

**Citogenotoxicidade em corpos d'água no perímetro urbano em Rio Verde –GO
utilizando bioensaios com *Allium cepa*¹**

Karolina de Moraes Oliveira², Maria de Fátima Rodrigues da Silva³

¹Artigo apresentado à Faculdade de Engenharia Ambiental como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental, Faculdade de Engenharia Ambiental, Universidade de Rio Verde, 2014.

²Graduanda da Faculdade de Engenharia Ambiental, Universidade de Rio Verde, 2014.

E-mail: keambiental@gmail.com.

³Orientadora, Professora, Doutora da Faculdade de Biologia, Universidade de Rio Verde, 2013. E-mail: fatimars@hotmail.com

Resumo: Devido a grande carga de poluição que afeta principalmente os recursos hídricos, a preocupação de se manter um equilíbrio ecológico e a garantia da disponibilidade dos recursos naturais, este estudo teve por objetivo avaliar a citogenotoxicidade de amostras de água em dois locais do Córrego Barrinha, um deles próximo (P1) à nascente e outro no encontro com o córrego do Sapo (P2), que foram avaliados por meio do sistema teste *Allium cepa*. Bulbos de *A. cepa* foram expostos por 72 horas nas amostras. Após o período de exposição, foram preparadas lâminas contendo células meristemáticas das extremidades radiculares, a partir das quais se contabilizou a ocorrência de alterações nucleares (micronúcleos e deformações nucleares) e índice mitótico. Os índices mitóticos de P1 e P2 diferiram significativamente entre si e também do controle negativo pelo teste de Tukey. Não foi encontrado MN em nenhuma das amostras, porém foram encontradas aberrações cromossômicas em ambas amostras indicando assim o potencial citogenotóxico do Córrego Barrinha e a necessidade de uma avaliação dos possíveis efeitos negativos da biota local.

Palavras-chave: alterações nucleares, esgoto doméstico, bioindicadores, biomonitoramento, ecotoxicologia.

Abstract: Due to heavy load of pollution primarily affecting water resources, the concern to maintain an ecological balance and ensuring the availability of natural resources, this study aimed to evaluate the citogenotoxic of water samples from the stream Barry through the test system *AlliumCepa*. Bulbs of *A. Cepa* were exposed for 72 hours to water samples collected at two points of the stream within the city limits. After the exposure period, slides containing meristematic cells of root ends were prepared, from which recorded the occurrence of nuclear changes (deformations micronuclei and nuclear), and IM frequency MN. Samples P1 and P2 differ and also the negative control in relation to mitotic index. MN was not found in any sample but ACs were found in treatment with glyphosate as well as in samples of P1 and P2, thus proving the potential of citogenotoxic Stream Barry and the need for an assessment of the possible negative effects of the local biota.

Keywords: nuclear alterations, sewage, biomarkers, biomonitoring, ecotoxicology.

1 INTRODUÇÃO

A escassez dos recursos naturais desencadeou um surto de problemas ambientais e deu origem ao grande desafio dos últimos tempos, o equilíbrio ecológico e o fato dele ser um determinante de sobrevivência para todos os seres vivos e a sua direta influência na economia (GOMES,2006; HOCHSTELER, 2002).

O desenvolvimento dos centros urbanos e industriais não se baseou de uma conscientização para que se mantivesse um meio ambiente sustentável (MORAES e TUROLLA, 2004). Assim, as medidas e ações para seu equilíbrio chegaram depois que os recursos naturais já estavam comprometidos e de uma ideia errônea que trata o meio ambiente como um produto dotado de alto valor, e não da importância de sua interação social e humana (SILVA, 2008).

A resolução do CONAMA nº 357/2005 define que a água é um recurso vital e ao mesmo tempo a mais afetada pelos impactos ambientais. O comprometimento com o equilíbrio ecológico melhora sua qualidade e influencia na saúde humana, devendo sua qualidade ser avaliada não somente pelos aspectos físico-químicos, mas também por meio da utilização de bioindicadores.

Goulart e Callisto (2003) mostram que a água é um dos recursos que mais tem sofrido cargas de poluição em razão da crescente atividade industrial e desenvolvimento urbano. Suas propriedades são alteradas comprometendo os ecossistemas aquáticos e saúde pública e a legislação vigente ainda não contempla uma efetiva proteção dos recursos hídricos.

Moraes e Turolla (2004) afirmam também que entre os maiores problemas está a poluição dos recursos hídricos oriundos das atividades agrícolas e poluição por esgoto doméstico.

Dados da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) mostram que em 2008 somente metade dos municípios brasileiros dispõe do serviço de esgotamento sanitário por rede coletora, isto sem considerar a eficiência e qualidade desses sistemas (IBGE, 2008).

O Censo agropecuário 2006 ainda destacou que é insignificante a quantidade de práticas alternativas de controle de pragas e doenças para minimizar a utilização de defensivos agrícolas (IBGE, 2010). Gomes e Barizon (2014) alertam que “ainda que se encontrem taxas baixas de agrotóxicos nas diversas regiões sendo no solo ou água, o risco de contaminação ainda é real devido os biomas e ecossistemas serem sensíveis.”

Diante da necessidade de um monitoramento dos recursos hídricos e investigações para que se consiga manter o padrão estabelecido na legislação, a resolução sugere que os ensaios toxicológicos, ecotoxicológicos e outros métodos cientificamente conhecidos são muito recomendados como ferramentas poderosas para este tipo de análises (CONAMA, 2005).

O sistema teste utilizando *Allium cepa* (cebola comum) é uma planta superior e representa um excelente modelo genético para a realização de análises de poluentes ambientais. Esta planta apresenta características como alta sensibilidade para detectar agentes mutagênicos no meio ambiente; são de fácil observação os danos no seu ciclo mitótico e número reduzido de cromossomos ($2n=16$) (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

O sistema teste utilizando *Allium cepa* é sugerido por Fiskesjo (1985) e iniciado por Levan (1938), quando avaliou os efeitos da Colchicina nas raízes de *A. Cepa*, como modelo de monitoramento ambiental sendo um determinador de potencial genotóxico de cursos d'água que possuam, por exemplo, misturas complexas industriais e urbanas. Além de ser de baixo custo, simples e eficiente, seus resultados tem uma boa correlação com testes em células de mamíferos, assim sua resposta aos testes podem traduzir resultados relevantes à integridade do meio ambiente (FISKESJO, 1985; CHAUHAN, 1999; ARRAES e LONGHIN, 2012).

Esses testes se baseiam nas respostas dos organismos em seus sistemas biológicos, mediante a variados tipos de exposições observando os efeitos destes (GALVAN, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral foi investigar o potencial citotóxico das águas no perímetro urbano da cidade de Rio Verde-GO, por meio do bioindicador *Allium cepa*.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- a) Determinar o índice mitótico em mil células dos meristemas radiculares de *Allium cepa* desenvolvidos em amostras de água do córrego Barrinha;
- b) Avaliar as variações no índice mitótico em células meristemáticas de *Allium cepa*;

c) Identificar e quantificar alterações mitóticas como C-metáfase, anáfases com pontes ou atrasos, fragmentos de cromossomos, núcleos disformes, brotamento nuclear e cromossomos aderentes, células binucleada sem células meristemáticas de *Allium cepa*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização e caracterização da área de estudo

O Município de Rio Verde está inserido no bioma cerrado e tem por sua maior atividade o agronegócio, sendo um dos maiores produtores de grãos do Estado de Goiás e tem por esta sua principal atividade e base da economia (BARRETO, 2007). Seu clima é considerado tropical, sendo uma estação chuvosa no verão (outubro a abril) e um período mais seco durante o inverno (maio a setembro) e possui uma média pluvial de 1.550 mm ano⁻¹. A temperatura média anual esta em 23,3 ° C. (NETO et.al, 2011).

As amostras foram coletadas em dois pontos no córrego Barrinha (Figura 1), localizado no perímetro urbano de Rio Verde. Sendo um próximo à nascente (P1) e o outro no encontro do córrego Barrinha com o Córrego do Sapo (P2), após receber esgotos de um dos bairros da cidade pela extensão de seu percurso.



Figura 1 – Imagem de satélite dos pontos de coleta de amostras de água sendo localizados os pontos 1 e 2. Locais situados no perímetro urbano de Rio Verde – GO. Fonte: INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais), 2012.

O córrego estudado apresenta pontos sem mata ciliar e outros com a mata bastante reduzida. Foram observados pontos de descarga de esgoto clandestino e efluentes de oficinas mecânicas como graxas e óleos.

As amostras foram coletadas durante os meses de setembro a novembro, sendo assim 3 (três) coletas no P1 e 3 (três) do P2 (Figura 2). As coletas foram realizadas em frascos de polietileno e encaminhadas imediatamente para análise. Antes da coleta, os frascos foram enxaguados na água do local.



Figura 2 – Locais de coleta de amostras de água. **A:** próximo a nascente (P1) no Córrego Barrinha. **B:** P2 encontro do Córrego Barrinha em seu percurso final e Córrego Sapo. **C:** Trecho canalizado do Córrego Abóbora. **D:** Imagem da nascente. Locais situados no perímetro urbano de Rio Verde – GO. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

4 BIOENSAIOS

O delineamento experimental seguiu conforme descrito por Fiskesjo (1989). Foram utilizados 10 (dez) bulbos de *A. Cepa* (Figura 3) para cada amostra coletada e para os controles negativos e positivos. Como controle negativo (CN), foi utilizada água destilada.

Foram utilizados dez bulbos para o tratamento com 50 μ /L do inseticida Glifosato diluídos em água destilada para observação de possíveis aberrações cromossômicas.

O Glifosato é utilizado pela sua eficiência na eliminação de ervas daninhas. É classificado como de toxicidade baixa, porém em grandes concentrações podem comprometer a saúde de ecossistemas, sendo os mais sensíveis os aquáticos (AMARANTE JUNIOR, 2002).

Os bulbos foram selecionados e preparados retirando-se os contaminados com fungos, folhas secas, retirada das raízes, mantendo o anel de primórdios radiculares. Foram selecionados bulbos de 2,0 cm (dois centímetros) de diâmetros colocados em água destilada durante 24 horas em temperatura ambiente, para estimular o desenvolvimento do meristema radicular. Após este período, os bulbos foram colocados no material a ser testado por um período de 72 horas.

Após o período de exposição, os bulbos com menor desenvolvimento radicular em cada tratamento e nos controles foram descartados.



Figura 3 – Imagem de bulbos com as raízes colocados em Erlenmeyer no tratamento com a água do Ponto 1. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

4.1 Coleta e fixação das raízes

Após o período de exposição, os bulbos de cebola foram retirados das amostras testes e foram coletadas cerca de 8 a 10 raízes de cada bulbo e fixadas em Carnoy, durante aproximadamente 6 horas e armazenadas em etanol 70% a 4°C para posterior preparação e observação de lâminas.

4.2 Preparo das lâminas

Em relação às lâminas, as raízes foram retiradas do etanol 70%, lavadas em água destilada, submetidas à hidrólise ácida com HCl 1N durante 8 (oito) minutos à temperatura ambiente, lavadas novamente em água destilada, coradas durante dois minutos em orceína-acética 1% e então, preparadas em uma lâmina de citologia através de esmagamento manual.

Foram preparadas 10 (dez) lâminas, sendo uma lâmina para cada bulbo contendo uma raiz cada uma e foi estimado o número de micronúcleos em 1.000 (mil) células e o número de anormalidades (cromossomos retardatários, pontes cromossômicas, fragmentos, células trinucleadas, binucleadas e brotamentos) em 100 (cem) anáfases-telófases.

4.3 Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação de efeitos citotóxicos, o parâmetro analisado foi o índice mitótico (IM).

A coleta de imagens e contagem de células foram feitas no sistema de captura de imagens do microscópio.

O índice mitótico será determinado pela equação: $IM = NCM/NTC \times 100$, em que NCM corresponde ao número de células em mitose e NTC ao número total de células analisadas. Foram analisadas 1000 (mil) células por tratamento, sendo para cada tratamento dez lâminas e 100 (cem) células por lâmina.

4.5 Análise da Genotoxicidade

As análises das atividades genotóxicas foram feitas por meio da investigação de anormalidades cromossômicas (AC) nas células de raízes. Foram analisadas 1000 (mil) células por tratamento, sendo para cada tratamento dez lâminas e 100 (cem) células por lâmina. Estes efeitos foram verificados por meio de irregularidades em metáfases, como: aderência, perdas, C-metáfase; em anáfase, como desorganização, multipolares, com pontes, células em brotamento, perdas, atrasos cromossômicos, células com fragmentos cromossômicos, células portadoras de micronúcleo e células multinucleadas.

4.6 Análise estatística

Os resultados do índice mitótico foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$, para indicar o valor significativo. As lâminas portadoras das alterações mais representativas, para cada anormalidade, foram fotos documentadas, para ilustrar os resultados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O córrego Barrinha apresenta uma série de problemas em seu trajeto, como casas construídas na nascente, erosões, despejo de lixo, esgoto clandestino, demonstrando a utilização inadequada deste curso d'água.

Os tratamentos e os resultados do índice mitótico (IM) analisados em 1.000 (mil) células meristemáticas de *A. cepa* em cada coleta estão apresentados na Tabela 1. Neste teste observa-se aumento significativo do IM em ambos os pontos, quando comparados ao controle. No ponto 1, a média foi de aproximadamente 17,0 e no ponto 2 a média foi 36,3. O controle negativo (CN), feito com água destilada, teve IM aproximadamente igual a 7,5.

Os tratamentos em P1 e P2 diferiram significativamente entre si indicando a diferença na composição ou concentração dos efluentes despejados no P2. O aumento do IM em amostras contaminadas por esgotos domésticos também foi observado por Amaral et. al., (2007) em estudo realizado no Rio Tapanhon em São Paulo em que o índice mitótico indicou a estimulação de mitoses.

Machado (2013) também observou em seu estudo um aumento do índice mitótico em suas amostras coletadas no sistema separador de água e óleo no Terminal Almirante Soares Dutra, próximo à cidade de Tramandaí (RS), o que também concluiu uma influência negativa deste aumento na quantidade de células.

Segundo Leme e Marin (2009, p. 5), a diferença significativa do índice mitótico menor do que o controle resulta em alterações devido à influência de compostos químicos e ao passo que um índice mitótico maior desencadeia um desordenado crescimento das células que podem levar a formação de tumores.

O índice mitótico do ponto 1 foi menor que o do ponto 2 e diferiram também significativamente entre si. As amostras de águas de ambos os pontos estão sujeitas ao descarte de efluentes domésticos e resíduos de oficinas mecânicas, como graxas e óleos, sendo o Ponto 2 do córrego o maior receptor em todo seu perímetro devido às descargas pontuais de efluentes de esgoto doméstico clandestino. De acordo com Azevedo (1998), o

lançamento de esgoto doméstico gera um enriquecimento de fósforo e nitrogênio que diminui OD (Oxigênio dissolvido) nos cursos d'água e compromete assim os ecossistemas aquáticos.

Os resultados do índice mitótico (IM) de células meristemáticas de *A. cepa* comparados entre os meses de coleta, não apresentam diferenças significativas.

Tabela 1- Avaliação do Índice Mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às amostras de água do Córrego Barrinha, Rio Verde GO.

Tratamento	mês	IM(%)
P1 Média e DP	set/14	15,57
	out/14	18,41
	nov/14	16,72
		16,9 ± 1,43 b
P2 Média e DP	set/14	34,63
	out/14	34,58
	nov/14	39,64
		36,28±2,9 c
Controle negativo (Água Destilada)	set/14	7,26
	out/14	7,4
	nov/14	7,8
		7,7± 0,67 a

Médias seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)
CV= 9,09

Está apresentada na tabela 2 a quantidade de aberrações cromossômicas encontradas nas amostras. O número de alterações representa a quantidade em 1000 (mil) células observadas por tratamento. O agrotóxico glifosato foi utilizado como um controle positivo por seus efeitos citogenotóxico ter sido demonstrado por Krüger, (2009). Este apresentou 38 (trinta e oito) aberrações cromossômicas de diferentes tipos como micronúcleo, metáfases desorganizadas, brotamento nuclear e células binucleadas. O controle negativo sendo a água destilada (CN), não apresentou nenhum tipo de alteração. A quantidade de alterações totais observadas no Ponto 2 (n=12) foram maiores que a do Ponto 1 (n=9).

Não foram encontrados micronúcleos (MNC) nas amostras coletadas. Os resultados de Amaral et. al. (2007) também não apresentaram frequência de MNC, mas se mostrou alterados os outros parâmetros os quais provaram o potencial citogenotóxico em seu local coletado.

Resultados semelhantes foram encontrados por Alvim et al. (2011), quando utilizaram o esgoto bruto obtendo maior taxa de alterações cromossômicas em relação ao controle negativo onde utilizou água ultrapura. Dados do estudo de Ukaegbu e Odeigah (2009), também encontraram um aumento de aberrações cromossômicas à proporção que aumentaram a concentração de efluentes em suas amostras.

Alterações similares também foram encontradas por Maziviero (2011), onde foram identificados alguns tipos de aberrações cromossômicas.

Tabela 2- Alterações cromossômicas de células meristemáticas de *Allium cepa* expostas às amostras de água do Córrego Barrinha, em Rio Verde GO.

Tratamento	Mês	Células com Aberrações cromossômicas
G (Glifosato) (CP)		
	set/14	03
	out/14	03
P1	nov/14	03
Total		09
Média e DP		03 ±00
P2		
	set/14	03
	out/14	04
P2	nov/14	05
Total		12
Média e DP		04±0,5
Agua Destilada (CN)		
	set/14	00
	out/14	00
	nov/14	00

Na figura 4 estão apresentados os tipos de aberrações cromossômicas encontradas nos diferentes tratamentos analisados.

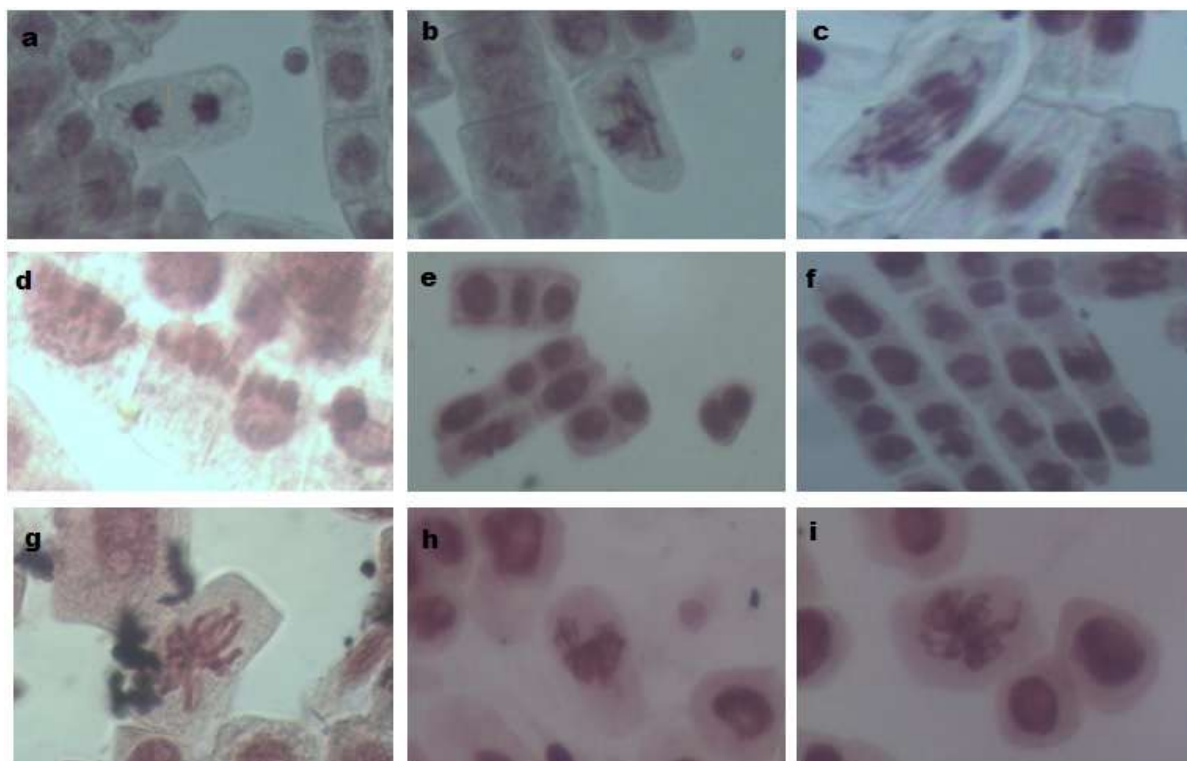


Figura 4 – Aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas expostas aos tratamentos. **a:** telófase com fragmentos; **b:** cromossomos atrasados; **c:** anáfase com pontes e fragmentos; **d:** brotamentos; **e:** células binucleadas; **f:** núcleos com brotos; **g:** metáfase desorganizada; **h:** metáfase desorganizada com perdas; **i:** metáfase desorganizada com perdas. Fonte: arquivo pessoal, 2014.

Em seu trabalho, Belcavello (2012) explana que efeitos aneugênicos e mutagênicos são identificados em células com aberrações na metáfase (c-metáfase, aderências), na anáfase (anáfases multipolares, pontes e atrasos), alterações na telófase (pontes e atrasos), células binucleadas, perdas cromossômicas, micronúcleos e quebras cromossômicas, assim como foram encontrados nas avaliações das células no presente estudo.

CONCLUSÃO

O sistema teste de *Allium cepa* se apresentou como método eficiente de avaliação da citogenotoxicidade de amostras de água do Córrego Barrinha.

Os resultados apontam a existência de efeitos citogenotóxicos a partir de amostras de água coletadas principalmente no ponto de encontro entre os córregos Barrinha e do Sapo. O índice mitótico apontou estimulação das mitoses indicando a eutrofização do local.

Foi observado que as águas do córrego Barrinha apresentaram potencial citogenotóxico devido às alterações no índice mitótico nos pontos coletados e a presença de aberrações cromossômicas nas células analisadas.

Devido à importância em se preservar os recursos naturais são necessários estudos de biomonitoramento para contribuir com ações que promovam o uso adequado dos recursos hídricos da região e a garantia da integridade do ecossistema ali presente.

REFERÊNCIAS

ALVIM, Luige Biciati et al. **Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa***. L. Revista Ambiente & Água- Na Interdisciplinary Journal of Applied Science: v. 6, n. 2. 2, 2011.

AMARAL, Alexandre de Moraes et al. **Avaliação Preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium cepa*** (*Allium cepa*). Revista Brasileira de Toxicologia 20, n.1 e 2 (2007) 65-72.

AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de et al. **Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação**. Química Nova: São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ARRAES, Aliny Inocência Oliveira Melo; LONGHIN, Sandra Regina. **Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, N.14; p. - 2012.

AZEVEDO, S. M. F. O. **Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a saúde pública**. Medicina online, v. 3, n. 1, p. 1-19, 1998.

BARRETO, Clarissa de Araújo. **Agricultura e meio ambiente: percepções e práticas de sojicultores em Rio Verde-GO/ Clarissa de Araujo Barreto**. – São Paulo, 2007. 139f.: il.

BECAVELLO, Luciano et al. **Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de *Zorniadiphylla*, uma planta medicinal**. Natureza online, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, CONAMA, 2005.

CHAUHAN LKS, SAXENA PN, GUPTA SK. **Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cell of *Allium cepa***. Environ Exp Bot 42: 181-189. 1999.

FISKESJO, G. 1985. **The Allium test as a standard in environmental monitoring.**- Hereditas 102: 99-112.Lund, Sweden. ISSN 0018-0661. Received May 4, 1984.

GOMES, Daniela Vasconcellos. **Algumas considerações sobre o desenvolvimento sustentável e a necessária preocupação com os recursos naturais.**Revista de Doutrina da 4ª Região, Porto Alegre, n.14, setembro 2006. Disponível em: <http://www.revistadoutrina.trf4.jus.br/artigos/edicao014/Daniela_Gomes.htm> Acesso em: 28 out. 2014.

GOMES, Marco Antonio Ferreira; BARIZON, Robson Rolland Monticell. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de origem Agrícola no Brasil: cenário1992/2011.** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2014.

GOULART, M. e CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade da água como ferramenta de estudos de impacto ambiental.**Revista da Faculdade de Pará de Minas -FAPAM,ano 2, nº 1, 2003.

HOCHSTELER, Richard Lee. **Recursos naturais e o mercado: três ensaios.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.Publicado em 2002.

KRÜGER, Rosangela Angelise. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa*.** Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Feevale, Novo Hamburgo-RS, 2009.

MACHADO, Andressa Tworkowski. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa*.** 2013.

MAZIVIERO, Guilherme Thiago. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*.** 2011.

MORAES, Sandra Regina R.; TUROLLA, Frederico Araújo. **Visão geral dos problemas e da política ambiental no Brasil.** Informações Econômicas, São Paulo,v.34, n.4, p. 07-13, 2004.

MORAES,Thiago Vieira de et al. **Caracterização Físico-Química de dois cursos D'água de Rio Verde – GO.** Anais do VIII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde – Universidade de Rio Verde. Rio Verde, GO, 2014.

NETO, Marcos M. Siqueira et al. **Emissão de gases do efeito estufa em diferentes usos da terra no bioma Cerrado.** Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 35, n. 1, p. 63-76, 2011.

SILVA, Gilberto.**O ambientalismo tardio: A Amazônia como temática ambiental no jornalismo impresso paulista.** Dissertação [mestrado em comunicação] - Programa de Pós-Graduação em Comunicação, Faculdade Cásper Líbero. São Paulo: 2006, 175f.

UKAEGBU, Michael C.; ODEIGAH, Peter GC. **Genotoxic effects of sewage effluent on *Allium cepa*.** Reportand Opinion, v. 1, n. 6, p. 36-41, 2009.