

## AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DOS RESERVATÓRIOS DE SANTA CRUZ E UMARI - RN: CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.

Marcos Antonio Nobrega de Sousa<sup>1\*</sup>; Mayra Joyce da Costa Pinheiro<sup>2</sup>, Renata Keli da Silva<sup>3</sup>, Edigleyce de Lima Costa<sup>4</sup>, Naama Jéssica de Assis Melo<sup>4</sup>, Eliezer Fernandes da Silva Filho<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Docente Adjunto. Departamento de Ciências Animais (DCAN). Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).  
\*Correspondência: Avenida Francisco Mota, 572. Bairro Costa e Silva. Mossoró/RN. CEP: 59.625-900. Email: marcosousa@ufersa.edu.br

<sup>2</sup>Graduanda em Biotecnologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>3</sup>Graduanda em Ecologia da Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

<sup>4</sup>Biotecnologistas, Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Produção Animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró-RN.

### RESUMO

Os ecossistemas aquáticos vêm sendo alterados constantemente em decorrência de ações antrópicas. Buscamos avaliar a toxicidade e o potencial mutagênico de amostras de água de dois reservatórios da bacia hidrográfica do rio Apodi/Mossoró, com piscicultura em tanques-rede. As amostras de água para o teste de crescimento de raízes de *Allium cepa* foram coletadas em fevereiro e agosto de 2014, distribuídas em quatro tratamentos: 1) água destilada (controle -); 2) Santa Cruz; 3) Umari e 4) sulfato de cobre 0,0006% (controle +). Os dados foram observados após 72 horas de incubação e analisados estatisticamente com Anova e teste de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ) e Bonferroni ( $\alpha=0,05$ ). 35 exemplares de peixes, coletados entre fevereiro e agosto de 2014 foram utilizados para o teste de micronúcleo. O esfregaço sanguíneo fixado foi analisado em microscopia óptica e os dados foram comparados pelo teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ). Houve maior crescimento das raízes de *A. cepa* com as águas do reservatório de Umari do que o de Santa Cruz ( $\alpha=0,05$ ,  $p=0,036$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre o período chuvoso e o seco. Os valores médios da frequência de micronúcleo foram de  $0,008 \pm 0,004$ ,  $0,007 \pm 0,005$  e  $0,013 \pm 0,014$  cm para Santa Cruz, Umari e a Lagoa de Apodi, respectivamente. O teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) indicou que estas diferenças não são estatisticamente significativas. Para os períodos analisados as águas dos reservatórios estudados apresentaram efeitos citotóxicos, mas não genotóxico.

**Descritores:** raízes, crescimento, micronúcleo, reservatórios.

## EVALUATION OF WATER QUALITY OF THE RESERVOIRS OF SANTA CRUZ, RN E UMARI, RN: CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY

### ABSTRACT

Aquatic ecosystems are being changed constantly as a result of human actions. We sought to evaluate the toxicity and mutagenic potential of water samples from two reservoirs in the river basin Apodi / Mossoró, with fish farming in cages. Water samples for the *Allium cepa* root growth test were collected in February and August 2014, distributed in four treatments: 1) distilled water (control - ); 2) Santa Cruz; 3) Umari and 4) Copper sulfate 0.0006 % (control +). Data were observed after 72 hours of incubation and analyzed statistically by ANOVA and Dunnett 's test ( $\alpha = 0.05$ ) and Bonferroni ( $\alpha = 0.05$ ). 35 specimens of fish, collected between February and August 2014 were used for the micronucleus test. The fixed smears were analyzed with light microscopy and the results were compared by Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ). There was strong root growth of *A. cepa* with the waters of Umari reservoir than that of Santa Cruz ( $\alpha = 0.05$ ,  $p = 0.036$ ). Significant differences between the rainy and dry not were observed. The mean values of micronucleus frequency were  $0.008 \pm 0.004$ ,  $0.007 \pm 0.005$  and  $0.013 \pm 0.014$  cm for Santa Cruz, Umari and Lagoa de Apodi, respectively. The Tukey test ( $\alpha = 0.05$ ) indicated that these differences are not statistically significant. For the periods analyzed the waters of the studied reservoirs showed cytotoxic effects, but not genotoxic.

**Keywords:** roots, growth, Micronuclei, reservoirs.

## INTRODUÇÃO

A atividade pesqueira norte-rio-grandense desempenha papel relevante para a economia do Estado, o que pode ser confirmado pelo grande número de reservatórios de grande porte presentes no Rio Grande do Norte (1). A construção de grandes reservatórios nas cidades vem permitindo a intensificação da atividade pesqueira, pelo estímulo, através de programas governamentais, para produção de peixes em tanques-rede. (2)

O cultivo intensivo de peixes em tanques-rede permite a saída das excretas produzidas pelos animais e os produtos da excreção adicionados às eventuais sobras de alimentos não absorvidas ou não consumidas pelos peixes enriquecem o ambiente aquático com nutrientes. Entretanto, o grande volume de nutrientes na água ocasiona eutrofização dos ecossistemas aquáticos. Que pode ser observado quando ocorrem formação de densas populações de algas e cianobactérias, o que resulta em sérios problemas ambientais, econômicos e sociais (3).

A eutrofização pode desencadear um processo de desoxigenação do ambiente e liberação de gases tóxicos em regiões anóxicas, com graves consequências, como: morte de animais aquáticos; aumento nos custos de tratamento da água; perda do valor estético, turístico, prejuízos a atividades econômicas, e saúde humana em decorrência de doenças de veiculação hídrica (4).

Além disso, a biota de ambientes degradados também pode sofrer danos genéticos, e/ou distúrbios na sua síntese proteica, que poderá acarretar disfunções estruturais, regulatórias, catalíticas e/ou fisiológicas nas células dos organismos expostos e, até mesmo, o desaparecimento de espécies de uma população local. Entretanto, os estudos dos danos causados pela exposição e consumo de águas poluídas ao nível celular e molecular ainda é bastante deficiente no Brasil (5).

Sendo assim, é importante o monitoramento dos recursos hídricos sujeitos a alterações decorrentes de atividades comerciais, como aquicultura. Para isso, os peixes são importantes modelos ambientais para o monitoramento da qualidade da água.

Como excelente organismo bioindicador, *Oreochromis niloticus* (Perciforme, Cichlidae) é um peixe de água doce, onívoro de origem africana introduzido no Brasil pelo Centro de Pesquisas Ictiológicas do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), em 1971, em alguns açudes do nordeste brasileiro (6-7).

É um peixe facilmente reconhecido por apresentar listras verticais na nadadeira caudal, coloração metálica, corpo curto e alto, cabeça e cauda pequenas e, quando alevinos, um colorido metálico em tom verde azulado na cabeça (8). Tal espécie é

amplamente comercializada na região nordeste, e responde de maneira rápida às alterações ambientais (9).

Estes organismos, quando afetados, manifestam respostas biológicas, inicialmente, a nível celular, sendo possível observar os efeitos de contaminantes e outras alterações abióticas em longo prazo através de ensaios mutagênicos; ferramenta de grande importância para a avaliação e monitoramento de genotoxicidade ambiental (10).

Esses ensaios permitem a análise de alguns aspectos que não conseguem ser avaliados apenas pelas variáveis abióticas. Assim, diversas técnicas são aplicadas para a análise de efeitos nos organismos submetidos às condições de alterações ambientais e possíveis agentes mutagênicos.

Os testes podem avaliar danos de toxicidade celular e danos ao material genético, como alterações e quebras cromossômicas.

Em avaliações de citotoxicidade, o sistema teste vegetal com *Allium cepa* tem demonstrado que é um excelente para o primeiro *screening* de toxicidade, devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes, como os de genotoxicidade, auxiliando os estudos de prevenção de danos à saúde humana (11).

Uma das metodologias utilizadas para avaliar danos causados por substâncias xenobióticas nos organismos é o Teste do Micronúcleo (MN), que foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (12). Esse tipo de teste tem sido recomendado para estudos de biomonitoramento ambiental, principalmente por sua capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos), e de agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) (13-14).

O teste de micronúcleo é uma das metodologias mais promissoras para avaliação de possíveis danos mutagênicos, pois consiste em uma avaliação menos invasiva, mais rápida, de baixo custo e altamente sensível para alterações cromossômicas estruturais e numéricas (15-16).

Em estudos realizados por (17), o teste do Micronúcleo foi utilizado para biomonitoramento ecotoxicológico nos Rios Itajaí-Açú e Itajaí-Mirim, no Estado de Santa Catarina-BR, para verificar o grau de poluição através da exposição às águas dos Rios utilizando peixe tilápia (*Oreochromis niloticus*) como bioindicador.

Desse modo, foi buscado avaliar, através do teste de citotoxicidade de crescimento de raízes em *Allium cepa* de amostras de água e teste de micronúcleos píceos de dois reservatórios localizados na bacia hidrográfica do rio Apodi/Mossoró

com práticas de piscicultura desenvolvidas em sistema de tanques-rede as condições de citotoxicidade e/ou genotoxicidade ambiental dos referidos locais.

## MATERIAL E MÉTODOS

O Reservatório de Santa Cruz do Apodi ( $5^{\circ} 45' 59''$  S e  $37^{\circ} 47' 57''$  O) detém a segunda maior capacidade de reserva de água do Estado do Rio Grande do Norte. E o reservatório de Umari ( $5^{\circ} 45' 59''$  S e  $37^{\circ} 47' 57''$  O) é o terceiro maior reservatório do Estado do Rio Grande do Norte com um volume de acumulação de 292.813.650,00 m<sup>3</sup>. Ele foi construído para atender à agricultura irrigada, dar suporte a atividade agropecuária e desenvolver a produção de pescado em sua represa, beneficiando cerca de 25.492 habitantes (18). (Figura 1).

As barragens estão localizadas no oeste do Estado de Rio Grande do Norte na bacia do rio Apodi-Mossoró, que possui uma área de 14.276 km<sup>2</sup>, o que representa 26,8% da área estimada do Estado, e constitui a maior bacia hidrográfica genuinamente potiguar. O clima local é do tipo BSw'h', da classificação climática de Köppen, caracterizado por um clima muito quente e semiárido, com a estação chuvosa se atrasando para o outono (19).

As atividades de piscicultura nos reservatórios são desenvolvidas pela Associação dos Aquicultores de Apodi (Aquapo) e pela Associação dos aquicultores de Upanema.



**Figura 1.** Mapa da localização geográfica do Reservatório de Santa Cruz, Apodi, RN (a) e Reservatório de Umari, Upanema, RN (b) Em destaque (setas) os pontos de localização dos tanques-rede.

Para a caracterização do regime pluviométrico, durante o período de estudo, foram utilizados os dados de precipitação obtidos a partir de estações meteorológicas automáticas instaladas nos reservatórios, com medições a cada hora, durante 24 horas,

o que permitiu observar que em 2014, a precipitação em Fevereiro e Maio foi de 86,4 mm, em cada mês, e em Agosto foi de apenas 9 mm. De modo que, foi possível avaliar os dois primeiros meses como chuvosos e o último como seco.

Para a avaliação de citotoxicidade, através do crescimento de raízes, as amostras de água foram coletadas com garrafa de Van Dohr vertical, nos meses de fevereiro e maio de 2014, no local exatamente abaixo dos tanques-rede, de acordo com metodologia padronizada (20-21). E em seguida, as amostras de água foram transportadas em recipientes de poliestireno opacos, para o Laboratório de Genética e Evolução – Lagene da Ufersa onde foram distribuídas em recipientes de vidro, com capacidade de 100 ml cada. Foi colocado um bulbo de cebola em cada recipiente, com a área radicular em contato com a água, sendo deixados para germinar em temperatura ambiente controlada (25°C).

Os bulbos de cebolas da espécie *A. cepa* (diâmetro: 60 a 80 mm e peso: 160 a 180 g), com catafilos externos brancos, não germinados e saudáveis foram adquiridos comercialmente em supermercados em Mossoró-RN. Foram mantidos em local livre de umidade e ao abrigo de luz. E antes do teste, os catafilos externos secos foram removidos com bisturi, cuidando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, os bulbos foram postos em água de torneira por duas horas para reduzir os efeitos de inibidores do brotamento (21).

Após 72 horas de exposição, as raízes foram medidas com o auxílio de uma régua, e para padronização foi extraída a maior raiz de cada bulbo. Como controle negativo foi utilizada água destilada e como controle positivo, sulfato de cobre a 0,0006 mg/mL (21).

Para a análise de genotoxicidade foram realizadas coletas de exemplares de *O. niloticus* nos meses de fevereiro, maio e agosto de 2014 nos tanques-rede dos reservatórios de Santa cruz e Umari. No mês de agosto ainda foi realizada uma coleta adicional na Lagoa do Apodi, no município de Apodi - RN.

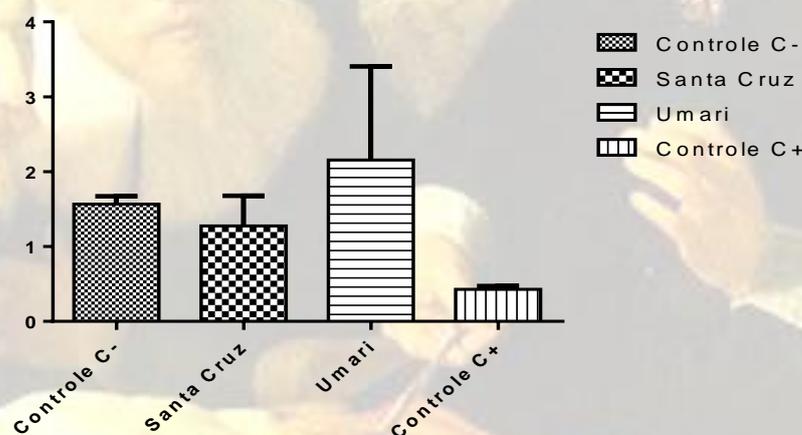
Amostras de sangue retiradas das brânquias com o auxílio de uma seringa foram gotejadas sobre lâminas de microscopia para confeccionar o esfregaço sanguíneo e, em seguida, após 24 horas, o material foi fixado com metanol (100%) por 10 minutos e deixado para secar por 24 horas. Posteriormente o material foi corado, por 30 minutos em solução Giemsa (1:30), seco ao ar, em temperatura ambiente.

Foram analisados 35 espécimes, sendo contados 1000 eritrócitos intactos por animal através dos esfregaços em lâminas de microscopia analisados em microscópios ópticos de luz (aumentos de 400x e 1000X).

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Prisma 6.0. Para o crescimento de raízes as médias do crescimento das raízes de cada localidade foram comparadas com as médias dos controles negativo e positivo, com 100% de crescimento. Também foi realizada uma análise de variância ANOVA e testes de Dunnett ( $\alpha=0,05$ ) e Bonferroni ( $\alpha=0,05$ ) a posteriori. Para comparação entre as médias de micronúcleos foi realizada uma ANOVA e Teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) a posteriori.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios do crescimento de raízes estudados pelo teste de crescimento de raízes em *Allium cepa* nas coletas de fevereiro e maio de 2014 foram: controle negativo  $1,49\pm 1,88$  e  $1,64\pm 0,93$  cm; e controle positivo  $0,46\pm 0,23$  e  $0,4\pm 0,27$  cm, respectivamente. As amostras do reservatório de Santa Cruz foram  $0,99\pm 0,40$  e  $1,56\pm 1,52$  cm, respectivamente; e as do reservatório de Umari foram  $3,04\pm 1,70$  e  $1,27\pm 1,46$  cm, respectivamente. Desse modo, os valores médios finais das coletas foram:  $3,13\pm 2,81$ cm para o controle negativo;  $0,86\pm 0,51$  cm para o controle positivo;  $2,55\pm 1,93$  cm para Santa Cruz e  $4,31\pm 3,17$  cm para Umari (Gráfico 1).



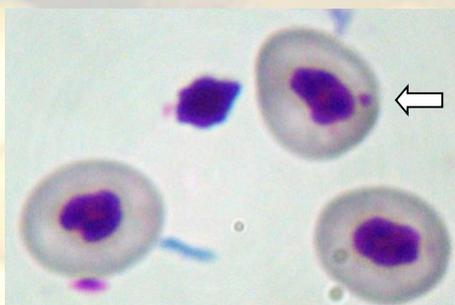
**Gráfico 1.** Média do comprimento da raiz (cm) ( $n=10$ ) de *Allium cepa* por ponto de coleta e controles.  $\alpha=0,05$  em relação ao controle negativo (C-) – Anova, Dunnet.

Observa-se que não houve grande variação no crescimento das raízes de *A. cepa* com as águas dos reservatórios de Santa Cruz e Umari quando comparados ao controle negativo. Contudo, quando são comparados os valores do reservatório de Santa Cruz com o de Umari observa-se que houve maior crescimento das raízes nas águas do reservatório de Umari em relação a Santa Cruz. Estes dados foram

confirmados pelo Teste de Bonferroni ( $\alpha=0,05$ ,  $p=0,036$ ), significando que o reservatório de Santa Cruz apresenta-se mais afetado pela piscicultura do que o reservatório de Umari.

Quando comparado o controle negativo com o controle positivo os valores foram significativos, confirmado pelo Teste de Dunnet ( $\alpha=0,05$ ,  $p=0,032$ ), o que demonstra que a substância utilizada como controle positivo (sulfato de cobre 0,0006%) conseguiu inibir satisfatoriamente o crescimento das raízes, enquanto que o controle negativo permitiu o seu crescimento, confirmando estes controles, como uma fonte confiável de comparação dos dados.

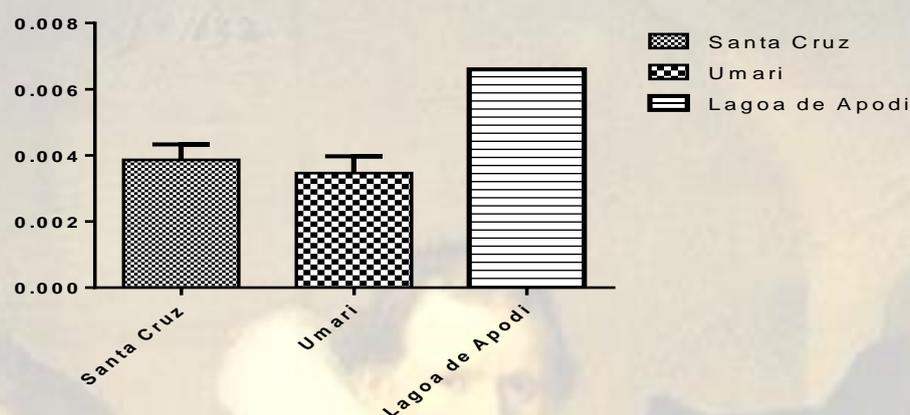
Para o teste de micronúcleo foram identificados e classificados como micronúcleos apenas os que apresentavam diâmetro menor que um terço do núcleo; não refratário; e de coloração não mais escura que a do núcleo (21). (Figura 02).



**Figura 02.** Fotografia de micronúcleo (seta) em eritrócitos de *O. niloticus* (1000x).

Os valores médios da frequência de micronúcleo das três coletas foram de  $0,008\pm 0,004$ ,  $0,007\pm 0,005$  e  $0,013\pm 0,014$  cm para o reservatório de Santa Cruz, Umari e a Lagoa de Apodi, respectivamente (Gráfico 2).

Apesar das coletas terem sido realizadas no período chuvoso e seco, não foram observadas diferenças significativas entre as estações. No entanto, quando foram comparadas as localidades, entre si, foi observado que a Lagoa de Apodi apresentou o maior índice de micronúcleos, podendo ser considerada como o controle positivo, pois é um ambiente com intensa concentração de nutrientes. No entanto, com o auxílio do teste de Tukey ( $\alpha=0,05$ ) foi observado que estas diferenças não são estatisticamente significativas.



**Gráfico 2.** Média do número de micronúcleos nos três ambientes analisados.

Considerando os parâmetros analisados, os dados de crescimento de raízes, apresentaram uma inibição menor do crescimento no reservatório de Umari em relação ao reservatório de Santa Cruz. Observa-se deste modo, que o primeiro reservatório apresenta potencial citotóxico inferior ao segundo. Isso é evidenciado pela divergência nos dados das raízes tratadas com os controles positivos e negativos.

No entanto, quando levado em consideração os valores da frequência de micronúcleo, que embora tenham sido observadas variação entre coletas e reservatórios as diferenças não são estatisticamente significativas, de modo que, não foi possível estimar com segurança os dados para a população.

Assim, infere-se que possivelmente os reservatórios apresentem potencial mutagênico nas amostras estudadas. Essa possibilidade pode ser levantada porque se observa na literatura científica que os efeitos genotóxicos e citotóxicos estão diretamente relacionados (22-24).

Vale salientar que, as atividades antrópicas atuam na redução da qualidade da água, e que a atividade de piscicultura influencia diretamente nas taxas de sedimentação. Na região dos tanques-redes a sedimentação de nutrientes e matéria orgânica é maior do que em regiões afastadas do cultivo, sendo assim torna-se necessário conhecer, com estudos em longo prazo, quais efeitos os compostos podem produzir no organismo (25-27).

O teste de micronúcleo se mostra eficaz e tem se consolidado como uma técnica preferencial para monitoramentos ambientais, devido sua simplicidade e rapidez na detecção de impactos genotóxicos em organismos, e pelo fato de que a formação espontânea de micronúcleos é baixa e quase uniforme entre as espécies (28).

Portanto, é importante que sejam realizados outros bioensaios, como o ensaio de cometa, teste de Ames, além da análise da frequência de micronúcleos, para a avaliação

de genotoxicidade e mutagenicidade dos corpos d'água, que são os principais receptores de resíduos das atividades antropogênicas e se possa desenvolver metodologias para diminuir o impacto ambiental (29).

## CONCLUSÕES

As águas dos reservatórios estudados apresentaram efeitos citotóxicos, mas não genotóxico para os períodos analisados. É necessária a realização de novas pesquisas, no intuito de realizar um monitoramento ambiental dessa bacia, para criar medidas mitigatórias e amenizar os possíveis impactos provenientes das atividades de piscicultura.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte pelo financiamento do projeto de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa RS, Novaes JLC, Peretti D. Estudos ictiológicos e pesqueiros em águas interiores do Rio Grande do Norte. Boletim ABLimno. 2009 [Acesso em 2014 out 10]; 37(1):9-13. Disponível em: [http://www.ablimno.org.br/boletins/pdf/bol\\_37\(1-3\).pdf](http://www.ablimno.org.br/boletins/pdf/bol_37(1-3).pdf).
2. Ayroza, D. M. M. R.; Furlaneto, F. P. B.; Ayroza, L. M. S.; *Bol. Inst. Pesca* 2006, 36, 1.
3. Carpenter SR, Caraco NE, Correl DL, Howart RW, Sharpley NA, Smith VH. Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen. *Ecol. Appl.* 1998; 8(3):559-568.
4. Tundisi JG. Água no século XXI: enfrentando a escassez. 1. ed. São Carlos: Ed. Rima; 2003.
5. Lam PKS. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean Coast Manage.* 2009; 52:348-354, 2009.
6. Starling FLRM. Development of biomanipulation strategies for the remediation of eutrophication problems in an urban reservoir, Lago Paranoá– Brazil. [Tese de PhD]. Scotland: Institute of Aquaculture, University of Stirling; 1998.
7. Tanaka PR. O papel das tilápias (*Oreochromis niloticus*) no ciclo do fósforo no Lago Azul (Rio Claro – SP). [Trabalho de Conclusão de Curso]. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista; 2001.
8. Galli LF, Torloni CE. Criação de peixes. 3. ed. São Paulo: Nobel; 1986
9. Vijayan MM, Morgan JD, Sakamoto T, Grau EG, Iwama GK. Food deprivation affects sweater acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. *J. Experim. Biol.* 1996; 199: 2467-2475.
10. Mersch J, Beauvais MN. The micronucleous assay in the zebra mussel, *Deissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat. Res.* 1997; 383: 141-149.
11. Leme DM, Marin-Morales MA. Allium cepa test in environmental monitoring, a review on its application. *Mutat. Res.* 2009; 682:71-81.
12. Schmid, W. 1976. The micronucleus test for cytogenetics analysis. In: Principles and Methods for Their Detection (ed. Hollaender, A.). Plenum Press, New York, Vol.4, p.31-53.

13. Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. N. 455. p.81-95.
14. Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA. Canoas-RS. 356pp.
15. Heddle JA, Hite M, Irkhart B, Macgregor JTE, Salamone, MF. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity – a measure of the US environmental protection agency gene-tox program. *Mutat. Res.* 1983; 123 (1): 61-118.
16. Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. Assessment of environmental stress by the Micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004; 57:168-174.
17. Bücken, A.; Conceição, M.B. 2004. Avaliação da genotoxicidade por frequência de Micronúcleos em eritrócitos de tilápias expostas às águas do Rio Itajaí-Açu e Itajaí-Mirim, Santa Catarina-Brasil.
18. SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS HÍDRICOS – SEMARH. Manual de instrução para licenciamento ambiental de fontes potencialmente poluidoras. GOIÂNIA-GO. 2010. 52p.
19. CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). Resolução nº 357, de 17 de março de 2005 [Internet]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. 2005 mar. 18 [acesso em 2014 out 15]. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>
20. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão. [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.
21. Mitteregger HJ, Silva J, Arenzon A, Portela C, Ferreira I, Henriques JAP. Evaluation of genotoxicity and toxicity of water and sediment samples from a Brazilian stream influenced by tannery industries. *Chemosphere.* 2007; 67:1211–1217.
22. Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* 1985; 102: 99-112.
23. Da Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat. Res.*1994;313:57–68.
24. Nielsen MH, Rank J. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the Allium test. *Hereditas.* 1994; 121:249-254.
25. Moura RST, Lopes YVA, Henry-Silva GG. Sedimentação de nutrientes e material particulado em reservatório sob influência de atividades de piscicultura no semiárido do Rio Grande do Norte. *Quim. Nova.* 2014. Vol. XY, No. 00, 1-6, 200.
26. Silva AG, Souza LD. Efeitos antropicos e sazonais na qualidade da água do Rio do Carmo. *Holos.* 2013. Ano 29, Vol 5.
27. Bezerra JM, Silva PCM, Batista RO, Pinto CHC, Feitosa AP. Análise dos indicadores de qualidade da água no trecho urbano do Rio Apodi-Mossoró em Mossoró-RN, Brasil. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 2013. v. 34, n. 6, suplemento 1, p. 3443-3454.
28. Siu WHL, Mak E, Cao J, Luca-Abbott SBD, Richardson BJ, Lam PKS. Micronucleus induction in gill cells of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons and chlorinated pesticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004; 232(5):1317-1325.
29. Amaral AM, Barbério A, Voltoline JC, Barros L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP- Brasil) através do teste Allium (*Allium cepa*). *Rev Bras Toxicol.* 2007; 20(1 e 2):65-72.