

GENOTOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA ÁGUA DO RIO PASSAÚNA: BIOENSAIO COM *ALLIUM CEPA* E RELAÇÃO COM NÍVEIS DE CAFEÍNA

PASSAÚNA RIVER WATER GENOTOXICITY AND CYTOTOXICITY:
BIOASSAY WITH *ALLIUM CEPA* AND RELATIONSHIP WITH CAFFEINE

Giuliana Peixer

Gestora Ambiental pela Faculdade Evangélica do Paraná. Mestre em Gestão Ambiental pela Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil.

Francini dos Reis Henrique

Farmacêutica pela Universidade Positivo. Mestre em Biotecnologia Industrial pela Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil.

Thiago Caon

Graduado em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Administração Empresarial pela Escola Superior de Administração e Gerência da Universidade do Estado de Santa Catarina (ESAG-UDESC). Professor adjunto A do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

Marcos Antonio Segatto Silva

Farmacêutico Industrial pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mestre e doutor em Fármacos e Medicamentos pela Universidade de São Paulo (USP). Professor do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC – Florianópolis (SC), Brasil.

Cíntia Mara Ribas de Oliveira

Química pela Universidade Federal do Paraná (UFPR). Mestre e doutora em Ciências Biológicas (área de concentração Bioquímica) pela UFPR. Professora titular do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental da Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil.

Eliane Carvalho de Vasconcelos

Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Mestre e doutora em Ciência (área de concentração Química Analítica) pela USP. Professora titular do Programa de Pós-Graduação em Gestão Ambiental da Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil.

Endereço para correspondência:

Eliane Carvalho de Vasconcelos – Rua Professor Pedro Viriato Parigot de Souza, 5.300 – Campo Comprido – 81210-330 – Curitiba (PR), Brasil –
E-mail: evasconcelos@up.edu.br

Recebido: 27/04/2016

Aceito: 20/11/2017

RESUMO

Os recursos naturais se tornam cada vez mais limitados, em consequência da degradação ambiental. O presente trabalho teve como objetivo verificar possível correlação entre dados de genotoxicidade/citotoxicidade, via teste de *Allium cepa*, em amostras de águas superficiais e determinações de concentração do micropoluentes cafeína. Analisando-se amostras de água de um rio urbano, foi encontrada uma correlação positiva, $R = 0,504$ e $p = 0,095$, entre os valores de concentração de cafeína na água e o índice de aberrações cromossômicas (IAC), obtido no bioensaio, representando certa dependência entre as variáveis. Os resultados de citotoxicidade e genotoxicidade apresentaram variação no índice mitótico (IM) e aberrações cromossômicas (AC), respectivamente. Os resultados do bioensaio, quando relacionados à presença de cafeína, indicam a contaminação por esgoto contendo substâncias que podem levar a essas alterações, por exemplo, fármacos. Demonstra-se, assim, a potencialidade do uso das técnicas para auxiliar nas tomadas de decisão para proteção dos mananciais.

Palavras-chave: biomonitoramento; águas superficiais; micropoluentes.

ABSTRACT

Natural resources are becoming more limited and degraded. This study sought to evaluate the possible correlation between genotoxicity and cytotoxicity, via the *Allium cepa*, and caffeine concentration in the water of an urban river. A positive correlation ($R = 0.504$ and $p = 0.095$) was found between the concentration of caffeine and the aberrations index chromosome (IAC), obtained from a bioassay, representing dependence between the variables. The results of cytotoxicity and genotoxicity showed variation in mitotic index (MI) and chromosomal aberrations, respectively. The bioassay results when related to the presence of caffeine indicate sewage contamination containing substances that may have caused these changes, e.g., drugs. The study herein demonstrates the potentiality of using those techniques to assist in decision making for protecting water resources.

Keywords: biomonitoring; surface water; micropollutant.

INTRODUÇÃO

Todas as atividades sociais e econômicas necessitam de água para sua sustentabilidade. Isso gera conflitos de interesses entre os diversos usuários, devido aos crescentes problemas de quantidade e qualidade. Além do consumo humano, outros usos igualmente importantes e de interesse das comunidades devem ser considerados, como industrial, agropecuário, turístico, paisagístico, recreacional, de irrigação e de navegabilidade (BRUNKOW *et al.*, 2004). Para garantir a quantidade de água necessária para suprir toda a demanda, vários rios são barrados para que se formem reservatórios. Com isso, é importante a realização de um monitoramento ambiental da bacia hidrográfica, a fim de manter a qualidade da água em reservatórios (SANTOS, 1999).

Na Região Metropolitana de Curitiba, o barramento na bacia do Rio Passaúna (Paraná) deu origem ao reservatório de mesmo nome, utilizado para captação de água para abastecimento público. Saunitti *et al.*, já em 2004, destacavam que a falta de esgotamento sanitário e a expansão urbana irregular na região gerava fontes de poluição prejudiciais à qualidade ambiental da bacia hidrográfica desse rio. Essa influência foi, posteriormente, também observada por Silva *et al.* (2011), que isolaram cepas de *Escherichia coli* multirresistentes a antibióticos em amostras de água da área.

Tendo em vista que os contaminantes presentes no ambiente aquático, que derivam principalmente da descarga de águas residuárias domésticas, são motivos de preocupação devido ao possível impacto ecológico para a biota do ambiente (PETRIE *et al.*, 2015), indicadores de poluição de origem antrópica são essenciais para identificar e monitorar processos de remediação de fontes de contaminação e, assim, proteger a saúde pública (GARRIDO *et al.*, 2016; MCLELLAN & EREN, 2014). Na literatura, a cafeína tem sido utilizada como indicadora de influências antropogênicas (MACHADO *et al.*, 2016; GARRIDO *et al.*, 2016; ZARRELLI *et al.*, 2014; FERREIRA, 2005; CHEN *et al.*, 2002), e sua presença pode estar associada à de outros contaminantes orgânicos, como: ciprofloxacina, paracetamol (SIM *et al.*, 2010); di-n-butiltalato, bisfenol, 17 β -estradiol e 17 α -etinilestradiol (SODRÉ *et al.*, 2007). A simples presença de marcadores químicos, no entanto, pode não ser suficiente para determinar o quanto esses contaminantes estão influenciando na qualidade da água e na

manutenção de ecossistemas aquáticos. Estudos que verifiquem se a água de um determinado corpo hídrico apresenta toxicidade potencial podem fornecer informações mais seguras sobre sua qualidade e auxiliar na escolha de estratégias mais adequadas para minimização do problema. O teste de toxicidade utilizando *Allium cepa* vem sendo empregado, nesse sentido, como um bioensaio, devido ao baixo custo de análise (FISKESJÖ, 1985; RANK, 2003), facilidade de aplicação (FISKESJÖ, 1985; RANK, 2003), sensibilidade (LEME & MARIN-MORALES, 2009; SMAKA-KINCL *et al.*, 1996; FISKESJÖ, 1985), confiabilidade (SMAKA-KINCL *et al.*, 1996), além de boas condições dos cromossomos do organismo-teste para avaliar aberrações ocasionadas por xenobióticos (FISKESJÖ, 1985). Uma das primeiras análises utilizando *Allium cepa* foi realizada por Levan (1938), quando os efeitos da colchicina foram investigados. Desde então, o teste vem sendo utilizado em avaliações ambientais, por exemplo, de amostras de águas de lagos (GRISOLIA *et al.*, 2005; BARBOSA, 2008) e de rios (CASTRO E SOUSA *et al.*, 2017; DÜSMAN *et al.*, 2014; SILVA & NASCIMENTO, 2013; CIRCUNVIS *et al.*, 2012; FERREIRA *et al.*, 2012; BIANCHI *et al.*, 2011; MENEGUETTI *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2011; MANZANO, 2010; SANTOS *et al.*, 2009; PERON *et al.*, 2009; MASCHIO *et al.*, 2009; LEME & MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ & MARIN-MORALES, 2008; EGITO *et al.*, 2007; AMARAL *et al.*, 2007; MATSUMOTO & MARIN-MORALES, 2005).

A associação de um método que determine a ocorrência de micropoluentes em corpos hídricos com um que dimensione aspectos de toxicidade que as misturas xenobióticas ali presentes podem ocasionar traz contribuições no tocante à gestão de reservatórios, tendo em vista que análises integradas propiciam diagnósticos mais qualificados das áreas e podem servir para balizar tomadas de decisão por parte dos gestores de companhias de saneamento, quanto às prioridades para remediação. Nesse contexto, a hipótese do presente estudo é que a associação entre resultados de análise de cafeína em águas e do teste de *Allium cepa* pode servir como um método na verificação da qualidade química e presença de compostos tóxicos em um dado corpo hídrico. Dessa forma, o objetivo da pesquisa foi verificar possível correlação entre dados de genotoxicidade/citotoxicidade, com base nesse teste, em amostras de águas superficiais

e determinações de concentração do micropoluinte cafeína. Para tanto, utilizou-se como modelo de estudo o

Rio Passaúna, por se inserir em uma bacia urbana, que contempla diferentes tipos de uso e ocupação do solo.

MATERIAIS E MÉTODOS

As coletas do presente estudo foram realizadas no Rio Passaúna, que faz parte da Bacia Hidrográfica do Alto-Iguaçu, e cuja nascente situa-se no município de Almirante Tamandaré (GONZAGA *et al.*, 2004) entre as Seras de São Luiz do Purunã e Bocaina, com percurso de 57 km até desembocar no Rio Iguaçu (DIAS, 1997). As

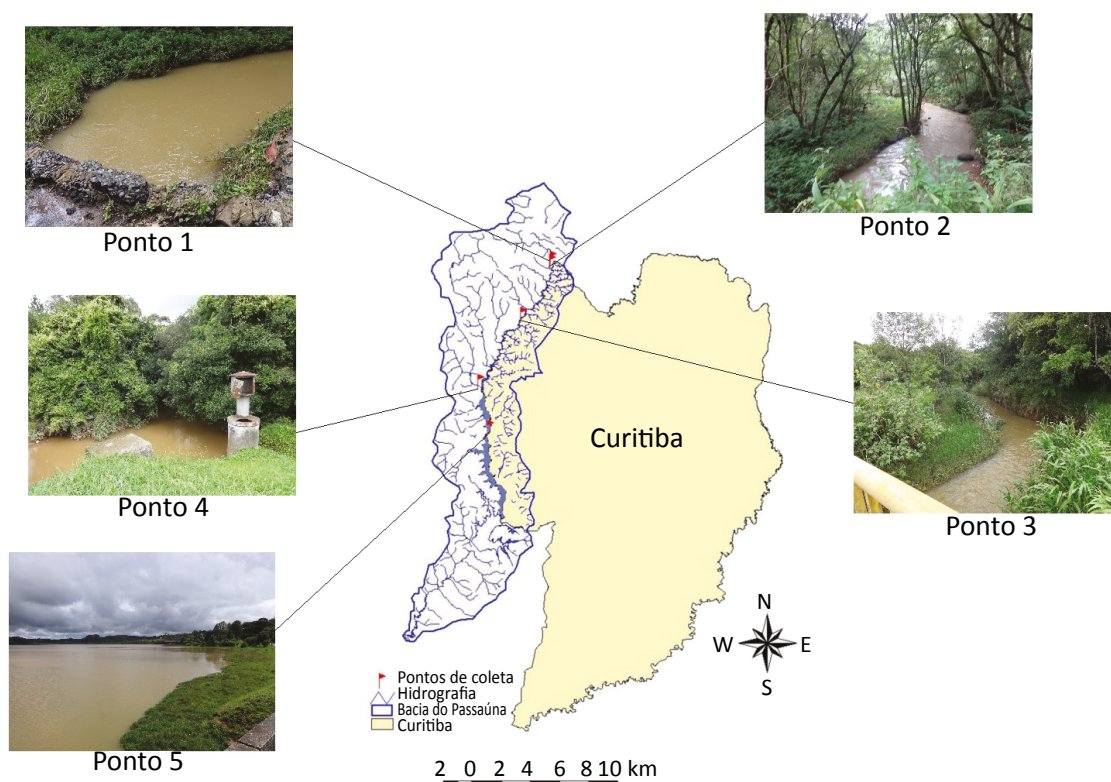
amostras de água foram coletadas em cinco pontos do Rio Passaúna (Figura 1), mensalmente dos meses de outubro de 2014 a janeiro de 2015, próximo aos mesmos pontos utilizados por Silva *et al.* (2011) e Bocalon (2007), cujas coordenadas geográficas e localização estão informadas na Tabela 1.

Ensaio de toxicidade

Os experimentos foram realizados conforme descrito por Oliveira *et al.* (2011), com modificações.

Cebolas orgânicas foram adquiridas no mercado municipal de Curitiba (PR) e delas utilizados três bulbos (*Allium cepa*) para cada uma das amostras. Os bulbos foram colo-

cados em béqueres contendo as amostras da água do rio, durante um período de 72 horas, para enraizamento, em estufa incubadora Novatecnica NT 718, a 22°C, com fotoperíodo de 10 horas. Após essa fase, as raízes dos bulbos com maior desenvolvimento foram cortadas e fixadas em etanol/ácido acético glacial numa proporção de 3:1 (v/v)



Fonte: adaptado de Silva *et al.* (2011).

Figura 1 – Identificação dos pontos de coleta de água superficial, no Rio Passaúna, definido como modelo de estudo.

(Carnoy) por 5 minutos e conservadas em álcool 70% sob refrigeração. Um controle negativo com água destilada foi conduzido seguindo as mesmas condições.

As pontas das raízes foram submetidas à reação de Feulgen, consistindo de hidrólise ácida com HCl 4 N a 24°C por 75 minutos, interrompida com rápida lavagem em HCl 0,1 N (gelado), seguida por imersão por 40 minutos em reagente de Schiff (corante púrpura nucleofílico) e lavagem com água sulfurosa e água destilada posteriormente. Para o preparo das lâminas, cada raiz foi enxugada em papel filtro; a região meristemática das raízes foi cortada em 1 cm, e a coifa retirada em seguida. A parte da raiz selecionada foi colocada em uma lâmina e uma gota de ácido acético 45% foi adicionada. Esta foi, então, cortada em pequenos pedaços, coberta

Determinação da concentração de cafeína

Para a análise da presença de cafeína, um litro de cada amostra foi filtrado utilizando papel de filtro comum com o objetivo de retirar as partículas maiores. A seguir, as amostras foram filtradas utilizando filtros Millipore com poros de 0,45 µm.

As amostras filtradas foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) para retirada da cafeína da água, utilizando cartuchos Oasis® HLB 12cc (500 mg) LP Extraction Cartridge.

Para proceder à extração, os cartuchos foram condicionados com 2 mL de metanol grau HPLC e em seguida com 2 mL de água destilada. Em seguida a água filtrada foi eluí-

Análise dos dados

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se o software StatPlus:mac de Analyst

com uma lamínula para que fosse esmagada com leve pressão com o auxílio de um bastão de vidro e pressionada com papel filtro para o espalhamento. A análise das lâminas foi realizada em microscópio de luz com aumento de 40 vezes (GUERRA & SOUZA, 2002).

Para cada raiz, foi preparada uma lâmina e em cada uma delas, 500 células foram contadas, totalizando 1.500 células por bulbo e 4.500 por ponto de coleta. Foram observadas, em cada célula, as ocorrências de divisão, de alterações cromossômicas e calculado o percentual de índice mitótico (IM) (PIRES *et al.*, 2001).

Para o presente estudo, não foi realizada a remoção das lamínulas após o processo de preparo das lâminas, conforme Oliveira *et al.* (2011) haviam descrito, pois a análise foi feita a fresco.

da em um fluxo aproximado de 6 mL.min⁻¹. Após a eluição da água, o analito de interesse foi extraído passando-se 6 mL de metanol grau HPLC para tubos de ensaio.

Os extratos coletados nos tubos foram secos sob um fluxo suave de nitrogênio e em seguida foram reconstituídos com 1 mL de metanol grau HPLC. Após reconstituição, o extrato foi analisado utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Shimadzu com detector UV-VIS-DAD no comprimento de onda de 274 nm; coluna cromatográfica Allcrom 5 µ C18 (2) 100 Å com comprimento igual a 250 mm; fase móvel 30% metanol: 70% água com fluxo de 1 mL.min⁻¹.

Soft Inc. — programa de análise estatística, Versão 2009. Os dados (divisão celular, índice mitótico e

Tabela 1 – Localização dos pontos de coleta de água do Rio Passaúna.

Pontos	Latitude SUL	Longitude OESTE	Localização
1	25°21'9,18"	49°20'18,10"	Situado a montante da Lamenha Pequena
2	25°21'2,12"	49°20'16,77"	Situado a jusante do Aterro Sanitário da Lamenha Pequena
3	25°22'57,11"	49°21'32,10"	Próximo à estrada do Cerne
4	25°25'39,00"	49°23'19,90"	Próximo à ponte da BR 277 que cruza o Rio Passaúna
5	25°27'22,25"	49°22'55,56"	Próximo à entrada do Reservatório do Passaúna

índice de aberração cromossômica) foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi aplicado o teste para análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Fisher para avaliação tanto do índice mitótico como de divisão

celular. O índice de aberração cromossômica foi submetido ao teste de Kruskal-Wallis. As concentrações de cafeína e os índices de aberração cromossômica foram submetidos ao teste de correlação de Pearson ($p = 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organismos (*Allium cepa*) submetidos a todas as amostras de água coletadas no Rio Passaúna apresentaram mais células em prófase do que em intérfase, da mesma forma que o observado no controle negativo (branco). Os resultados das contagens de células de organismos *Allium cepa* expostos às amostras de água coletadas no mês de outubro, para todos os pontos de análise do Rio Passaúna, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre prófase e intérfase com relação aos outros meses, conforme observado na Tabela 2.

Os organismos submetidos às amostras coletadas no mês de outubro apresentaram aumento significativo, em relação ao controle, para o número de células em anáfase e telófase. Este crescimento pode indicar a presença de substâncias que possuem a capacidade de favorecer o aparecimento de tumores, confirmando o observado para a elevação do IM (Tabela 3).

No presente estudo, observou-se uma redução do IM (Tabela 3) nas raízes dos organismos que cresceram em contato apenas com as amostras do Passaúna coletadas nos pontos 1 e 2, no mês de novembro, o que indica a presença de poluente(s) citotóxico(s) nas águas analisadas. Já os organismos submetidos às amostras coletadas nos pontos 1, 2, 3 e 5, no mês de outubro, tiveram IM superiores aos do grupo controle, o que pode sugerir a presença de poluente(s) aquático(s) potencialmente indutor(es) do crescimento desordenado de células (CASTRO & SOUSA *et al.*, 2017). Além disso, o número de células dos organismos expostos às amostras coletadas no mês de outubro foi estatisticamente diferente do identificado para os mesmos pontos em outros meses, sendo possível perceber números maiores de células em divisão para amostras coletadas nesse mês.

Alterações no IM de *Allium cepa* submetido a águas de rios no Brasil também foram observadas por outros autores. Tais rios apresentavam-se impactados em decorrência do uso do solo, devido, por exemplo, a lançamento de efluentes industriais (CASTRO & SOU-

SA *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2011; PERON *et al.*, 2009), agricultura (PERON *et al.*, 2009) e lançamento de esgoto doméstico (OLIVEIRA *et al.*, 2011; AMARAL *et al.*, 2007), de forma semelhante ao uso da bacia do Rio Passaúna.

Similar ao observado no presente trabalho, quando organismos *Allium cepa* foram expostos a amostras de água do Rio Passaúna, coletadas no mês de outubro, Amaral *et al.* (2007) identificaram o potencial de amostras de água coletadas no Rio Tapanhon (Pindamonhangaba-SP) em induzir aumento no IM desse organismo quando comparado ao controle negativo. Tais autores relacionaram o estímulo à mitose com a possibilidade de ocorrência de substância(s) no corpo hídrico receptor, passíveis de causar efeitos genotóxicos em organismos.

Já em novembro, nos organismos submetidos às amostras coletadas nos pontos 1 e 2, foram observados resultados contrários a outubro. Ocorreu uma diminuição no IM, o que pode representar uma maior concentração de agentes químicos citotóxicos nestes pontos. Segundo Smaka-Kincl *et al.* (1996), o nível de citotoxicidade das águas contaminadas pode ser determinado pela taxa de redução do IM em relação ao controle negativo. A presença de metais pesados, como alumínio, também pode causar efeitos citotóxicos (CASTRO & SOUSA *et al.*, 2017).

A redução no IM pode estar relacionada aos processos de eutrofização que se acentuam em épocas de pouca chuva, conforme descrito por Peron *et al.* (2009), quando avaliaram a qualidade do Rio Pirapó (Apucarana-PR). Essa relação não pode ser aplicada ao presente estudo, pois o mês de novembro apresentou índice pluviométrico de 200 mm, de modo que foi descartada a influência de possíveis processos de eutrofização. Sendo assim, os resultados sugerem que esses pontos receberam algum tipo de descarte que continha substâncias capazes de provocar efeitos citotóxicos no organismo teste.

Ferreira *et al.* (2012), ao avaliarem a citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), observaram que não houve alterações estatisticamente significativas, nos IM de *Allium cepa* submetidos às amostras de

água de ambos os locais. Assim como descrito para a bacia do Rio Passaúna, as regiões estudadas por Ferreira *et al.* (2012) abrigam empresas do setor industrial e recebem lançamentos de efluentes industriais e domésticos.

Tabela 2 – Contagem de células (média ± desvio padrão) das amostras analisadas durante o período de outubro de 2014 a janeiro de 2015.

Ponto de coleta	Mês	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	Intérfase
Ponto 1	out.	346,22 ± 36,72 ^{*a}	21,78 ± 10,67 ^{*a}	12,11 ± 9,00 ^{*a}	15,00 ± 8,48 ^{*a}	104,89 ± 22,26 ^{*a}
	nov.	300,89 ± 14,72	16,33 ± 10,17	6,22 ± 3,80	12,33 ± 7,44	164,22 ± 22,61
	dez.	303,89 ± 36,40	13,11 ± 6,31	5,78 ± 2,33	10,33 ± 4,66	166,89 ± 34,78
	jan.	312,89 ± 32,73	10,00 ± 4,90	7,55 ± 3,16	10,56 ± 4,61	159,00 ± 32,89
Ponto 2	out.	336,11 ± 25,30 ^{*a}	16,78 ± 11,72 ^{*a}	6,67 ± 5,63 ^{*a}	13,89 ± 5,71 ^{*a}	126,55 ± 21,35 ^{*a}
	nov.	296,56 ± 23,73	16,44 ± 7,84	6,78 ± 4,46	14,67 ± 6,38	165,56 ± 31,10
	dez.	314,00 ± 29,72	14,44 ± 5,66	5,89 ± 4,14	11,89 ± 4,59	153,78 ± 26,49
	jan.	306,89 ± 25,51	15,44 ± 12,16	9,00 ± 5,87	16,56 ± 15,60	152,11 ± 33,00
Ponto 3	out.	371,00 ± 40,46 ^{*a}	14,89 ± 10,88 ^{*a}	7,00 ± 4,55 ^{*a}	10,33 ± 4,92 ^{*a}	96,78 ± 27,49 ^{*a}
	nov.	281,22 ± 29,86	22,33 ± 12,46	12,44 ± 7,33	26,11 ± 14,64	157,89 ± 17,42
	dez.	335,33 ± 35,92	10,33 ± 4,77	4,44 ± 2,40	7,33 ± 3,57	142,56 ± 31,60
	jan.	324,78 ± 33,46	10,89 ± 5,97	4,67 ± 2,18	10,78 ± 1,85	148,89 ± 34,29
Ponto 4	out.	312,67 ± 38,60 ^{*a}	20,55 ± 7,37 ^{*a}	9,00 ± 3,60 ^{*a}	17,11 ± 5,30 ^{*a}	140,67 ± 42,28 ^{*a}
	nov.	298,67 ± 41,29	23,22 ± 21,27	9,44 ± 8,53	20,22 ± 12,23	148,00 ± 37,32
	dez.	329,22 ± 28,72	9,44 ± 5,81	3,77 ± 3,03	7,33 ± 3,42	150,22 ± 25,20
	jan.	323,56 ± 20,10	10,00 ± 4,69	4,56 ± 2,60	8,56 ± 3,94	153,33 ± 17,89
Ponto 5	out.	304,55 ± 29,92 ^{*a}	48,22 ± 16,67 ^{*a}	15,44 ± 6,58 ^{*a}	18,11 ± 10,59 ^{*a}	113,67 ± 22,98 ^{*a}
	nov.	280,33 ± 37,82	34,77 ± 18,16	19,33 ± 12,71	22,22 ± 12,55	143,33 ± 17,83
	dez.	325,78 ± 21,81	16,89 ± 5,80	8,89 ± 3,92	8,78 ± 1,92	139,67 ± 18,99
	jan.	332,78 ± 26,00	7,33 ± 5,24	3,33 ± 1,66	7,00 ± 4,06	149,56 ± 25,12
Controle Negativo	out.	305,22 ± 33,05	19,00 ± 13,75	10,11 ± 5,84	10,44 ± 7,90	155,22 ± 46,48
	nov.	337,78 ± 34,13	12,11 ± 6,60	6,56 ± 6,06	12,00 ± 8,54	131,56 ± 18,74
	dez.	327,11 ± 15,23	11,22 ± 6,92	5,44 ± 3,28	11,22 ± 4,49	145,00 ± 19,50
	jan.	320,22 ± 33,63	7,56 ± 3,91	5,44 ± 5,27	7,11 ± 3,52	159,67 ± 32,54

*significativamente diferente do controle ($p < 0,05$); ^asignificativamente diferente dos meses de novembro, dezembro e janeiro.

Tabela 3 – Índices mitóticos em porcentagem, índices de aberrações cromossômicas em porcentagem das amostras analisadas durante o período de outubro de 2014 a janeiro de 2015 e do controle negativo. Concentração ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de cafeína obtida para os pontos estudados durante o período de outubro de 2014 a dezembro de 2014.

Ponto de coleta	Mês	IM	IAC	Concentração de cafeína
Ponto 1	out.	79,02 \pm 4,45 ^{*abc}	0,13 \pm 0,07 [*]	0,193
	nov.	67,16 \pm 4,52 [*]	0,04 \pm 0,08 [*]	< LQ
	dez.	66,62 \pm 6,96	0,00 \pm 0,00	0,137
	jan.	68,20 \pm 6,58	0,07 \pm 0,07 [*]	n.a.
Ponto 2	out.	74,69 \pm 4,27 ^{*abc}	0,02 \pm 0,04 [*]	0,132
	nov.	66,89 \pm 6,22 [*]	0,07 \pm 0,00 [*]	< LQ
	dez.	69,24 \pm 5,29	0,04 \pm 0,04 [*]	0,208
	jan.	69,58 \pm 6,59	0,09 \pm 0,10 [*]	n.a.
Ponto 3	out.	80,64 \pm 5,49 ^{*abc}	0,11 \pm 0,04 [*]	0,164
	nov.	68,42 \pm 3,48	0,09 \pm 0,04 [*]	0,435
	dez.	71,49 \pm 6,32	0,16 \pm 0,10 [*]	0,175
	jan.	70,22 \pm 6,86	0,04 \pm 0,04 [*]	n.a.
Ponto 4	out.	71,87 \pm 8,46 ^{abc}	0,00 \pm 0,00	0,257
	nov.	70,36 \pm 7,46	0,07 \pm 0,07 [*]	0,118
	dez.	69,96 \pm 5,04	0,02 \pm 0,04 [*]	0,020
	jan.	69,33 \pm 3,58	0,02 \pm 0,04 [*]	n.a.
Ponto 5	out.	77,27 \pm 4,59 ^{*abc}	0,11 \pm 0,04 [*]	0,190
	nov.	71,33 \pm 3,57	0,07 \pm 0,07 [*]	0,075
	dez.	72,07 \pm 3,79	0,02 \pm 0,04 [*]	< LQ
	jan.	70,09 \pm 5,02	0,04 \pm 0,04 [*]	n.a.
Controle Negativo	out.	68,96 \pm 9,29	00,00 \pm 0,00	n.a.
	nov.	73,69 \pm 3,75	00,00 \pm 0,00	n.a.
	dez.	71,00 \pm 3,90	00,00 \pm 0,00	n.a.
	jan.	68,07 \pm 6,51	00,00 \pm 0,00	n.a.

< LQ: abaixo do limite de quantificação; n.a.: não analisado; ^{*} diferente do controle; ^a diferente entre os meses no mesmo ponto; ^b diferente entre os pontos no mesmo mês; ^c diferente entre os meses e os pontos. IM: índices mitóticos; IAC: índices de aberrações cromossômicas.

Além dos efeitos citotóxicos verificados no presente estudo, também foram observadas alterações cromossômicas nas células avaliadas para os organismos sub-

metidos às amostras de água do Passaúna. Foram observados cinco tipos de aberrações cromossômicas (AC) em *Allium cepa* decorrentes da exposição à água do Rio

Passaúna: anáfase com perda de cromossomo, C-metáfase (Figura 2A), anáfase com ponte, metáfase aderido e metáfase com perda de cromossomo. No controle negativo, não foram encontradas aberrações (Figura 2B).

Segundo Castro e Sousa *et al.* (2017) e Souza *et al.* (2013), a identificação de AC poderia sugerir a ocorrência de contaminação por substâncias genotóxicas nas amostras avaliadas em seu ensaio.

Os resultados obtidos para as AC corroboram com os estudos de Castro e Sousa *et al.* (2017) e Oliveira *et al.* (2011), sobre o potencial mutagênico dos poluentes nas águas dos rios Guaribas (Piauí) e Paraíba do Sul (São Paulo), respectivamente. Os autores sugeriram que estas aberrações indicam o potencial mutagênico de substâncias nocivas aos organismos que vivem no ambiente e que podem variar de acordo com o tempo, sazonalidade, vazão do corpo hídrico e índice de chuva. O presente

estudo, ao analisar amostras de água do Rio Passaúna, não obteve resultados de aberração com diferença significativa entre os meses avaliados.

Os índices de chuva para o período de outubro a dezembro na região do Rio Passaúna não apresentaram grande variação (120 e 160 mm, respectivamente). O maior índice pluviométrico foi observado para o mês de janeiro (180 mm), porém não foi possível estabelecer uma relação com os resultados observados para o número de aberrações encontradas, conforme sugerido por Oliveira *et al.* (2011).

Amostras de água coletadas no ponto 3 ocasionaram maior variedade de tipos de AC nas raízes de *Allium cepa* (Figura 2B). Em todos os pontos foram observadas AC do tipo anáfase com ponte e anáfase com perda de cromossomo, que indicam a presença de substâncias com atividade clastogênica (SEOANE & DULOUT, 1999).

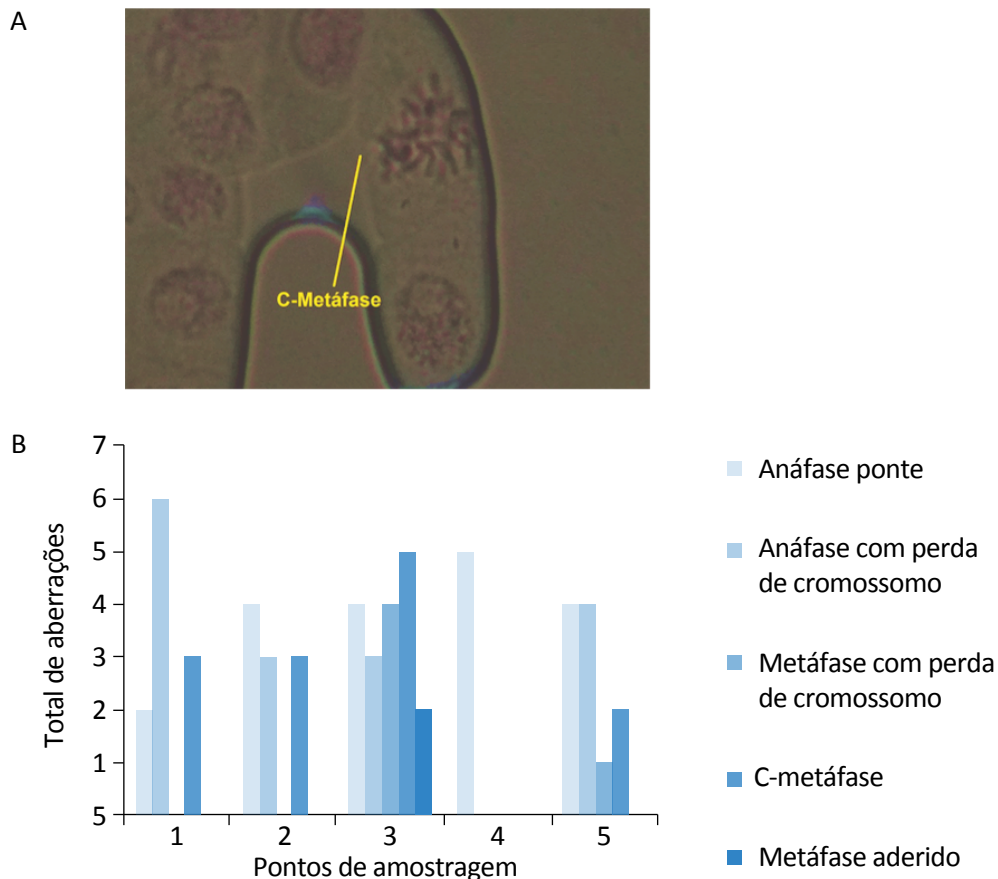


Figura 2 – (A) C-metáfase induzida em células de raízes de *Allium cepa* pela amostra de água superficial coletada no dia 21/10/2014 no ponto 1 estudado; (B) número total de aberrações cromossômicas observadas para os tratamentos em 18.000 células analisadas.

Os demais pontos também apresentaram AC, prevalecendo as em anáfase, o que pode estar relacionado às alterações observadas no mês de outubro, no tocante ao maior número de células em anáfase.

Organismos submetidos a efluentes coletados em duas estações de tratamento de esgoto, em diferentes estados da Índia (Saharanpur e Aligarh), tiveram seus IM reduzidos quando comparados ao controle negativo, além de apresentarem AC como pontes cromossômicas, cromossomos aderidos, quebra e fragmentação (TABREZ & AHMAD, 2011), em consonância aos resultados encontrados nos pontos 1 e 2 do Rio Passaúna, no mês de novembro do presente estudo.

No Rio Tapanhon, em Pindamonhangaba, São Paulo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras quando comparadas entre si em relação às AC; porém, células aberrantes foram observadas em todos os tratamentos, apresentando resultados estatisticamente significativos quando comparados ao controle. As aberrações mais frequentes ocasionadas em *Allium cepa* por exposição às águas desse rio foram cromossomos aderidos, pontes, desgarrados, C-mitoses e, em menor frequência, anáfases multipolares (AMARAL *et al.*, 2007).

Em outro estudo empregando *Allium cepa* como organismo-teste (BIANCHI *et al.*, 2011), amostras de água coletadas no Rio Monjolinho, quando coletadas no verão interferiram na divisão celular das raízes, induzindo alterações como AC, micronúcleos e alterações no IM em pelo menos um dos pontos estudados. Os autores identificaram que, no inverno, os resultados das AC e IM não foram diferentes dos observados no controle negativo. No outono, houve presença significativa de AC em um dos pontos. Já na primavera, todas as amostras de água apresentaram potencial para inibir a divisão celular. Os resultados de Bianchi *et al.* (2011) corroboram com os observados nos organismos submetidos às amostras coletadas nos pontos 1 e 2 no mês de novembro, cujo IM apresentou-se alterado em comparação ao controle.

As diferenças observadas na Figura 2 não corroboram os resultados mostrados no Índice de Aberrações Cromossômicas (IAC) (Tabela 3), segundo o qual não houve diferença significativa entre os pontos avaliados; ou seja, embora as amostras do ponto 3 tenham causado maior número de tipos de AC ao organismo teste, o IAC não foi diferente dos demais pontos.

Os resultados do IAC demonstram que, com exceção dos organismos submetidos às amostras coletadas no ponto 1, em dezembro, e no ponto 4, em outubro, todos os outros tiveram resultados significativamente diferentes do controle. Apesar de não haver diferença estatística entre os pontos, os organismos submetidos à amostra coletada no ponto 3 apresentaram uma tendência em ter um IAC maior do que os de outros pontos. Essa tendência pode ser melhor visualizada com o maior número de AC observadas para esse ponto.

Em relação à cafeína, as concentrações no presente estudo (Tabela 3) estão abaixo daquelas encontradas na literatura para outros rios na cidade de Curitiba: Atuba, Palmital, Iguaçu, Iraí, Pequeno, Itaqui (IDE & ARTIGAS, 2011) e Barigui (FROEHNER *et al.*, 2011) — nesses estudos, foram encontrados valores que variaram de 608,57 a 0,228 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

A cafeína tem sido utilizada como indicador de contaminação por esgotos (FROEHNER *et al.*, 2011; PUERRI *et al.*, 2012; EDWARDS *et al.*, 2015; EKKLESIA *et al.*, 2015; KUZMANOVIC *et al.*, 2015; PHILLIPS *et al.*, 2015; SENTA *et al.*, 2015; THOMAIDI *et al.*, 2015), podendo, dessa forma, ser empregada por órgãos ambientais e companhias de saneamento como um parâmetro para verificação de ineficiência do sistema de esgotamento sanitário ou ocorrência de lançamentos clandestinos.

Froehner *et al.* (2011) encontraram uma relação positiva entre os parâmetros físico-químicos (nitrato e DBO), microbiológicos (coliformes termotolerantes) e a concentração de cafeína. Segundo os autores, tal resultado indica que a cafeína é proveniente de esgoto doméstico e efluente de estação de tratamento. Esse tipo de correlação também pode ser feito para outros parâmetros, com o objetivo de estabelecer a fonte da contaminação.

No presente estudo, a correlação entre a concentração de cafeína e o IAC apresentou-se positiva, $R = 0,504$, $p = 0,095$. O valor de R indica uma correlação moderada entre as variáveis (FIGUEIREDO FILHO & SILVA JÚNIOR, 2009), representando certa dependência entre elas. Uma correlação moderada pode sugerir que a fonte dos poluentes responsáveis por provocar as alterações na divisão celular não seja exclusivamente o lançamento de esgoto doméstico. Entre as atividades que ocorrem na região do Rio Passaúna está a mineração de pedra, areia, argila, saibro e brita (COMEC, 2012), e é sabido que metais relacionados a atividades de mi-

neração possuem atividade genotóxica quando *Allium cepa* é exposto a águas por eles contaminadas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Montagner *et al.* (2014) sugeriram a utilização da cafeína como marcador da presença de substâncias com atividade estrogênica em águas naturais. Embora ela não possua essa atividade, sua ocorrência em águas pode estar associada, porém, à presença de uma série de substâncias passíveis de exercer esse tipo de efeito sobre a biota aquática e sobre o homem. Os autores encontraram uma relação positiva entre a atividade estrogênica e a concentração de cafeína a partir de 100 ng.L⁻¹. Considerando-se, assim, as concentrações desse alcaloide encontradas no presente trabalho, em amostras de água do Rio Passaúna (Tabela 3), é possível inferir que as amostras de outubro apresentaram níveis de cafeína indicativos da provável presença de substâncias com atividade estrogênica.

As demais amostras analisadas também apresentaram concentrações compatíveis com a presença de substâncias com atividade estrogênica, com exceção dos pontos 1, 2 e 5, em novembro, e dos pontos 4 e 5, em dezembro. Quando presente na água de rios, a

cafeína costuma estar associada a outras substâncias que também possuem atividades citotóxicas e genotóxicas, como, por exemplo, anti-inflamatórios e bisfenol A (FROEHNER *et al.*, 2011; PUERARI *et al.*, 2012; EDWARDS *et al.*, 2015; EKKLESIA *et al.*, 2015; KUZMANOVIC *et al.*, 2015; PHILLIPS *et al.*, 2015; SENTA *et al.*, 2015; THOMAIDI *et al.*, 2015).

Os resultados obtidos no presente estudo, alinhados aos de outros autores aqui apresentados, reforçam a necessidade de medidas estruturais no Brasil quanto às deficiências sanitárias, para que possam ser minimizados os riscos ante a presença de micropoluentes em ecossistemas aquáticos. Nesse contexto, os sistemas de coleta e tratamento de esgoto, principalmente doméstico, precisam de maior atenção do poder público, para que os mananciais possam ser protegidos. Trabalhos que utilizaram *Allium cepa* como organismo teste para averiguar a qualidade de água de rios, de norte a sul do Brasil (CASTRO & SOUZA *et al.*, 2017; AMARAL *et al.*, 2007) corroboram o observado no estudo de caso na bacia do Passaúna, demonstrando, de maneira conjunta, a potencialidade do uso da técnica para auxiliar nas tomadas de decisão para proteção dos mananciais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos possibilitaram estabelecer uma correlação moderada entre a toxicidade e a concentração de cafeína. Para testar se essa ligação é realmente apenas moderada, é necessário que sejam elaborados novos estudos considerando rios mais e menos poluídos que o Passaúna.

Em função dos resultados obtidos, não é possível descartar uma análise em relação a outra. Mas, as análises de genotoxicidade e presença de cafeína podem ser ferramentas úteis para o monitoramento e gerenciamento da bacia, por demonstrarem de forma mais clara que os impactos sofridos pelo rio vão além da presença de cepas de bactérias multirresistentes a antibióticos.

O presente estudo demonstra o contínuo processo de degradação da qualidade da água do Rio Passaúna e a

presença de substâncias que provocam efeitos citotóxicos e genotóxicos como preocupante, por se tratar de substâncias não removidas pelo tratamento convencional de água para abastecimento público.

A partir dos resultados obtidos, sugere-se aos órgãos públicos responsáveis a adoção de medidas de saneamento, como a ampliação da rede coletora de esgotos e a fiscalização em empresas da bacia hidrográfica do Passaúna, a fim de minimizar os lançamentos de efluentes sem os devidos tratamentos. Faz-se necessário, também, que o poder público adote medidas para que as leis de uso e ocupação do solo sejam cumpridas, e crie programas de educação ambiental para sensibilizar e conscientizar a população.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Positivo pelo apoio financeiro e bolsa de estudo concedida à aluna de mestrado Giuliana Pixier.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do Rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 20, n. 1-2, p. 65-72, 2007.
- BARBOSA, J. S. *Análise da genotoxicidade das águas da lagoa de Extremoz-RN*. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.
- BIANCHI, J.; ESPINDOLA, E. L. G.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 74, p. 826-833, 2011.
- BOCALON, T. S. *Estudos de sedimentos do Rio Passaúna, com ênfase na determinação de metais pesados*. 99f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Positivo, Curitiba, 2007.
- BRUNKOW, R. F.; XAVIER, C. F.; DIAS, L. N.; DOMINGUES, L. L.; WOSIACK, A. C.; SANTANA, S. S.; ANDRADE, E. F. *Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do estado do Paraná, no período de 1999 a 2004*. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004. 13 p.
- CARITÁ, 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. *Chemosphere*, v. 72, p. 722-725, 2008.
- CASTRO E SOUSA, J. M.; PERON, A. P.; SILVA E SOUSA, L.; HOLANDA, M. M.; LIMA, A. M. V.; OLIVEIRA, V. A.; SILVA, F. C. C.; LIMA, L. H. E. G. M.; MATOS, L. A.; DANTAS, S. M. M. M.; AGUIAR, R. P. S.; ISLAM, M. T.; MELO-CAVALCANTE, A. A. C.; BONECKER, C. C.; JÚLIO JUNIOR, H. F. Cytotoxicity and genotoxicity of Guaribas river water (Piauí, Brazil), influenced by anthropogenic action. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 189, p. 301, 2017.
- CHEN, Z.; PAVELIC, P.; DILLON, P.; NAIDU, R. Determination of caffeine as a tracer of sewage effluent in natural waters by on-line solid-phase extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Water Research*, v. 36, n. 19, p. 4830-4838, 2002.
- CIRCUNVIS, A. C.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. Investigação do potencial citotóxico das águas superficiais do ribeirão atlântico (Madaguaçu-PR) em *Allium cepa* L. *Saúde e Biologia*, v. 7, n. 3, p. 7-14, 2012.
- COORDENAÇÃO DA REGIÃO METROPOLITANA (COMEC). *Zoneamento da APA do Passauna*. Curitiba: Governo do Paraná, 2012. Disponível em: <http://www.aguasparana.pr.gov.br/arquivos/File/COALIAR/CTPLAN/gt_psa/2a_reuniao/Apresentacao_APA_Passauna_comec.pdf>. Acesso em: 21 ago. 2015.
- DIAS, L. N. *Estudo integrado da bacia hidrográfica do reservatório Passaúna (Araucária – Paraná – Brasil), considerando a inter-relação da ocupação dos solos com a qualidade de água*. 141f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- DÜSMAN, E.; LUZZA, M.; SAVEGNAGO, L.; LAUXEN, D.; VICENTINI, V. E. P.; TONIAL, I. B.; SAUER, T. P. *Allium cepa* L. as a bioindicator to measure cytotoxicity of surface water of the Quatorze River, located in Francisco Beltrão, Paraná, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 186, n. 3, p. 1793-1800, 2014.
- EDWARDS, Q. A.; KULIKOV, S. M.; GARNER-O'NEALE, L. D. Caffeine in surface and wastewaters in Barbados, West Indies. *Springer Plus*, v. 4, n. 1, p. 1-12, 2015.
- EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential of surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v. 30, p. 435-441, 2007.
- EKKLESIA, E.; SHANAHAN, P.; CHUA, L. H. C.; EIKAAS, H. S. Associations of chemical tracers and faecal indicator bacteria in a tropical urban catchment. *Water Research*, v. 75, p. 270-281, 2015.

- FERREIRA, A. P. Caffeine as an environmental indicator for assessing urban aquatic ecosystems. *Caderno de Saúde Pública*, v. 21, n. 6, p. 1884-1892, 2005.
- FERREIRA, C. F.; FRUEH, A. B.; DÜSMAN, E.; HECK, M. C.; VICENTINI, V. E. P. Avaliação da citotoxicidade das águas dos ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinga (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. *Saúde e Biologia*, v. 7, n. 2, p. 46-54, 2012.
- FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JÚNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de Correlação de Pearson (r). *Política Hoje*, v. 18, n. 1, 2009.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Chemosphere*, v. 102, p. 99-112, 1985.
- FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; FALCÃO, F.; MONNICH, C.; BESSA, M. Inputs of Domestic and Industrial Sewage in Upper Iguassu, Brazil Identified by Emerging Compounds. *Water Air Soil Pollution*, v. 215, n. 1-4, p. 251-259, 2011.
- GARRIDO, E.; CAMACHO-MUÑOZ, D.; MARTÍN, J.; SANTOS, A.; SANTOS, J. L.; APARICIO, I.; ALONSO, E. Monitoring of emerging pollutants in Guadiamar River basin (South of Spain): analytical method, spatial distribution and environmental risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 25127-25144, 2016.
- GONZAGA, C. A. M.; WANDEMBRUCK, A.; SEGER, C. D.; BIONDI, D. Análise paisagística da trilha recreativa do Parque Municipal do Passaúna, Curitiba, Paraná. *Cadernos da Biodiversidade*, v. 4, n. 2, p. 66-73, 2004.
- GRISOLIA, C. K.; OLIVEIRA, A. B. B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M. N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 2, p. 334-338, 2005.
- GUERRA, M.; SOUZA, M. J. *Como observar cromossomos: um guia de técnica em citogenética vegetal, animal e humana*. São Paulo: Funpec, 2002.
- IDE, A. H.; ARTIGAS, A. V. *Utilização da cafeína como traçador da atividade antrópica na bacia do Alto Iguçu*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- KUZMANOVIC, M.; GINEBRED, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. *Science of the Total Environment*, v. 503-504, p. 289-299, 2015.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. *Mutation Research*, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, v. 24, p. 471-486, 1938.
- MACHADO, K. C.; GRASSI, M. T.; VIDAL, C.; PESCARA, I. C.; JARDIM, W. F.; FERNANDES, A. N.; SODRÉ, F. F.; ALMEIDA, F. V.; SANTANA, J. S.; CANELA, M. C.; NUNES, C. R.O.; BICHINHO, K. M.; SEVERO, F. J.R. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. *Science of the Total Environment*, v. 572, p. 138-146, 2016.
- MANZANO, B. C. *Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do ribeirão Tatu, região de Limeira/SP, após o recebimento de efluentes urbanos*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2010.
- MASCHIO, Lucilene Regina. *Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas do Rio Preto na área de influência da região de São José do Rio Preto/SP*. 2009. 194 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2009. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/102733>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Toxic and genotoxic effects of trivalent and hexavalent chromium – a review. *Revista Brasileira de Toxicologia*, v. 18, p. 77-85, 2005.

MCLELLAN, S. L.; EREN, A. M. Discovering new indicators of fecal pollution. *Trends in Microbiology*, v. 22, n. 12, p. 697-706, 2014.

MENDES, B. G.; BUDZIAK, D.; STOLBERG, J.; PEIXER, Z. I.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E. L.; PEDROSA, R. C.; FELIPE, K. B.; OGAWA, J.; PEGORARO, C.; SCHEFFER, L.; BESEN, M. R.; OLIVEIRA, L. J. G. G.; GEREMIAS, R. Estudo da qualidade das águas do Rio Marombas (SC/Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e bioensaios. *Revista de Ciências Ambientais*, v. 5, n. 2, p. 43-58, 2011.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R. A.; POLETTI, P. O.; RAMOS, L. J. Adaptação da técnica de micronúcleo em *Allium cepa*, para futuras análises de mutagenicidade dos rios da região do vale do Jamari, Rondônia, Amazônia ocidental. *Pesquisa & Criação*, v. 10, n. 2, p. 181-187, 2011.

MONTAGNER, C. C.; UMBUZEIRO, G. A.; PASQUINI, C.; JARDIM, W. F. Caffeine as an indicator of estrogenic activity in source water. *Environmental Science: Processes & Impacts*, v. 16, n. 8, p. 1866-1869, 2014.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N.; PIBERNAT, C. C.; BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e Análises Físico-Químicas das águas do Rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012.

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*, v. 6, p. 90-103, 2011.

PERON, A. P.; CANESIN, E. A.; CARDOSO, C. M. V. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Porto Alegre. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 7, n. 2, p. 155-159, 2009.

PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, v. 72, p. 3-27, 2015.

PHILLIPS, P. J.; SCHUBERT, C.; ARGUE, D.; FISHER, I.; FURLONG, E. T.; FOREMAN, W.; GRAY, J.; CHALMERS, A. Concentrations of hormones, pharmaceuticals and other micropollutants in groundwater affected by septic systems in New England and New York. *Science of the Total Environment*, v. 512-513, p. 43-54, 2015.

PIRES, N. M.; SOUZA, I. R. P.; PRATES, H. T.; FARIA, T. C. L.; PEREIRA FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade peroxidase em plântulas de milho. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, Sete Lagoas, v. 13, p. 55-65, 2001.

PUERARI, L.; CARREIRA, R. S.; NETO, A. C. B.; ALBARELLO, L. C.; GALLOTTA, F. D. C. Regional Assessment of Sewage Contamination in Sediments of the Iguaçu and the Barigui Rivers (Curitiba City, Paraná, Southern Brazil) using Fecal Steroids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 23, p. 2027-2034, 2012.

RANK, J. The method of *Allium* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Ekologija*, v. 1, p. 38-42, 2003.

SANTOS, A. *Distribuição de metais no reservatório de captação de água superficial Anhumas – Américo Brasiliense – SP*. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

- SANTOS, T. C. O.; MACIEL, L. F.; LEAL, K. S.; BENDER, A. E. N.; PAIVA, T. S.; GARCAS, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G. Mutagenic potential of water from Pelotas Creek in Rio Grande do Sul, Brazil. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 3, p. 1057-1066, 2009.
- SAUNITTI, R. M.; FERNANDES, L. A.; BITTENCOURT, A. V. L. Estudo do assoreamento do reservatório da barragem do rio Passaúna-Curitiba-PR. *Boletim Paranaense de Geociências*, n. 54, p. 65-82, 2004.
- SENTA, I.; GRACIA-LOR, E.; BORSOTTI, A.; ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S. Wastewater analysis to monitor use of caffeine and nicotine and evaluation of their metabolites as biomarkers for population size assessment. *Water Research*, v. 74, p. 23-33, 2015.
- SEOANE, A. I.; DULOUT, F. N. Contribution to the validation of the anaphase-telophase test: aneugenic and clastogenic effects of cadmium sulfate, potassium dichromate and nickel chloride in Chinese hamster ovary cells. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, n. 4, p. 551-555, 1999.
- SILVA, C. C.; NASCIMENTO, F. M. Citogenotoxicidade de amostras de água do Rio Tietê em células meristemáticas radiculares de *Allium cepa*. *Atas de Saúde Ambiental*, v. 1, n. 1, 2013. Disponível em: <<http://www.revistaseletronicas.fmu.br/index.php/ASA/article/view/315>>. Acesso em: 10 jun. 2014.
- SILVA, T. F. B. X.; RAMOS, D. T.; DZIEDZIC, M.; OLIVEIRA, C. M. R.; VASCONCELOS, E. C. Microbiological quality and antibiotic resistance analysis of a Brazilian water supply source. *Water Air and Soil Pollution*, v. 218, p. 611-618, 2011.
- SIM, W.; LEE, J.; OH, J. Occurrence and fate of pharmaceuticals in wastewater treatment plants and rivers in Korea. *Environmental Pollution*, v. 158, p. 1938-1947, 2010.
- 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/Genetic Toxicology*, v. 368, p. 171-179, 1996.
- SODRÉ, F. F.; MONTAGNER, C. C.; LOCATELLI, M. A. F.; JARDIM, W. F. Ocorrência de interferentes endócrinos e produtos farmacêuticos em águas superficiais da região de Campinas (SP, Brasil). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 2, n. 2, p. 187-196, 2007.
- SOUZA, P. M. S.; CORROQUÉ, N. A.; MORALES, A. R.; MARIN-MORALES, M. A.; MEI, L. H. I. PLA and Organoclays Nanocomposites: degradation process and evaluation of ecotoxicity using *Allium cepa* as Test Organism. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 21, n. 4, p. 1052-1063, 2013.
- TABREZ, S.; AHMAD, M. Oxidative stress-mediated genotoxicity of wastewaters collected from two different stations in northern India. *Mutation Research*, v. 726, p. 15-20, 2011.
- THOMAIDI, V. S.; STASINAKIS, A. S.; BOROVA, V. L.; THOMAIDIS, N. S. Is there a risk for the aquatic environment due to the existence of emerging organic contaminants in treated domestic wastewater? Greece as a case-study. *Journal of Hazardous Materials*, v. 283, p. 740-747, 2015.
- ZARRELLI, A.; DELLAGRECA, M.; IESCE, M. R.; LAVORGNA, M.; TEMUSSI, F.; SCHIAVONE, L.; CRISCUOLO, E.; PARRELLA, A.; PREVITERA, L.; ISIDORI, M. Ecotoxicological evaluation of caffeine and its derivatives from a simulated chlorination step. *Science of the Total Environment*, v. 470-471, p. 453-458, 2014.