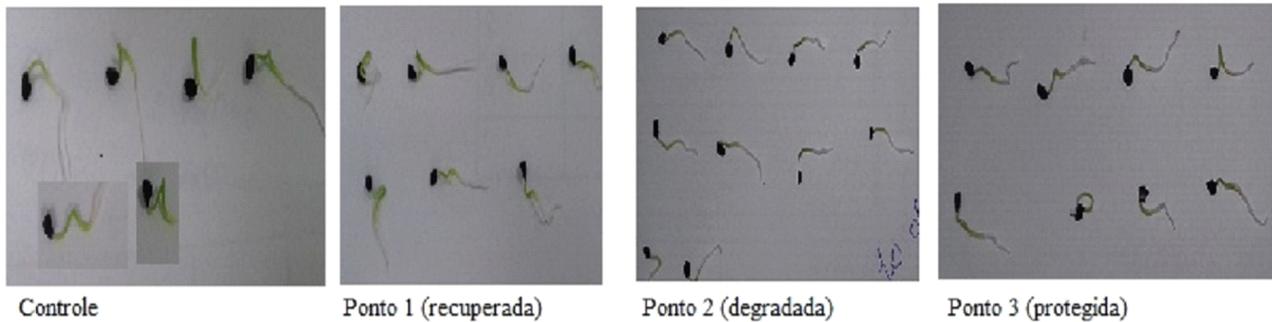
Gráfico 1. Parâmetros macroscópicos em cm da germinação de sementes *Allium cepa*, nos diversos pontos e no controle.



De tal modo os dados já obtidos evidenciaram que não houve a diminuição do crescimento das radículas. No entanto as características morfológicas evidenciaram nas radículas torções, indicando o efeito de toxicidade no ambiente analisado.

Quanto aos dados relacionados aos parâmetros macroscópicos da germinação de das sementes *Allium cepa*, não ocorreu necrose o que facilitou a obtenção macroscópica das torções (Figura 4). As alterações morfológicas foram quantificadas pela presença de raízes torcidas em todos os pontos e no controle, assim apresentando potencial tóxico das amostras analisadas o que confirmou a hipótese de toxicidade, pois a não toxicidade é determinada quando a análise morfológica das raízes é caracterizada pelo crescimento normal e regular, nem má formação, significando que o ambiente em que está exposto não possui potencial tóxico (Cuchiara; Borges; Bobrowski, 2012; Oliveira; Voltolini; Barbério, 2011).

Figura 4. Demonstrações das alterações macroscópicas de torções nas radículas.



4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos através das análises da água das nascentes recuperada, degradada e a protegida, podemos concluir que, a água da nascente recuperada P1 apresenta resultados mais satisfatórios relacionados a efeitos genotóxicos em relação a nascente degradada P2. Como foi demonstrado nos resultados, a nascente degradada P2 possui eventos que sugerem fortes indícios da presença de substâncias tóxicas aneugênicas e clastôgenica que interferem nos processos de divisão celular e no material genético dos organismos presentes nesse ecossistema.

Contudo, mais estudos são necessários para acompanhar a qualidade da água dessas nascentes, principalmente a nascente em recuperação P2, pois o processo de recuperação de uma área degradada demanda tempo. Ações de conscientização quanto a importância da preservação e por fim, recuperação de áreas são necessárias para buscar um futuro melhor, sabendo que somos seres capazes de atuar conscientemente e ativamente para a busca de um Planeta Terra melhor, onde cabe a cada um, tornar-se a engrenagem propulsora da mudança, resultando em benefícios mútuos para o meio em que estamos inseridos, bem como o Planeta que habitamos.

5. AGRADECIMENTOS

Á Professora Dr^a Izabel Aparecida Soares, quem é um dos grandes exemplos que tive em minha vida acadêmica, me inspirou em prosseguir, com suas aulas e orientações.

Á Professora Dr^a Gilza Maria de Franco e Professora Dr^a Berta Lúcia Villagra, onde suas contribuições no Projeto Integrador possibilitaram que a Nascente Ponto 1 – Recuperada tivesse êxito em seu processo inicial de recuperação.

E a minha família, em especial a meu esposo que sempre colaborou e compreendeu-me no decorrer de todo o processo e execução deste trabalho.

Obrigada!

6. REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.; TICE, R.; WATER, M. D.; AITIO, A. **IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety. Mutation Research**, v. 463, p.111-172, 2000.
- AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D. **Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais**. Revista de Saúde Pública. v. 37, n. 4, 2003.
- ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. **Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador Allium cepa como organismo teste**. 2012. 15 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnóloga em Química Agroindustrial, Instituto Federal de Goiás, 2012. Disponível: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2012a/engenharia/otimizacao.pdf>. Acessado em : 05/05/2016.
- BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)**. Resolução Nº 303/2002, que dispõe sobre os parâmetros, definições e limites de Áreas de Preservação Permanente, e também conceitua as nascentes como exutório de águas subterrâneas. Diário Oficial da União 2002.
- BRASIL. Lei nº 12.651, de 25 de maio de 2012. Institui o novo Código Florestal. Diário Oficial da União, Brasília, 25 de maio de 2012. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/112651.htm. Acessado em 26/06/2016.
- CALHEIROS, R. de O.; TABAI, F. C. V.; BOSQUIL, S. V.; CALAMARI, M.. **Preservação e Recuperação das Nascentes**. 2004. 53 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ecologia, Comitê das Bacias Hidrográficas dos Rios Piracicaba, Capivarí e Jundiáí, Piracicaba São Paulo, 2004. Disponível em: <http://www.jorgeamaro.com.br/nascentes.pdf> Acessado em: 05/05/2016.
- CUNHA, B. M. da. **Avaliação ecotoxicológica de distintos tipos de efluentes mediante ensaios de toxicidade aguda utilizando Artemia salina e Lactuca sativa**. Porto Alegre, 2011.
- CUCHIARA C. C.; BORGES C. S.; BOBROWSKI V. L. **Sistema teste de Allium cepa como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água**. Technol. & Ciên. Agropec., João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, mar. 2012.
- FATIMA, R. A.; AHMAD, M. **Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from twodifferent pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays**. *Mutation Research, Amsterdam*, v. 609, p. 81-91, 2006.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Allium cepa test in environmental monitoring: A review on its application**. *Mutation Research, Amsterdam*, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- MIGID, H. M. A.; AZAB, A. Y.; IBRAHIM, M. W. **Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent**. *Ecotoxicology and environmental safety*, V 66 p. 57-64, 2007.
- MORAES, D. S. L.; JORDAO, B.Q. **Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a**

saúde humana. Rev. Saúde Pública [online]. 2002, vol.36, n.3, pp. 370-374. ISSN 0034-8910.

OBE, G.; PFEIFFER, P.; SAVAGE, J.R.K.; JOHANNES, C.; GOEDECKE, W.; JEPPESEN, P.; NATARAJAN, A.T.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, W.; FOLLE, G.A.; DRETS, M.E. **Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution.** *Mutation Research*, v. 504, p. 17-36, 2002.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. **Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste Allium cepa.** *Ambi-Agua, Taubaté*, v. 6, n.1, p. 90-103, 2011.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M. J. **The Evaluation of Waste, Surface and Ground Water Quality Using Allium Test Procedure.** *Mutation Research, Amsterdam*, V 368 p. 171-179, jul. 1996.

VESNA, S.; 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, n. 3-4, p. 171-179, 1996.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** 1. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 478 p.