UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

IAN DRUMOND DUARTE

RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E TOXICOGENÉTICAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO

VITÓRIA - ES

2017

IAN DRUMOND DUARTE

RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E TOXICOGENÉTICAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.ª Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto

VITÓRIA - ES

2017

RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÕES ECOFISIOLÓGICAS E TOXICOGENÉTICAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA, SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO

IAN DRUMOND DUARTE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 18 de Dezembro de 2017.

Comissão Examinadora:

_____

Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto - UFES
Orientador(a) e Presidente da Comissão

_____

Dr. Antelmo Ralph Falqueto - UFES
Examinador Interno

_____

Dr. Geraldo Rogerio Faustini Cuzzuol - UFES
Examinador Interno

_____

Dr.ª Maria Aparecida Marin Morales - UNESP
Examinador Externo

_____

Dr. Levi Pompermayer Machado - UNESP
Examinador Externo

Aos familiares, namorada, amigos e docentes que possibilitaram e torceram pela realização desta tese, dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), funcionários e docentes, agradeço pela estrutura, vivência e aprendizado que ao longo de dez anos possibilitaram uma formação científica, profissional e pessoal de excelência.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, reconheço e sou grato aos esforços dos funcionários e docentes que ao longo da minha formação me concederam ensino, estrutura de qualidade e meios para a realização desta tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que subsidiou a bolsa de pesquisa, agradeço pelo apoio financeiro, essencial ao longo desta caminhada.

À Agência Estadual de Recursos Hídricos do Estado do Espírito Santo (AGERH) e ao Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial à Prof.ª Dr.ª Valéria de Oliveira Fernandes, sou grato pela parceria estabelecida e apresentação das estações amostrais utilizadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleos (LabPetro) da Universidade Federal do Espírito Santo, em especial à Prof.ª Dr.ª Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro, agradeço a parceria e realização das análises de metais, essenciais para esta tese.

Aos Laboratório de Anatomia de Vegetal (LABAV) e Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (LaBioPlant) da Universidade Federal do Espírito Santo, sou grato pela estrutura e companheirismo na realização das análises desta tese, em especial aos amigos Ma. Dayana Effgen Fantinato, Dr. Leonardo Valandro Zanetti e Dr. Vinicius Novo Gama.

Ao “antimutagênico” Grupo de Estudos de Mutagênese e Toxicologia (GEMUT) da Universidade Federal do Espírito Santo que ao longo de anos mostrou-se unido e estruturado para a realização dos trabalhos científicos. Neste, agradeço aos amigos Ma. Iasmini Nicoli Galter, Ma. Lívia Dorsch Rocha, Ma. Francielen Barroso Aragão, Me. Edvar Junior Roncetti Coelho pela parceria e colaboração na

realização desta tese. Em especial, ao Ian de Oliveira Martins e à Camila Rodrigues Gonçalves, reconheço e sou grato pela contribuição direta nesta tese. Aos novos e mais recentes amigos, também agradeço.

À Prof.ª Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto, sou grato pela amizade e orientação desta tese. E além disto, pela confiança e incentivos na realização de outros projetos bem como pelas conversas e conselhos aos longo destes anos de orientação.

À banca examinadora, composta pela Dr.ª Maria Aparecida Marin Morales, Dr. Levi Pompermayer Machado, Dr. Antelmo Ralph Falqueto e Dr. Geraldo Rogerio Faustini Cuzzuol, sou grato pela disponibilidade e empenho na correção desta tese.

Ao Wemerson Diascano Oliveira agradeço a parceria e colaboração na abordagem geográfica realizada nesta tese.

Aos docentes, discentes, equipe técnica e direção da Escola Estadual de Ensino Fundamental e Médio Professora Juraci Machado, sou grato pelo apoio e compreensão que me permitiram cursar a pós graduação e realizar este trabalho com tranquilidade e confiança.

Aos meus pais Glória e Jânio sou grato pelos ensinamentos e apoio, sobretudo financeiro, que possibilitaram a realização desta tese e pós-graduação.

À minha namorada Ma. Liliane Baldan Zani sou imensamente grato pelo companheirismo, essencial para a realização desta tese e todo estudo envolvido. Mais que isso, agradeço à união estabelecida ao longo desses anos, seja na pesquisa, seja em nossas vidas.

Aos meus nobres amigos Philipe, Gustavo, Fábio, Jorge, Patrick, Thiago e Diogo que em geral não me ajudaram diretamente nesta tese, mas como inestimáveis amigos acompanharam esta trajetória, colaborando para a sua realização.

Ao meu fiel amigo de quatro patas Fred, agradeço. A sua sensibilidade e companheirismo canino foram essenciais durante as incontáveis horas de análise de dados, estudo, escrita e elaboração desta tese e pós graduação.

À Deus, gratidão.

A perfeição não é alcançável. Mas se perseguimos a perfeição, podemos conseguir a excelência.

(Vince Lombardi)

RESUMO

O Rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil) apresenta importância ecológica e socioeconômica, mas sofre diversos impactos antrópicos. Considerando a sua importância, este trabalho analisou a qualidade da água, do sedimento e elutriato do sedimento deste rio nos dois períodos em seis estações amostrais, por meio da quantificação de metais e respostas ecotoxicológicas em células de *Allium cepa L., Lactuca sativa L.* e cultura de células CHO-K1. A quantificação de metais nas amostras foi baseada no método U.S. EPA 200.8, sendo o sedimento preparado pelo método U.S. EPA 3051. A partir das amostras de água foram realizados os ensaios toxicogenéticos em *A. cepa* e *L. sativa* por meio de células meristemáticas e F1 da raiz. Assim, foram calculados o índice mitótico, a taxa de aberrações cromossômicas e a frequência de micronúcleos para avaliar, respectivamente, a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade. A partir da cultura celular da linhagem CHO-K1 foi avaliado o potencial citotóxico das amostras por meio dos testes do MTT, Azul de tripan e índice de divisão nuclear. O potencial genotóxico foi avaliado pelo ensaio do cometa, enquanto o mutagênico pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Em ensaios com *L. sativa*, foram realizadas análises de fitotoxicidade e, em estágio de pré-crescimento, realizadas análises das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol, bem como quantificado o teor de clorofila estimado. Além disso, foram analisadas as trocas gasosas a partir da assimilação líquida de CO_2, condutância estomática, concentração intracelular de CO_2, transpiração, razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular e eficiência de carboxilação. As amostras de sedimento e elutriato do sedimento foram avaliadas por ensaios toxicogenéticos em *A. cepa*. Entre os metais quantificados, destacaram-se Mn, Pb, Cu e principalmente Al que apresentou as maiores concentrações, sendo sugerido como o principal contaminante avaliado. Neste sentido, sugere-se que a concentração de metais esteja relacionada às características geomorfológicas e pedológicas da região, bem como à fontes antrópicas. Essas concentrações de metais poderiam ser influenciadas pela precipitação e vazão do Rio Santa Maria da Vitória. As variáveis analisadas por meio *A. cepa*, *L. sativa* e CHO-K1 revelaram potenciais citotóxicos e genotóxicos tanto nas amostras de água quanto sedimento e elutriato do sedimento. Além disso, as amostras de água

apresentaram potencial fitotóxico em *L. sativa*, e promoveram aumento do metabolismo antioxidante em algumas estações. As análises de troca gasosas demonstraram diminuição da eficiência do processo fotossintético, possivelmente relacionada às concentrações de Cu. Os efeitos observados neste estudo podem estar relacionados aos metais quantificados nas amostras avaliadas. Assim, considerando as variáveis analisadas, conclui-se que a qualidade ambiental do Rio Santa Maria da Vitória está comprometida.

Palavras-chave: *Allium cepa* • CHO-K1 • *Lactuca sativa* • Metabolismo antioxidante • Metais • Trocas gasosas •

ABSTRACT

The Santa Maria da Vitória River (ES, Brazil) is ecologically and socioeconomically important, but it suffers from several anthropic impacts. Considering its importance, this work analyzed water, sediment and sediment elutriate quality of this river on two periods on six sampling stations, through quantification of metals and ecotoxicological responses in cells of *Allium cepa L., Lactuca sativa L.* and culture of CHO-K1 cells. Metals quantification in samples was based on the U.S. EPA 200.8 method, being sediment prepared by the U.S. EPA 3051 method. From water samples, toxigenic assays were carried out in *A. cepa* and *L. sativa* by means of root meristematic and F1 cells. Thus, mitotic index, chromosomal aberration rate and micronucleus frequency were calculated to evaluate, respectively, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. From CHO-K1 lineage cell culture, cytotoxic potential of samples was evaluated through MTT, Tripan blue and nuclear division index tests. Genotoxic potential was evaluated by comet assay, while the mutagen, by micronucleus test with cytokinesis block. In experiments with *L. sativa*, phytotoxicity analyzes were carried out, and in pre-growth stage, activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase were analyzed, as well as estimated chlorophyll content. In addition, gaseous exchanges were analyzed from the CO2 net assimilation, stomatal conductance, intracellular CO_2 concentration, transpiration, intra- and extracellular CO_2 concentration ratio and carboxylation efficiency. Sediment and sediment elutriate samples were evaluated by toxicogenic assays in *A. cepa*. Among quantified metals, Mn, Pb, Cu and mainly Al showed the highest concentrations, being suggested as the major contaminant evaluated. In this sense, it is suggested that metals concentration is related to geomorphological and pedological characteristics of the region, as well as to anthropic sources. These metals concentrations could be influenced by precipitation and flow of Santa Maria da Vitória River. The variables analysed by *A. cepa*, *L. sativa* and CHO-K1, revealed cytotoxic and genotoxic potentials in both water, sediment and elutriate of sediment samples. Besides that, water samples showed phytotoxic potential in *L. sativa*, and promoted an increase in antioxidant metabolism in some stations. The gas exchange analysis showed a decrease in photosynthetic process efficiency, possibly related to Cu concentrations. The effects observed in this study can be related to quantified metals on evaluated

samples. Therefore, considering evaluated variables, it is concluded that Rio Santa Maria da Vitória environmental quality is compromised.

Keywords: *Allium cepa* • Antioxidant metabolism • CHO-K1 • Gaseous exchanges • *Lactuca sativa* • Metals •

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* L. expostos à agentes químicos. (A) Metáfase normal; (A_1) Metáfase com quebra cromossômica; (A_2) C-metáfase; (A_3) Metáfase com perda cromossômica; (A_4) Célula binucleada em metáfase; (A_5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B_1) Anáfase com ponte cromossômica; (B_2) Anáfase com quebra cromossômica; (B_3) Anáfase com perda cromossômica e ponte; (B_4) Anáfase com perda cromossômica; (B_5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C_1) Telófase com ponte cromossômica; (C_2) Telófase com a perda cromossômica e ponte; (C_3) Telófase com quebra cromossômica; (C_4) Telófase multipolar; (C_5) Telófase Multipolar com ponte cromossômica. (Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009). 28

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* L. expostos a agentes químicos. (A) Intérfase normal; (A_1) Intérfase com micronúcleo; (B) Prófase normal; (B_1) Prófase com micronúcleo; (C) Metáfase normal; (C_1) Metáfase com micronúcleo; (D) Anáfase normal; (D_1) Anáfase com micronúcleo; (E) Telófase normal; (E_1) Telófase com micronúcleo. (Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009). 29

Figura 3: Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil). 36

CAPITULO 1 – TOXICOGENÉTICA EM *Allium cepa* L. E CÉLULAS CHO-K1 EXPOSTAS ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL)

Figura 1: Mapa pedológico da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil), destacando a localização das estações amostrais. 55

Figura 2: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa* L., após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens. 67

Figura 3: Proporção acumulada do índice de viabilidade (MTT), Azul de tripan® (AZTP), índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos no DNA ($ID_{(ua)}$) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células CHO-K1 após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.....71

CAPITULO 2 – RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÃO POR MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM *Lactuca sativa* L. DE AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS POR METAIS

Figura 1: Uso e ocupação do solo da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil). 101

Figura 2: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular de *Lactuca sativa* L., após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens. 113

Figura 3: Atividades enzimáticas de superóxido dismutase (unidade de $SOD.mg^{-1}$ de proteína), catalase (µmol de $H_2O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína), peroxidase do ascorbato (µmol de $ascorbato.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína) e peroxidase do guaiacol (µmol de purporogalina $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína) de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle (CON) nas duas amostragens. *Valores de APX foram multiplicados por 10 para apresentação. 118

CAPITULO 3 – TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL) EM *Allium cepa* L.

Figura 1: Perfil de elevação e Mapa hipsométrico da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil), destacando a localização das estações amostrais. 150

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* L.. (A) Intérfase normal; (B) Prófase normal; (C) Metáfase normal; (D) Anáfase normal; (E) Telófase normal; (F) Aderência cromossômica; (G) Ponte cromossômica anafásica; (H) C-metáfase; (I) Intérfase com micronúcleo. 153

Figura 3: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa* L., após exposição às amostras de sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens. 160

Figura 4: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa* L., após exposição às amostras de elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens. 161

Figura 5: Análise de componentes principais dos metais quantificados nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória. *Estações seguidas pelo caractere “S” remetem-se às amostras de sedimento, enquanto que “E” às amostras de elutriado do sedimento. 165

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 – TOXICOGENÉTICA EM *Allium cepa* L. E CÉLULAS CHO-K1 EXPOSTAS ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL)

Tabela 1: Localização e georreferências das estações amostrais no Rio Santa Maria da Vitória. 54

Tabela 2: Metais quantificados (μg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na primeira amostragem. 62

Tabela 3: Metais quantificados (μg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na segunda amostragem. 63

Tabela 4: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa* L., após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS 4x10^{-4} mM) nas duas amostragens. 66

Tabela 5: Viabilidade (MTT), Azul de tripan® (AZTP), índice de danos no DNA ($ID_{(ua)}$), frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) avaliados por meio de células CHO-K1, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS 10^{-4} mM) nas duas amostragens. 70

CAPITULO 2 – RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÃO POR MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM *Lactuca sativa* L. DE AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS POR METAIS

Tabela 1: Metais quantificados (μg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na primeira amostragem. 108

Tabela 2: Metais quantificados (μg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na segunda amostragem. 109

Tabela 3: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema

radicular de *Lactuca sativa* L., após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS, $4x10^{-4}$ mM) nas duas amostragens. 112

Tabela 4: Correlação de Pearson entre as variáveis toxicogenéticas (IM, AC, MN) e fitotóxicas (Germ, Comp, IG, ER). IM = índice mitótico; AC = índice de aberrações cromossômicas; MN = frequência de micronúcleos; Germ = porcentagem de germinação; Comp = comprimento radicular; IG = índice de germinação; ER = índice de elongação radicular. 113

Tabela 5: Porcentagem de germinação (Germ, %), comprimento radicular (Comp, mm), índice de germinação (IG) e índice de elongação radicular (ER) avaliados por meio de sementes de *Lactuca sativa* L., após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens. 116

Tabela 6: Atividades enzimáticas de superóxido dismutase (unidade de $SOD.mg^{-1}$ de proteína), catalase (µmol de $H_2O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína), peroxidase do ascorbato (µmol de $ascorbato.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína) e peroxidase do guaiacol (µmol de purporogalina $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína) de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens. 117

Tabela 7: Assimilação líquida de CO_2 (A, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}$), condutância estomática (g_s, mol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), concentração intracelular de CO_2 (C_i, µmol CO_2 mol^{-1}), transpiração (E, mmol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular (C_i/C_a), eficiência de carboxilação (A/C_i, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}.Pa^{-1}$) e índice SPAD de plântulas de *Lactuca sativa* L. expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens. 120

CAPITULO 3 – TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL) EM *Allium cepa* L.

Tabela 1: Metais quantificados nas amostras de sedimento do Rio Santa Maria da Vitória nas duas amostragens. 155

Tabela 2 Metais quantificados no elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória nas duas amostragem. 157

Tabela 3: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa* L., após exposição às amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo nas duas amostragens. 159

Tabela 4: Correlação de Pearson entre os metais quantificados nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória. 165

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 21
2. OBJETIVO GERAL 23
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 23
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 24
4.1. Ambientes aquáticos: Contaminação por metais e biomonitoramento 24
4.2. Toxicogenética: Allium cepa, Lactuca sativa, *CHO-K1* 27
4.3. Enzimas antioxidantes e trocas gasosas 32
4.4. Bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória 35
5. REFERÊNCIAS 38
CAPITULO 1 – TOXICOGENÉTICA EM *Allium cepa* L. E CÉLULAS CHO-K1 EXPOSTAS ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL) 49
RESUMO 50
ABSTRACT 51
1. INTRODUÇÃO 52
2. MATERIAIS E MÉTODOS 54
2.1. Área de estudo, período e amostragem 54
2.2. Quantificação elementar 56
2.3. Teste do Allium cepa 56
2.4. Cultura celular 57
2.4.1. Linhagem, cultivo e tratamento 57
2.4.2. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade 58
2.4.3. Ensaio do cometa 58
2.4.4. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese 59
2.5. Análises estatísticas 60
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 60
3.1. *Precipitação, vazão pluvial e metais dissolvidos* 60
3.2. Toxicogenética em Allium cepa *e CHO-K1* 65
3.3. Metais e Toxicogenética 74
4. CONCLUSÕES 77
5. AGRADECIMENTOS 77
6. REFERÊNCIAS 78

CAPITULO 2 – RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÃO POR MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM *Lactuca sativa* L. DE AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS POR METAIS 92
RESUMO 93
ABSTRACT 95
1. INTRODUÇÃO 97
2. MATERIAIS E MÉTODOS 99
2.1. Área de estudo, período e amostragem 99
2.2. Quantificação elementar 100
2.3. Citogenética em Lactuca sativa 102
2.4. Fitotoxicidade em Lactuca sativa 103
2.5. *Aspectos fisiológicos em* Lactuca sativa 103
2.5.1. Exposição 103
2.5.2. Metabolismo antioxidante 104
2.5.3. Trocas gasosas e teor de clorofila estimado 106
2.6. *Análises estatísticas* 106
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 107
3.1. Precipitação, vazão pluvial e metais dissolvidos 107
3.2. Toxicogenética 111
3.3. Fitotoxicidade 114
3.4. Metabolismo antioxidante 117
3.5. Trocas gasosas 119
4. DISCUSSÃO GERAL 121
5. CONCLUSÕES 125
6. AGRADECIMENTOS 126
7. REFERÊNCIAS 126
CAPITULO 3 – TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL) EM *Allium cepa* L. 142
RESUMO 143
ABSTRACT 145
1. INTRODUÇÃO 147
2. MATERIAIS E MÉTODOS 149
2.1. Área de estudo e período de amostragem 149
2.2. Quantificação elementar 151

2.3. Teste do Allium cepa 152
2.4. Análises estatísticas 153
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 154
3.1. Metais 154
3.2. Toxicogenética em Allium cepa *L.* 158
3.3. Discussão geral 163
4. CONCLUSÕES 168
5. AGRADECIMENTOS 169
6. REFERÊNCIAS 169
6. CONCLUSÃO GERAL 181

1. INTRODUÇÃO GERAL

Tendo em vista os impactos ambientais decorrentes do uso e ocupação da Biosfera pelo homem, claramente os ecossistemas aquáticos sofrem as maiores pressões. Seja pela degradação de suas margens, mudanças em seus cursos, captação excessiva de água, processos extrativistas, ou pela contaminação por efluentes, agroquímicos, metais e compostos orgânicos via fontes difusas e pontuais, os ambientes aquáticos são os mais degradados.

Para tanto, diversas agências e órgãos, governamentais ou não, realizam continuamente o monitoramento da qualidade da água dos ecossistemas aquáticos, principalmente os continentais. Todavia, os métodos empregados nestes estudos baseiam-se sobretudo em variáveis abióticas que apesar de disponibilizarem informações sobre a litologia da região e influencias atmosféricas sobre o ambiente aquático, são insensíveis na avaliação dos efeitos dos contaminantes sobre a biota.

Assim, observa-se que os estudos de monitoramento dos ecossistemas aquáticos carecem de abordagens que avaliem a ação dos contaminantes sobre a biota. Essas abordagens, quando realizadas em ensaios com organismos dos mais diversos níveis de complexidade, fornecem ricas informações sobre os efeitos dos potenciais contaminantes presentes nos recursos hídricos e são mais sensíveis, permitindo avaliar temporalmente o ambiente durante o ciclo de vida dos próprios organismos. Além disso, possibilitam investigar os efeitos de misturas complexas de contaminantes comumente encontradas nos rios, lagos e lagoas.

Além dos estudos da qualidade da água, a plena avaliação dos ecossistemas aquáticos demanda estudos em outros compartimento além da coluna d'água. Assim destacam-se os compartimentos sedimento e elutriato do sedimento que apresentam propriedades singulares quanto ao armazenamento e disponibilização de contaminantes, e influenciam na biodiversidade local e de todo o ecossistema. Dessa forma, a realização de avaliações amplas que contemplem fatores abióticos e bióticos dos ecossistemas aquáticos em seus distintos compartimentos são de grande valia por apresentar os possíveis efeitos dos contaminantes sobre a biota de cada compartimento desses ecossistemas.

Entre os contaminantes dos ecossistemas aquáticos, os metais se destacam. Apesar de muitos serem essenciais aos seres vivos, em concentrações não ideais podem apresentar-se altamente nocivos à biota, seja em nível molecular, celular, metabólico, fisiológico, de organismos ou mesmo comunidades e ecossistemas. A contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais não se restringe ao seu lançamento bruto propriamente dito, mas também às mais diversas formas de contaminação direta e indireta como os processos geomorfológicos, a lixiviação de áreas desmatadas, a percolação, a lavagem de áreas pavimentadas, as chuvas em regiões cuja atmosfera é poluída, os lançamentos de efluentes domésticos e industriais, o armazenamento indevido de resíduos sólidos domésticos e industriais, e as atividades agrícolas associadas à utilização indiscriminada de agroquímicos.

Assim, procurando integrar a avaliação abiótica dos ecossistemas aquáticos por meio da quantificação de metais aos ensaios ecotoxicológicos, o presente trabalho analisou amostras de água, sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória. Este caracteriza-se como principal recurso hídrico da região metropolitana de Vitória, Espírito Santo (Brasil), tendo sua bacia de drenagem abrangendo áreas interioranas e costeiras com os mais diversos usos e ocupação. Apesar de sua importância, a bacia deste recurso hídrico sofre com os diversos impactos antrópicos, com destaque ao desmatamento de mata ciliar, assoreamento, lançamento de efluentes e utilização indiscriminada, em potencial, de agroquímicos como fertilizantes e pesticidas. Para tanto, neste estudo foram avaliados ao longo do Rio Santa Maria da Vitória, em dois períodos de amostragens, diversas variáveis, como: moleculares, citogenéticas, fitotóxicas, do metabolismo antioxidade e da fotossíntese, a partir de ensaios em cultura celular e nos vegetais *Allium cepa* L. e *Lactuca sativa* L..

As hipóteses deste trabalho foram que as amostras de água, elutrato do sedimento e sedimento apresentassem elevadas concentrações de metais. Com relação aos ensaios realizados as hipóteses foram de elevados potenciais fitótóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico em *A. cepa* e *L. sativa*, bem como efeitos citogenéticos em células CHO-K1. Em *L. sativa,* as hipóteses foram de alterações do metabolismo antioxidante e do processo fotossintético.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da água, sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil) por meio da análise integrada da concentração de metais, variáveis ecofisiológicas e toxicogenéticas.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar metais em amostras de água, sedimento e elutriato do sedimento.
- Avaliar os efeitos de amostras de água sobre a atividade das enzimas antioxidantes, trocas gasosas e teor estimado de clorofila em *Lactuca sativa.*
- Analisar os potenciais fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água por meio de testes citogenéticos, de germinação e elongação radicular em *L. sativa*.
- Avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de água por meio do teste do *Allium cepa* e cultura celular de linhagem CHO-K1.
- Analisar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras de sedimento e elutriato do sedimento por meio de testes citogenéticos em *A. cepa*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Ambientes aquáticos: Contaminação por metais e biomonitoramento

O nível de contaminação do ambiente por metais cresce nas últimas décadas, seja pelos lançamentos de efluentes domésticos e industriais, seja pelos processos de intemperismo ou pedogênicos, bem como aporte atmosférico (SEYLER; BOAVENTURA, 2003; LIMA, 2013; SANTOS-FILHO, 2015). Atuando concomitantemente, estes agentes promovem dinâmicas de sedimentação completamente distintas daquelas encontradas em ambientes naturais não perturbados. Estes processos de incorporação de metais ocorrem, geralmente, de maneira lenta e induzem à errônea consideração de que não há efeitos graves sobre a biota. Entretanto, estes processos resultam na poluição de ecossistemas aquáticos e terrestres (COTTA et al., 2006; PEREIRA; QUINÁIA 2007; JARDIM et al., 2008; WU et al., 2016; HURLEY et al., 2017; VU et al., 2017).

Os íons metálicos podem desempenhar dupla função na fisiologia dos organismos, uma vez que muitos desses íons são indispensáveis para a vida enquanto outros são tóxicos, podendo afetar as atividades da biota por perda de funções vitais, deformidades em órgãos e até mesmo mortandade (SEILER et al., 1988; VANDECASTEELE et al., 1997). Co, Cu, Mn, Mo, V, Sr e Zn, por exemplo são necessários para a realização de funções vitais, entretanto em excesso podem ser extremamente tóxicos. Por outro lado, Hg, Pb e Cd, por exemplo, não possuem nenhuma função dentro dos organismos, sendo sua acumulação nociva aos organismos (FERREIRA et al., 2010).

Assim como outros contaminantes, os metais ao serem depositados nos ecossistemas aquáticos estão sujeitos à diversos processos ambientais, tanto físicos quanto bióticos. Entre estes, destacam-se o fator diluição que pode aumentar ou diminuir a concentração do metal, a ação hidrodinâmica que pode influenciar no transporte, a ação da luz, da temperatura e de microrganismos que podem degradar as moléculas, bem como a ação da gravidade que pode auxiliar na sedimentação dos contaminantes (PEREIRA, 2004).

Segundo Esteves (2011), o ambiente aquático apresenta alta capacidade de solubilização de compostos orgânicos e inorgânicos, sendo que estas reações ocorrem a partir da formação de um gradiente vertical entre as regiões mais

superficiais e as regiões mais profundas da coluna d'água onde existe distribuição desigual de luz, nutrientes, temperatura e gases.

Os fenômenos de acúmulo e de redisposição de metais nos sedimentos qualifica-os como de extrema importância em estudos de impacto ambiental, pois registram em caráter mais permanente os efeitos de contaminação. A determinação de metais em sedimentos permite quantificar o estoque mobilizável de determinado contaminante em um local específico e, assim, detectar o grau de contaminação a que a água e os organismos estão sujeitos ao longo do tempo (BAIRD, 2002; COTTA et al., 2006).

Os sedimentos são constituídos por misturas complexas, podendo apresentar argila, areia, sais minerais e matéria orgânica, sendo considerados compartimentos de acumulação e transformação da matéria orgânica presente no meio aquático (ARAÚJO et al., 2006). Além disso, considerando a contaminação da coluna d'água por meio de lançamentos de poluentes, o sedimento pode atuar como como reservatório, apresentando, usualmente, concentrações mais elevadas de contaminantes do que aquelas observadas na coluna d'água (YI et al., 2008; MIRELES et al., 2011; WETZEL et al., 2013).

Além do sedimento propriamente dito, destaca-se a importância dos estudos com o elutriato do sedimento, uma vez que a partir deste, é simulado a ressuspensão dos sedimentos como em situações de dragagem, tempestade ou elevados aportes de água pluvial, por exemplo (ALEGRE, 2009). Dessa forma, pode-se avaliar a biodisponibilização de contaminantes presentes no sedimento, para a coluna d'água (ABESSA et al., 2006).

Entre os estudos recentes que abordaram a contaminação dos ambientes aquáticos, destacam-se o estudo de Whitall e outros (2014) que avaliaram os metais e contaminantes orgânicos no sedimento da Baía de Guánica (Porto Rico) e observaram, entre outros, concentrações de As, Cu, Hg, Ni, Cr e Zn que supostamente resultaram na toxicidade do sedimento. Em outro estudo, no Rio Houjing (Taiwan), foram quantificados As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn e Hg em amostras de água e sedimento, sendo sugerido que os metais presentes na água seriam menos propensos a causar riscos ao ecossistema. Todavia, no sedimento foram observados elevados níveis de contaminação, principalmente de Cd e Cu (VU et al., 2017). Nestes casos, a contaminação foi atribuída ao uso e ocupação

dos ecossistemas ou às características pedológicas da região, como tipo de rocha e processos de formação geológicos.

No Brasil, há os estudos no Rio Palmeiras (SC) onde se observou o aumento das concentrações de Ca, Mg, Fe, Al, Mn, Zn, e Pb na água e a diminuição das concentrações de Al, Mn, Zn, Cu e Pb no sedimento em função da mineração de carvão (BRANDELERO et al., 2017), e no Rio Pardo (RS) onde Machado e outros (2017) avaliaram concentrações de l, As, Be, Cd, Cr, Cu, Pb, Mn, Hg, Ni, Tl, Sn, V e Zn, bem como herbicidas, em amostras de água e espécies de peixe local. Neste caso, Al, Cd, Cu, Mn, Pb e Zn apresentaram concentrações elevadas nas amostras de água e abaixo do limite estabelecido pela legislação nas amostras de peixe. Com relação aos herbicidas, as concentrações apresentaram-se abaixo da preconizada pela legislação brasileira, mas acima da europeia. No Rio Ceará, Nilin e outros (2013) observaram contaminações forte a moderada por Al, Cu, Cr e Zn. Além disto, os autores discutem que os potenciais tóxicos observados no sedimento e elutriato do sedimento podem estar relacionados à outros contaminantes, além de metais.

Tendo em vista os compartimentos dos ecossistemas aquáticos e os processos de contaminação, é necessário a utilização de ferramentas e estudos interdisciplinares que permitam estimar o risco existente tanto para a saúde dos ecossistemas aquáticos quanto à saúde humana, o que tem sido auxiliado pelo emprego do biomonitoramento (MUGNAI; GATTI, 2008). Neste aspecto, Buss e outros (2008) destacam a necessidade de integração entre os métodos físicos e químicos tradicionais às análises bióticas, uma vez que os métodos físicos e químicos abordam o tipo e a intensidade de fatores, inferindo indiretamente sobre os efeitos nos organismos.

Por outro lado, o biomonitoramento fornece informações sobre os efeitos de estressores nos sistemas bióticos, eventualmente possibilitando inferências a respeito da qualidade e quantidade do distúrbio. Dessa forma, o monitoramento bem como a avaliação de risco dos ambientes impactados não devem ser restritas às análises abióticas, pois essas são ineficientes para a indicação e predição de efeitos deletérios causados por contaminantes na biota (CAJARAVILLE et al., 2000; BARSIENE et al., 2006).

O monitoramento ambiental é realizado por séries temporais de medições de variáveis físicas, químicas e bióticas utilizadas para responder às mudanças dos

ecossistemas (LOVETT et al., 2007). O biomonitoramento mensura os atributos de organismos vivos como consequência das alterações ocorridas no ambiente. Estes atributos são avaliados por meio de biomarcadores que possibilitam determinar o grau de impacto sobre a biota bem como identificar os possíveis estressores responsáveis por estes efeitos (MATTHEWS et al., 1982; FUENTES-RIOS et al., 2005). Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas em células, fluidos corpóreos, tecidos e órgãos de organismos. Sendo que aqueles baseados em respostas nos níveis molecular e celular refletem os primeiros sinais de perturbação ambiental (LAM; GRAY, 2003; NIGRO et al., 2006; SILVA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016).

4.2. Toxicogenética: Allium cepa*,* Lactuca sativa*, CHO-K1*

Segundo Barbério (2013), as preocupações referentes aos riscos que os agentes químicos lançados no ambiente podem levar à alterações genéticas nos organismos, foi uma das razões fundamentais para o desenvolvimento de métodos para avaliar a ação dos compostos químicos sobre o material genético.

Para tanto, diversos ensaios foram estabelecidos em plantas, animais e cultura celular, sendo possível avaliar diversos biomarcadores. Entre estes, destacam-se aqueles utilizados na avaliação dos potenciais genotóxicos e mutagênicos, como as aberrações cromossômicas e os micronúcleos observados nas fases do ciclo celular (Figuras 1 e 2). Os primeiros podem ocorrer por alterações na estrutura cromossômica ou no número de cromossomos bem como por interferências no fuso mitótico, de forma natural ou como consequência da exposição à agentes físicos ou químicos. Já a formação dos micronúcleos ocorre por fragmentos de cromossomos acêntricos ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular, deixando de ser incorporados ao núcleo das células filhas (PANTALEÃO et al., 2006). Além destes, destaca-se a análise do ciclo celular que permite determinar a atividade citotóxica de compostos quando estes alteram a frequência da divisão celular (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

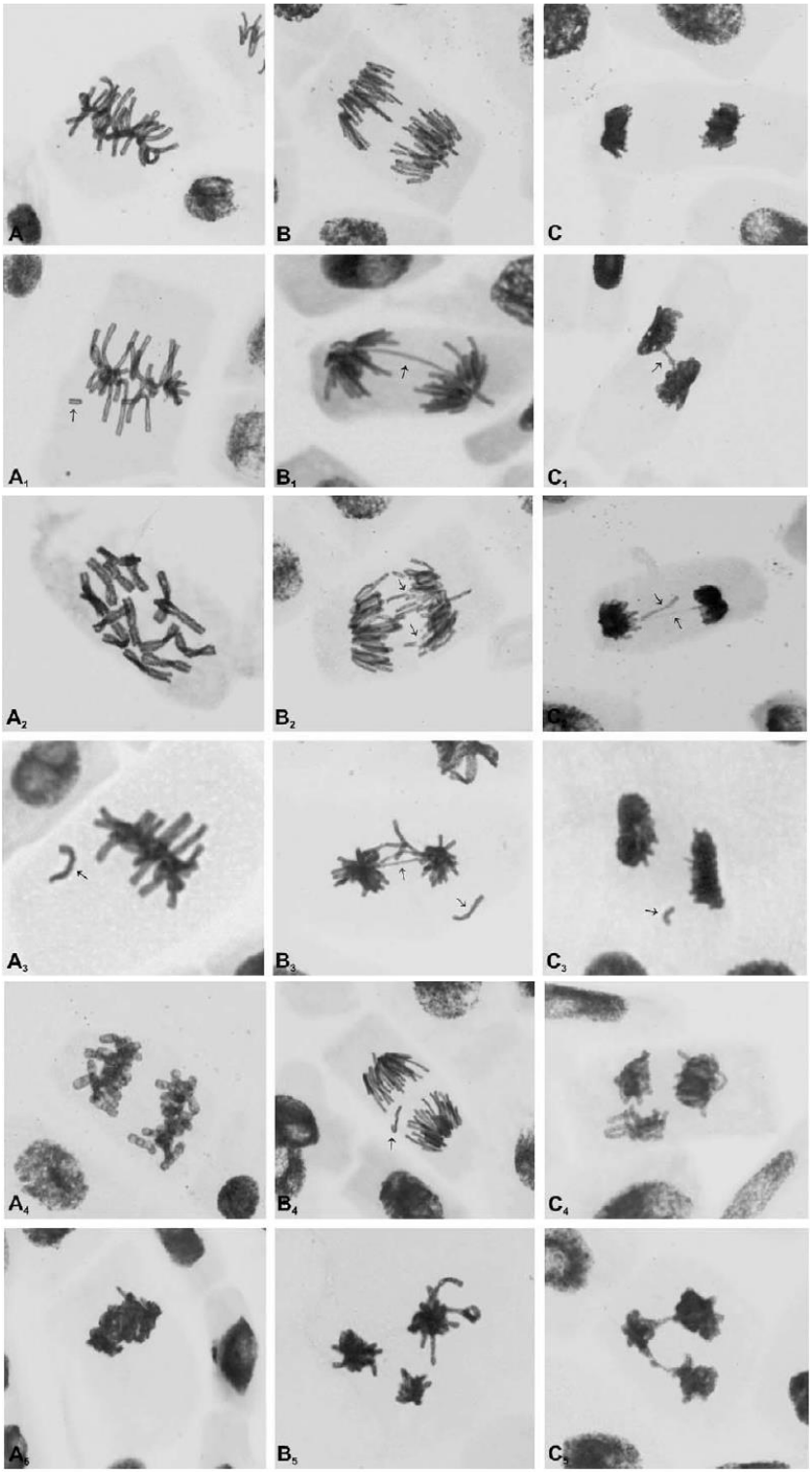

Figura 1: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos à agentes químicos. (A) Metáfase normal; (A_1) Metáfase com quebra cromossômica; (A_2) C-metáfase; (A_3) Metáfase com perda cromossômica; (A_4) Célula binucleada em metáfase; (A_5) Metáfase com aderência cromossômica; (B) Anáfase normal; (B_1) Anáfase com ponte cromossômica; (B_2) Anáfase com quebra cromossômica; (B_3) Anáfase com perda cromossômica e ponte; (B_4) Anáfase com perda cromossômica; (B_5) Anáfase multipolar; (C) Telófase normal; (C_1) Telófase com ponte cromossômica; (C_2) Telófase com a perda cromossômica e ponte; (C_3) Telófase com quebra cromossômica; (C_4) Telófase multipolar; (C_5) Telófase Multipolar com ponte cromossômica. (Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009).

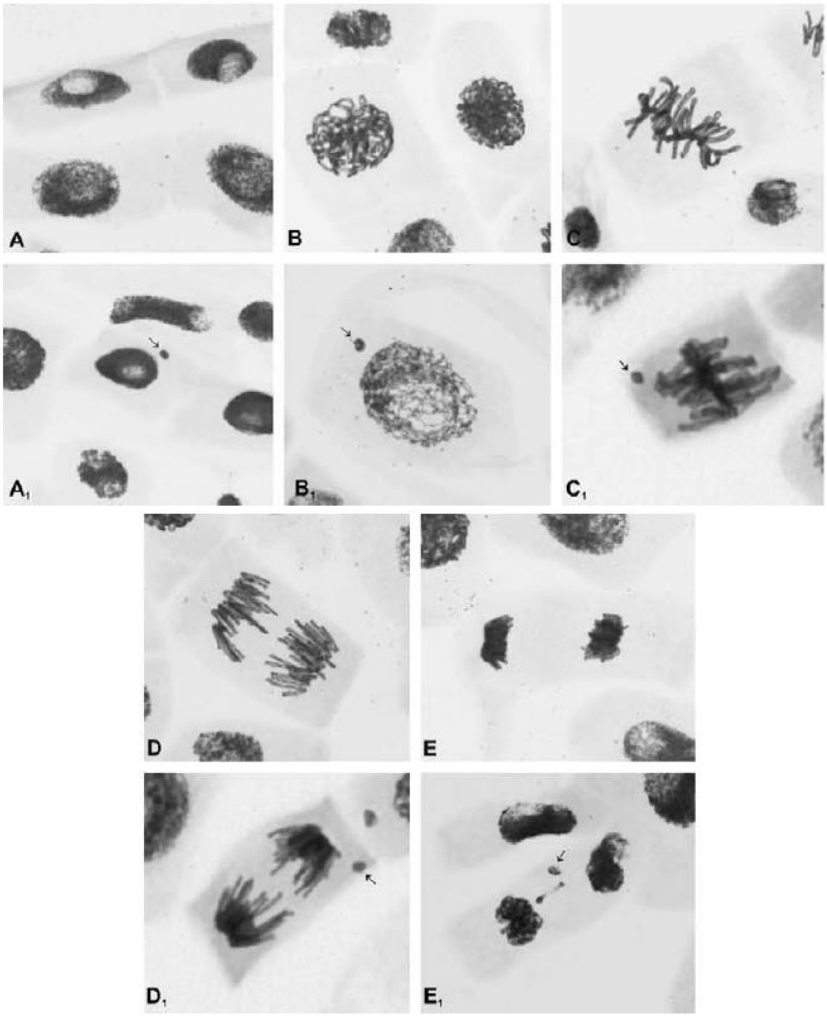

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostos à agentes químicos. (A) Intérfase normal; (A_1) Intérfase com micronúcleo; (B) Prófase normal; (B_1) Prófase com micronúcleo; (C) Metáfase normal; (C_1) Metáfase com micronúcleo; (D) Anáfase normal; (D_1) Anáfase com micronúcleo; (E) Telófase normal; (E_1) Telófase com micronúcleo. (Adaptado, Leme; Marin-Morales, 2009).

O ensaios realizados com *Allium cepa* L. (cebola) são considerados eficientes, sendo utilizado na avaliação de compostos químicos no meio ambiente devido sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de animais e outros vegetais (GRANT, 1982; LEMOS et al., 2007; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011; DUARTE et al., 2017a). Além disso, o teste do *A. cepa* permite a avaliação de diferentes biomarcadores como as aberrações cromossômicas utilizadas na detecção da genotoxicidade, o índice mitótico na detecção da citotoxicidade e a frequência de micronúcleos para a verificação da mutagênicidade (LEME; MARIN-MORALES, 2009; GRIPPA et al., 2012; DUARTE et al., 2017b).

Assim, os estudos de aberrações cromossômicas em ponta da raiz de *A. cepa* foram adotados pelo *International Program on Plant Bioassay* para monitorar ou testar os poluentes ambientais (MA, 1999). De acordo com Firbas e Amon (2013), a versatilidade deste teste remete-se às diversas características de *A. cepa*, como crescimento radicular rápido, sensibilidade aos poluentes, divisão celular facilmente observada, cariótipo e número de cromossomos estável (2n = 16) com diversidade na morfologia dos cromossomos com possibilidade de avaliação de células meristemáticas e células diferenciadas F1.

Outro sistema teste para estudos toxicogenéticos, estabelecido em plantas, rementem-se à *Lactuca sativa* L. (alface)*. L. sativa* tem sido utilizado como indicador devido à sua alta sensibilidade à fatores externos, possuir cromossomos grandes (2n = 18), apresentar baixo custo para realização das pesquisas, apresentar grande quantidade de sementes e de fácil manuseio. Assim como *A. cepa*, o estudo do meristema radicular de *L. sativa* possibilita a avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico (GRANT, 1994; SOUSA et al., 2009; GOMES et al., 2012; ARAGÃO et al., 2015).

Além disso, *L. sativa* é sensível aos ensaios de fitotoxicidade por meio da avaliação do crescimento radicular e geminação, sendo recomendado por agências de proteção ambiental e padronizações de bioensaios, como a *Organization For Economic Cooperation And Development*, para a determinação dos efeitos de substâncias tóxicas (OECD, 2006). Neste aspecto, Andrade e outros (2010) destacam a importância da combinação de análises macroscópicas, como o crescimento radicular inicial, e microscópicas, como alterações no ciclo celular e nos cromossomos, como sendo importantes ferramentas de análise dos efeitos tóxicos e sinergéticos de compostos lançados no ambiente.

Além dos ensaios *in vivo* com espécimes vegetais, destaca-se os ensaios *in vitro* em cultura celular. Segundo Cardozo e outros (2006), a cultura celular é eficiente ferramenta para a avaliação ambiental, apresentando características favoráveis, entre eles a padronização das condições experimentais, como temperatura, pH, composição do meio de cultura e densidade populacional. Outras vantagens são a uniformidade metabólica e comportamental do organismo teste, a possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular, a rapidez e a boa reprodutibilidade. Além disso, ressaltam-

se que a organização dos cromossomos e de seu DNA assemelha-se às células dos espécimes *in vivo*.

Entre as técnicas citogenéticas, a cultura com a linhagem de células de mamíferos CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) demonstrou eficácia nos estudos de biomonitoramento por sua sensibilidade, sendo capaz de determianr potenciais genotóxicos do ambiente (MATSUMOTO et al., 2005; RIGONATO et al., 2010). Além disso, CHO-K1 é capaz de fornecer respostas relacionadas aos riscos à saúde humana pela proximidade taxonômica, e apresenta vantagens como ciclo de divisão celular curto e fácil reprodutibilidade (ROGERO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2006).

Tendo em vista a avaliação de ambientes aquáticos, entre os estudos realizados por meio de bioensaios com *A. cepa*, *L. sativa* e CHO-K1, destacam-se os estudos de Zimmermman e outros (2017) que avaliaram o Rio da Ilha (RS, Brasil) e constataram, além de concentrações acima da legislação ambiental brasileira de fósforo, alumínio, chumbo, ferro, níquel e coliformes termotolerantes, efeitos citotóxicos sobre *A. cepa* de amostras de água coletadas no inverno e verão. De forma similar, a avaliação da Lagoa Jacuném (ES, Brasil) constatou potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa* expostos à amostras de água em períodos de chuva e estiagem (DUARTE et al., 2017b). Neste caso, os autores relacionaram estas respostas aos contaminantes presentes na lagoa, entre eles os metais Al e Cd. A partir de ensaios com *L. sativa* e outras espécies, Giorgetti e outros (2011) avaliaram efluentes de indústrias têxteis da região de Fez-Boulmane (Marrocos) antes e após tratamento, e concluíram que as amostras não tratadas apresentaram potenciais fitotóxicos, citotóxicos e genotóxicos.

Em outro estudo, avaliando-se o sedimento do Lago Orta (Itália) por meio da frequência de germinação e crescimento radicular, foram observados efeitos fitotóxicos em *L. sativa*, principalmente nas camadas mais antigas do sedimento, sendo estes efeitos atribuídos às concentrações de metais como Pb, Zn, Cu, Ni, Mn, Cr (BARBERO et al., 2001). Em um estudo comparativo, Silveira e outros (2017) relataram que tanto *A. cepa* quanto *L. sativa* são eficientes na avaliação de potenciais poluentes presentes nos ecossistemas. Com relação à cultura celular, a partir de CHO-K1, Caffetti e outros (2008) avaliaram o Rio Paraná (Argentina) e constataram potenciais genotóxicos em três estações avaliadas, enquanto

Matsumoto e outros (2005) ao avaliarem o Rio Sapucaizinho (SP, Brasil), constataram elevada genotoxicidade e relacionaram este efeito ao efluente de curtume rico em Cr lançado neste ambiente.

4.3. Enzimas antioxidantes e trocas gasosas

O aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas plantas pode ocorrer devido às diversas condições de estresse de origens naturais e antrópicas (CARRILLO; VALLE, 2005). Neste aspecto, o estresse oxidativo corresponde ao estado em que há maior produção de EROs, ou seja, momentos em que os mecanismos celulares pró-oxidativos superam os antioxidativos (GRATÃO et al., 2005). Entre as condições de estresse, destacam-se a radiação UV, luminosidade intensa, condições de seca e salinidade, bem como os contaminantes como agroquímicos e metais (MALLICK; MOHN, 2000; SCANDALIOS et al., 2000).

As EROs são também denominadas radicais livres, sendo muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Os eventos de produção de EROs após exposições à diferentes condições de estresse, caracterizados pela produção do ânion superóxido (O^{2-}), oxigênio singleto ($^1O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^-), apresentam-se como agentes causadores de injúrias nos tecidos vegetais (WANG et al., 2009). As EROs podem interagir com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando danos às membranas e à outras macromoléculas essenciais. Entre estas, os pigmentos cloroplastídicos, ácidos nucléicos, proteínas e lipídeos diversos (FOYER et al., 1994; MITTLER, 2002).

Todavia, as plantas apresentam o sistema antioxidante complexo que atua evitando o dano oxidativo das EROs. Este sistema pode envolver a ação de defesas antioxidantes não-enzimáticas e enzimáticas (AZEVEDO-NETO et al., 2008). As defesas não enzimáticas incluem antioxidantes tais como ácido ascórbico, glutationa, α-tocoferol e carotenoides, enquanto as defesas enzimáticas incluem a ação das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidases, ascorbato peroxidase, entre outras enzimas (GONDIM et al., 2010).

A superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) catalisa a dismutação de O^{2-} gerado por meio de diferentes processos do metabolismo celular, como o transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplastos, à H_2O_2 e O_2. A redução na

atividade da SOD ocorre concomitante ao aumento da acumulação de O^{2-}, sendo este radical um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e o consequente aumento na permeabilidade das membranas (APEL; HIRT, 2004). A catalase (CAT; EC 1.11.1.6) é responsável pela remoção do H_2O_2, decompondo-o em H_2O e O_2. Assim, atua na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em concentrações elevadas (MITTLER, 2002). A peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) primariamente localizada em cloroplastos e no citosol, reduz o H_2O_2 até H_2O, utilizando ascorbato como substrato (RIZHSKY et al., 2003). A peroxidase do guaiacol (POD; EC 1.11.1.7) localizadas na parede celular e nos vacúolos também realiza essa conversão, utilizando o H_2O_2 como oxidante e compostos fenólicos como doadores de elétrons (Locato et al. 2010).

Tendo em vista as respostas do metabolismo antioxidantes das plantas aos diversos estressores, estudos como o de Horemans e outros (2014) utilizaram esses biomarcadores em plantas para avaliação de ecossistemas aquáticos. Neste estudo, espécimes da planta aquática *Lemna minor* L. foram utilizados para avaliar a inibição do crescimento e estresse oxidativo de Cd e U, sendo observadas significantes alterações nas enzimas avaliadas, como SOD e POD. Outro estudo demonstra os efeitos da acumulação de Cu em macrófitas *Elodea nuttallii* e sua associação com a radiação UV. Neste caso, foram observadas atividades de SOD nas macrófitas expostas à Cu e UV, e POD nas macrófitas expostas apenas à Cu (REGIER, 2015). Estudando outras macrófitas, Wahsha e outros (2017) concluem que biomarcadores do estresse oxidativo podem ser utilizados na avaliação e monitoramento de ecossistemas aquáticos contaminados.

O Sol atua como fonte primária de toda a energia metabólica das plantas, sendo a fotossíntese fundamental para os processos de crescimento e manutenção das formas de vida existentes (MARENCO; LOPES, 2007). Segundo Kozlowski e outros (1991), a fotossíntese pode variar sob vários aspectos, como entre espécies distintas e os ambientes de crescimento e desenvolvimento das plantas. As variações das taxas fotossintéticas podem ocorrer até mesmo no mesmo indivíduo ao longo do ano, entre as folhas de sol e as folhas de sombra. Essas variações podem ser resultados de aspectos como a idade da folha, a

condutância estomática e os fatores ambientais, como intensidade de luz, temperatura, disponibilidade de água e outros.

Outro processo de grande importância às plantas é a transpiração na qual as plantas eliminam a água para a atmosfera na forma de vapor. Geralmente, a transpiração acontece nas folhas, de modo que a evaporação ocorre a partir das paredes celulares em direção aos espaços intercelulares. E a partir dos espaços intercelulares, ocorre a difusão da molécula de água para a atmosfera por meio dos estômatos que são essenciais na regulação da taxa transpiratória, juntamente com a camada limítrofe (PEREIRA et al., 2002).

Com relação à estes aspectos e os respectivos estudos, umas das técnicas remete-se à utilização do analisador de gás por infravermelho (*Infra-Red Gas Analizer*, IRGA) onde é possível a avaliação de diversas variáveis relacionadas à fotossíntese e às trocas gasosas, tais como assimilação líquida de CO_2 (A, μmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}$), condutância estomática (g_s, mol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), concentração intracelular de CO_2 (C_i, μmol CO_2 mol^{-1}) e transpiração (E, mmol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$).

Durante a fotossíntese, as moléculas de clorofila atuam em funções como absorção de luz, transferência de energia e transferência de elétrons. Assim, esses pigmentos são essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química na forma de ATP e NADPH (JESUS; MARENCO, 2008; NOBEL, 2009), sendo assim, importante suas análises. Entre os métodos de avaliação da clorofila, destaca-se a utilização do medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta, Japão) que é capaz de fornecer leituras relacionadas com os teores de clorofila presentes nas folhas. Com as vantagem de mensurar de forma rápida, prática, com baixo custo e não destrutiva, os valores obtidos pelo SPAD são proporcionais ao teores de clorofila presentes nas folhas (ARGENTA et al., 2001).

Os estudos de qualidade de água relacionados ao metabolismo fotossintético, em geral, baseiam-se na utilização de macrófitas como bioindicadores. Entre estes, o estudo de Macinnis-Ng e Ralph (2002) avaliou *in situ* a atividade fotossintética e a concentração de pigmentos cloroplastídicos em *Zostera capricorni* expostas aos metais Cu, Cd, Pb e Zn. A importância dos aspectos fotossintéticos foram levantados por Zhou e outros (2008) no levantamento de técnicas e bioindicadores para a avaliação de ecossistemas aquáticos contaminados por metais. Neste caso, os autores discutem que a toxicidade em plantas aquáticas expostas a estes contaminantes inclui,

principalmente, alterações ultraestruturas celulares, inibição da fotossíntese, alterações da capacidade de respiração e inibição do crescimento.

Os efeitos de água contaminada sobre a fotossíntese também foram observados por Bittencourt-Oliveira e outros (2016) ao submeter *Lactuca sativa* à amostras de água contaminada pela cianotoxina microcistina. Neste estudo, foram constatados aumentos das taxa fotossintética líquida, da condutância estomática, da transpiração do tecido foliar e da concentração de CO_2 intracelular.

4.4. Bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória apresenta área de drenagem de aproximadamente 1876 km^2, desnível de aproximadamente 1100 metros e extensão de 122 Km até desaguar, na forma de um delta, na Baía de Vitória (Espírito Santo, Brasil). Tendo em vista sua dimensão, esta bacia hidrográfica é enquadrada pela Agência Nacional de Águas no nível 4 (ANA, 2017). Considerando a resolução brasileira de nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente que estabelece a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, ela se enquadra na classe 2. Conforme referida resolução, essas águas podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; à proteção das comunidades aquáticas; recreação de contato primário como natação, esqui aquático e mergulho, irrigação de hortaliças, plantas frutíferas e de parques, jardins, campos de esporte e lazer, com os quais o público possa vir a ter contato direto; aquicultura e atividade de pesca.

A bacia situa-se na região centro serrana do Estado do Espírito Santo e abrange os Municípios de Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Cariacica, Serra, Viana e Vitória. O Rio Santa Maria da Vitória nasce na região serrana, na Serra do Garrafão, em Santa Maria de Jetibá. Além do rio principal e seus afluentes, a bacia possui três represas: Duas Bocas que funciona como reservatório para fins de abastecimento público e, duas represas que atuam como reservatórios para usinas hidrelétricas, Rio Bonito e Suíça (COELHO, 2017).

De acordo com a Agência Estadual de Recursos Hídricos - AGERH do Espírito Santo (AGERH 2016), a bacia do Rio Santa Maria da Vitória é dividida em três Unidades de Planejamento (UPs): Alto Santa Maria da Vitória; Médio Santa Maria da Vitória e Baixo Santa Maria da Vitória (Figura 3).

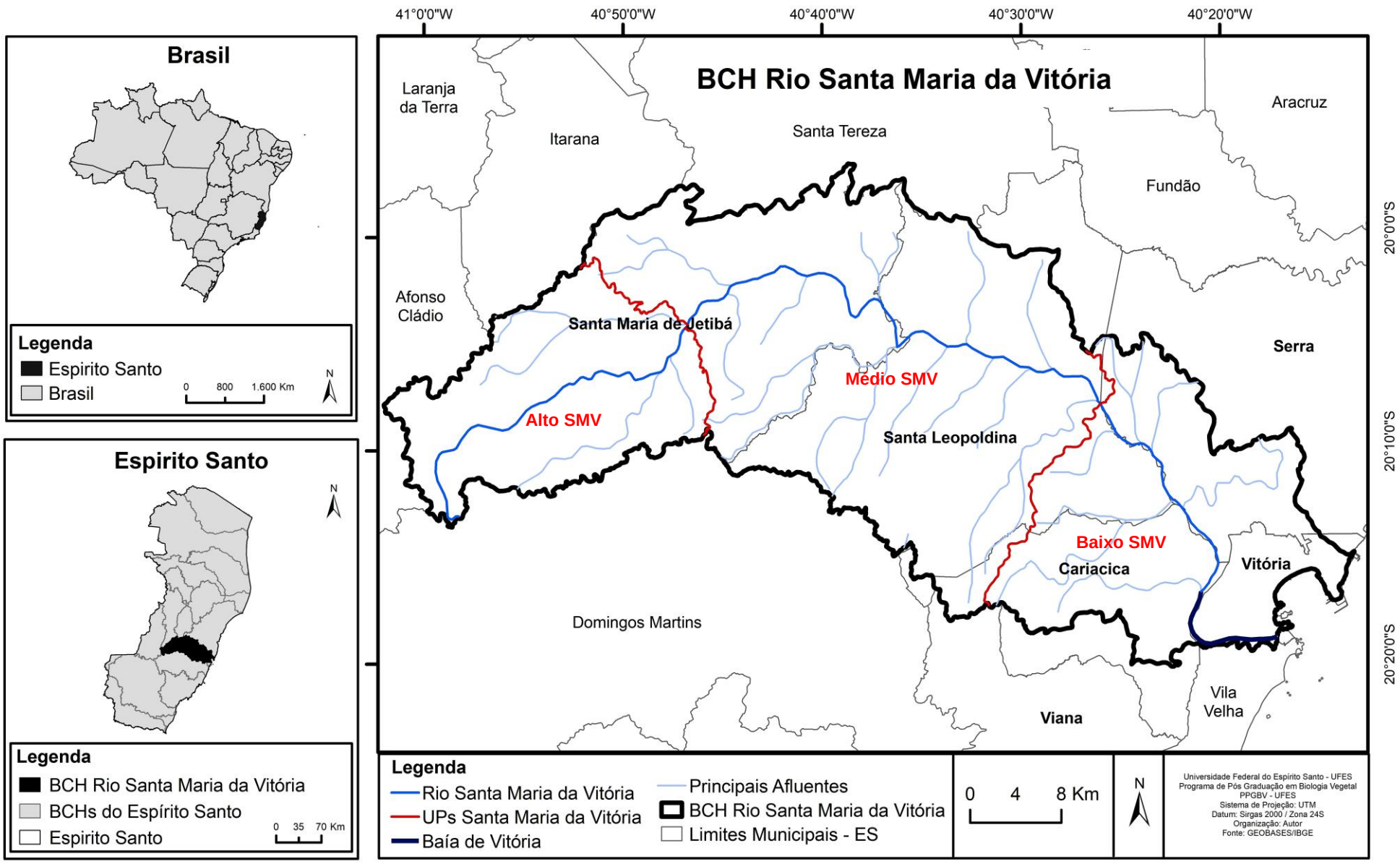

Figura 3: Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil).

Com relação ao uso e ocupação destas regiões, durante o levantamento do Enquadramento de Corpos de Água e Plano de Recursos Hídricos, foram mapeadas 11 categorias de uso do solo: área florestal, cultura agrícola, pastagem, silvicultura, área alagada, manguezal, área urbanizada, restinga e faixa de praia, mineração, afloramento rochoso e corpo d'água. Em relação ao Alto Santa Maria da Vitória, "cultura agrícola" e "silvicultura e cultura permanente" (café) correspondem às classes em segundo e terceiro lugar na ocupação da área total da bacia. No Médio Santa Maria da Vitória há predomínio de "área florestal" (mata nativa em diferentes estágios de regeneração) na área total, enquanto no Baixo Santa Maria da Vitória, as categorias "Pastagem" e "Área urbanizada" tem destaque.

Estão presentes na Região Hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória 20 unidades de conservação. A Reserva Biológica de Duas Bocas está inserida, com aproximadamente 99%, na Região Hidrográfica de Santa Maria da Vitória, sendo a maior porção situada dentro do segmento Baixo do Santa Maria da Vitória. A Área de Proteção Ambiental Monte Mochuara e Mestre Álvaro, representam, respectivamente, a segunda e terceira Unidade de Conservação de maior destaque. Segundo Gollner (1994), as características fitossociológicas permitem classificar os ambientes desta bacia em Floresta Ombrófila Densa e Aberta, Mata de Galeria, Vegetação Rupícula, Campo de Várzea e Manguezal. Avaliando-se os usos da água do rio, o levantamento do enquadramento supra citado destaca as atividades relacionadas à pecuária (bovinocultura de corte, bovinocultura de leite, suínos, aves e em menor escala a criação de equinos e caprinos), agricultura (cafeicultura, fruticultura, oleicultura), atividade industrial (bebidas, alimentos, metal, aterro industrial, petróleo e gás, minério) e abastecimento público.

Apesar de sua importância ecológica e socioeconômica, a bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória sofre com desmatamentos em áreas de preservação permanente, assoreamento de suas margens, utilização indiscriminada de agroquímicos e eliminação inadequada de resíduos sólidos e líquidos, principalmente efluentes domésticos (MIRANDA, 2009; MARTINS; FERNANDES, 2011; GRIPPA et al., 2012).

5. REFERÊNCIAS

ABESSA, D.M.S; SOUZA E.C.P.M.; TOMMASI L.R. Utilização de toxicidade na avaliação da qualidade de sedimentos marinhos. **Revista de Geologia – UFC**, v. 19, n. 2, p. 253-261, 2006.

AGERH - Agência Estadual de Recursos Hídricos do Espírito Santo. CBH Santa Maria da Vitória, 2016. Disponível em: https://agerh.es.gov.br/cbh-smv Acesso em: 05 out. 2017.

ALEGRE, G.F. Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do rio Tietê, entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP**. Dissertação de Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2009. 121p.

ANA - Agência Nacional de Águas. Bases de Dados Georreferenciadas; Ottobacias, 2017. Disponível em http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/solicitacaoBaseDados.asp Acesso em: 05 de out. 2017.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004. DOI:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

ARAGÃO, F.B.; PALMIERI, M.J.; FERREIRA, A.; COSTA, A.V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P.F.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAÚJO, R.P.A.; SHIMIZU, G.Y.; BOHRER, M.B.C.; JARDIM, W. Avaliação da Qualidade de Sedimentos. *In:* ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Ed.). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. 1 ed. São Carlos: Editora Rima, p. 293-320, 2006.

ARGENTA, G.; SILVA, P.R.F.; BORTOLINI, C.G. Teor de clorofila na folha como indicador do nível de N em cereais. **Ciência Rural**, v. 31, n. 3, p. 715-722, 2001. DOI:10.1590/S0103-84782001000400027

AZEVEDO-NETO, A.D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity andoxidative stress. *In:* KHAN, N.A.; SINGH, S (Ed.). **Abiotic stress and plant responses**. New Delhi: I.K. International, p.57-82, 2008.

BAIRD, C.; RECIO, M.A.L.; CARRERA, L. C. M. **Química ambiental**. 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BARBÉRIO, A.; BARROS, L.; VOLTOLINI, J.C.; MELLO, M.L.S. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of water from the Brazilian river Paraíba do Sul with the *Allium cepa* test. **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n.3, p. 837-842, 2009. DOI:10.1590/S1519-69842009000400010

BARBERO, P.; BELTRAMI, P.; BAUDO, R.; ROSSI, D. Assessment of Lake Orta sediments phytotoxicity after the liming treatment. **Journal of Limnology**, v. 60, n.2, p. 269-276, 2001. DOI:10.4081/jlimnol.2001.1.269

BARSIENE, J.; LEHTONEN, K.K.; KOEHLER, A.; BROEG, K.; VUORINEN, P.J.; LANG, T.; PEMPKOWIAK, J.; SYVOKIENE, J.; DEDONYTE, V.; RYBAKOVAS, A.; REPECKA, R.; VUONTISJÄRVI, H.; KOPECKA J. Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipeda-Būtinge area (Baltic Sea). **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, p. 422-436, 2006. DOI:10.1016/j.marpolbul.2006.03.009

BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.D.O.C.; CORDEIRO-ARAÚJO, M.K.; CHIA, M.A.; ARRUDA-NETO, J.D.; DE OLIVEIRA, Ê.T.; DOS SANTOS, F. Lettuce irrigated with contaminated water: Photosynthetic effects, antioxidative response and bioaccumulation of microcystin congeners. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 83-90, 2016. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.02.014

BRANDELERO, S.M.; MIQUELLUTI, D.J.; CAMPOS, M.L.; DORS, P. Monitoramento de água e sedimento no Rio Palmeiras, Bacia Hidrográfica do Tubarão (SC), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n.1, p. 203-212, 2017. DOI:10.1590/s1413-41522016159344

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205-213, 2011. DOI:10.1093/mutage/geq073

BUSS, D.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAPTISTA, D.F. Monitoramento Biológico De Ecossistemas Aquáticos Continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p. 339-345, 2008.

CAFFETTI, J.D.; MANTOVANI, M.S.; PASTORI, M.C.; FENOCCHIO, A.S. First genotoxicity study of Paraná river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (*Cricetulus griseus* Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. **Genetics and**

Molecular Biology, v. 31, n.2, p. 561-565, 2008. DOI:10.1590/S1415-47572008000300026

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v.247, n.2-3, p. 295-311, 2000. DOI:10.1016/S0048-9697(99)00499-4

CARDOZO, T.R; ROSA D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.V.; OLIVEIRA, N.C.D.; PEREIRA, T.S.; PASTORIZA, T.F.; MARQUES, D.M.; LEMOS, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M.F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v. 603, p. 83–96, 2006. DOI:10.1016/j.mrgentox.2005.11.011

CARRILLO, N.; VALLE, E.M. El lado oscuro del oxígeno. **Revista de la Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal**, v. 2, n. 2, 2005.

Coelho E.J.R. Respostas fisiológicas e citogenéticas em raízes de *Allium cepa* L. expostas às amostras de água e Sedimento de três represas da bacia do rio Santa Maria da Vitória (ES, Brasil). **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2017. 87p.

COTTA, J.A.O.; REZENDE, M.O.O.; PIOVANI, M.R. Avaliação do teor de metais em sedimento do Rio Betari no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira: PETAR, São Paulo, Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 40-45, 2006. DOI:0.1590/S0100-40422006000100009

DOS SANTOS, D.R.; YAMAMOTO, F.Y.; FILIPAK NETO, F.; RANDI, M.A.; GARCIA, J.E.; COSTA, D.D.; LIEBEL, S.; CAMPOS, S.X.; VOIGT, C.L.; DE OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. The applied indicators of water quality may underestimate the risk of chemical exposure to human population in reservoirs utilized for human supply-Southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 10, p. 9625-9639, 2017. DOI:10.1007/s11356-015-5995-0

DUARTE, I.D.; SILVA, N.H.; DA COSTA SOUZA, I.; DE OLIVEIRA, L.B.; ROCHA, L.D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; DE ALMEIDA PEREIRA, T.; DIAS, M.C.; DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; MATSUMOTO, S.T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p. 10855-10868, 2017. DOI:10.1007/s11356-017-8721-2

DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; COELHO, E.J.R.; DIAS, M.C.; MATSUMOTO, S.T. Cytogenetic responses of *Allium cepa* L. after exposure to contaminated pond waters. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2017.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011.

FERREIRA, A.P.; HORTA, M.A.P.; CUNHA, C.L.N. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**. v. 10, n.2, p. 229-241, 2010.

FIRBAS, P.; AMON, T. Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. **Journal of Bioremediation & Biodegradation**, v. 4, p. 189, 2013. DOI:10.4172/2155-6199.1000189

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Acta Physiology Plant**, v. 92, p. 696-717, 1994. DOI:10.1111/j.1399-3054.1994.tb03042.x

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p.192-199, 2005. DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.02.062

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n.8, p. 2275-2283, 2011. DOI:10.1016/j.ecoenv.2011.08.002

GOLLNER, R. A geografia geossitêmica e o estudo dos manguezais do estuário do Rio Santa Maria da Vitória (ES). **Anais do III Simpósio sobre Ecossistemas da costa sul e sudeste brasileira: subsídios a um gerenciamento ambiental**, v. 1, p. 61-68, Serra Negra/SP, 1994.

GOMES, L.; SILVA, F.; BARBOSA, S.; KUMMROW, F. Ecotoxicity of Sludges Generated by Textile Industries: A review. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.7, p. 89-96, 2012. DOI:10.5132/jbse.2012.01.013

GONDIM, A.R.O.; PRADO, R.M; ALVES, A.U.; FONSECA, I.M. Eficiência nutricional do milho cv. BRS 1030 submetido à omissão de macronutrientes em solução nutritiva. **Revista Ceres**, v. 57, n. 4, p. 539-544, 2010.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene- Tox Program. **Mutation Research**, v.99, p 273-291, 1982. DOI:10.1016/0165-1110(82)90046-X

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994. DOI:10.1016/0027-5107(94)90112-0

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n. 6, p. 481-494, 2005. DOI:10.1071/FP05016

GRIPPA, G.A.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Evaluation of Water Samples from a River by Cytologic Analysis in *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 77, n. 1, p. 3-9, 2012. DOI:10.1508/cytologia.77.3

HOREMANS, N.; VAN HEES, M.; VAN HOECK, A.; SAENEN, E.; DE MEUTTER, T.; NAUTS, R.; BLUST, R.; VANDENHOVE, H. Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in *Lemna minor* L. **Plant Biology**, v. 1, p. 91-100, 2015. DOI:10.1111/plb.12222

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 8, p. 2090-2095, 2009. DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.07.002

HURLEY, R.R.; ROTHWELL, J.J.; WOODWARD J.C. Metal contamination of bed sediments in the Irwell and Upper Mersey catchments, northwest England: exploring the legacy of industry and urban growth. **Journal of Soils and Sediments**, v. 17, n. 11, p. 2648-2665, 2017. DOI:10.1007/s11368-017-1668-6

JARDIM, G.M.; ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R. Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbataí River, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 51-59, 2008. DOI:10.1590/S1519-69842008000100008

JESUS, S.V.; MARENCO R.J. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta amazônica**, 38:815-818, 2008. DOI:10.1590/S0044-59672008000400029

KOZLOWSKI, T.T.; KRAMER, P.J.; PALLARDY, S.G. **The Physiological Ecology of Woody Plants** London: Academic Press, 1991.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n.2, p. 182-186, 2003. DOI:10.1016/S0025-326X(02)00449-6

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. DOI:10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LEMOS, C.T.; RÖDEL, P.M.; TERRA, N.R.; D'AVILA, O.N.C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronucleus assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 391-401, 2007. DOI:10.1016/j.ecoenv.2006.01.004

LIMA, D. P. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical**, Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, 2013. 147p.

LOVETT, G.M.; BURNS, D.A.; DRISCOLI, C.T.; JENKINS, J.C.; MITCHELL, M.J.; RUSTAD, L.; SHANLEY, J.B.; LIKENS, G.E.; HAEUBER, R. Who needs environmental monitoring? **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.5, n.5, p. 253-260, 2007. DOI:10.1890/1540-9295(2007)5[253:WNEM]2.0.CO;2

LOCATO, V.; DE PINTO, M.C.; PARADISO, A.; DE GARA, L. Reactive Oxygen Species and Ascorbate-Glutathione Interplay in Signaling and Stress Responses. In Gupta, S.D. (Ed.). **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, Florida: Science Publishers / CRC Press, p 45-64, 2010.

MA, T.H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research**, v.426, p. 103-106, 1999. DOI:10.1016/S0027-5107(99)00049-4

MACHADO, C.S.; FREGONESI, B.M.; ALVES, R.I.S.; TONANI, K.A.A.; SIERRA, J.; MARTINIS, B.S.; CELERE, B.S.; MARI, M.; SCHUHMACHER, M.; NADAL, M.; DOMINGO, J.L.; SEGURA-MUÑOZ, S. Health risks of environmental exposure to metals and herbicides in the Pardo River, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v.24, n.25, p. 20160-20172, 2017. DOI:10.1007/s11356-017-9461-z

MACINNIS-NG, C.M.; RALPH, P.J. Towards a more ecologically relevant assessment of the impact of heavy metals on the photosynthesis of the seagrass, *Zostera capricorni*. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, n.1-12, p. 100-106, 2002. DOI:10.1016/S0025-326X(01)00300-9

MALLICK, N.; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000. DOI:10.1016/S0176-1617(00)80189-3

MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**. Viçosa: UFV, 2007.

MARTINS, F.C.O.; FERNANDES, V.O. Biomassa e composição elementar (C, N e P) da comunidade perifítica no alto Rio Santa Maria da Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. v. 15, n. 1, p. 11-18, 2011. DOI:10.14210/bjast.v15n1.p11-18

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v.58, n.1, p.40-46, 2005. DOI:10.1080/00087114.2005.10589430

MASTUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with Chromium, by the Comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, Vol. 58, no. 1: 40-46, 2005

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS Jr., J. Biological monitoring: Part IIA - receiving system functional methods, relationships and indices. **Water Research**, v. 16, p. 129-139, 1982. DOI:10.1016/0043-1354(82)90102-6

MIRANDA, C.L.P. Preservação de mananciais sob a ótica da sobrevivência: história e sustentabilidade a partir do rio Santa Maria da Vitória/ES. **Dissertação de Mestrado em Arquitetura e Urbanismo**, Universidade Federal do Espírito Santo -UFES, 2009. 177p.

MIRELES, F.; PINEDO, J.L.; DACILA, J.I.; OLIVA, J.E.; SPEAKMAN, R.J.; GLASCOCK, M.D. Assessing sediment pollution from the Julian Adame-Alatorre dam by instrumental neutron activation analysis. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 20-25, 2011. DOI:10.1016/j.microc.2011.03.014

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002. DOI:10.1016/S1360-1385(02)02312-9

MUGNAI, R.; GATTI, M.G. Infra-estrutura básica de suporte para o estudo de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 506-519, 2008.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 339-347, 2006. DOI:10.1016/j.aquatox.2005.12.013

NILIN, J.; MOREIRA, L.B.; AGUIAR, J.E.; MARINS, R.; DE SOUZA ABESSA, D.M.; DA CRUZ LOTUFO, T.M.; COSTA-LOTUFO, L.V. Sediment quality assessment in a tropical estuary: the case of Ceará River, Northeastern Brazil. **Marine Environmental Research**, v. 91, p. 89-96, 2013. DOI:10.1016/j.marenvres.2013.02.009

NOBEL, P.S. **Physicochemical and environmental plant physiology**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 2009.

OECD - Organization For Economic Cooperation And Development, **Guidelines For The Testing Of Chemicals.** Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, 2006. DOI:10.1787/9789264070066-en

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; MATUO, R.; RIBEIRO, L.R.; SILVA, A.F. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p.1225-1233, 2006. DOI:10.1016/j.tiv.2006.04.001

PANTALEÃO, S.D.E.M.; ALCÂNTARA, A.V.; ALVES J.D.O.P.; SPANÓ, M.A. The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, n.3, p. 219-224, 2006. DOI:10.1002/em.20188

PEREIRA, R.S. Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos. **Revista Eletrônica de Recursos Hídricos**, v. 1, n. 1, p. 20-36. 2004.

PEREIRA, A.R.; ANGELOCCI, L.R.; SENTELHAS, P.C. **Agrometeorologia: fundamentos e aplicações práticas**. Guaíba: Agropecuária, 2002.

PEREIRA, C.D.; QUINÁIA, S.P. Estudo do coeficiente de distribuição do Cr em águas naturais. **Ambiência, Guarapuava**, v. 3, n. 1, p. 27-37, 2007.

REGIER, N.; COSIO, C.; VON MOOS, N.; SLAVEYKOVA, V.I. Effects of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte

Elodea nuttallii. **Chemosphere**, v. 128, p.56-61, 2015. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.12.078

RIGONATO, J.; JORDÃO, B. Q.; MANTOVANI, M. S. Detection of Genotoxicity of Water from an Urbanized Stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (In Vivo) and CHO-K1 Cells (In Vitro) Using Comet Assay. **Archives of Environmental Contaminationand Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 31-38, 2010. DOI:10.1007/s00244-009-9446-0

RIZHSKY, L.; LIANG, H.; MITTLER, R. The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n.40, p. 38921-38925, 2003. DOI:10.1074/jbc.M304987200

ROGERO, S.O.; CRUZ, A.S; IKEDA, T.I.; LUGÃO, A.B. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n.3, p.317-320, 2003. DOI:10.1590/S1516-14392003000300003

SANTOS-FILHO, F.M. Mercúrio, cromo, cádmio e chumbo em *Pygocentrus nattereri* (Kner, 1858) e *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) de dois rios do Pantanal-MT, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais**, Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT, 2015. 54p.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7-12, 1993. DOI:10.1104/pp.101.1.7

SEILER, H.G.; SIGEL, H.; SIGEL A. **Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds**, New York: Marcel Dekker, 1988.

SILVA, V.C.; ALMEIDA, S.M.; RESGALLA, C.JR.; MASFARAUD, J.F.; COTELLE, S.; RADETSKI, C.M. Arsenate (As V) in water: quantitative sensitivity relationships among biomarker, ecotoxicity and genotoxicity endpoints. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 92, p. 174-179, 2013. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.03.025

SILVEIRA, G.L.; LIMA, M.G.; REIS, G.B.; PALMIERI, M.J.; ANDRADE-VIERIA, L.F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 78, p. 359-367, 2017. DOI:10.1016/j.chemosphere.2017.03.048

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of Verbenaceae. **Caryologia**, v. 62, n. 4, p. 326-333, 2009. DOI: 10.1080/00087114.2004.10589698

VANDECASTEELE, C.; BLOCK, C.B. **Modern Methods for Trace Element Determination**, New York: John Wiley & Sons, 1997.

VU, C.T.; LIN, C.; SHERN, C.C.; YEH, G.; LE, V.G.; TRAN, H.T. Contamination, ecological risk and source apportionment of heavy metals in sediments and water of a contaminated river in Taiwan. **Ecological Indicators**, v. 82, p. 32-42, 2017. DOI:10.1016/j.ecolind.2017.06.008

WAHSHA, M.; JUHMANI, A.S.; BUOSI, A.; SFRISO, A.; SFRISO, A. Assess the environmental health status of macrophyte ecosystems using an oxidative stress biomarker. Case studies: The Gulf of Aqaba and the Lagoon of Venice. **Energy Procedia**, v. 125, p. 19-26, 2017. DOI:10.1016/j.egypro.2017.08.041

WANG, C.; ZHANG, S.H.; WANG, P.F.; HOU, J.; ZHANG, W.J.; LI, W.; LIN; Z.P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1468-1476, 2009. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.02.033

WETZEL, M.A.; WAHRENDORF, D.S.; VON DER OHE, P.C. Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels. **Science of the Total Environment**, v. 449, p. 199-207, 2013. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.01.016

WHITALL, D.; MASON, A.; PAIT, A.; BRUNE, L.; FULTON, M.; WIRTH, E.; VANDIVER, L. Organic and metal contamination in marine surface sediments of Guánica Bay, Puerto Rico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 80, n.1-2, p.293-301, 2014. DOI:10.1016/j.marpolbul.2013.12.053

YI, Y.; WANG, Z.; ZHANG, K.; YU, G.; DUAN, X. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze River. **International Journal of Sediment Research**, v. 23, n. 4, p. 338-347, 2008. DOI:10.1016/S1001-6279(09)60005-6

WU, B.; LI, X.; SONG, J.; HU, L.; SHI, X. Impact of extreme metal contamination at the supra-individual level in a contaminated bay ecosystem. **Science of The Total Environment**, v. 557-558, p. 102-109, 2016. DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.03.047

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135-50, 2008. DOI:10.1016/j.aca.2007.11.018

ZIMMERMANN, G.P.R.; DALZOCHIO, T.; GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta toxicológica argentina**, v. 24, n.2, p. 97-104, 2017.

CAPITULO 1 – TOXICOGENÉTICA EM *Allium cepa* L. E CÉLULAS CHO-K1 EXPOSTAS ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL)

Autores: Ian Drumond Duarte[1] • Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro[2] • Silvia Tamie Matsumoto[1*]

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitoria, ES, Brasil.
(2) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Química, CEP 29075-910, Vitoria, ES, Brasil.
* Autor para correspondência: siltamie@gmail.com

Periódico a ser submetido: *Environmental Science and Pollution Research*.

RESUMO

O Rio Santa Maria da Vitória (SMV), localizado no Estado do Espírito Santo (Brasil), constitui uma das principais fontes de abastecimento de água da região. No entanto, sua bacia hidrográfica está localizada em uma região antropizada, podendo receber contaminantes como efluentes e resíduos domésticos e agrícolas. Considerando a sua importância, este estudo avaliou a qualidade da água deste rio por meio de respostas toxicogenéticas em células de *Allium cepa* L. e cultura celular da linhagem CHO-K1. Para isso, foram estabelecidas seis estações amostrais georreferênciadas dais quais amostras de água subsuperficial foram coletadas em duas amostragens em 2015. A quantificação de metais nas amostras de água foi baseada no método U.S. EPA 200.8. O teste do *A. cepa* foi realizado utilizando as células das regiões meristemáticas e F1 da raiz seguindo o protocolo usual. A partir da análise das fases do ciclo celular e os danos nos cromossomos, foram calculados o índice mitótico, a taxa de aberrações cromossômicas e a frequência de micronúcleos para avaliar, respectivamente, a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagênicidade das amostras avaliadas. A partir da cultura celular da linhagem CHO-K1 foi avaliado o potencial citotóxico das amostras por meio dos testes do MTT, Azul de tripan e índice de divisão nuclear. Além disso, foram avaliados os potenciais genotóxico pelo ensaio do cometa e, o mutagênico pelo teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese. Entre os metais quantificados, destacam-se Mn, Pb, Cu e principalmente Al que apresentou valores acima do aceito pela legislação brasileira CONAMA 357. Considerando as variáveis avaliadas por *A. cepa* e CHO-K1, foi possível observar maior sensibilidade de *A. cepa* na avaliação da qualidade da água do Rio SMV. Neste aspecto, foram detectados potenciais citotóxicos e genotóxicos significativos, sendo estes atribuídos, especialmente às concentrações de Al.

Palavras-chave: Alumínio • citotoxicidade • genotoxicidade • metais • mutagênicidade •

ABSTRACT

The Santa Maria da Vitória River (SMV), located in the State of Espírito Santo (Brazil), constitutes one of the main water supply sources in the region. However, its watershed is located in a anthropized region, being able to receive contaminants such as effluents and domestic and agricultural residues. Considering their importance, this study evaluated the water quality of this river through toxicogenetic responses in *Allium cepa* L. and CHO-K1 culture cells lineage. For that, six georeferenced sampling stations were established and subsurface water samples were collected in two samplings on 2015. Metal quantification on water samples was based on U.S. EPA 200.8 method. The *A. cepa* test was performed using meristematic and F1 root cells following the usual protocol. From analysis of cell cycle phases and chromosomes damages were calculated the mitotic index, the rate of chromosomal aberrations and the micronuclei frequency to evaluate, respectively, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity. The lineage CHO-K1 cell culture was used to evaluate the cytotoxic potential by MTT, Trypan blue tests and nuclear division index. Furthermore, genotoxic potential was evaluated by comet assay, and mutagenic pontential by micronucleus test with cytokinesis block. Among the quantified metals, it's highlights Mn, Pb, Cu and mainly Al that presented values higher than those accepted by the Brazilian legislation CONAMA 357. Considering the variables evaluated by *A. cepa* and CHO-K1, it was possible to observe the highest sensitivity of *A. cepa* in this evaluation. In this regard, significant cytotoxic and genotoxic potentials were detected, and these were attributed, especially to Al concentrations.

Keywords: Aluminum • cytotoxicity • genotoxicity • metals • mutagenicity •

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista as relações de produção e consumo da sociedade, observa-se que a presença de compostos químicos nos ecossistemas, a diversificação das drogas sintéticas bem como a utilização de agroquímicos tornaram-se necessários (CHANDEL; TANK, 2016). Não bastasse, esse descontrole destaca-se como problema chave na conservação dos ecossistemas e na saúde humana, tendo em vista os milhares de compostos naturais e industriais que contaminam as águas superficiais (SCHWARZENBACH et al., 2006). Nesse aspecto, destacam-se os efluentes domésticos, industriais e agrícolas não tratados ou tratados incorretamente que podem depositar diversos contaminantes nas águas superficiais e nos sedimentos de ambientes lóticos (AKINBORO et al., 2011; KOPLIKU; MESI, 2013).

Segundo Han e outros (2016), embora existam diretrizes com longas listas de poluentes para a avaliação da qualidade da água, é difícil estimar todo o conjunto de efeitos adversos envolvidos na contaminação ambiental. O monitoramento da qualidade água ocorre usualmente por meio de variáveis abióticas que possibilitam verificar influências antrópicas e litológicas sobre os ecossistemas aquáticos (DUARTE et al., 2012). Entretanto, segundo Buss e outros (2008), faz-se necessária a implementação de critérios apropriados para a avaliação da qualidade da água que aliem a tradicional abordagem abiótica à avaliação biótica do meio. Desse modo, a realização de bioensaios que avaliem os potenciais genotóxicos de recursos hídricos são essenciais (CHARALAMPOUS et al., 2015; WARREN et al., 2015).

Os recursos hídricos podem apresentar micropoluentes desconhecidos ou não detectados bem como misturas complexas de contaminantes potencialmente tóxicas que podem ser avaliadas apenas por variáveis bióticas (LUO et al., 2014). Neste aspecto, destacam-se os biomarcadores que são definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas que são indicativos da exposição ou efeito à xenobióticos (LAM; GRAY, 2003). De acordo com Nigro e outros (2006), os biomarcadores baseados em respostas moleculares e celulares refletem respostas sobre os primeiros sinais de alteração ambiental, além de atuar como receptores diretos dos agentes presentes no ambiente (FERNANDES et al., 2009). Os biomarcadores são ferramentas

importantes nos estudos de avaliação da qualidade ambiental devido à sua sensibilidade (CAJARAVILLE et al., 2000) e respostas à misturas complexas de poluentes (MONSERRAT et al., 2007).

Dentre os biomarcadores, há àqueles avaliados em sistemas-testes baseados em espécimes vegetais tais como *Allium cepa* L. que além de se correlacionarem a outros sistemas bióticos, são úteis no monitoramento dos potenciais efeitos sinérgicos da mistura de poluentes (BARBÉRIO, 2013; DOURADO et al., 2017). A partir da análise das células meristemáticas do *A. cepa*, é possível determinar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diversas amostras, tendo em vista a alta sensibilidade desta espécie à compostos químicos (GRIPPA et al., 2012). Logo, o teste do *A. cepa* apresenta-se como ferramenta eficaz para a avaliação de contaminantes nos recursos hídricos (SALLES et al., 2016).

Além dos bioensaios em espécimes vegetais, os ensaios baseados em cultura de células de mamíferos tem sido ferramenta eficiente na análise dos contaminantes ambientais (CARDOZO et al., 2006; MARIM-MORALES et al., 2016). A utilização de células de mamíferos da linhagem CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) tem mostrado eficácia em estudos de biomonitoramento por sua sensibilidade à agentes citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (MATSUMOTO et al., 2005; RIGONATO et al., 2010; BONOMO et al., 2016; MOROZESK et al., 2016) e capacidade de fornecer respostas relacionadas à saúde humana, tendo em vista a proximidade taxonômica (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, apresenta vantagens como o ciclo de divisão celular curto e fácil reprodutibilidade (SPEIT et al., 1998; ROGERO et al., 2003).

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória situa-se na região centro serrana do Estado do Espírito Santo. Suas principais atividades econômicas são o turismo, a produção industrial e agropecuária, a geração de energia elétrica e o abastecimento público (MIRANDA, 2009). Todavia, o Rio Santa Maria da Vitória está localizado em uma região fortemente antropizada e sofre com desmatamentos em áreas de preservação permanente, assoreamento de suas margens, utilização indiscriminada de agroquímicos e eliminação inadequada de resíduos sólidos e líquidos, sobretudo efluentes domésticos. Sua bacia hidrográfica atravessa vários povoados com atividades agrícolas tipicamente hortigranjeiras (MARTINS; FERNANDES, 2011; GRIPPA et al., 2012).

Os recursos hídricos são indispensáveis, sendo utilizados virtualmente em todos os aspectos da vida humana bem como por toda a biota, sendo necessário assegurar que a água não apresente substâncias potencialmente perigosas (SINGH, 2015). Sendo assim, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água do Rio Santa Maria da Vitória ao longo de três municípios, utilizando o teste do *A. cepa,* o ensaio *in vitro* com células CHO-K1 e a quantificação de metais dissolvidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo, período e amostragem

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) apresenta área de drenagem de aproximadamente 1876 km^2 e extensão de 122 Km até a sua foz, na Baía de Vitória. Esta bacia situa-se na região centro serrana do Estado do Espírito Santo (ES, Brasil) e abrange os municípios de Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Cariacica, Serra e Vitória. Segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2017), tendo em vista sua dimensão, a bacia hidrográfica do Rio SMV enquadra-se no nível 4. Considerando a resolução brasileira de nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA que estabelece a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, o Rio SVM enquadra-se na classe 2.

Para a avaliação do Rio SMV, seis estações amostrais georreferênciadas foram estabelecidas (GPS, Garmin Nüvi) (Tabela 1).

Tabela 1: Localização e georreferências das estações amostrais no Rio Santa Maria da Vitória.

	Georreferência	Detalhes
EA1	20° 3.333'S / 40° 46.447'O	Localizada à montante do centro do Município de Santa Maria de Jetibá
EA2	20° 2.290'S / 40° 43.782'O	Situada à jusante próximo ao centro do Município de Santa Maria de Jetibá
EA3	20° 3.248'S / 40° 38.996'O	Localizada no reservatório Rio Bonito
EA4	20° 4.896'S / 40° 35.043'O	Situada na represa Suíça
EA5	20° 6.080'S / 40° 31.067'O	Localizada na região central do Município de Santa Leopoldina
EA6	20° 10.283'S / 40° 23.656'O	Situada próxima à estação de captação da companhia de abastecimento da região localizada no Município de Cariacica.

O mapa de localização da área de estudo e dos tipos de solo (Figura 1) foi elaborado no software SIG ArcMap 10.1 a partir de dados vetoriais (*shapefille*) adquiridos junto aos sites do IBGE e GEOBASES.

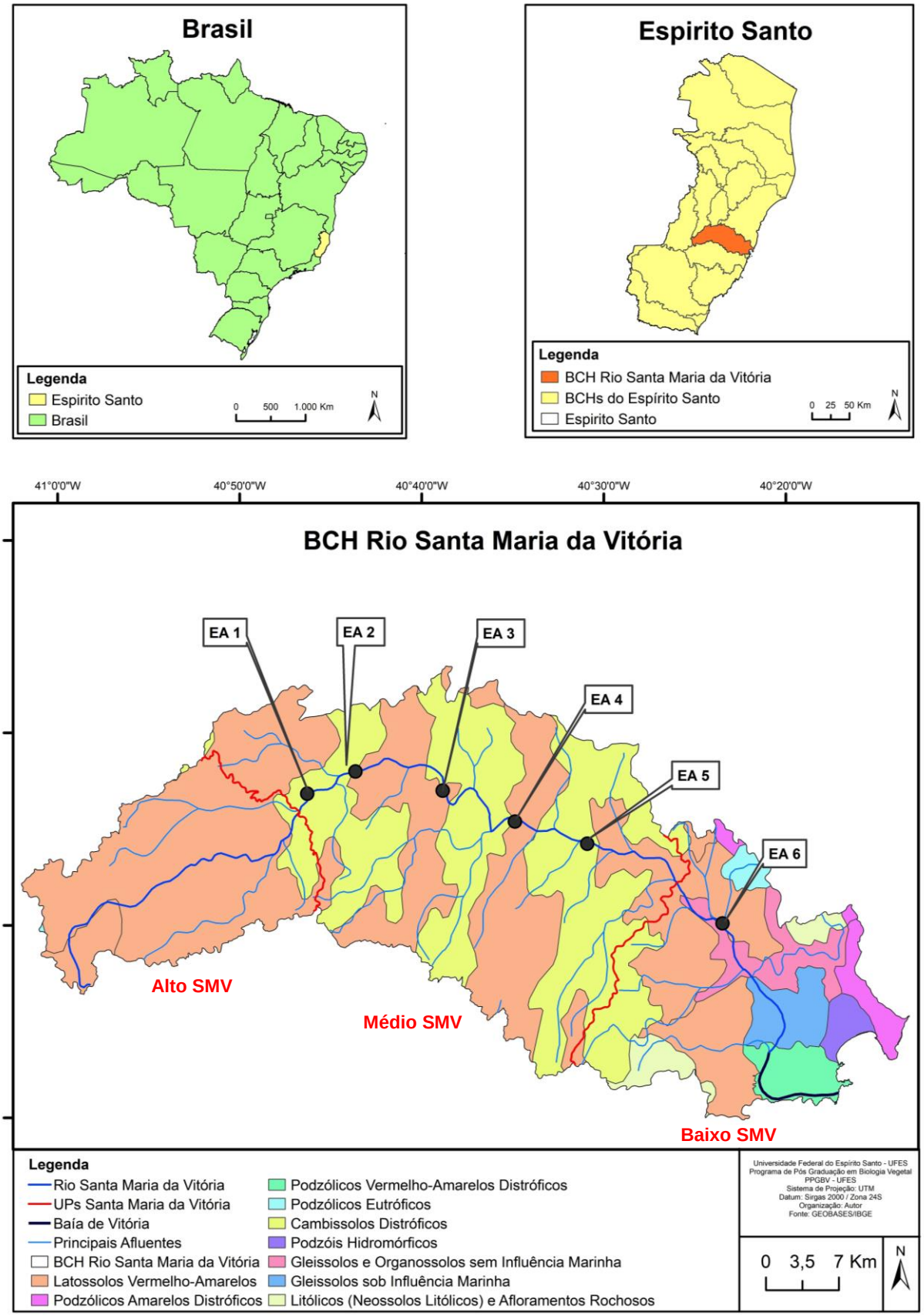

Figura 1: Mapa pedológico da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil), destacando a localização das estações amostrais.

As amostragens foram realizadas no início de Abril de 2015 e no início de Outubro do mesmo ano. Amostras, em duplicata, de água subsuperficial foram coletadas a aproximadamente 20 cm da superfície e armazenadas em garrafas plásticas previamente higienizadas. As amostras para a quantificação elementar foram armazenadas em garrafas plásticas higienizadas em solução ácida de H_3NO_2 (10 % v/v), sendo essas acidificadas a 2 % (v/v) com o mesmo ácido. Em ambos os casos, as amostras foram mantidas sob refrigeração (-6 °C) até análise.

Para a avaliação da precipitação mensal total (mm) na região, foram consideradas as estações pluviométricas da ANA e da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais - CPRM: estação 02040007, situada à montante do reservatório Rio Bonito; estação 02040018, situada à jusante de Rio Bonito; estação 02040010, situada à jusante da represa Suíça. Já para a vasão ($m^3.s^{-1}$) no Rio SMV, foram considerados os dados obtidos por Guimarães (2016) cujo estudo utilizou em estações de monitoramento presentes à montante e jusante do reservatório Rio Bonito, e à jusante da represa Suíça.

2.2. Quantificação elementar

Para a avaliação elementar, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa azul e então submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. Desse modo, os metais Al, Ba, Mn e Zn foram quantificados a partir de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) utilizando o equipamento Optima 7000 DV (Perkin Elmer). Enquanto os metais As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Se foram quantificados por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer).

2.3. Teste do Allium cepa

O teste do *A. cepa* foi realizado a partir do protocolo de Fiskesjö (1994), com modificações. Assim, bulbos de *A. cepa* foram previamente selecionados e tiveram seus catafilos externos e raízes retiradas, mantendo-se o meristema intacto. Após padronização de tamanho, sete bulbos foram lavados e então expostos em tubos de ensaio contendo 15 mL de amostras de água das estações amostrais. O controle negativo foi realizado com o mesmo volume de água destilada e o controle positivo, solução de Metil-metanosulfonato - MMS (4×10^{-4} mM) (Sigma, St. Louis, MO, USA), reconhecido agente indutor de danos no DNA.

A exposição ocorreu durante 5 dias até o crescimento radicular em torno de 2 cm, então cinco bulbos mais uniformes foram selecionados para a retirada das raízes.

Para a preparação das lâminas, as raízes previamente fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético v/v) passaram pelo processo de coloração conforme método tradicional de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), com hidrólise em HCl 1M (60°C) por 7 minutos, seguida de imersão em reativo de Schiff sob ausência de luz. Cinco mil células foram analisadas para cada tratamento em microscópio de luz Nikon E200.

As fases do ciclo celular bem como as alterações observadas nos cromossomos foram registradas e suas frequências utilizadas para o cálculo do índice mitótico (IM), taxa de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) como estabelecido por Leme e Marin-Morales (2008). A partir de IM foi mensurado o potencial citotóxico, obtido por meio da razão do número total de células em divisão pelo número total de células analisadas. Para o potencial genotóxico avaliado por meio de AC, foram consideradas as alterações nos diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como a presença de ponte cromossômica, quebra cromossômica, C-metáfase, anáfase multipolar, atraso cromossômico, aderência cromossômica, perda cromossômica, núcleo fragmentado e broto nuclear. Neste caso, AC foi calculado por meio da razão entre o total de células contendo alterações cromossômicas pelo total de células analisadas. E por meio do MN, foi avaliado o potencial mutagênico cujo cálculo foi a partir da frequência de células meristemáticas contendo o micronúcleo. Além destes, foi avaliado o potencial mutagênico observado nas células diferenciadas F1 (F1-MN) pela frequência de micronúcleos observadas nestas células.

2.4. Cultura celular

2.4.1. Linhagem, cultivo e tratamento

Foram utilizadas células de ovário de Hamster Chinês (CHO-K1), linhagem celular não metabolizadora, fornecidas pelo Banco de células do Estado do Rio de Janeiro (Brasil). O crescimento celular ocorreu em 5,0 mL de meio de cultura DMEM/F12 (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK). O cultivo foi realizado em monocamadas dispostas em frascos de 25 cm^2 com concentração inicial de 1,0 x

10^6 células por frasco em estufa tipo BOD à 37 ºC, possibilitando o ciclo celular de 12 horas.

As células CHO-K1 foram cultivadas e estabilizadas por um ciclo celular completo de 12 horas, sendo posteriormente acrescidos 3,75 mL de meio de cultura livre de soro bovino e 1,25 mL das amostras do Rio SMV para tratamento durante um ciclo celular. Anteriormente à adição destas amostras, o pH das mesmas foram ajustados para 7,0. O controle negativo foi realizado com solução salina tamponada (PBS pH 7,4) e o controle positivo, com solução de MMS (4 x 10^{-4} mM).

2.4.2. Ensaios de viabilidade celular e citotoxicidade

Após o tratamento, o ensaio de proliferação celular MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio) foi realizado de acordo com Mosmann (1983). As células foram cultivadas em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM/F12 (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK) na concentração de 2 x 10^4 células por placas. Para estabilização, as placas foram mantidas à 37 °C em estufa do tipo BOD. Posteriormente, as células foram expostas aos tratamentos por um ciclo celular (12 horas) e então incubadas em solução MTT (5,0 mg/ml) por 4 horas. Após incubação, 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram acrescentados para a precipitação dos cristais de formazan. A mistura foi solubilizada e as absorbâncias de cada poço foram lidas a 550 nm em leitor de Elisa Epoch (BioTek).

Além do ensaio do MTT, foi realizado o teste de viabilidade celular Azul de tripan® conforme método de Strober (2001). Após os tratamentos, as células foram desprendidas dos frascos e 10 µL da solução celular foram solubilizadas em 10 µL de solução Azul de tripan® (0,4 %) (GIBCO®, Paisley, Scotland, UK). O teste foi realizado em triplicata.

2.4.3. Ensaio do cometa

A realização do teste de viabilidade celular precedeu a execução do ensaio do cometa cujo procedimento seguiu o método descrito por Singh e outros (1988), com modificações. Uma alíquota de 20 µL da suspensão celular foi solubilizada em 120 µL de solução agarose de baixo ponto de fusão (0,5 %, UltraPure™) e aplicadas sobre lâminas pré-revestidas com agarose (1,5 %, UltraPure™).

Posteriormente, essas foram mantidas a 4º C. Em seguida, as lâminas foram imersas em solução de lise alcalina (NaCl 2,5 M, Tris 10 mM, EDTA 100 mM, DMSO 10 %, Triton X-100 1 %, pH 10,0) por uma hora.

Após o processo de lise, as lâminas foram lavadas com água deionizada e incubadas durante 20 minutos em solução de eletroforese gelada (NaOH 0,3 M, EDTA 1 mM, pH 13) e consecutivamente submetidas à eletroforese (25 V, 300 mA) por mais 20 minutos. Após isso, as lâminas foram neutralizadas em solução Tris (0,4 M, pH 7,5) e fixadas em etanol (PA). Para análise dos nucleóides, as lâminas foram coradas com Gel red^{TM} (5 %).

Foram analisados 100 nucleóides por lâmina em microscópio de fluorescência Nikon E200, combinando luz azul (480 nm) e filtro amarelo. A análise seguiu a classificação visual de danos (classes 0, 1, 2, 3 e 4) proposta por Collins e outros (1995), sendo calculado o índice de danos no DNA (ID_{ua}) a partir do somatório das multiplicações entre o número da classe e o número de nucleóideos da respectiva classe, pelo total de nucleóides avaliados.

2.4.4. Teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese

O teste do micronúcleo foi realizado a partir do bloqueio da citocinese de acordo com o método proposto por Fenech e Morley (1985). Para isto, após o tratamento com as amostras do Rio SMV e controles, as células foram lavadas com solução PBS e em seguidas receberam 5,0 mL de meio de cultura completo com 3 $mg.mL^{-1}$ de Citocalasina-B (Sigma®, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, as células foram incubadas por 18 horas para a indução de células binucleadas. Após esses tratamentos, as células foram desprendidas dos frascos e fixadas conforme o protocolo de Oliveira e outros (2006). Para análise, as lâminas foram montadas e a coloração realizada com Laranja de acridina 0,1 % (Sigma®, St. Louis, MO, USA) para então serem analisadas em microscópio de fluorescência Nikon E200, combinando luz azul (480 nm) e filtro amarelo. Foram contabilizadas 1000 células binucleadas por tratamento para o cálculo da frequência de micronúcleos (FENECH et al., 2003).

Após o processo de bloqueio da citocinese, complementar aos ensaios de citotoxicidade, foi calculado o índice de divisão nuclear (IDN) a partir da avaliação de 100 células por lâmina, considerando o número de células mononucleadas,

binucleadas, trinucleadas e polinucleadas pelo total de células analisadas, conforme estabelecido por Fenech e outros (2003).

2.5. Análises estatísticas

A partir do programa InfoStat (Versão para estudantes) os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Os dados de metais não seguiram a distribuição normal, logo foram analisados por meio do teste de Kruskal Wallis (P <0,05) e expressos em média ± desvio padrão. Os dados bióticos, alcançados a partir dos ensaios com *A. cepa* e CHO-K1 seguiram a distribuição normal, sendo então avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$) e expressos em média ± erro padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. *Precipitação, vazão pluvial e metais dissolvidos*

Considerando o regime de precipitação do mês anterior à primeira amostragem, ou seja Março/2015, as medições de precipitação total mensal foram de 136,50 mm à montante de Rio Bonito, 40,90 mm à jusante de Rio Bonito e 78,90 mm à jusante de Suíça na primeira amostragem. E na segunda, considerando a precipitação de Setembro/2015, 21,39 mm à montante de Rio Bonito, 29,39 mm à jusante de Rio Bonito e 32,00 mm à jusante de Suíça.

A vasão média observada na primeira amostragem foi de 3,45 $m^3.s^{-1}$ à montante de Rio Bonito, 1,56 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Rio Bonito e 3,55 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Suíça. Já na segunda amostragem, observou-se as vasões de 1,28 $m^3.s^{-1}$ à montante de Rio Bonito, 2,30 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Rio Bonito e 3,58 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Suíça. Sendo assim, constata-se que tanto a precipitação quanto a vasão ao longo do curso do Rio SMV é variada, podendo esta última ser influenciada pelos manejos dos reservatórios Rio Bonito e represa Suíça que atuam na reserva de água para abastecimento público e produção de energia.

A quantificação dos metais dissolvidos indicou a presença dos doze metais avaliados nas estações amostrais avaliadas. Comparando-se as concentrações dos metais entre as estações amostrais na primeira amostragem, EA1 apresentou níveis superiores de Al (1096,820 ± 7,020), Ba (31,480 ± 1,011), Mn (60,930 ± 0,500) em relação à maioria das outras estações amostrais. Na segunda amostragem, além desses, EA1 também apresentou níveis superiores de Cr

(3,975 ± 0,032) e Pb (7,971 ± 0,016) em relação às outras estações (Tabelas 2 e 3).

Todavia, outras estações também se destacaram pelos níveis superiores de alguns metais, como Al em EA5 (627,380 ± 8,658) e Mn em EA4 (42,170 ± 0,772) na primeira amostragem, e Al em EA2 (250,950 ± 1,079), Cr (2,298 ± 0,023) e Cu (4,900 ± 0,284) em EA5 na segunda. Entretanto, tendo em vista os níveis aceitáveis preconizados pela legislação brasileira CONAMA 357, observa-se que Al apresentou níveis consideravelmente elevados, chegando a 1096,820 ± 7,020 ($\mu g.L^{-1}$) em EA1 na primeira amostragem, ou seja concentração 10 vezes maior do que aquela estabelecida pela referida legislação.

Os elevados teores de Al observados podem estar relacionados às características pedológicas e geológicas da bacia hidrográfica, bem como aos potenciais processos de erosão superficial do solo e lixiviação. Como pode ser observado na Figura 1, os tipos de solo predominantes na bacia hidrográfica do Rio SMV são o Latossolo Vermelho-Amarelo e o Cambissolo.

Segundo Oliveira e outros (1983), o Latossolo presente nesta área possui grande porosidade, textura argilosa e são bem drenados, conferindo-o alta permeabilidade. Enquanto o Cambissolo apresenta maiores valores de siltes, proporcionando maior impermeabilização superficial, tornando-o mais susceptível aos processos erosivos. Os Latossolos e os Cambissolos presentes na área de estudo são classificados como distróficos apresentando saturação de alumínio de até 50%. Sendo assim, esses solos podem ser considerados de baixa fertilidade natural (IBGE, 2015).

Tabela 2: Metais quantificados (µg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na primeira amostragem.

	Primeira amostragem								
	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6	LD 1	LQ 1	CONAMA**
Al	1096,820 ± 7,020^{D}	405,250 ± 6,646^{ABC}	92,470 ± 1,859^{A}	473,100 ± 5,015^{BCD}	627,380 ± 8,658^{CD}	322,200 ± 2,578^{AB}	0,700	2,340	100,000
As	0,161 ± 0,008^{BC}	0,167 ± 0,004^{C}	0,167 ± 0,007^{C}	0,160 ± 0,004^{ABC}	0,130 ± 0,005^{A}	0,144 ± 0,004^{AB}	7,802*	26,008*	10,000
Ba	31,480 ± 1,011^{B}	19,990 ± 0,204^{AB}	19,370 ± 0,054^{A}	21,390 ± 0,066^{B}	19,890 ± 0,066^{AB}	18,960 ± 0,125^{A}	0,350	1,150	700,000
Cd	0,036 ± 0,002^{C}	0,018 ± 0,003^{A}	0,029 ± 0,001^{BC}	0,029 ± 0,002^{BC}	0,024 ± 0,000^{AB}	0,026 ± 0,003^{AB}	1,084*	3,612*	1,000
Co	0,218 ± 0,001^{CD}	0,167 ± 0,002^{BCD}	0,069 ± 0,001^{A}	0,158 ± 0,001^{ABC}	0,245 ± 0,002^{D}	0,142 ± 0,000^{AB}	1,789*	5,962*	50,000
Cr	2,811 ± 0,014^{D}	2,076 ± 0,006^{ABC}	1,949 ± 0,006^{A}	2,194 ± 0,022^{CD}	2,119 ± 0,017^{BCD}	2,007 ± 0,006^{AB}	0,134	0,448	50,000
Cu	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,600 ± 0,374	0,8	2,6	9,000
Mn	60,930 ± 0,500^{C}	30,510 ± 0,540^{AB}	<LQ	42,170 ± 0,772^{BC}	37,950 ± 1,207^{ABC}	27,460 ± 0,890^{A}	7,240	24,140	100,000
Ni	0,929 ± 0,001^{D}	0,611 ± 0,002^{A}	0,900 ± 0,010^{CD}	0,714 ± 0,012^{AB}	0,784 ± 0,002^{BCD}	0,768 ± 0,008^{ABC}	3,935*	13,117*	25,000
Pb	1,642 ± 0,016^{C}	0,725 ± 0,002^{A}	1,215 ± 0,033^{BC}	1,625 ± 0,024^{C}	1,141 ± 0,019^{ABC}	1,078 ± 0,008^{AB}	3,521*	11,736*	10,000
Se	0,272 ± 0,006^{AB}	0,296 ± 0,001^{BC}	0,366 ± 0,037^{C}	0,284 ± 0,025^{ABC}	0,267 ± 0,018^{AB}	0,242 ± 0,020^{A}	65,273*	217,577*	10,000
Zn	8,930 ± 0,000	<LD	3,030 ± 0,123	<LD	<LD	<LD	0,570	1,900	180,000

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. *Concentração expressa em ng.L^{-1}. **CONAMA 357, limites para ambientes Classe 2.

Tabela 3: Metais quantificados (µg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na segunda amostragem.

	Segunda amostragem								
	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6	LD 1	LQ 1	CONAMA***
Al	1043,600 ± 6,679^{D}	250,950 ± 1,079^{CD}	51,770 ± 1,362^{A}	145,430 ± 2,734^{ABC}	130,640 ± 0,549^{AB}	181,940 ± 0,418^{BCD}	0,700	2,340	100,000
As	0,170 ± 0,003^{BC}	0,203 ± 0,004^{C}	0,142 ± 0,001^{ABC}	0,144 ± 0,082**	0,122 ± 0,004^{AB}	0,119 ± 0,001^{A}	7,802*	26,008*	10,000
Ba	31,980 ± 0,179^{D}	22,070 ± 0,139^{CD}	17,860 ± 0,077^{AB}	18,360 ± 0,072^{ABC}	17,430 ± 0,071^{A}	20,150 ± 0,153^{BCD}	0,350	1,150	700,000
Cd	0,083 ± 0,003^{C}	0,024 ± 0,000^{AB}	0,018 ± 0,001^{A}	0,038 ± 0,031**	0,024 ± 0,002^{AB}	0,026 ± 0,002^{BC}	1,084*	3,612*	1,000
Co	0,429 ± 0,003^{C}	0,311 ± 0,002^{BC}	0,050 ± 0,001^{A}	0,136 ± 0,110**	0,129 ± 0,001^{ABC}	0,119 ± 0,003^{AB}	1,789*	5,962*	50,000
Cr	3,975 ± 0,032^{C}	2,118 ± 0,021^{ABC}	1,572 ± 0,005^{A}	2,537 ± 0,622**	2,298 ± 0,023^{BC}	1,956 ± 0,008^{AB}	0,134	0,448	50,000
Cu	4,200 ± 0,533^{AB}	<LD	<LD	<LD	4,900 ± 0,284^{B}	2,600 ± 0,060^{A}	0,8	2,6	9,000
Mn	58,59 ± 2,057^{BC}	78,33 ± 0,697^{C}	<LQ	29,800 ± 1,019^{AB}	<LQ	26,820 ± 0,204^{A}	7,240	24,140	100,000
Ni	1,218 ± 0,01^{C}	0,712 ± 0,017^{AB}	0,540 ± 0,006^{A}	0,722 ± 0,598**	0,827 ± 0,017^{ABC}	0,865 ± 0,012^{BC}	3,935*	13,117*	25,000
Pb	7,971 ± 0,016^{C}	1,820 ± 0,022^{AB}	0,920 ± 0,004^{A}	2,429 ± 1,977**	4,689 ± 0,080^{BC}	2,365 ± 0,031^{ABC}	3,521*	11,736*	10,000
Se	0,242 ± 0,020^{AB}	0,281 ± 0,010^{BC}	0,298 ± 0,032^{C}	0,285 ± 0,171**	0,236 ± 0,017^{A}	<LQ	65,273*	217,577*	10,000
Zn	4,490 ± 0,106	<LD	<LD	6,380 ± 0,343	<LD	<LD	0,570	1,900	180,000

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. *Concentração expressa em ng.L^{-1}. **Valor desconsiderado na análise estatística tendo em vista o desvio padrão elevado. ***CONAMA 357, limites para ambientes Classe 2.

De acordo com dados do Serviço Geológico do Brasil (VIEIRA; MENEZES, 2015), o alto e médio SMV está assentado sobre substrato geológico pertencente a unidade estratigráfica Província Mantiqueira, composto por rochas graníticas ricas em alumínio e gnáissicas paraluminosas. Adicionalmente, segundo Gatto e outros (1983), o alto e médio SMV possui relevo montanhoso, fortemente ondulado e frentes escarpadas. Enquanto o baixo SMV é caracterizada por relevo ondulado e suavemente ondulado.

Esta configuração morfológica, associada às características pedológicas e geológicas bem como aos eventos de precipitação e vazão do rio, podem propiciar os processos de erosão e lixiviação na área de estudo, possibilitando, por exemplo, o aporte de Al ao leito do Rio SMV bem como outros elementos. Neste sentido, destaca-se que a erosão do solo é considerada a principal degradação ambiental, causando a perda de solo agricultável bem como o assoreamento e a contaminação de cursos d'água, represas e lagos (VESTENA, 2008; CARVALHO et al., 2009). O processo erosivo envolve tanto forças ativas, como precipitação, declividade, capacidade de infiltração no solo e o comprimento da rampa quanto forças passivas, como a resistência do solo à ação do cisalhamento da água e a densidade da cobertura vegetal (BERTONI; LOMBARDI NETO, 2008).

Os metais usualmente estão relacionados à poluição ambiental, sendo potencialmente mutagênicos à biota. O Al é considerado o metal mais abundante (PATRA et al., 2000) e o terceiro elemento mais frequente na crosta terrestre, constituindo mais de 8% da crosta terrestre (ACHARY et al., 2008). Grande parte do interesse pelas investigações dos efeitos do Al nos ambientes aquáticos decorrem de trabalhos que relacionam a sua toxidez aos ambientes ácidos, como observado nas amostras de água do Rio SMV que se apresentaram levemente ácidas, com pH variando de 5,41 a 5,75. Isto por que este metal torna-se mais solúvel e, por esta razão, potencialmente mais tóxico à medida que o pH diminui abaixo de 6,0 (GENSEMER; PLAYLE, 1999). Assim, de acordo com Alstad e outros (2005), concentrações elevadas de Al, como observado nas amostras avaliadas do Rio SMV, podem representar um grande problema ambiental.

Avaliando-se o uso e ocupação do solo da bacia do Rio SMV, com 22,08 % de atividades agrícolas e 6,87 % de pastagens (GUIMARÃES, 2016), os potenciais processos de erosão superficial e lixiviação bem como os problemas

de infertilidade do solo, é possível sugerir que a presença de diversos metais dissolvidos nas amostras avaliadas também podem estar relacionadas à utilização de insumos agrícolas cujas formulações apresentam concentrações de metais. Os fertilizantes elaborados a partir de rochas fosfatadas, por exemplo, podem apresentar concentrações significantes de Cd (O' CONNOR, 2005), o esterco de origem animal pode apresentar Zn, Cd e Cu (ALLOWAY, 1990) e aditivos alimentares podem apresentar compostos de As (O' NEILL, 1990).

Além disso, destacam-se as possibilidades de adição de Mn, Zn, Co e Pb via aplicação de agrotóxicos e fertilizantes em diversos tipos de solo (GIMENO-GARCIA et al., 1996). Nesse aspecto, destaca-se o estudo de Nziguheba e Smolders (2008) que avaliaram 196 amostras de fertilizantes de 12 países europeus e concluiram que estes fertilizantes e os fosfatos de rochas utilizados para produzi-los são fontes significativas de contaminação do solo por As, Cr, Cd e Pb.

3.2. Toxicogenética em Allium cepa *e CHO-K1*

Os resultados do teste do *A. cepa* revelaram que na primeira amostragem (Tabela 4; Figura 2), todas a estações avaliadas apresentaram IM inferiores em relação ao controle negativo (0,095 ± 0,005), enquanto que na segunda amostragem apenas EA3 (0,101 ± 0,006) não apresentou diferença significativa em relação ao mesmo (0,114 ± 0,006).

Tanto na primeira quanto na segunda amostragem, as estações com IM inferiores não apresentaram diferença significativa entre si, indicando que o potencial efeito citotóxico das amostras é semelhante. Desse modo, observa-se a redução substancial da frequência de células em divisão nessas estações amostrais. Este processo relaciona-se ao elevado número de células na fase interfase em relação às outras fases do ciclo de divisão celular e pode ocorrer pela ação dos pontos de checagem G1/S e G2 do ciclo celular que inibem a síntese de DNA e/ou bloqueiam o ciclo após a detecção de danos sobre o material genético (ALBERTS et al., 2008).

Tabela 4: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS $4x10^{-4}$ mM) nas duas amostragens.

	Controle negativo	MMS $4x10^{-4}$ mM	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6
				Primeira amostragem				
IM	$0,095 \pm 0,005^{B}$	$0,055 \pm 0,005^{A}$	$0,064 \pm 0,005^{A}$	$0,060 \pm 0,005^{A}$	$0,049 \pm 0,005^{A}$	$0,057 \pm 0,005^{A}$	$0,060 \pm 0,005^{A}$	$0,064 \pm 0,005^{A}$
AC	$0,001 \pm 0,001^{A}$	$0,014 \pm 0,001^{C}$	$0,003 \pm 0,001^{A}$	$0,010 \pm 0,001^{B}$	$0,014 \pm 0,001^{C}$	$0,017 \pm 0,001^{C}$	$0,013 \pm 0,001^{C}$	$0,006 \pm 0,001^{A}$
MN	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,010 \pm 0,000^{C}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$
F1-MN	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,004 \pm 0,000^{C}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,001 \pm 0,000^{B}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{B}$
				Segunda amostragem				
IM	$0,114 \pm 0,006^{C}$	$0,050 \pm 0,006^{A}$	$0,085 \pm 0,006^{B}$	$0,079 \pm 0,006^{B}$	$0,101 \pm 0,006^{C}$	$0,094 \pm 0,006^{B}$	$0,087 \pm 0,006^{B}$	$0,093 \pm 0,006^{B}$
AC	$0,002 \pm 0,001^{A}$	$0,013 \pm 0,001^{C}$	$0,015 \pm 0,001^{C}$	$0,009 \pm 0,001^{B}$	$0,016 \pm 0,001^{C}$	$0,016 \pm 0,001^{C}$	$0,015 \pm 0,001^{C}$	$0,015 \pm 0,001^{C}$
MN	$0,000 \pm 0,001^{A}$	$0,014 \pm 0,001^{B}$	$0,002 \pm 0,001^{A}$	$0,001 \pm 0,001^{A}$	$0,004 \pm 0,001^{A}$	$0,003 \pm 0,001^{A}$	$0,006 \pm 0,001^{A}$	$0,003 \pm 0,001^{A}$
F1-MN	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,008 \pm 0,000^{C}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$). EP: Erro padrão.

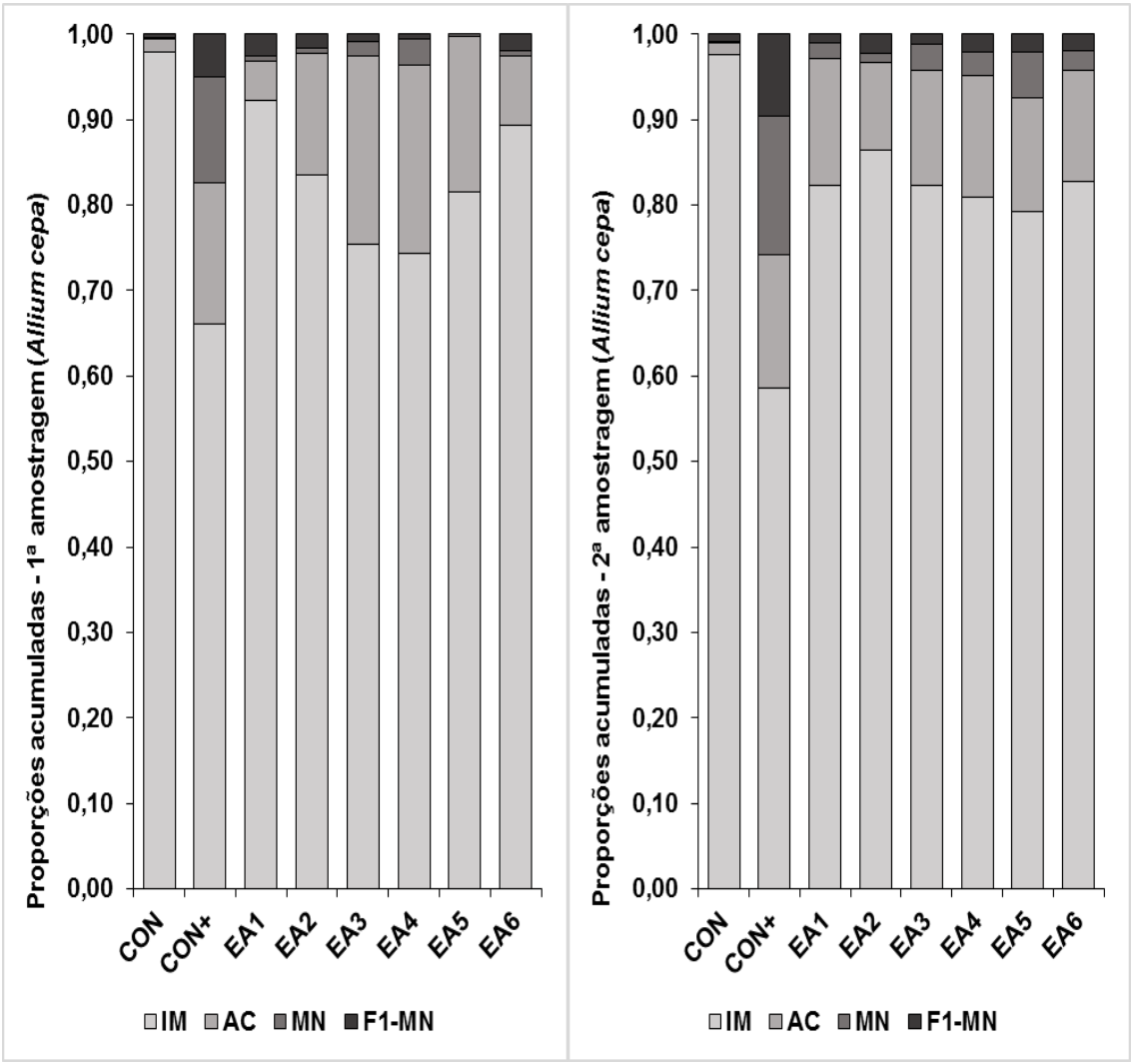

Figura 2: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema e da região F1 radiculares de *Allium cepa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.

Com relação às aberrações cromossômicos (Tabela 4; Figura 2), na primeira amostragem as estações EA2, EA3, EA4 e EA5 apresentaram índices superiores em relação ao controle negativo (0,001 ± 0,001), tendo AC variado de 0,010 ± 0,001 (EA2) à 0,017 ± 0,001 (EA4). Já na segunda amostragem, todas as estações avaliadas apresentaram AC superior em relação ao controle negativo (0,002 ± 0,001), tendo os índices variando entre 0,009 ± 0,001 (EA2) a 0,016 ± 0,001 (EA3 e EA4). Assim, observa-se que as amostras coletadas no Rio SMV apresentaram potencial genotóxico em ambas as amostragens realizadas, sendo este potencial relacionado, sobretudo, à ocorrência de aderências cromossômicas que foram as aberrações de maior frequência observada.

Os eventos de aderência cromossômica são indicativos da influência tóxica de compostos sobre o DNA e possivelmente são irreversíveis (FISKESJÖ; LEVAN, 1993; MARCANO; DEL-CAMPO, 1995; MARCANO et al., 1998). A aderência cromossômica surge devido à dobra indevida da fibra cromossômica em cromátides simples, resultando na ligação dos cromossomos uns aos outros por meio de pontes subcromáticas (MCGILL et al., 1974; KLÁSTERSKÁ et al., 1976). Segundo Fiskesjö (1988, 1995, 1997), a aderência cromossômica envolve tanto a porção proteica da cromatina quanto o DNA propriamente dito e sendo irreversível, usualmente promove a morte celular.

Além da morte celular, a aderência cromossômica pode determinar o surgimento de pontes cromossômicas, uma vez que os cromossomos tendem à permanecerem juntos, e se por ventura separados, resultam em quebras cromossômicas (MARCANO et al., 2004). Na avaliação das aberrações cromossômicas em *A. cepa* expostos às amostras de água do Rio SMV, não foram observadas possíveis relações entre aderência cromossômica e morte celular, ou ponte cromossômica.

Diferentemente do observado para IM e AC, a frequência de micronúcleos foi superior ao controle negativo apenas em EA4 (0,002 ± 0,000) na primeira amostragem (Tabela 4; Figura 2). A ausência de MN significativo nas outras estações avaliadas na primeira amostragem e em todas as estações na segunda amostragem, parece estar relacionada aos elevados potenciais citotóxicos observados nas estações amostrais. Ou seja, a divisão celular inferior, representada pelo baixo IM, resultaria na menor transferência dos danos entre gerações de células meristemáticas, consequentemente resultando na menor formação de micronúcleos.

Esse fato parecer ter influenciado, também, na avaliação de F1-MN, principalmente na primeira amostragem (Tabela 4; Figura 2). Apesar disso, a constatação de F1-MN significativo em EA1 (0,002 ± 0,000), EA2 e EA6 (0,001 ± 0,000) na primeira amostragem e EA2, EA4, EA5 e EA6 (0,002 ± 0,000) na segunda, sugerem que as frequências de micronúcleos observada nessas estações decorrem de danos cromossômicos e/ou nucleares em células meristemáticas não reparadas ou reparados incompletamente que foram fixados nessas células diferenciadas (FERNANDES et al., 2007; LEME; MARIN-MORALES, 2008).

Os micronúcleos são pequenas massas de cromatina presentes no citoplasma morfologicamente semelhantes ao núcleo principal que não são incorporados no núcleo principal durante o ciclo de divisão celular (FENECH, 2000). Apesar de potencialmente originar-se naturalmente, sua indução é indicativo da exposição à agentes mutagênicos, sendo resultado de eventos de quebras cromossômicas ou aneuploidias (HEDDLE et al., 1983; AL-SABTI; METCALFE, 1995; FENECH, 2000).

Com relação às análises toxicogenéticas realizadas em CHO-K1, os resultados alcançados por meio do teste do MTT não demonstraram diferenças entre as amostras analisadas do Rio SMV e o controle negativo (Tabela 5; Figura 3) nas amostragens realizadas. Assim, observa-se que pelo ensaio CHO-K1 as amostras não apresentaram efeito citotóxico sobre a linhagem celular utilizada. Ou seja, não foi constatada perda significativa da função mitocondrial. Apesar da não citotoxidade observada neste caso, a eficácia deste ensaio foi relatada em avaliações de amostras de águas superficiais e fontes de abastecimento urbano (ZEGURA et al., 2009; BIANCHI et al., 2015; TRINTINAGLIA et al. 2015).

Como ressaltado por Robertson e Orrenius (2002), as mitocôndrias frequentemente são alvos de substâncias tóxicas e podem refletir diretamente na viabilidade celular. Corroborando os resultados do teste do MTT, as células expostas aos tratamentos e submetidas ao teste com o Azul de tripan® apresentaram valores de viabilidade celular acima de 90%. A técnica de exclusão de corante Azul de tripan® apresenta-se como estimativa rápida da viabilidade em células de mamíferos, tornando-se ferramenta eficiente em ensaios toxicológicos para avaliar compostos complexos (ALTMAN et al., 1993; GAJSKI et al., 2012).

Na avaliação do IDN (Tabela 5; Figura 3), observa-se que na primeira amostragem EA1 (2,117 ± 0,044), EA3 (2,117 ± 0,044) e EA6 (2,120 ± 0,044) apresentaram divisão nuclear superior em relação ao controle negativo (2,057 ± 0,044). Enquanto que na segunda amostragem, não houveram diferenças entre as divisões nucleares das estações avaliadas e o controle negativo.

Tabela 5: Viabilidade (MTT), Azul de tripan® (AZTP), índice de danos no DNA ($ID_{(ua)}$), frequência de micronúcleos (MN) e índice de divisão nuclear (IDN) avaliados por meio de células CHO-K1, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS 10^{-4} mM) nas duas amostragens.

	Controle negativo	MMS 10^{-4} mM	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6
				Primeira amostragem				
MTT	100,00 ± 15,373^{A}	-	69,700 ± 15,373^{A}	75,697 ± 15,373^{A}	92,000 ± 15,373^{A}	103,807 ± 15,373^{A}	90,833 ± 15,373^{A}	103,07 ± 15,373^{A}
AZTP	100,00 ± 0,736^{B}	100,00 ± 0,736^{B}	100,00 ± 0,736^{B}	98,667 ± 0,736^{B}	99,333 ± 0,736^{B}	100,00 ± 0,736^{B}	100,00 ± 0,736^{B}	96,333 ± 0,736^{A}
IDN	2,057 ± 0,044^{A}	2,187 ± 0,044^{B}	2,117 ± 0,044^{B}	1,967 ± 0,044^{A}	2,117 ± 0,044^{B}	2,020 ± 0,044^{A}	1,997 ± 0,044^{A}	2,120 ± 0,044^{B}
$ID_{(ua)}$	1,333 ± 6,058^{A}	173,667 ± 6,058^{B}	12,667 ± 6,058^{A}	5,333 ± 6,058^{A}	13,333 ± 6,058^{A}	7,667 ± 6,058^{A}	3,333 ± 6,058^{A}	4,333 ± 6,058^{A}
MN	0,001 ± 0,003^{A}	0,031 ± 0,003^{C}	0,012 ± 0,003^{B}	0,006 ± 0,003^{A}	0,015 ± 0,003^{B}	0,014 ± 0,003^{B}	0,017 ± 0,003^{B}	0,010 ± 0,003^{B}
				Segunda amostragem				
MTT	100,000 ± 6,613^{A}	-	92,930 ± 6,613^{A}	100,663 ± 6,613^{A}	101,340 ± 6,613^{A}	93,517 ± 6,613^{A}	93,210 ± 6,613^{A}	89,733 ± 6,613^{A}
AZTP	99,667 ± 0,687^{A}	99,333 ± 0,687^{A}	100,00 ± 0,687^{A}	98,000 ± 0,687^{A}	98,667 ± 0,687^{A}	98,000 ± 0,687^{A}	100,00 ± 0,687^{A}	98,667 ± 0,687^{A}
IDN	2,047 ± 0,033^{A}	2,127 ± 0,033^{A}	2,090 ± 0,033^{A}	2,053 ± 0,033^{A}	2,133 ± 0,033^{A}	2,100 ± 0,033^{A}	2,127 ± 0,033^{A}	2,123 ± 0,033^{A}
$ID_{(ua)}$	0,677 ± 2,751^{A}	156,333 ± 2,751^{C}	14,667 ± 2,751^{B}	7,333 ± 2,751^{A}	18,000 ± 2,751^{B}	9,000 ± 2,751^{A}	4,677 ± 2,751^{A}	6,000 ± 2,751^{A}
MN	0,003 ± 0,002^{A}	0,042 ± 0,002^{C}	0,018 ± 0,002^{B}	0,009 ± 0,002^{A}	0,016 ± 0,002^{B}	0,024 ± 0,002^{B}	0,010 ± 0,002^{A}	0,007 ± 0,002^{A}

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott ($P < 0.05$). EP: Erro padrão.

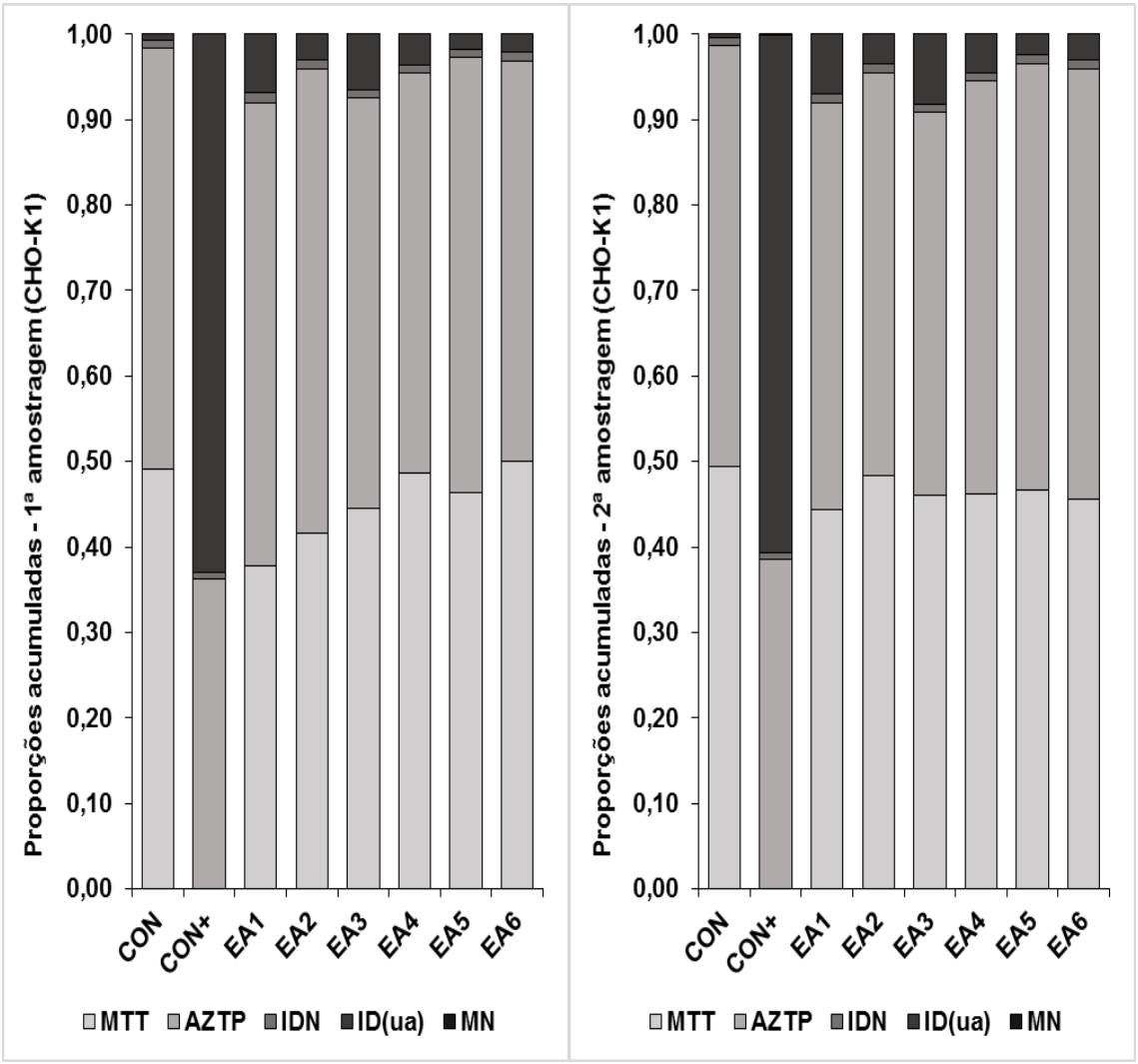

Figura 3: Proporção acumulada do índice de viabilidade (MTT), Azul de tripan® (AZTP), índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos no DNA ($ID_{(ua)}$) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células CHO-K1 após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.

Tanto os testes de MTT e Azul de tripan, quanto a análise do índice de divisão nuclear podem ser consideradas variáveis de citotoxicidade. Nesse aspecto, segundo Fenech (2000), índices de divisão celular inferiores ao controle negativo indicariam que o crescimento e desenvolvimento do organismo teste está sendo afetado. Por outro lado, índices acima do controle negativo são indicativos do aumento do número de células em divisões, o que poderia caracterizar proliferação celular descontrolada (FENECH et al., 2003). Todavia, no caso deste estudo, o IDN observado não sugere citotoxicidade.

Os resultados relativos ao ensaio do cometa possibilitam observar que as amostras referentes à primeira amostragem não apresentaram $ID_{(ua)}$ superiores

em relação ao controle negativo, o que indica a ausência de genotoxidade destas amostras sobre CHO-K1. Porém, na segunda amostragem foi observado efeito genotóxico nas células expostas às amostras de EA1 (14,667 ± 2,751) e EA3 (18,000 ± 2,751) em relação ao controle negativo (0,677 ± 2,751).

O efeito genotóxico também foi constatado em outros estudos que realizaram o ensaio do cometa em cultura celular para a avaliação de ecossistemas aquáticos. Assim, destacam-se as avaliações da qualidade da água em ambientes lóticos realizadas por Manzano (2010) que avaliou o Ribeirão Tatu (Brasil) por meio de células HTC e Caffetti e outros (2008) que avaliaram o Rio Paraná (Brasil) por meio de células CHO-K1 e detectaram potenciais genotóxicos nas amostras avaliadas. Rigonato e outros (2010), investigando a qualidade da água do Córrego Cambé (Brasil) observaram elevados índices de danos no DNA em CHO-K1, relacionando-os aos potenciais contaminantes presentes neste ambiente, tendo em vista o lançamento de efluentes domésticos em sua bacia hidrográfica. Por outro lado Leme (2010) e Hara (2012) utilizando células CHO-K1 para analisar, respectivamente, água e solo contaminados por biodiesel e ecossistemas lóticos impactados por efluentes de petróleo, não observaram genotoxicidade nas amostras avaliadas.

Quanto às frequências de micronúcleos em CHO-K1 (Tabela 5; Figura 3), observa-se que em EA1, EA3, EA4, EA5 e EA6, este índice apresentou-se superior em relação ao controle negativo (0,001 ± 0,003) na primeira amostragem, com MN variando entre 0,010 ± 0,003 (EA6) a 0,017 ± 0,003 (EA5). Na segunda amostragem, o mesmo fato foi observado nas estações EA1 (0,018 ± 0,002), EA3 (0,016 ± 0,002) e EA4 (0,024 ± 0,002), demonstrando que o efeito mutagênico destas três estações foi significativo nas duas amostragens realizadas. A detecção do efeito mutagênico por meio de células CHO-K1 também foi observado nos estudos de Hara (2012) ao avaliar amostras de água de rio com influência de efluentes de refinaria de petróleo. Assim como o ensaio do cometa, o teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese é considerado sistema teste eficiente. Este possibilita avaliar a mutagênicidade de substâncias químicas e efluentes, promovendo ampla avaliação dos potenciais efeitos causados pelos compostos avaliados (FENECH, 2006; MRDANOVIC et al.; 2009).

As diferenças observadas nas respostas de *A. cepa* e CHO-K1 expostas às amostras de água das estações do Rio SMV ressaltam a necessidade de

integração de diferentes abordagens na avaliação de ambientes aquáticos. Neste aspecto, Monteith e Vanstone (1995) e Jha (2004) discutem que diferenças entre bioensaios *in vivo* e *in vitro* na avaliação de compostos químicos podem ocorrer pelo fato de que em ensaios *in vivo* os compostos avaliados podem ser metabolizados pelo organismo teste como um todo, enquanto que em ensaios *in vitro* as células estão diretamente expostas ao mesmo e não metabolizá-los, dependendo da linhagem celular. Além disso, há a possiblidade de haver diferenças quanto à ocorrência de danos no DNA devido aos diferentes tipo celulares de cada ensaio e as respectivas possibilidades de mecanismos de incorporação, acumulação e reparo de DNA distintos. Neste aspecto, Caffetti e outros (2008) observaram diferenças quanto à genotoxicidade ao avaliar amostras do Rio Paraná (Argentina) por meio do ensaio do cometa em ensaios *in vivo* e *in vitro.* Outros estudos atribuíram à ausência de genotoxicidade pelo ensaio do cometa em células CHO-K1 aos processos de filtração das amostras que poderiam ter retido os contaminantes e à não metabolização de compostos químicos pelas células CHO-K1 (LEME, 2010; HARA, 2012).

Considerando-se os índices analisados por meio teste do *A. cepa* e cultura celular em CHO-K1 expostos às amostras de água das estações amostrais, em ambas as amostragens realizadas, bem como as constatações dos níveis de precipitação e vazão observados à montante e à jusante do reservatório Rio Bonito, e à jusante da represa Suíça, sugere-se que esses índices possam ter sido influenciados pela a ocorrência de potenciais processos de concentração e diluição de contaminantes.

Diversos estudos observaram os efeitos da precipitação sobre a disponibilidade de contaminantes, uma vez que a concentração destes compostos na água pode estar relacionada aos processos de concentração ou diluição causados pelos eventos de precipitação ou drenagem (ERGENE et al., 2007). Nesse aspecto, os estudos realizados Duarte e outros (2012; 2017a) ao avaliarem amostras de água de ambiente lêntico altamente contaminado e Salles e outros (2016) ao avaliarem amostras de água de rio, observaram que os maiores níveis de danos sobre o DNA ocorreram no período chuvoso, sugerindo que a precipitação e os processos de lixiviação carrearam os contaminantes para os corpos hídricos avaliados. Por outro lado, Da Silva-Souza (2006) ao avaliar um ambiente lótico, e Duarte e outros (2017b) ao avaliarem um ambiente lêntico

observaram os maiores danos citogenéticos no período de menor profundidade do corpo hídrico, sugerindo a concentração dos contaminantes.

3.3. Metais e Toxicogenética

Os efeitos toxicogenéticos do Al e sua relação com espécimes vegetais são observadas em diversos estudos. Segundo Pejchar e outros (2008), Al apresentam-se como metal altamente citotóxico para as plantas. Este fato pode estar relacionado aos processos de interrupção do ciclo celular causado pelo rompimento do aparato mitótico por meio da inibição da polimerização dos microtúbulos, interrompendo o crescimento radicular e alterando a sua morfologia (VOUTSINAS et al., 1997). Fiskejö (1983; 1988) remete a genotoxicidade do Al aos processos de dissolução nuclear e aderência cromossômica, enquanto Rajeshwari e outros (2015) constataram a genotoxicidade deste metal pelo surgimento de alterações como anáfase multipolar, aderência cromossômica, quebra e perda cromossômica em *A. cepa* após exposições à óxidos de alumínio. Além disso, índices mitóticos reduzidos também foram atribuídos às exposições de espécimes de *A. cepa* e *Zea mays* às concentrações de Al no estudo Campos e Viccini (2003).

Segundo Achary e outros (2012), a ocorrência de danos ao DNA pelo Al decorre de explosões oxidativas, sugerindo que os mecanismos celulares de manutenção da homeostase e proteção do material genético contra espécies reativas de oxigênio foram comprometidos por este processo (KULTZ, 2005). Neste aspecto, experimentos com Al em doses de 1-200 µM (ACHARY et al., 2008) e 200-800 µM (ACHARY; PANDA, 2009) resultaram, respectivamente, em estresse oxidativo e indução de danos no DNA bem como morte celular em células de raízes de *A. cepa.* Chowra e outros (2017) também constataram esta relação ao avaliar concentrações de Al em *Vigna mungo,* e assumiram que as espécies reativas de oxigênio desempenharam o principal papel na sinalização do estresse deste metal. Além disso, avaliações de amostras de água da Lagoa Jacuném (Brasil) por meio do teste do *A. cepa* relacionaram os reduzidos índices mitótico e elevados índice de aberrações cromossómicas e frequência de micronúcleos às concentrações de metais, sobretudo Al e Cd (DUARTE et al., 2017a).

A avaliação das amostras do Rio SVM não apresentou danos substanciais pelo sistema teste CHO-K1 como observado em *A. cepa*. Todavia, observou-se efeitos genotóxico e mutagênico em CHO-K1 após exposição à algumas amostras. A relação entre o Al e os danos toxicogenéticos em outras células de mamíferos foi relatada por Léonard e Gerber (1988) que apontavam a influência de Al na polimerização do microtúbulos de células de mamíferos e aves. A exposição de linfócitos humanos à concentrações de Al, possibilitaram observar que este metal induz a danos no DNA e reduz a capacidade de reparo destas células. Além disso, o aumento das frequências de micronúcleo, aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs também foram observadas após a exposição de linfócitos humanos ao Al (YUMEI et al., 1998; MIGLIORE et al., 1999; LANKOFF et al., 2006; LIMA et al., 2007). Rajiv e outros (2016) ao compararem a citotoxicidade e genotoxicidade de algumas nanopartículas em linfócitos humanos, observaram que as nano partículas de Al resultam em danos no DNA, mas em menor proporção que as nanopartículas de Co e Fe, por exemplo.

Além da ocorrência das concentrações de Al muito elevadas, a presença de metais como Ba, Mn, Pb e Cu nas amostras de água do Rio SMV também podem estar relacionadas aos danos observados nos sistemas testes utilizados neste estudo. Neste aspecto, o estudo de Qin e outros (2015) observou os efeitos de soluções de Cu (2,0 µM e 8,0 µM) sobre *A. cepa* e constaram a ocorrência de aberrações cromossômicas (C-mitoses, aderências cromossômicas e pontes cromossômicas) bem com a diminuição do índice mitótico, destacando o efeito de Cu sobre os microtúbulos com a diminuição dos níveis de α-tubulina. Ao avaliar um córrego receptor de efluentes industriais, Dourado e outros (2017) relacionaram a presença de danos citogenéticos às concentrações de Cu, Pb, Cd e Ni quantificadas nas amostras. O Pb possui propriedades tóxicas aos organismos, apresentando efeitos genotóxicos, induzindo por exemplo a formação de atrasos cromossômicos e núcleos com cromatina mais condensada (SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005).

Além destes, foram relacionado à danos observados pelo teste do *A. cepa* concentrações de Ba em amostras de água e sedimento de áreas de mineração (GERAS'KIN et al., 2011) e concentrações de Mn em efluentes industriais (PATHIRATNE et al., 2015) e amostras de ambientes lóticos (SALLES et al.,

2016), sendo neste último caso relacionado à indução de aberrações cromossômicas como aderência cromossômica, C-mitose e ponte. Ainda com relação a Mn, o estudo de Lima e outros (2008) demonstrou que concentrações de 15, 20 e 25 µM de cloreto de manganês mostraram-se citotóxicas e reduziram significativamente a divisão celular de cultura de células de linfócitos humanos.

De maneira geral, os resultados observados neste estudo sugerem que as concentrações de metais quantificadas no Rio SMV, sobretudo Al, atuam como os principais agentes dos danos observados nos sistemas testes *A. cepa* e CHO-K1. Entretanto salienta-se que a bacia do Rio SMV e o seu próprio curso estão localizados em áreas antropizadas, urbanas e rurais. Desse modo, considerando os processos de lixiviação e despejo de efluentes, é possível que o Rio SMV receba complexas misturas de poluentes que potencialmente causam danos sobre o material genético, como reportado por Matsumoto e outros (2006) e Sik e outros (2009), aos estudarem o efeito de misturas complexas sobre o *A. cepa.*

Diversos trabalhos relatam a ocorrência de danos toxicogenéticos após a exposição à fertilizantes (BHATTA; SAKYAN, 2008), herbicidas (GOUJON et al., 2015; LIMAN et al., 2015), fungicidas (SUTAN et al., 2014), inseticidas (DE SOUZA et al., 2017) e pesticidas (GOUJON et al., 2014) em *A. cepa*. As mesmas constatações foram realizadas a partir de ensaios em células CHO-K1 expostas à pesticidas (SOLONEKI et al., 2015), herbicidas (NIKOLOFF et al., 2012), rio com influência de efluente industrial (MATSUMOTO et al., 2003) e estrógenos sintéticos (RADOSEVIC et al., 2011).

Com relação ao Rio SMV, Grippa e outros (2012) ao analisarem as amostras de água pelo teste do *A. cepa,* relataram que os efeitos genotóxico e mutagênico observados parecem estar relacionados à presença de defensivos agrícolas, pesticidas e fertilizantes dissolvidos na coluna d'água. O Rio SMV sofre diversos impactos ao longo de sua bacia hidrográfica, destacando-se o despejo do efluente das cidades de Santa Maria de Jetibá e Santa Leopoldina, bem como as atividades hortigranjeiras e agricultura intensiva (MARTINS; FERNANDES, 2011; TRINDADE; MENDONÇA, 2014). Desse modo, considerando o uso e ocupação de sua bacia hidrográfica, observa-se que o Rio SMV apresenta potencialmente múltiplas fontes de contaminação de suas águas, desde processos de erosão superficial e lixiviação à lançamento de agroquímicos e misturas complexas por meio de efluentes.

4. CONCLUSÕES

A avaliação das seis estações amostrais do Rio SMV indicaram potencial contaminação por metais, principalmente Al que apresentou níveis muito elevados. Como potenciais fontes destes, destacam-se os processos de erosão e lixiviação da bacia, bem como o lançamento de outros contaminantes de forma pontual e difusa, via efluentes e agroquímicos. Analisando-se os resultados alcançados por meio dos sistemas testes *A. cepa* e CHO-K1, observou-se que o primeiro apresentou maior sensibilidade na detecção de danos citotóxicos e genotóxicos. Estas constatações sugerem a ação de potenciais contaminantes presentes nas amostras avaliadas, com destaque para os metais, em especial Al que apresentou concentrações acima do permitido pela legislação nacional. Além disso, sugere-se que há interferências da precipitação e vazão Rio SMV, influenciada pelos reservatórios, nos processos de concentração e diluição dos contaminantes presentes neste ambiente lótico. O Rio SMV apresenta grande importância ecológica e socioeconômica para todas as comunidades que vivem ao seu entorno. Entretanto, os resultados indicam que a qualidade da água deste ambiente pode estar comprometida. Espera-se que estes resultados forneçam subsídios para a realização do manejo apropriado e que se integre os estudos utilizando bioensaios aos usuais métodos abióticos para a avaliação da qualidade da água pelas agências governamentais.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Agência Estadual de Recursos Hídricos - AGERH do estado do Espírito Santo pela apresentação das estações amostrais, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES pelas bolsas de estudo. Os autores também são gratos pela disponibilidade e estrutura do Grupo de Estudos de Mutagênese e Toxicologia (GEMUT) e Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleos (LabPetro) e Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

6. REFERÊNCIAS

ACHARY, V.M.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 300-310, 2008. DOI:10.1016/j.ecoenv.2007.10.022

ACHARY, V.M.M.; PANDA, B.B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 201-209, 2009. DOI:10.1093/mutage/gep063

ACHARY, V.M.M.; PARINANDI, N.L.; PANDA, B.B. Aluminum Induces Oxidative Burst, Cell Wall NADH Peroxidase Activity and DNA Damage in Root Cells of *Allium cepa* L. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 7, p. 550-560, 2012. DOI:10.1002/em.21719

AKINBORO, A.; MOHAMMED, K.; RATHNASAMY, S.; MUNIANDY, V.R. Genotoxicity assessment of water samples from the Sungai Dua river in Pulau Pinang, Malaysia, using the *Allium cepa* test. **Tropical Life Sciences Research**, v. 22, n. 2, p. 23-35, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. New York: Garland Publishing, 2008.

ALLOWAY, B.J. Cadmium. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons Inc., p. 100-124, 1990.

AL-SABTI, K.; METCALFE, C. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v. 343, n.1-2, p. 121-135, 1995. DOI:10.1016/0165-1218(95)90078-0

ALSTAD, N.E.W.; KJELSBERG, B.M.L.; VOLLESTAD, A.; LYDERSEN, E.; POLÉO, A.B.S. The significance of water ionic strength on aluminum toxicity in brown trout (*Salmo trutta* L.). **Environmental Pollution**, v. 132, n. 2, p. 333-342, 2005. DOI:10.1016/j.envpol.2004.05.030

ALTMAN, S.A.; RANDERS, L.; RAO, G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. **Biotechnology Progress**, v. 9, n.6, p. 671-674, 1993. DOI:10.1021/bp00024a017

ANA - Agência Nacional de Águas. **Bases de Dados Georreferenciadas; Ottobacias**, 2017. Disponível em:

http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/solicitacaoBaseDados.asp Acesso em: 21 jun. 2017.

BARBÉRIO, A. Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality. *In*: ELSHORBAGY, W.; KABIR, R. (Ed.). **Water Treatment**, Croácia: InTech, p. 317-334, 2013.

BERTONI, J.; LOMBARDI-NETO, F. **Conservação do Solo**. 7 ed. São Paulo: Ícone, 2010.

BHATTA, P.; SAKYA, S.R. Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem of *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. **Ecoprint: An International Journal of Ecology**, v. 15, p. 83-88, 2008. DOI:10.3126/eco.v15i0.1947

BIANCHI, E.; GOLDONI, A.; TRINTINAGLIA, L.; LESSING, G.; SILVA, C.E.M.; NASCIMENTO, C.A.; ZIULKOSKI, A.L.; SPILKI, F.R.; SILVA, L.B. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 2015. DOI:10.1590/1519-6984.1913

BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; FERNANDES, M.N.; MATSUMOTO, S.T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-K1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n.11, p. 11069–11075, 2016. DOI:10.1007/s11356-016-6201-8

BUSS, D.F.; OLIVEIRA, R.B.; BAPTISTA, D.F. () Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.3, p. 339-345, 2008.

CAFFETTI, J.D.; MANTOVANI, M.S.; PASTORI, M.C.; FENOCCHIO, A.S. First genotoxicity study of Paraná river water from Argentina using cells from the clam *Corbicula fluminea* (Veneroida Corbiculidae) and Chinese hamster (Cricetulus griseus Rodentia, Cricetidae) K1 cells in the comet assay. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 2, p. 561-565, 2008. DOI:10.1590/S1415-47572008000300026

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M.J.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach.

Science of The Total Environment, v. 247, n. 2-3, p. 295-311, 2000. DOI: 10.1016/S0048-9697(99)00499-4

CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. Cytotoxicity of aluminium on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 65-73, 2003. DOI:10.1080/00087114.2003.10589309

CARDOZO, T.R.; ROSA, D.P.; FEIDEN, I.R.; ROCHA, J.A.; DE OLIVEIRA, N.C.; DA SILVA PEREIRA, T.; PASTORIZA, T.F.; DA MOTTA MARQUES, D.; DE LEMOS, C.T.; TERRA, N.R.; VARGAS, V.M. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, v. 603, n. 1, p. 83-96, 2006. DOI:10.1016/j.mrgentox.2005.11.011

CARVALHO, D.F.; CRUE, E.S.; PINTO, M.F.; SIDA, L.D.B.; GUERRA, J.G.M. Características da chuva e perdas por erosão sob diferentes práticas de manejo de solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2009.

CHANDEL, M.; TANK, S.K. Cytogenetic Study of *Allium cepa* Root Tip Cells treated with Textile Effluent. **Biotechnological Research**, v. 2, n. 3, p. 100-103, 2016.

CHARALAMPOUS, N.; KINDOU, A.; VLASTOS, D.; TSARPALI, V.; ANTONOPOULOU, M.; KONSTANTINOU, I.; DAILIANIS, S. A multidisciplinary assessment of river surface water quality in areas heavily influenced by human activities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 69, n. 2, p. 208-222, 2015. DOI:10.1007/s00244-015-0152-9

CHOWRA, U.; YANASE, E.; KOYAMA, H.; PANDA, S.K. Aluminium-induced excessive ROS causes cellular damage and metabolic shifts in black gram *Vigna mungo* (L.) Hepper. **Protoplasma**, v. 254, n. 1, 9. 293-302, 2017. DOI:10.1007/s00709-016-0943-5

COLLINS, A.R.; MA, A.G.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. **Mutation Research**, v. 336, n. 1, p 69-77, 1995. DOI:10.1016/0921-8777(94)00043-6

DOURADO, P.L.R.; ROCHA, M.P.D.; ROVEDA, L.M.; RAPOSO, J.L. JUNIOR.; CÂNDIDO, L.S.; CARDOSO, C.A.L.; MARIM-MORALES, M.A.; OLIVEIRA, K.M.P.; GRISOLIA, A.B. Genotoxic and mutagenic effects of polluted surface water in the midwestern region of Brazil using animal and plant bioassays.

Genetics and Molecular Biology, v. 40, n. 1, 123-133, 2017. DOI:10.1590/1678-4685-GMB-2015-0223

DUARTE, I.D.; DIAS, M.C.; DAVID, J.A.O.; MATSUMOTO, S.T. A qualidade da água da Lagoa Jacuném (Espírito Santo, Brasil) em relação a aspectos genotóxicos e mutagênicos, mensurados respectivamente pelo ensaio do cometa e teste do micronúcleo em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 10, n. 2, p. 211-219, 2012.

DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; COELHO, E.J.R.; DIAS, M.C.; MATSUMOTO, S.T. Cytogenetic responses of *Allium cepa* L. after exposure to contaminated pond waters. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2017.

DUARTE, I.D.; SILVA, N.H.; DA COSTA SOUZA, I.; DE OLIVEIRA, L.B.; ROCHA, L.D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; DE ALMEIDA PEREIRA, T.; DIAS, M.C.; DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; MATSUMOTO, S.T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p. 10855-10868, 2017. DOI:10.1007/s11356-017-8721-2

ERGENE, S.; ÇAVAS, T.; ÇELIK, A.; KOLELI, N.; KAYA, F.; KARAHAN, A. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. **Ecotoxicology**, v. 16, n. 4, p. 385-391, 2007. DOI:10.1007/s10646-007-0142-4

FENECH, M.; MORLEY, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, n.1-2, p. 29-36, 1985. DOI:10.1016/0165-1161(85)90015-9

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n.1-2, p. 81-95, 2000. DOI:10.1016/S0027-5107(00)00065-8

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003. DOI:10.1016/S1383-5718(02)00249-8

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, n. 1-2, p. 58-66, 2006. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2006.05.028

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007. DOI:10.1016/j.pestbp.2006.12.003

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO. D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009. DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.03.014

FISKESJÖ, G. Nucleolar dissolution induced by aluminium in root cells of Allium. **Physiologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 508-511, 1983. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1983.tb04238.x

FISKESJÖ, G. The Allium test - An alternative in environmental studies - the relative toxicity of metal-ions. **Mutation Research**, v. 197, n. 2, p. 243-60, 1988. DOI:10.1016/0027-5107(88)90096-6

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, n. 2, p. 139-149, 1993.

FISKESJÖ, G. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Chromosomes and Cell Divisions in Root Tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 235-241, 1994. DOI:10.1002/tox.2530090311

FISKESJÖ, G. Allium Test. *In:* O'Hare, S.; Atterwill, C.K. (Ed.) **In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology™**, vol 43. Totowa: Humana Press, p 119-127, 1995. DOI:10.1385/0-89603-282-5:119

FISKESJÖ, G. Allium test for screening chemicals, evaluation of cytological parameters. *In:* Wang, W.; Gorsuch, J.W.; Hughes, J.S. (Ed.) **Plants for Environmental Studies**, NewYork: Lewis Publishers, p 307-333, 1997.

GAJSKI, G.; ORESCANIN, V.; GARAJ-VRHOVAC, V. Chemical composition and genotoxicity assessment of sanitary landfill leachate from Rovinj, Croatia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 253-259, 2012. DOI:10.1016/j.ecoenv.2011.11.032

GATTO, L.C.S.; RAMOS, V.L.S.; NUNES, B.T.A.; MAMEDE, L.; GÓES, M.H.; MAURO, C.A.; ALVARENGA, S.M.; FRANCO, E.M.S.; QUIRICO, A.F.; NEVES, L.B. **Geomorfologia.** Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

GENSEMER, W.; PLAYLE, R.C. The bioavailability and toxicity of aluminumin aquatic environments. **Critical Reviews in Environmental Sciences and Technology**, v. 29, n. 4, p. 315-450, 1999. DOI:10.1080/10643389991259245

GERAS'KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1133-46, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.01.008

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996. DOI:10.1016/0269-7491(95)00090-9

GOUJON, E.; STA, C.; TRIVELLA, A.; GOUPIL, P.; RICHARD, C.; LEDOIGT, G. Genotoxicity of sulcotrione pesticide and photoproducts on *Allium cepa* root meristem. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 113, p. 47-54, 2014. DOI:10.1016/j.pestbp.2014.06.002

GOUJON, E.; RICHARD, C.; GOUPIL, P.; LEDOIGT, G. Cytotoxicity on *Allium cepa* of the two main sulcotrione photoproducts, xanthene-1,9-dione-3,4-dihydro-6-methylsulphonyl and 2-chloro-4-mesylbenzoic acid. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 37-42, 2015. DOI:10.1016/j.pestbp.2015.04.001

GRIPPA, G.A.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 77, n. 1, p. 3-9, 2012DOI:10.1508/cytologia.77.3

GUIMARÃES, C.F. Simulação hidrológica e hidrossedimentológica em uma bacia com reservatórios com o modelo soil and water assessment tool (SWAT). **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2016. 114p.

HAN, Y.; LI, N.; ODA, Y.; MAA, M.; RAO, K.; WANG, Z.; JIN, W.; HONG, G.; LI, Z.; LUO, Y. Evaluation of genotoxic effects of surface waters using a battery of bioassays indicating different mode of action. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p.448-456, 2016. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.07.022

HARA, R.V. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia - SP. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas**, Universidade Estadual Paulista - UNESP, 2012. 170p.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.; SALAMONE, M.F.; The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983. DOI:10.1016/0165-1110(83)90047-7

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico de pedologia (3 ed).** Manuais técnicos em geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 2015.

JHA, A.N. Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. **Mutation Research**, v. 552, n. 1-2, p. 1-17, 2004. DOI:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.034

KLÁSTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A.T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromossome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, v. 83, n.2, p. 153-162, 1976. DOI:10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x

KOPLIKU, D.; MESI, A. Assessment of cytotoxic and genotoxic potency of Cr (VI)-Doped river water of Nen-Shkodra lowland Albania on *Allium cepa* L. **Journal of Environmental Research And Development**, v. 7, n. 4, p. 1322-1332, 2013.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225-57, 2005. DOI:10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003. DOI:10.1016/S0025-326X(02)00449-6

LANKOFF, A.; BANASIK, A.; DUMA, A.; OCHNIAK, E.; LISOWSKAA, H.; KUSZEWSKI, T.; GÓZDZ, S.; WOJCIK, A. A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. **Toxicology Letters**, v. 161, n.1, p. 27-36, 2006. DOI:10.1016/j.toxlet.2005.07.012

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Researsh**, v. 650, n. 1, p. 80-6, 2008. DOI:10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

LEME, D.M. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e solo. **Tese de Doutorado em Ciências Biológicas**, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2010. 226p.

LÉONARD, A.; GERBER, G.B. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of aluminium. **Mutation Research**, v. 196, n. 3, p. 247-57, 1988. DOI:10.1016/0165-1110(88)90009-7

LIMA, P.D.; VASCONCELLOS, M.C.; BAHIA, M.O.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R. Genotoxic and cytotoxic effects of manganese chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 4, p.1032-1037, 2008. DOI:10.1016/j.tiv.2007.12.011

LIMA, P.D.; LEITE, D.S.; VASCONCELLOS, M.C.; CAVALCANTI, B.C.; SANTOS, R.A.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R. Genotoxic effects of aluminum chloride in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n.7, p. 1154-1159, 2007. DOI:10.1016/j.fct.2006.12.022

LIMAN, R.; CIĞERCI, I.H.; ÖZTÜRK, N.S. Determination of genotoxic effects of Imazethapyr herbicide in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 118, n. 38-42, 2015. DOI:10.1016/j.pestbp.2014.11.007

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H.H.; NGHIEM, L.D.; HAI, F.I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X.C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of The Total Environment**, v. 473-474, p. 619-641, 2014. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065

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 de Mestrado em Ciências Biológicas**, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2010. 126p.

MARCANO, L.; DEL-CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo em poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium ce*pa L. tratadas com inhibitores metabólicos. **Ciencia**, v. 3, p. 73-82, 1995.

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efectomitóxico y genotoxico del cadmio em problaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebola). **Ciencia**, v. 6, p. 93-99, 1998.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of actino of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n.2, p. 221-226, 2004. DOI:10.1016/S0013-9351(03)00121-X

MARIN-MORALES, M.A.; HOSHINA, M.M.; HARA, R.V.; SOMMAGGIO, L.R.D. Eco-Genotoxicity in Aquatic Systems. *In:* Polonini H, Brayner R (Ed.) **Aquatic Toxicology**, USA: OMICS Group eBooks, p. 1-19, 2016.

MARTINS, F.C.O.; FERNANDES, V.O. Biomassa e composição elementar (C, N e P) da comunidade perifítica no alto Rio Santa Maria da Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2011. DOI:10.14210/bjast.v15n1.p11-18

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALLAGUTI, M.I.; MARIN-MORALES, M.A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. **Cytologia**, v. 68, n. 4, p. 395-401, 2003. DOI:10.1508/cytologia.68.395

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S.; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the genotoxic potential due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n. 1, p. 40-46, 2005. DOI:10.1080/00087114.2005.10589430

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006. DOI: 10.1590/S1415-47572006000100028

MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, n. 2, p. 157-166, 1974. DOI:10.1007/BF00331803

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura**, v. 30, p. 665-676, 1978.

MIGLIORE, L.; COCCHI, L.; NESTI, C.; SABBIONI, E. Micronuclei and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 34, n. 4, p. 279-284, 1999. DOI:10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:4<279::AID-EM8>3.0.CO;2-7

Miranda, C.L.P. Preservação de mananciais sob a ótica da sobrevivência: história e sustentabilidade a partir do Rio Santa Maria da Vitória/ES. **Dissertação de Mestrado em Arquitetura e Urbanismo**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2009. 177p.

MONSERRAT, J.M.; MARTÍNEZ, P.E.; GERACITANO, L.A.; AMADO, L.L.; MARTINS, C.M., PINHO, G.L.; CHAVES, I.S.; FERREIRA-CRAVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 146, n. 1-2, p. 221-234, 2007. DOI:10.1016/j.cbpc.2006.08.012

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutation Research**, v. 345, n.3-4, p. 97-103, 1995. DOI:10.1016/0165-1218(95)90045-4

MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; ROCHA, L.D.; DUARTE, I.D.; ZANEZI, E.R.L.; JESUS, H.C.; FERNANDES, M.N.; MATSUMOTO, S.T. Landfill leachate sludge use as soil additive prior and after electrocoagulation treatment: A cytological assessment using CHO-K1. **Chemosphere**, v. 158, p. 66-71, 2016. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.05.054

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI:10.1016/0022-1759(83)90303-4

MRDANOVIC, J.; SOLAJIC, S.; BOGDANOVIC, V.; STANKOV, K.; BOGDANOVIC, G.; DJORDJEVIC, A. Effects of fullerenol $C_{60}(OH)_{24}$ on the frequency of micronuclei and chromosome aberrations in CHO-K1 cells. **Mutation Research**, v. 680, n. 1-2, p. 25-30, 2009. DOI:10.1016/j.mrgentox.2009.08.008

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 339-347, 2006. DOI:10.1016/j.aquatox.2005.12.013

NIKOLOFF, N.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide flurochloridone on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Toxicology In Vitro**, v. 26, n. 1, p. 157-163, 2012. DOI:10.1016/j.tiv.2011.10.015

NZIGUHEBA, G.; SMOLDERS, E. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 1, p. 53-57, 2008. DOI:10.1016/j.scitotenv.2007.09.031

O'CONNOR, G.A.; ELLIOT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C.; SMITH JR, J.E. Sustainable land application: An overview. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 7-17, 2005.

O'NEILL, P. Arsenic. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons, pp 83-89, 1990.

OLIVEIRA, V. DE.; COSTA, A.M.R. DA.; AZEVEDO, W.P. DE.; CAMARGO, M.N.; LARACH, J.O.L. **Pedologia**. Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

OLIVEIRA, R.J.; RIBEIRO, L.R.; DA SILVA, A.F.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of b-glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology In Vitro**, v. 20, n. 7, p. 1225-1233, 2006. DOI:10.1016/j.tiv.2006.04.001

PATHIRATNE, A.; HEMACHANDRA, C.K.; DE SILVA, N. Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 12, p. 730, 2015. DOI:10.1007/s10661-015-4954-z

PATRA, J.; BAISAKHI, B.; MOHAPATRO, M.K.; PANDA, B.B. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercurric chloride and ethyl methane sulfonate, nut not to maleic hidrazide in plant cells *in vivo*. **Mutation Research**, v. 465, n. 1-2, p. 1-9, 2000. DOI:10.1016/S1383-5718(99)00193-X

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phspholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, v. 32, n. 5, p. 554-556, 2008. DOI:10.1016/j.cellbi.2007.11.008

QIN, R.; WANG, C.; CHEN, D.; BJÖRN, L.O.; LI, S. Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. agrogarum L. involves disturbances in cell division and DNA damage. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1045-1055, 2015. DOI:10.1002/etc.2884

RADOŠEVIĆ, K.; TONKOVIĆ, T.; SLIVAC, I.; KNIEWALD, Z.; GAURINA SRČEK, V. Comparison of Cytotoxicity Induced by 17α-Ethynylestradiol and Diethylstilbestrol in Fish CCO and Mammalian CHO-K1 Cell Lines. **Bulletin of**

Environmental Contamination and Toxicology, v. 86, n. 3, p. 252-257, 2011. DOI:10.1007/s00128-011-0217-z

RAJESHWARI, A.; KAVITHA, S.; ALEX, SA.; KUMAR, D.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip - effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 11057-11066, 2015. DOI:10.1007/s11356-015-4355-4

RAJIV, S.; JEROBIN, J.; SARANYA, V.; NAINAWAT, M.; SHARMA, A.; MAKWANA, P.; GAYATHRI, C.; BHARATH, L.; SINGH, M.; KUMAR, M.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes *in vitro*. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35, n. 2, p. 170-183, 2016. DOI:10.1177/0960327115579208

RIGONATO, J.; JORDÃO, B.Q.; MANTOVANI, M.S. Detection of genotoxicity of water from an urbanized stream, in *Corbicula fluminea* (Mollusca) (*in vivo*) and CHO-K1 cells (*in vitro*) using comet assay. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 59, n. 1, p. 31-38, 2010. DOI:10.1007/s00244-009-9446-0

ROBERTSON, J.D.; ORRENIUS, S. Role of mitochondria in toxic cell death. **Toxicology**, v. 181-182, p. 491-496, 2002. DOI:10.1016/S0300-483X(02)00464-X

ROGERO, S.O.; CRUZ, A.S.; IKEDA, T.I.; LUGÃO, A.B. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003. DOI:10.1590/S1516-14392003000300003

SALLES, F.J.; DE TOLEDO, M.C.B.; CÉSAR, A.C.G.; FERREIRA, G.M.; BARBÉRIO, A. Cytotoxic and genotoxic assessment of surface water from São Paulo State, Brazil, during the rainy and dry seasons. **Ecotoxicology**, v. 25, n.4, p. 633-645, 2016. DOI:10.1007/s10646-016-1622-1

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŹNY, A. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. **Aquatic Botany**, v. 83, n. 4, p. 289-295, 2005. DOI:10.1016/j.aquabot.2005.06.007

SCHWARZENBACH, R.P.; ESCHER, B.I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T.B.; JOHNSON, C.A.; GUNTEN, U. VON.; WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1072-1077, 2006. DOI:10.1126/science.1127291

SILVA SOUZA, T. DA.; FONTANETTI, C.S. () Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v. 605, n. 1-2, p. 87-93, 2006. DOI:10.1016/j.mrgentox.2006.02.010

SIK, L.; ACAR, O.; AKI, C. Genotoxic effects of industrial wastewater on *Allium cepa* L. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n 9, p. 1919-1923, 2009

SINGH. N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988. DOI:10.1016/0014-4827(88)90265-0

SINGH, P. Genotoxicity assessment of water samples from Gomti river, U.P. India using the *Allium cepa* L. test. **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n.3, p. 474-482, 2015.

SOLONESKI, S.; KUJAWSKI, M.; SCUTO, A.; LARRAMENDY, M.L. Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 5, p. 834-844, 2015. DOI:10.1016/j.tiv.2015.03.011

SOUZA, R.B. DE.; SOUZA, C.P. DE.; BUENO, O.C.; FONTANETTI, C.S. Genotoxicity evaluation of two metallic-insecticides using *Allium cepa* and *Tradescantia pallida*: A new alternative against leaf-cutting ants. **Chemosphere**, v. 168, p. 1093-1099, 2017. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.10.098

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v. 88, n. 1-3, p. 91-98, 1996. DOI:10.1016/0378-4274(96)03723-X

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, Ap. 3:3B, 2001. DOI:10.1002/0471142735.ima03bs21

SUTAN, N.A.; POPESCU, A.; MIHAESCU, C.; SOARE, L.C.; MARINESCU, M.V. Evaluation of cytotoxic and genotoxic potential of the fungicide ridomil in *Allium cepa* L. **Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University of Iasi. New Series, Section 2. Vegetal Biology**, v. 60, n. 1, p. 5-12, 2014.

TRINDADE, P.B.C.B.; MENDONÇA, A.S.F. Eutrofização em reservatórios - estudo de caso: reservatório de Rio Bonito (ES). **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 275-282, 2014. DOI:10.1590/S1413-41522014019000000537

TRINTINAGLIA, L.; BIANCHI, E.; NASCIMENTO, C.A.; SILVA, L.B.; SPILKI, F.R.; ZIULKOSKI, A.L. Ensaios de citotoxicidade como ferramentas para avaliar a qualidade da água da bacia do Rio do Sinos. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 2, p. 75-80, 2015. DOI:10.1590/1519-6984.0113

VESTENA, R.L. Análise da relação entre a dinâmica de áreas saturadas e o transporte de sedimentos em uma bacia hidrográfica por meio de monitoramento e modelagem. **Tese de Doutorado em Engenharia Ambiental**, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2008. 303p.

VIEIRA, V.S.; MENEZES, R.G. **Geologia e Recursos Minerais do Estado do Espírito Santo: texto explicativo do mapa geológico e de recursos minerais.** Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais-CPRM/Serviço Geológico do Brasil, Belo Horizonte, 2015.

VOUTSINAS, G.; ZARANI, F.E.; KAPPAS, A. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architeture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. **Cell Biology International**, v. 21, n. 7, p. 411-418, 1997. DOI:10.1006/cbir.1997.0171

WARREN, S.H.; CLAXTON, L.D.; DILIBERTO, J.; HUGHES, T.J.; SWANK, A.; KUSNIERZ, D.H.; MARSHALL, V.; DEMARINI, D.M. Survey of the mutagenicity of surface water, sediments, and drinking water from the Penobscot Indian Nation. **Chemosphere**, v. 120, p. 690-696, 2015. DOI:10.1016/j.chemosphere.2014.10.002

YUMEI, W.; JINFENG, J.; XIAOHONG, Z.; BAOSHAN, Y. Genotoxicity of the dust organic extract and its fractions derived from an aluminium electrolytic plant. **Toxicology Letters**, v. 98, n. 3, p. 147-153, 1998. DOI:10.1016/S0378-4274(98)00113-1

ZEGURA, B.; HEATH, E.; CERNOSA, A.; FILIPIC, M. Combination in vitro of bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1453-1460, 2009. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.02.041

CAPITULO 2 – RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL): AVALIAÇÃO POR MÚLTIPLOS BIOMARCADORES EM *Lactuca sativa* L. DE AMOSTRAS DE ÁGUA CONTAMINADAS POR METAIS

Autores: Ian Drumond Duarte[1] • Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro[2] • Silvia Tamie Matsumoto[1*]

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitoria, ES, Brasil.
(2) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Química, CEP 29075-910, Vitoria, ES, Brasil.
*Autor para correspondência: siltamie@gmail.com

Periódico a ser submetido: *Journal of Environmental Sciences*.

RESUMO

O trabalho objetivou avaliar a qualidade da água de um importante recurso hídrico para o estado do Espírito Santo (Brasil), contaminado por metais, utilizando ensaios com espécimes de *Lactuca sativa* L., analisando variáveis citogenéticas e fitotóxicas, assim como o metabolismo antioxidante e fotossintético. Para tanto, amostras de água foram coletadas de cinco estações amostrais em dois períodos de amostragem no Rio Santa Maria da Vitória (SMV). A partir destas, foram realizadas a quantificação elementar de metais e bioensaios em *L. sativa* onde foram realizadas avaliações citogenéticas no meristema radicular por meio dos índices mitótico (IM), de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleo (MN), bem como análises da fitotoxicidade a partir da germinação e elongação radicular das plântulas. Além disso, foram realizadas avaliações fisiológicas nas plantas em estágio de pré-crescimento a partir da análise das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase do guaiacol (POD). E por fim, quantificação do teor de clorofila estimado e análise das trocas gasosas a partir da assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), concentração intracelular de CO_2 (C_i), transpiração (E), razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular (C_i/C_a) e eficiência de carboxilação (A/C_i). Entre os 12 metais quantificados, Al apresentou concentrações de até 1096,820 $\mu g.L^{-1}$, mas também foram observadas concentrações elevadas de Mn, Pb e Cu. A concentração de Al parece estar relacionada tanto às atividades antrópicas quanto à características morfológicas, pedológicas e geológicas da bacia hidrográfica de SMV. As análises citogenéticas constataram IM, AC e MN das estações amostrais significativamente diferentes do controle negativo, sugerindo, respectivamente, potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico na maioria das estações avaliadas. Além disso, foi constatado fitotoxicidade de algumas estações amostrais, sendo esta correlacionada ao IM observado. Com relação às avaliações fisiológicas, as enzimas SOD, CAT e POD apresentaram atividade superior em algumas estações amostrais, sugerindo o aumento do metabolismo antioxidante frente ao estresse provocado pela espécies reativas de oxigênio geradas possivelmente devido às amostras de água avaliadas. As análises de troca gasosas demonstraram diminuição da eficiência do processo fotossintético, sendo este fato

possivelmente relacionado às concentrações de Cu observadas nas estações amostrais. Os resultados alcançados neste estudo constataram potenciais efeitos sobre a biota exposta às águas do Rio SMV, sejam eles em nível citogenético ou fisiológico. Esses efeitos parecem estar relacionados aos metais quantificados. Todavia considerando o uso e ocupação da bacia hidrográfica, outros contaminantes poderiam atuar como agentes responsáveis pelos efeitos observados, comprometendo a qualidade ambiental deste recurso hídrico.

Palavras-chave: Alumínio • antioxidantes • fitotóxicidade • fotossíntese • toxicogenética •

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the water quality of an important water resource to the State of Espírito Santo (Brazil), contaminated by metals using tests with *Lactuca sativa* L. specimens, analyzing cytogenetic and phytotoxic parameters, as well as antioxidant and photosynthetic metabolism. For this purpose, water samples were collected from five sampling stations on two sampling periods in the Santa Maria da Vitória River (SMV). From these, elemental quantification of metals and bioassays in *L. sativa* was carried where cytogenetic evaluations were performed in root meristem through mitotic index (MI), chromosomal aberrations index (CA) and frequency of micronuclei (MN), as well as phytotoxicity tests based on germination and seedling root elongation. In addition, physiological evaluations were realized in pre-growth stage from analysis of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and guaiacol peroxidase (POD). Finally, quantification of estimated chlorophyll content and gas exchange analysis from CO_2 liquid assimilation (A), stomatal conductance (g_s), intracellular CO_2 concentration (C_i), transpiration (E), CO_2 concentration ratio intra and extracellular (C_i/C_a) and carboxylation efficiency (A/C_i). Among the 11 metals quantified, Al presented concentrations up to 1096,820 $\mu g.L^{-1}$, but considerable concentrations of Mn, Pb and Cu were also observed. The Al concentration appears to be related to both anthropic pressures and morphological, pedological and geological characteristics of the SMV watershed. The cytogenetic analyzes showed IM, AC and MN of sampling stations significantly different from negative control, suggesting, respectively, cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials in most stations evaluated. In addition, phytotoxicity of some sampling stations was observed, which was correlated with observed MI. In relation to physiological evaluations, SOD, CAT and POD enzymes presented superior activity in some sample stations, suggesting the increase of antioxidant metabolism against the stress caused by reactive oxygen species generated, possibly due to water samples evaluated. The gas exchange analyzes showed a decrease in photosynthetic process efficiency, being this fact possibly related to Cu concentrations observed in sample stations. The results obtained in this study verified potential effects on biota exposed to SMV River waters, whether at cytogenetic or physiological level.

These effects seem to be related to quantified metals. However considering the hydrographic basin use and occupation, other contaminants could act as responsible agents for observed effects, compromising the environmental quality of this water resource.

Key words: Aliminium • antioxidants • photosynthesis • phytotoxicity • toxicogenetic •

1. INTRODUÇÃO

Desde a revolução industrial cresce os impactos sobre os ecossistemas aquáticos por meio de lançamentos de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas que podem conter inúmeros compostos químicos potencialmente danosos à qualidade ambiental. Apesar da degradação natural de muitos contaminantes como as moléculas orgânicas, os metais permanecem no meio ambiente, fazendo com que suas concentrações aumentem continuamente sobretudo nos recursos hídricos e horizontes superiores do solo (ZORRING et al., 2010).

A contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais pode estar relacionada à diversas atividades, como a queima de carvão e outros combustíveis para a produção de energia, o lançamentos de efluentes sanitários, as atividades mineradoras e metalúrgicas, os despejos de lodo de esgoto e as aplicações de fertilizantes (LESAGE et al., 2007; MACDONALD et al., 2011; JIAO et al., 2012). Nos ecossistemas aquáticos, os metais apresentam-se dissolvidos ou complexados na coluna d'água, ou ainda presentes em sistemas coloidais e sólidos no sedimento. Além disso, a especiação dos metais depende de vários processos biológicos, potenciais redox, força iônica e pH que os tornam biodisponíveis e consequentemente perigosos à biota (LAROCQUE; RASMUSSEN, 1998).

Tendo em vista o aumento da contaminação bem como a complexidade das transformações químicas que podem ocorrer nos ecossistemas, a utilização de bioensaios com plantas apresentam-se como ferramenta efetiva para as avaliações da qualidade da água (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2017), poluição do solo (HU et al., 2016) e atmosfera (AMATO-LOURENCO et al., 2017). Segundo Ferrari e outros (1999), os biomarcadores vegetais apresentam diversas variáveis de avaliação, como por exemplo, a taxa de germinação, o peso da biomassa e a atividade enzimática. Sendo assim, os marcadores biológicos ou biomarcadores são úteis na determinação do grau de impacto, além de permitirem a identificação de estressores ou poluentes responsáveis pelos efeitos sobre a biota (FUENTES-RIOS et al., 2005).

Várias espécies de plantas são utilizadas em uma variedade de biotestes (JUCHIMIUK; MALUSZYNSKA, 2005), possibilitando o biomonitoramento da

extensão da contaminação de ecossistemas aquáticos assim como a avaliação de potenciais tóxicos e mutagênicos (GIORGETTI et al., 2011; BATISTA et al., 2016; DUARTE et al., 2017). Entre os biotestes vegetais, destaca-se *Lactuca sativa* L. (alface) cujo bioensaio é considerado simples, rápido e sensível para a avaliação de potencias riscos ambientais (GOPALAN, 1999). *L. sativa* apresenta pequenas sementes em grande número, grande superfície de contato com as amostras testes, alta sensibilidade e cromossomos visíveis (2n = 18) (CAMPOS et al., 2008). Além disso, as agências de proteção ambiental e padronizações de bioensaios recomendam espécimes de *L. sativa* para a determinação dos efeitos de substâncias tóxicas (OECD, 2006; US EPA, 2012ab).

Considerando a avaliação de ecossistemas aquáticos contaminados por metais por meio de bioensaios em plantas, observam-se que os estudos abrangem biomarcadores em níveis citogenéticos, bioquímicos, fisiológicos e de crescimento. A fitoxicidade de metais como As, Cu, Mn, Pb e Zn foram observadas sobre a germinação e crescimento radicular de *L. sativa* (GABUR-GONZÁLEZ et al., 2010). Com relação aos aspectos citogenéticos, a genotoxicidade de Cd (MONTEIRO et al., 2007) e do resíduo *spent pot liner* - SLP (ANDRADE et al., 2010), rico em Al e outros metais, também foi observada em ensaios com esta mesma espécie vegetal.

Outra consequência importante do estresse por metais nas plantas é a intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem mediar mecanismos de defesa antioxidantes. Estas podem danificar os componentes celulares como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucléicos (APEL; HIRT, 2004). Além disso, o acúmulo de EROs induz o estresse oxidativo secundário, resultando em efeitos nocivos sobre o metabolismo vegetal (YANG et al., 2010), como observado em exposições de *L sativa* à Cd (HAGHIGHI et al., 2010) e à Pb (HONG et al., 2015). Metais como o Cd sob determinadas concentrações podem afetar o aparato fotossintético, seja inibindo a atividade da Rubisco (Ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenasse), seja reduzindo a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (FSII) em diferentes espécies de plantas (SIEDLECKA et al., 1997; KRUPA; MONIAK, 1998; CHUGH; SAWHNEY, 1999). Vestígios de metais podem substituir o íon Mg da molécula de clorofila, impossibilitando sua atividade e diminuindo a atividade fotossintética (FERRAT et al., 2003).

Entre os recursos hídricos do Estado do Espírito Santo (Brasil), há em sua região centro serrana a bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória que apresenta grande importância socioeconômica e ambiental. Além de abrigar remanescentes de Mata Atlântica, esta bacia apresenta papel importante para a produção industrial e agropecuária da região, bem como possibilita a geração de energia elétrica e abastecimento público (MIRANDA, 2009). Entretanto, a bacia do Rio Santa Maria da Vitória tem sofrido diversos impactos antrópicos como desmatamentos, assoreamento das margens do rio, utilização indiscriminada de agroquímicos e lançamentos inadequados de efluentes (MARTINS; FERNANDES, 2011; GRIPPA et al., 2012).

Tendo em vista a importância da conservação dos recursos hídricos e a avaliação da qualidade ambiental por meio de múltiplos biomarcadores em biotestes sensíveis, o presente estudo objetivou avaliar a qualidade da água do Rio Santa Maria da Vitória em ensaios com espécimes de *L. sativa* por meio variáveis citogenéticas e fitotóxicas durante estágios de germinação e plântula, assim como variáveis do metabolismo antioxidante e fotossintético durante o estágio de pré-crescimento em dois períodos de amostragem.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo, período e amostragem

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) localiza-se na região centro serrana do Estado do Espírito Santo (Brasil), tendo em sua área os municípios de Santa Maria de Jetibá, Santa Leopoldina, Cariacica, Serra e Vitória. A mesma apresenta área de drenagem e extensão até a foz, na Baía de Vitória, de aproximadamente 1876 km^2 e 122 Km, respectivamente. De acordo com a classificação da Agência Nacional de Águas (ANA, 2017), a bacia hidrográfica do Rio SMV enquadra-se no nível 4, tendo em vista sua dimensão. E com relação às diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, considerando a resolução brasileira de nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, o Rio SVM enquadra-se na classe 2.

Seis estações amostrais foram georreferênciadas (GPS, Garmin Nüvi) e utilizadas para a avaliação da qualidade da água do Rio SMV: EA1 (20° 3.333'S / 40° 46.447'O), situada à montante do centro do Município de Santa Maria de Jetibá; EA2 (20° 2.290'S / 40° 43.782'O), localizada à jusante do centro do

Município de Santa Maria de Jetibá; EA3 (20° 3.248'S / 40° 38.996'O), presente no reservatório Rio Bonito; EA4 (20° 4.896'S / 40° 35.043'O), situada na represa Suíça; EA5 (20° 6.080'S / 40° 31.067'O), localizada na região central do Município de Santa Leopoldina e EA6 (20° 10.283'S / 40° 23.656'O) em Cariacica, próxima ao local de captação da companhia de abastecimento da região. Por meio do software de Sistemas de Informações Geográficas ArcMap 10.1 e a partir de dados vetoriais (*shapefille*) adquiridos junto aos sites do IBGE e GEOBASES, foi elaborado o mapa de localização da área de estudo (Figura 1).

Para a avaliação da precipitação mensal total (mm) na região, foram consideradas as estações pluviométricas da ANA e da Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (CPRM): estação 02040007, situada à montante do reservatório Rio Bonito; estação 02040018, situada à jusante de Rio Bonito; estação 02040010, situada à jusante da represa Suíça. E para a vasão ($m^3.s^{-1}$) no Rio SMV, foram considerados os dados obtidos no estudo de Guimarães (2016). Neste caso, os dados foram mensurados por estações instaladas à montante e jusante do reservatório Rio Bonito, e à jusante da represa Suíça.

Dispondo das estações amostrais, foram realizadas coletas de água em duas amostragens, início de Abril e início de Outubro de 2015. Amostras de água subsuperficial, em duplicata, foram coletadas a aproximadamente 20 cm da superfície e armazenadas em garrafas plásticas previamente higienizadas. As amostras para a quantificação elementar foram armazenadas em garrafas plásticas higienizadas em solução ácida de H_3NO_2 (10 % v/v), sendo essas acidificadas a 2 % (v/v) com o mesmo ácido. Em ambos os casos, as amostras foram mantidas sob refrigeração (-6°C) até análise.

2.2. Quantificação elementar

Para a avaliação elementar, as amostras em duplicata foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa azul e então submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. Os metais As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb e Se foram quantificados por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer). Al, Ba, Mn e Zn foram quantificados por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) utilizando o equipamento Optima 7000 DV (Perkin Elmer).

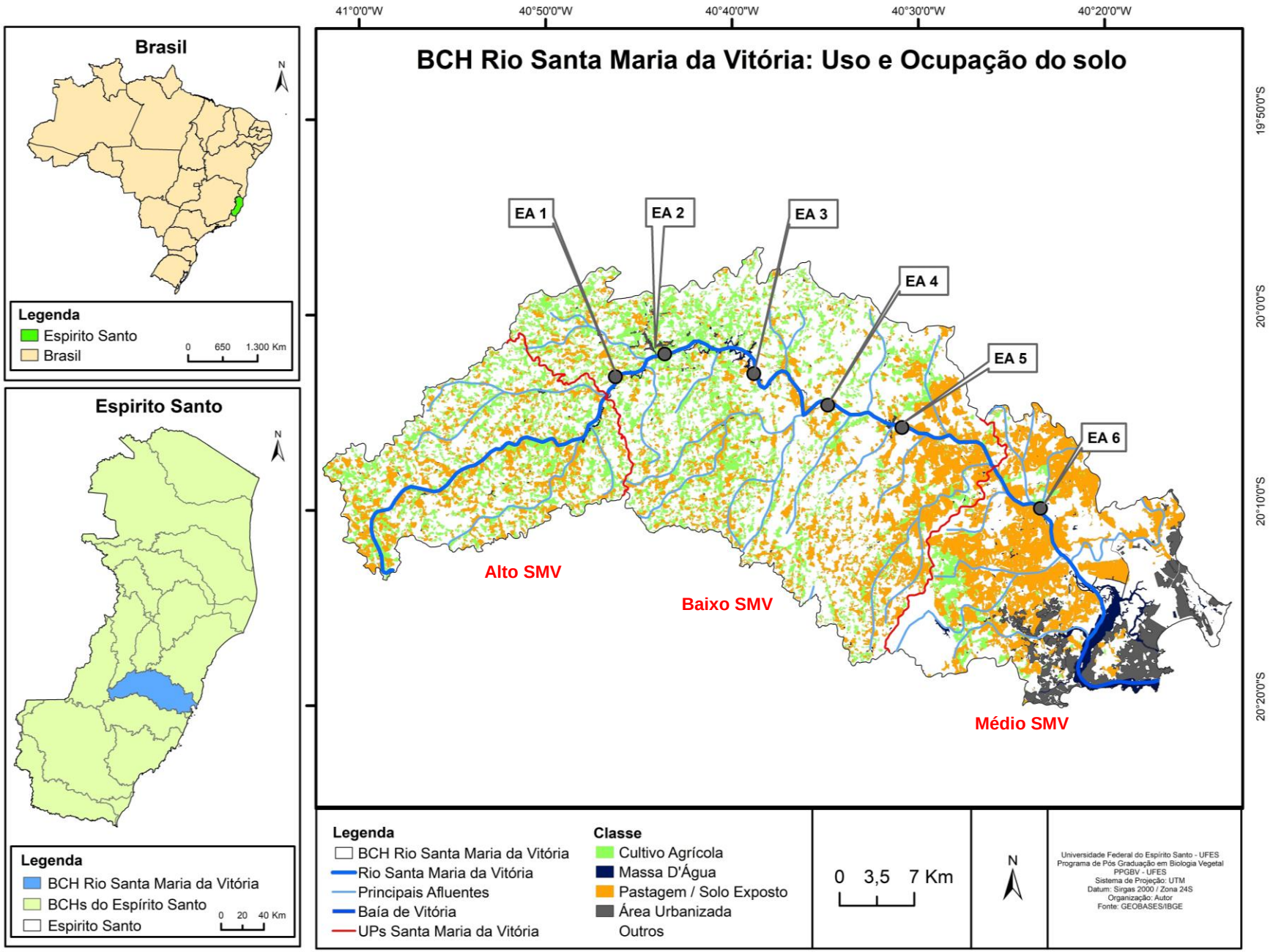

Figura 1: Mapa de Uso e ocupação do solo da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil).

2.3. Citogenética em Lactuca sativa

Os ensaios citogenéticos em *Lactuca sativa* foram realizados a partir do protocolo de Grant (1982), com algumas modificações. Assim, 50 sementes de *L. sativa* variedade Crespa repolhuda foram embebidas em 5 ml de amostras de água de cada estação amostral do Rio SMV em placa de Petri e papel filtro. O controle negativo foi realizado com o mesmo volume de água destilada e o controle positivo, com solução indutora de danos no DNA de Metil-metanosulfonato - MMS (4 x 10^{-4} mM) (Sigma, St. Louis, MO, USA). A exposição ocorreu por 48 horas em câmara de germinação à 24 °C na ausência de luz. O experimento foi realizado em triplicata.

Ao término da exposição, as raízes foram fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético v/v). A coloração dos meristemas seguiu o tradicional método de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), sendo realizada hidrólise ácida com HCl 1M (60°C) por 7 minutos e posteriormente imersão em reativo de Schiff. Após a confecção das lâminas pelo método do esmagamento, cinco mil células foram analisadas em microscópio de luz Nikon E200, para cada tratamento. As fases do ciclo celular e as alterações nos cromossomos foram registradas e suas frequências utilizadas para o cálculo do índice mitótico (IM), taxa de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

A partir de IM, obtido por meio da razão do número total de células em divisão pelo número total de células analisadas, foi mensurado o potencial citotóxico. Para AC, foram consideradas as alterações nos diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como a presença de ponte cromossômica, quebra cromossômica, C-metáfase, anáfase multipolar, atraso cromossômico, aderência cromossômica, perda cromossômica, núcleo fragmentado e broto nuclear. AC foi calculado por meio da razão do total de células contendo alterações cromossômicas pelo total de células analisadas, possibilitando a avaliação do potencial genotóxico. E o potencial mutagênico foi avaliado por MN cujo cálculo foi realizado a partir da frequência de células meristemáticas contendo o micronúcleo.

2.4. Fitotoxicidade em Lactuca sativa

O potencial fitotóxico das amostras de água do Rio SMV foi avaliado com base no método OPPTS 850.4200 (U.S. EPA, 1996) e no estudo de Bagur-González e outros (2011). Para este teste de toxicidade aguda, 15 sementes de *L. sativa* var. Crespa repolhuda foram embebidas em 5 ml de amostras de água de cada estação amostral do Rio SMV em placa de Petri e papel filtro. O controle foi realizado com o mesmo volume de água destilada. A exposição ocorreu por 120 horas em câmara de germinação à 24 °C com fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi realizado em duplicata.

Ao final da exposição foram calculadas a porcentagem de germinação (Germ $_{(\%)}$) e o comprimento radicular (Comp $_{(mm)}$), bem como os índices de germinação (IG) e elongação radicular (ER). IG foi calculado pela razão [Germ $_{(\%)}$ amostra - Germ $_{(\%)}$ controle] ÷ Germ $_{(\%)}$ controle. Enquanto ER considerou a razão [Comp $_{(mm)}$ amostra - Comp $_{(mm)}$ controle] ÷ Comp $_{(mm)}$ controle. Os valores observado de IG e ER classificam a fitotoxicidade como baixa (0 a -0,25), moderada (-0,25 a 0,50), elevada (-0,50 a -0,75) e muito elevada (-0,75 a -1,00), podendo chegar à -1 quando se caracteriza a fitotoxicidade máxima. Por outro lado, valores > 0 indicam estimulação da germinação ou elongação radicular (BAGUR-GONZÁLEZ et al., 2011).

2.5. *Aspectos fisiológicos em* Lactuca sativa

2.5.1. Exposição

Para as avaliações fisiológicas do metabolismo antioxidante e fotossintético nos espécimes de *L. sativa* var. Crespa repolhuda, foi realizado a exposição às amostras de água do Rio SMV por meio de estrutura hidropônica. Para tanto, o ensaio consistiu de duas etapas, germinação e pré-crescimento dos espécimes. Na primeira etapa, três sementes de *L. sativa* foram dispostas em cubos de espuma fenólica de 2 cm^3 previamente higienizadas. Após isso, as semente foram dispostas em recipientes plásticos com água potável deionizada e em local sombreado por 48 horas, seguido de 72 horas sob luz natural para a germinação e protrusão da radícula e dos cotilédones das plântulas (FURLANI et al., 2009).

Posteriormente, as plântulas de *L. sativa* foram expostas aos tratamentos com as amostras de água do Rio SMV. Neste caso, devido as localizações à montante e à jusante da bacia hidrografia ou de centros urbanos, foram utilizadas

as amostras das estações EA1, EA5 e EA6 das duas amostragens. Além das amostras do Rio SMV, foi estabelecido o controle com água deionizada. Tanto o controle quanto os tratamentos referentes às estações receberam suplementação de solução nutritiva Forth® Solúveis - Inicial na dosagem recomendada pelo fabricante (1,5 g/L). Nesta etapa, duas plântulas foram desbastadas em cada espuma fenólica para possibilitar o crescimento apropriado da terceira. Durante o ensaio, as soluções hidropônicas apresentaram o pH mantido em 5,5 a 6,5 e a condutividade à aproximadamente 2.000 µS por meio de soluções de NaOH (1M) e HCl (1M).

O ensaio foi conduzido sob luz natural por 21 dias que condiz com o estágio de pré-crescimento dos espécimes de *L. sativa*. Este experimento ocorreu em casa de vegetação modelo Van der Hoeven situada no Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória - ES, Brasil (20° 16.493'S / 40° 18.349'O). As médias de temperatura e radiação solar máxima durante o experimento, adquiridas da estação automática Vitória-A612 do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), foram, respectivamente: 26,2°C e 2415,16 $kJ.m^{-2}$ durante o experimento da primeira amostragem, 27,4°C e 3037,88 $kJ.m^{-2}$ durante o experimento da segunda amostragem. Ao final de cada experimento, cinco espécimes de *L. sativa* foram conduzidos para a realização das análises fisiológicas.

2.5.2. Metabolismo antioxidante

A avaliação do metabolismo antioxidante foi realizada a partir da quantificação indireta de proteínas totais e enzimas superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), catalase (CAT; EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX; EC 1.11.1.11) e peroxidase do guaiacol (POD; EC 1.11.1.7). Aproximadamente 0,4 g de massa fresca da segunda folha totalmente expandida, a partir da base, dos espécimes de *L. sativa* de cada tratamento foram maceradas em nitrogênio líquido. O macerado foi homogeneizado com 3 ml de solução tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,8), EDTA (0,1 mM) e ácido ascórbico (20 mM) e polivinilpolipirrolidona (1% p/v). As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo, sendo o extrato resultante centrifugado a 15.000 ^{X}g, a 4°C por 15 min em equipamento Hermle Z 326 K (PARIDA et al., 2004). O sobrenadante resultante

foi recolhido e armazenado a -80°C, compondo o extrato bruto para a quantificação de proteínas e enzimas.

Os teores de proteínas totais foram determinados pelo método de Bradford (1976), utilizando a coloração pelo corante Azul de Coomassie G250 e utilizando a albumina sérica bovina como padrão. Alíquotas de 100 µL do extrato bruto de *L. sativa* foram acrescidas a 5 mL do corante e após 2 minutos de reação, foram realizadas leituras em A_{595}. A análise da atividade da SOD seguiu o método descrito por Giannopolitis e Ries (1977), sendo neste caso avaliado a capacidade da enzima inibir a fotorredução do corante Azul de nitrotetrazólio (NBT). Assim, 100 µL de extrato bruto foram alicotados em 1500 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,5), 780 µL de metionina (50 mM), 60 µL de riboflavina (0,1 mM), 60 µL de EDTA (5 mM), 225 µL de NBT (1mM) e 275µL água ultrapura. A reação foi avaliada em A_{560} após 40 minutos de incubação a 25°C. Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima que produz uma inibição de 50% da redução fotoquímica do NBT, sendo expressa em unidade de $SOD.mg^{-1}$ de proteína.

A atividade da CAT foi determinada a partir da mistura de reação entre 100 µL de extrato bruto, 200 µL de H_2O_2 (10 mM) e 1700 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (50 mM, pH 7,0). A atividade da enzima foi monitorada durante 3 minutos a 25°C, sendo observado a velocidade de desaparecimento de H_2O_2 em A_{240} por meio da absorbância inicial e final constatadas. O coeficiente de extinção de H_2O_2 considerado foi de 36,0 $mol^{-1}.L.cm^{-1}$ para o cálculo da atividade enzimática, expressa em µmol de $H_2O_2.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína (AEBI, 1984; IBRAHIM; SROU, 2015).

A análise da atividade de APX baseou-se nos estudos de Ibrahim e Srou (2015) e Nakano e Asada (1981). O meio de reação consistiu de 100 µL do extrato de *L. sativa* e 1900 µL de solução contendo tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), EDTA (0,1 mM), ácido ascórbico (0,5 mM) e H_2O_2 (0,1 mM). A oxidação de H_2O_2 dependente de ácido ascórbico foi mensurada seguindo o decréscimo da absorbância em A_{290} por 3 minutos a 25°C, considerando as absorbâncias inicial e final. O coeficiente de extinção de H_2O_2 considerado foi de 2,8 $mmol^{-1}.L.cm^{-1}$ para o cálculo da atividade enzimática, expressa em µmol de $ascorbato.min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína.

Para determinação da atividade da POD, a mistura de reação foi composta por 100 µL de extrato, 1mL de H_2O_2 (260 mM), 50 µL de guaiacol (20 mM) e 900 µL de tampão fosfato Na_2PO_4 (pH 6,0). O aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol foi medido em A_{470} após 3 minutos a 25°C. O coeficiente de extinção de H_2O_2 considerado foi de 26,6 $mmol^{-1}.L.cm^{-1}$ para o cálculo da atividade enzimática, expresso µmol de purporogalina $min^{-1}.mg^{-1}$ de proteína (KÖKSAL; GÜLÇIN, 2008; HU et al., 2012). As leituras das reações nas absorbâncias supracitadas para a determinação da atividade de SOD, CAT, APX e POD ocorreram em espectrofotômetro Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis.

2.5.3. Trocas gasosas e teor de clorofila estimado

A partir das mesmas folhas dos espécimes de *L. sativa* utilizadas para a avaliação da atividade das enzimas antioxidantes, foram realizadas as medidas de trocas gasosas. Para tanto, foi utilizando o analisador de gás infravermelho (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA) acoplado com fonte de luz vermelho/azul (LI-6400-02B LED). O sistema foi mantido constante sob irradiância de 300 µmol fótons $m^{-2}.s^{-1}$, 400 µmol CO_2 mol^{-1} ar e temperatura de 27ºC, sendo obtidos os dados de assimilação líquida de CO_2 (A, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}$), condutância estomática (g_s, mol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), concentração intracelular de CO_2 (C_i, µmol CO_2 mol^{-1}), transpiração (E, mmol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular (C_i/C_a) e eficiência de carboxilação (A/C_i, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}.Pa^{-1}$).

O teor de clorofila foi estimado por meio do clorofilômetro digital portátil SPAD-502 Konica Minolta nas mesmas folhas onde foram realizadas as medidas de trocas gasosas. Neste caso, foram obtidas médias a partir de 6 leituras ao longo do limbo foliar de cada espécime de *L. sativa*, evitando leituras na nervura central.

2.6. *Análises estatísticas*

A partir do programa InfoStat (Versão para estudantes) os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilks para avaliar a distribuição normal das médias. Os dados de metais não seguiram a distribuição normal, logo foram analisados por meio do teste de Kruskal Wallis (P <0,05) e expressos em média ± desvio padrão. Os dados bióticos, alcançados a partir dos ensaios com *L. sativa* seguiram a distribuição normal, sendo então avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott (P *<0,05*) no caso dos variáveis citogenéticas e de toxicidade,

e ANOVA seguido pelo teste de Duncan (*P <0,05*) no caso das variáveis fisiológicas. Nestes casos, os dados foram expressos em média ± erro padrão. Além disso, foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis toxicogenéticas e fitotóxicas (*P* <0,05; *P* <0,01).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Precipitação, vazão pluvial e metais dissolvidos

As medições de precipitação total mensal constataram 136,50 mm de chuva à montante de Rio Bonito, 40,90 mm à jusante de Rio Bonito e 78,90 mm à jusante de Suíça na a primeira amostragem. E na segunda, 21,39 mm à montante de Rio Bonito, 29,39 mm à jusante de Rio Bonito e 32,00 mm à jusante de Suíça. Em ambos os casos, foram considerados o regime de precipitação do mês anterior às amostragens, ou seja Março e Setembro de 2015.

Com relação à vazão, também considerando o mês anterior à amostragem realizada, a vasão média observada na primeira amostragem foi de 3,45 $m^3.s^{-1}$ à montante de Rio Bonito, 1,56 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Rio Bonito e 3,55 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Suíça. Já na segunda amostragem, observou-se as vasões de 1,28 $m^3.s^{-1}$ à montante de Rio Bonito, 2,30 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Rio Bonito e 3,58 $m^3.s^{-1}$ à jusante de Suíça. A partir destes resultados, é possível constatar que há variações tanto de precipitação quanto de vasão ao longo do curso do Rio SMV. Além disso, ressalta-se que a vasão de SMV pode ser influenciada pelos reservatório Rio Bonito e represa Suíça e seus respectivos manejos, já que armazenam água para produção de energia hidroelétrica e abastecimento.

A maioria dos metais considerados na análise do Rio SMV foi quantificada nas amostras de cada estação em ambos os períodos de amostragem realizados (Tabelas 1 e 2). Comparando-se as concentrações dos metais entre as estações amostrais, EA1 se destaca pela concentração superior de metais como Al (1096,820 ± 7,020), Ba (31,480 ± 1,011) e Mn (60,930 ± 0,500) na primeira amostragem. Além desses, EA1 também apresentou níveis superiores de Cr (3,975 ± 0,032) e Pb (7,971 ± 0,016) em relação às outras estações na segunda amostragem.

Tabela 1: Metais quantificados (µg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na primeira amostragem.

	Primeira amostragem								
	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6	LD 1	LQ 1	CONAMA**
Al	1096,820 ± 7,020^{D}	405,250 ± 6,646^{ABC}	92,470 ± 1,859^{A}	473,100 ± 5,015^{BCD}	627,380 ± 8,658^{CD}	322,200 ± 2,578^{AB}	0,700	2,340	100,000
As	0,161 ± 0,008^{BC}	0,167 ± 0,004^{C}	0,167 ± 0,007^{C}	0,160 ± 0,004^{ABC}	0,130 ± 0,005^{A}	0,144 ± 0,004^{AB}	7,802*	26,008*	10,000
Ba	31,480 ± 1,011^{B}	19,990 ± 0,204^{AB}	19,370 ± 0,054^{A}	21,390 ± 0,066^{B}	19,890 ± 0,066^{AB}	18,960 ± 0,125^{A}	0,350	1,150	700,000
Cd	0,036 ± 0,002^{C}	0,018 ± 0,003^{A}	0,029 ± 0,001^{BC}	0,029 ± 0,002^{BC}	0,024 ± 0,000^{AB}	0,026 ± 0,003^{AB}	1,084*	3,612*	1,000
Co	0,218 ± 0,001^{CD}	0,167 ± 0,002^{BCD}	0,069 ± 0,001^{A}	0,158 ± 0,001^{ABC}	0,245 ± 0,002^{D}	0,142 ± 0,000^{AB}	1,789*	5,962*	50,000
Cr	2,811 ± 0,014^{D}	2,076 ± 0,006^{ABC}	1,949 ± 0,006^{A}	2,194 ± 0,022^{CD}	2,119 ± 0,017^{BCD}	2,007 ± 0,006^{AB}	0,134	0,448	50,000
Cu	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	2,600 ± 0,374	0,8	2,6	9,000
Mn	60,930 ± 0,500^{C}	30,510 ± 0,540^{AB}	<LQ	42,170 ± 0,772^{BC}	37,950 ± 1,207^{ABC}	27,460 ± 0,890^{A}	7,240	24,140	100,000
Ni	0,929 ± 0,001^{D}	0,611 ± 0,002^{A}	0,900 ± 0,010^{CD}	0,714 ± 0,012^{AB}	0,784 ± 0,002^{BCD}	0,768 ± 0,008^{ABC}	3,935*	13,117*	25,000
Pb	1,642 ± 0,016^{C}	0,725 ± 0,002^{A}	1,215 ± 0,033^{BC}	1,625 ± 0,024^{C}	1,141 ± 0,019^{ABC}	1,078 ± 0,008^{AB}	3,521*	11,736*	10,000
Se	0,272 ± 0,006^{AB}	0,296 ± 0,001^{BC}	0,366 ± 0,037^{C}	0,284 ± 0,025^{ABC}	0,267 ± 0,018^{AB}	0,242 ± 0,020^{A}	65,273*	217,577*	10,000
Zn	8,930 ± 0,000	<LD	3,030 ± 0,123	<LD	<LD	<LD	0,570	1,900	180,000

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. *Concentração expressa em ng.L^{-1}. **CONAMA 357, limites para ambientes Classe 2.

Tabela 2: Metais quantificados (µg.L^{-1}) nas amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória na segunda amostragem.

	Segunda amostragem								
	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6	LD 1	LQ 1	CONAMA***
Al	1043,600 ± 6,679^{D}	250,950 ± 1,079^{CD}	51,770 ± 1,362^{A}	145,430 ± 2,734^{ABC}	130,640 ± 0,549^{AB}	181,940 ± 0,418^{BCD}	0,700	2,340	100,000
As	0,170 ± 0,003^{BC}	0,203 ± 0,004^{C}	0,142 ± 0,001^{ABC}	0,144 ± 0,082**	0,122 ± 0,004^{AB}	0,119 ± 0,001^{A}	7,802*	26,008*	10,000
Ba	31,980 ± 0,179^{D}	22,070 ± 0,139^{CD}	17,860 ± 0,077^{AB}	18,360 ± 0,072^{ABC}	17,430 ± 0,071^{A}	20,150 ± 0,153^{BCD}	0,350	1,150	700,000
Cd	0,083 ± 0,003^{C}	0,024 ± 0,000^{AB}	0,018 ± 0,001^{A}	0,038 ± 0,031**	0,024 ± 0,002^{AB}	0,026 ± 0,002^{BC}	1,084*	3,612*	1,000
Co	0,429 ± 0,003^{C}	0,311 ± 0,002^{BC}	0,050 ± 0,001^{A}	0,136 ± 0,110**	0,129 ± 0,001^{ABC}	0,119 ± 0,003^{AB}	1,789*	5,962*	50,000
Cr	3,975 ± 0,032^{C}	2,118 ± 0,021^{ABC}	1,572 ± 0,005^{A}	2,537 ± 0,622**	2,298 ± 0,023^{BC}	1,956 ± 0,008^{AB}	0,134	0,448	50,000
Cu	4,200 ± 0,533^{AB}	<LD	<LD	<LD	4,900 ± 0,284^{B}	2,600 ± 0,060^{A}	0,8	2,6	9,000
Mn	58,59 ± 2,057^{BC}	78,33 ± 0,697^{C}	<LQ	29,800 ± 1,019^{AB}	<LQ	26,820 ± 0,204^{A}	7,240	24,140	100,000
Ni	1,218 ± 0,01^{C}	0,712 ± 0,017^{AB}	0,540 ± 0,006^{A}	0,722 ± 0,598**	0,827 ± 0,017^{ABC}	0,865 ± 0,012^{BC}	3,935*	13,117*	25,000
Pb	7,971 ± 0,016^{C}	1,820 ± 0,022^{AB}	0,920 ± 0,004^{A}	2,429 ± 1,977**	4,689 ± 0,080^{BC}	2,365 ± 0,031^{ABC}	3,521*	11,736*	10,000
Se	0,242 ± 0,020^{AB}	0,281 ± 0,010^{BC}	0,298 ± 0,032^{C}	0,285 ± 0,171**	0,236 ± 0,017^{A}	<LQ	65,273*	217,577*	10,000
Zn	4,490 ± 0,106	<LD	<LD	6,380 ± 0,343	<LD	<LD	0,570	1,900	180,000

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. *Concentração expressa em ng.L^{-1}. **Valor desconsiderado na análise estatística tendo em vista o desvio padrão elevado. ***CONAMA 357, limites para ambientes Classe 2.

Entre os metais quantificados, Al apresentou níveis consideravelmente elevados principalmente em EA1 (1096,820 ± 7,020 $\mu g.L^{-1}$) na primeira amostragem, ou seja, concentração aproximadamente 10 vezes maior do que aquela estabelecida pela legislação brasileira CONAMA 357. Neste caso, avaliando-se a bacia hidrográfica do Rio SMV, sugere-se que os elevados teores de Al podem estar relacionados às características pedológicas e geológicas da bacia hidrográfica e aos potenciais processos de erosão superficial do solo e lixiviação.

A bacia hidrográfica do Rio SMV apresenta áreas de Latossolo e Cambissolo que são classificados como distróficos, possuindo até 50% de saturação de Al o que confere baixa fertilidade aos mesmos (OLIVEIRA et al., 1983; IBGE, 2015). Além disso, o alto e médio SMV apresenta substrato geológico composto por rochas graníticas ricas em alumínio e gnáissicas paraluminosas (VIEIRA; MENEZES, 2015) bem como relevo montanhoso (GATTO et al., 1983) que associados às característica pedológicas e aos eventos de precipitação e vasão do rio podem propiciar os processos de erosão e lixiviação de diversos elementos, como Al, e consequentemente contaminar os recursos hídricos (VESTENA, 2008; CARVALHO et al., 2009).

Segundo Guimarães (2016), o uso e ocupação do solo da bacia do Rio SMV apresenta-se 22,08 % relacionado à atividades agrícolas e 6,87 % à pastagens (Figura 1). Dessa forma, considerando estas proporções, os potenciais processos de erosão superficial e lixiviação bem como os problemas de infertilidade do solo, sugere-se a possibilidade de que as concentrações de metais dissolvidos observados nas amostras avaliadas estejam também relacionadas à utilização de insumos agrícolas. Diversos estudos demonstram que estes podem apresentar metais, como Zn, Cd e Cu em esterco animal (ALLOWAY, 1990), As em aditivos alimentares (O' NEILL, 1990), Cd em fertilizantes fosfatados (O' CONNOR, 2005), Mn, Zn, Co e Pb em agrotóxicos e fertilizantes (GIMENO-GARCIA, et al., 1996). A avaliação de 196 amostras de fertilizantes e respectivas matérias primas de 12 países europeus concluiu que estes são fontes de contaminação do solo por As, Cr, Cd e Pb (NZIGUHEBA; SMOLDERS, 2008).

3.2. Toxicogenética

As análises dos meristemas radiculares de *L. sativa* após exposição às amostras de água do Rio SMV, permitiram constatar que na primeira amostragem (Tabela 3, Figura 2) todas as estações apresentaram IM inferiores em relação ao controle negativo (0,121 ± 0,002), com destaque para EA3 que apresentou o menor valor (0,050 ± 0,002). Na segunda amostragem, EA1, EA2 e EA3 apresentaram IM inferior ao controle negativo (0,112 ± 0,002) enquanto EA4, EA5 e EA6 apresentaram IM superiores.

O potencial citotóxico, caracterizado pelos IM reduzidos, pode apresentar relação à ação dos pontos de checagem do ciclo celular. Segundo Alberts e outros (2008) os pontos de checagem G1/S e G2 do ciclo celular inibem a síntese de DNA e/ou bloqueiam o ciclo após a detecção de danos sobre o material genético. Além disso, esse bloqueio pode ocorrer pela detecção de distúrbios no ciclo celular e disfunções da cromatina (CHANDRA et al., 2005; GLINSKA et al., 2007). Em contrapartida, os IM elevados observados também podem ser nocivos, pois podem resultar em proliferação celular desordenada e eventualmente aberrações cromossômicas (FENECH et al., 2003; ARAGÃO et al., 2015), como evidenciado, neste último caso, a partir da correlação significativa entre IM e AC (r = 0,788) (Tabela 4).

Com relação às aberrações cromossômicas, tanto na primeira quanto na segunda amostragem, os valores de AC observados nas estações amostrais foram superiores em relação ao controle negativo (Tabela 3, Figura 2), sugerindo elevado potencial genotóxico das amostras de água avaliadas. Na primeira amostragem, os maiores valores de AC foram observados nas estações EA1 (0,013 ± 0,001), EA2 (0,015 ± 0,001), EA5 (0,015 ± 0,001) e EA6 (0,017 ± 0,001). Enquanto na segunda amostragem, EA2 (0,020 ± 0,001), EA4 (0,023 ± 0,001) e EA6 (0,024 ± 0,001) apresentaram os maiores valores. Os AC observados apresentaram-se elevados devido às frequências de alterações do tipo C-metáfase e, principalmente, aderência cromossômica.

Tabela 3: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular de *Lactuca sativa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo (MMS, $4x10^{-4}$ mM) nas duas amostragens.

	Controle negativo	MMS	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6
				Primeira amostragem				
IM	$0,121 \pm 0,002^{E}$	$0,060 \pm 0,002^{B}$	$0,069 \pm 0,002^{C}$	$0,072 \pm 0,002^{C}$	$0,050 \pm 0,002^{A}$	$0,071 \pm 0,002^{C}$	$0,073 \pm 0,002^{C}$	$0,084 \pm 0,002^{D}$
AC	$0,001 \pm 0,001^{A}$	$0,011 \pm 0,001^{B}$	$0,013 \pm 0,001^{C}$	$0,015 \pm 0,001^{C}$	$0,009 \pm 0,001^{B}$	$0,010 \pm 0,001^{B}$	$0,015 \pm 0,001^{C}$	$0,017 \pm 0,001^{C}$
MN	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,008 \pm 0,000^{B}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$
				Segunda amostragem				
IM	$0,112 \pm 0,002^{C}$	$0,081 \pm 0,002^{A}$	$0,104 \pm 0,002^{B}$	$0,086 \pm 0,002^{A}$	$0,107 \pm 0,002^{B}$	$0,117 \pm 0,002^{D}$	$0,114 \pm 0,002^{D}$	$0,123 \pm 0,002^{E}$
AC	$0,002 \pm 0,001^{A}$	$0,015 \pm 0,001^{B}$	$0,019 \pm 0,001^{B}$	$0,020 \pm 0,001^{C}$	$0,018 \pm 0,001^{B}$	$0,023 \pm 0,001^{C}$	$0,018 \pm 0,001^{B}$	$0,024 \pm 0,001^{C}$
MN	$0,000 \pm 0,000^{A}$	$0,006 \pm 0,000^{D}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,003 \pm 0,000^{C}$	$0,001 \pm 0,000^{B}$	$0,002 \pm 0,000^{B}$	$0,001 \pm 0,000^{A}$	$0,001 \pm 0,000^{B}$

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott (P <0.05). EP: Erro padrão.

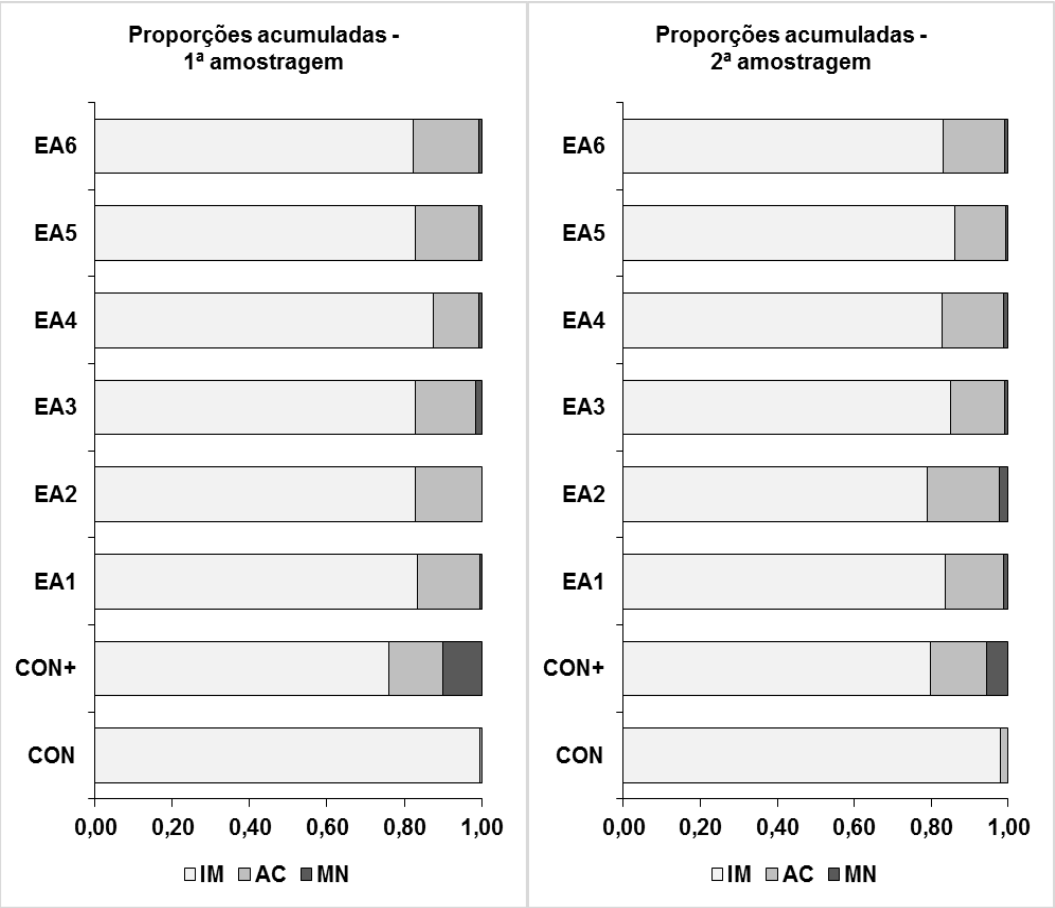

Figura 2: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular de *Lactuca sativa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.

Tabela 4: Correlação de Pearson entre as variáveis toxicogenéticas (IM, AC, MN) e fitotóxicas (Germ, Comp, IG, ER). IM = índice mitótico; AC = índice de aberrações cromossômicas; MN = frequência de micronúcleos; Germ = porcentagem de germinação; Comp = comprimento radicular; IG = índice de germinação; ER = índice de elongação radicular.

	Germ	Comp	IG	ER	IM	AC	MN
Germ	1	0,463	0,012	0,032	0,160	0,640	0,037
Comp	-0,097	1	0,407	0,000	0,001	0,007	0,034
IG	0,321*	-0,109	1	0,172	0,738	0,727	0,118
ER	-0,277*	0,759**	-0,179	1	0,000	0,000	0,002
IM	-0,184	0,428**	0,044	0,568**	1	0,000	0,014
AC	-0,062	0,343**	-0,046	0,436**	0,788**	1	0,001
MN	-0,269*	0,274*	-0,204	0,401**	0,315*	0,433**	1

Coeficientes seguidos de *são significantes a $P < 0,05$; e de **são significantes a $P < 0,01$.

Segundo os estudos de Fiskesjö (1985) e Fiskesjö e Levan (1993), a origem de C-metafase está relacionada à inativação completa do fuso mitótico celular, impedindo a formação da placa equatorial e interrompendo a divisão celular. Esse processo ocorreria por alterações nas moléculas de tubulinas do fuso mitótico, interferindo na polimerização dos microtúbulos e, consequentemente, na metáfase e no processo de migração dos cromossomos para os polos (ANTHONY; HUSSEY, 1999; FERNANDES et al., 2009). De acordo com Odeigah e outros (1997), C-metafases são consideradas alterações reversíveis, porém caso seus reparos não ocorram, pode haver a formação de células poliploides.

Por outro lado, os eventos de aderência cromossômica são indicativos da influência tóxica de compostos sobre o DNA e possivelmente é irreversível (MARCANO; DEL-CAMPO, 1995; MARCANO et al., 1998). Segundo os estudos de McGill e outros (1974) e Klásterská e outros (1976), a aderência cromossômica surge devido à dobras indevidas da fibra cromossômica em cromátides simples, resultando na ligação dos cromossomos uns aos outros por meio de pontes subcromáticas. Além disso, Fiskesjö (1997) discute que a aderência cromossômica envolve tanto a porção proteica da cromatina quanto o DNA propriamente dito.

No que diz respeito ao potencial mutagênico das amostras, observa-se que apenas na segunda amostragem os valores de MN das estações apresentaram-se elevados em relação ao controle negativo (0,000 ± 0,000), exceto EA5 (0,001 ± 0,000) (Tabela 3, Figura 2). As frequências significativas de MN na segunda amostragem podem ter relação com o IM deste período ser superior, em termos absolutos, em relação ao controle negativo quando comparado ao IM da primeira amostragem. Essa possível relação entre a frequência de micronúcleos e a divisão celular é evidenciada pela correlação significativa entre IM e MN (r = 0,315). Ou seja, a partir das divisões celulares há a perpetuação dos danos mutagênicos nas gerações celulares seguintes.

3.3. Fitotoxicidade

A análise da fitotoxicidade, revelou que as frequências de germinação absoluta mensuradas em *L. sativa* expostas às amostras de água do Rio SMV não apresentaram diferenças entre as estações e controle em ambas as amostragens (Tabela 5). Todavia, o comprimento radicular apresentou-se superior

em todas as estações em relação ao controle (30,861 ± 2,45) na segunda amostragem, com valores entre 37,295 ± 2,450 (EA3) e 42,477 ± 2,45 (EA1). O crescimento radicular significativo observado na segunda amostragem, sobretudo em EA4, EA5 e EA6, pode ter relação ao IM observado nas respectivas estações, o que foi evidenciado por meio da correlação significativa entre os mesmos (r = 0,428) (Tabela 4).

Ao avaliar os índices IG e ER que levam em consideração, respectivamente, a geminação e a elongação radicular das estações em relação ao controle, observa-se que na primeira amostragem as estações apresentaram baixa toxicidade tanto em relação à germinação quanto à elongação radicular, exceto em EA6. Os resultados de IG da segunda amostragem sugerem baixa toxicidade de EA1, EA2 e EA3 (-0,02), bem como em EA5 (-0,05) e EA6 (-0,10). Por outro lado, a avaliação de ER nesta amostragem demonstra a estimulação do crescimento radicular na estações, com ER entre 0,21 (EA3) e 0,38 (EA1). Este fato confirma a avaliação do crescimento radicular e do índice mitótico observados na segunda amostragem, sugerindo maior crescimento aliado à maior divisão celular do meristema radicular. Sendo evidenciado pelas correlações significativas entre $Comp_{(mm)}$ e ER (r = 0,759), bem como entre IM e ER (r = 0,568) (Tabela 4).

A combinação de análises macroscópicas e microscópicas constitui ferramenta importante para a determinação de efeitos tóxicos e sinérgicos de contaminantes (ANDRADE et al., 2010), uma vez que essas variáveis apresentam-se relacionados no processo de desenvolvimento das plantas (HARASHIMA; SCHNITTGER, 2010). Segundo Shishkova e outros (2008), a divisão celular do tecido meristemático combinada à elongação celular, é um dos principais fatores que influenciam no crescimento radicular.

Tabela 5: Porcentagem de germinação (Germ, %), comprimento radicular (Comp, mm), índice de germinação (IG) e índice de elongação radicular (ER) avaliados por meio de sementes de *Lactuca sativa*, após exposição às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens.

	Controle	EA1	EA2	EA3	EA4	EA5	EA6
				Primeira amostragem			
Germ	93,333 ± 3,940^{A}	93,333 ± 3,940^{A}	93,333 ± 3,940^{A}	88,889 ± 3,940^{A}	93,333 ± 3,940^{A}	93,333 ± 3,940^{A}	93,333 ± 3,940^{A}
Comp	38,103 ± 3,490^{A}	38,220 ± 3,490^{A}	34,906 ± 3,490^{A}	38,011 ± 3,490^{A}	37,038 ± 3,490^{A}	33,880 ± 3,490^{A}	38,434 ± 3,490^{A}
IG	-	0	0	-0,05	0	0	0
ER	-	0	-0,08	0	-0,03	-0,11	0,01
				Segunda amostragem			
Germ	91,111 ± 4,825^{A}	88,889 ± 4,825^{A}	88,889 ± 4,825^{A}	88,889 ± 4,825^{A}	97,778 ± 4,825^{A}	86,667 ± 4,825^{A}	82,222 ± 4,825^{A}
Comp	30,861 ± 2,45^{A}	42,477 ± 2,450^{B}	40,841 ± 2,450^{B}	37,295 ± 2,450^{B}	41,568 ± 2,450^{B}	39,643 ± 2,450^{B}	42,338 ± 2,450^{B}
IG	-	-0,02	-0,02	-0,02	0,07	-0,05	-0,10
ER	-	0,38	0,32	0,21	0,35	0,28	0,37

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Scott-Knott (P <0.05). EP: Erro padrão. IG e ER: -1 (fitotoxidade máxima) à > 0; 0 à −0,25 baixa fitotoxicidade; −0,25 à −0.5 fitotoxidade moderada; −0,50 à −0,75 alta fitotoxicidade; −0,75 à −1 fitotoxicidade bem alta. Valores de ER > 0 indicam a estimulação do crescimento radicular.

3.4. Metabolismo antioxidante

A avaliação das atividades das enzimas SOD, CAT, APX e POD nas folhas das plântulas de *L. sativa* permitiu constatar atividades significativas destas enzimas em relação ao controle nas amostragens realizadas (Tabela 6, Figura 3). A atividade da SOD mostrou-se superior em EA1 (28,524 ± 0,806) e EA5 (29,575 ± 0,806) na primeira amostragem, em relação ao controle (21,933 ± 0,806). Na segunda amostragem, a atividade superior desta enzima ocorreu em todas as estações consideradas. As SODs são consideradas enzimas da primeira linha de defesa das plantas contra os efeitos tóxicos das EROs e catalisam a dismutação de dois radicais O_2^-, gerando H_2O_2 e O_2. Desse modo, participam da modulação dos níveis de H_2O_2 nas mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (MITTLER, 2002; BHATTACHARJEE, 2010; GILL; TUTEJA, 2010).

Tabela 6: Atividades enzimáticas de SOD (unidade de SOD.mg^{-1} de proteína), CAT (µmol de H_2O_2.min^{-1}.mg^{-1} de proteína), APX (µmol de ascorbato.min^{-1}.mg^{-1} de proteína) e POD (µmol de purporogalina min^{-1}.mg^{-1} de proteína) de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens.

	Controle	EA1	EA5	EA6
		Primeira amostragem		
SOD	21,933 ± 0,806^{A}	28,524 ± 0,806^{B}	29,575 ± 0,806^{B}	24,118 ± 0,806^{A}
CAT	15,912 ± 2,737^{A}	16,860 ± 2,737^{A}	30,094 ± 2,737^{B}	30,185 ± 2,737^{B}
APX	0,575 ± 0,026^{C}	0,438 ± 0,026^{B}	0,190 ± 0,026^{A}	0,200 ± 0,026^{A}
POD	13,772 ± 4,867^{A}	23,835 ± 4,867^{AB}	35,531 ± 4,867^{BC}	45,798 ± 4,867^{C}
		Segunda amostragem		
SOD	23,421 ± 1,258^{A}	29,792 ± 1,258^{B}	31,515 ± 1,258^{B}	28,193 ± 1,258^{B}
CAT	16,036 ± 2,215^{A}	17,961 ± 2,215^{AB}	24,660 ± 2,215^{B}	17,874 ± 2,215^{AB}
APX	0,609 ± 0,046^{B}	0,443 ± 0,046^{A}	0,333 ± 0,046^{A}	0,404 ± 0,046^{A}
POD	17,36 ± 4,690^{A}	20,772 ± 4,690^{A}	46,12 ± 4,690^{B}	15,641 ± 4,690^{A}

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Duncan (P <0.05). EP: Erro padrão.

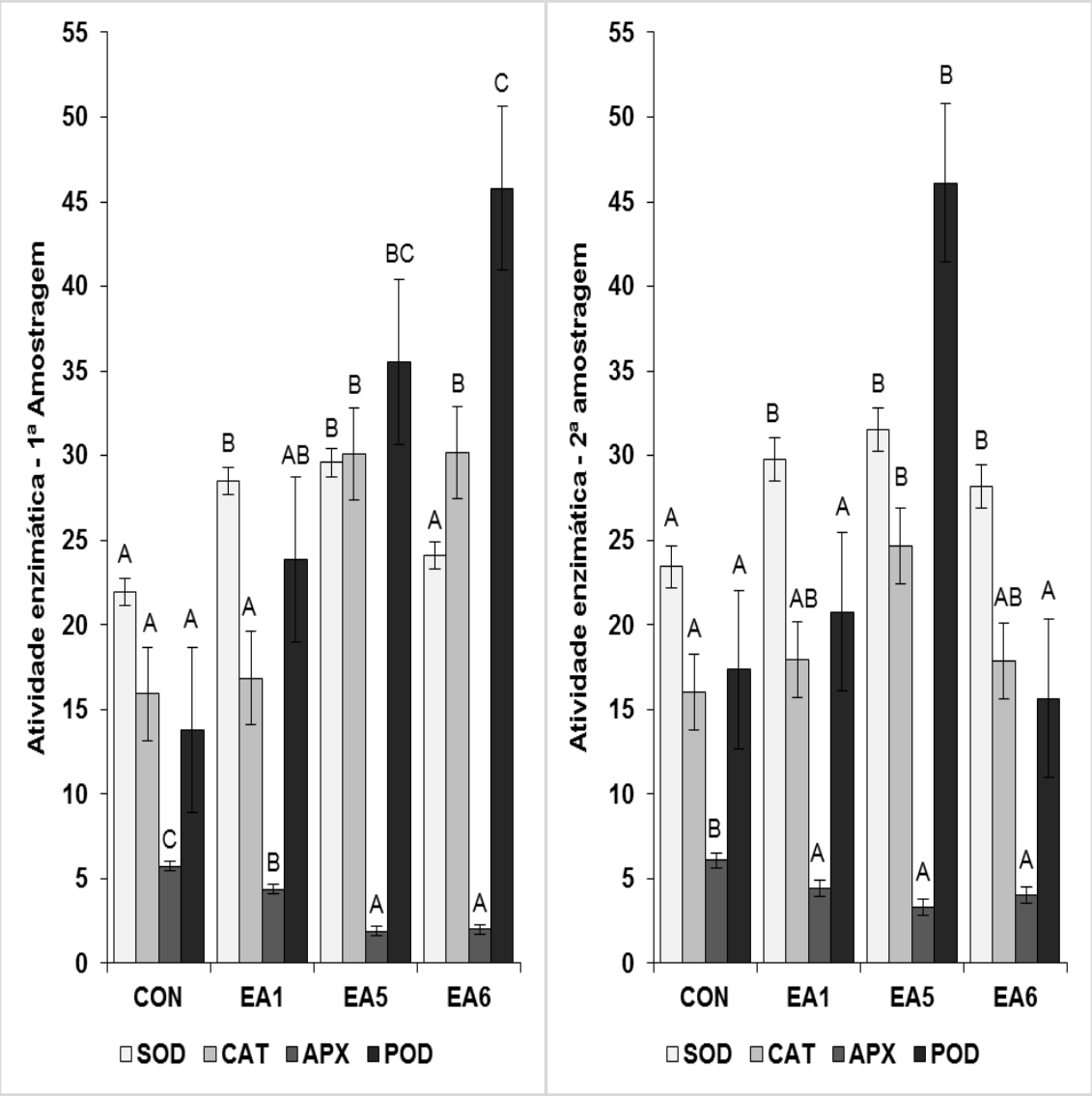

Figura 3: Atividade enzimática de SOD (unidade de SOD.mg^{-1} de proteína), CAT (µmol de H_2O_2.min^{-1}.mg^{-1} de proteína), APX (µmol de ascorbato.min^{-1}.mg^{-1} de proteína) e POD (µmol de purporogalina min^{-1}.mg^{-1} de proteína) de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens. *Valores de APX foram multiplicados por 10 para apresentação.

A análise da atividade da CAT demonstrou-se superior na primeira amostragem em EA5 (30,094 ± 2,737) e EA6 (30,185 ± 2,737) em relação ao controle (15,912 ± 2,737). Na segunda amostragem, apenas EA5 (24,660 ± 2,215) apresentou atividade superior em relação ao controle (16,036 ± 2,215). A CAT atua nos peroxissomos e glioxissomos, podendo ser encontrada nas mitocôndrias. São importantes no processo de desintoxicação celular das plantas pois atuam na dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e oxigênio molecular (GILL; TUTEJA, 2010; DUBEY, 2011). A CAT atua independentemente de agente

redutor, sendo eficiente energeticamente na remoção de H_2O_2 (SHARMA et al., 2012), sobretudo em concentrações elevadas dessa espécie reativa de oxigênio que caracterizam estresse severo (DUBEY, 2011). Além disso, segundo Wilson e Walker (2010), a CAT é uma das enzimas mais eficientes, apresentando elevados número de renovação e constante de especificidade (4.10^7 s^{-1}), assim como constante de Michaelis-Menter (K_M) bastante elevada (1,1 M).

A atividade da APX não se apresentou expressiva nas estações EA1, EA5 e EA6 em relação aos controles nas amostragens realizadas. A APX apresenta distintas isoformas enzimáticas, podendo ser encontrada em mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos, citosol e parede celular (DABROWSKA et al., 2007). Diferentemente da CAT, a APX requer o ácido ascórbico como redutor e apresenta K_M na ordem de µM (LOCATO et al., 2010; SHARMA et al., 2012). Todavia, segundo Bhatt e Tripathi (2011), a APX juntamente com a CAT apresentam-se como as enzimas mais importantes dentre os componentes de desintoxicação de H_2O_2.

Com relação à atividade da POD, constatou-se que na primeira amostragem as estações EA5 (35,531 ± 4,867) e EA6 (45,798 ± 4,867) apresentaram atividades superiores em relação ao controle (13,772 ± 4,867), enquanto na segunda amostragem apenas EA5 (46,12 ± 4,690) apresentou atividade superior em relação ao mesmo (17,36 ± 4,690). Segundo Lagrimini (1991), as POD apresentam várias isoformas e envolvem-se em diversos processos celulares como regulação do alongamento celular, ligação entre os polissacarídeos da parede celular, lignificação e proteção contra patógenos. Sendo estes, geralmente, em respostas a estresse biótico ou abiótico (VEITCH, 2004). Com relação ao metabolismo antioxidante, as PODs utilizam o H_2O_2 como oxidante e compostos fenólicos como doadores de elétrons, estando localizadas principalmente na parede celular e nos vacúolos (LOCATO et al., 2010).

3.5. Trocas gasosas

As análises de trocas gasosas em *L. sativa* após exposição às amostra de água das estações EA1, EA5 e EA6, possibilitaram constatar alterações nas variáveis fotossintéticas de trocas gasosa (Tabela 7).

Tabela 7: Assimilação líquida de CO_2 (*A*, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}$), condutância estomática (g_s, mol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), concentração intracelular de CO_2 (C_i, µmol CO_2 mol^{-1}), transpiração (*E*, mmol H_2O $m^{-2}.s^{-1}$), razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular (C_i/C_a), eficiência de carboxilação (*A/Ci*, µmol CO_2 $m^{-2}.s^{-1}.Pa^{-1}$) e índice SPAD de plântulas de *Lactuca sativa* expostas às amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória e ao controle nas duas amostragens.

	Controle	EA1	EA5	EA6
		Primeira amostragem		
A	9,412 ± 0,286^{B}	8,966 ± 0,286^{AB}	9,526 ± 0,286^{B}	8,433 ± 0,286^{A}
g_s	0,281 ± 0,027^{AB}	0,311 ± 0,027^{B}	0,208 ± 0,027^{A}	0,248 ± 0,027^{AB}
C_i	331,549 ± 7,118^{B}	339,065 ± 7,118^{B}	304,446 ± 7,118^{A}	326,249 ± 7,118^{B}
E	0,003 ± 0,000^{AB}	0,003 ± 0,000^{B}	0,002 ± 0,000^{A}	0,003 ± 0,000^{AB}
C_i/C_a	0,844 ± 0,018^{B}	0,862 ± 0,018^{B}	0,775 ± 0,018^{A}	0,829 ± 0,018^{AB}
A/Ci	0,028 ± 0,001^{AB}	0,026 ± 0,001^{A}	0,031 ± 0,001^{B}	0,026 ± 0,001^{A}
SPAD	20,800 ± 0,624^{AB}	19,240 ± 0,624^{A}	19,84 ± 0,624^{AB}	21,360 ± 0,624^{B}
		Segunda amostragem		
A	7,126 ± 0,308^{C}	4,269 ± 0,308^{A}	5,481 ± 0,308^{B}	5,663 ± 0,308^{B}
g_s	0,289 ± 0,027^{B}	0,244 ± 0,027^{AB}	0,178 ± 0,027^{A}	0,210 ± 0,027^{AB}
C_i	347,154 ± 7,677^{AB}	359,962 ± 7,677^{B}	327,456 ± 7,677^{A}	339,127 ± 7,677^{AB}
E	0,003 ± 0,000^{A}	0,003 ± 0,000^{A}	0,003 ± 0,000^{A}	0,003 ± 0,000^{A}
C_i/C_a	0,880 ± 0,02^{AB}	0,909 ± 0,02^{B}	0,828 ± 0,02^{A}	0,858 ± 0,02^{AB}
A/Ci	0,021 ± 0,001^{C}	0,012 ± 0,001^{A}	0,017 ± 0,001^{B}	0,017 ± 0,001^{B}
SPAD	23,060 ± 0,567^{A}	23,840 ± 0,567^{A}	23,740 ± 0,567^{A}	26,880 ± 0,567^{B}

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Duncan (P <0.05). EP: Erro padrão.

Com relação à assimilação líquida de CO_2 (*A*), observa-se que na primeira amostragem esta variável apresentou-se inferior em EA6 (8,433 ± 0,286) em relação ao controle (9,412 ± 0,286). Já na segunda amostragem, as três estações consideradas apresentaram *A* inferior em relação ao controle (7,126 ± 0,308). Neste aspecto, a partir da análise da eficiência de carboxilação (A/C_i), observa-se que na segunda amostragem as três estações apresentaram A/C_i inferior em relação ao controle negativo (0,021 ± 0,001), sugerindo menor eficiência do processo fotossintético em EA1, EA5 e EA6, em relação ao controle. Tendo em vista que a fotossíntese é a principal fonte de carbono orgânico para as plantas, de energia para o crescimento e produção de biomassa (LAWLOR, 2002), os resultados observados nessas estações amostrais demonstram possíveis alterações no desenvolvimento de plantas expostas às amostras de água destas estações.

Quanto à transpiração, as variáveis condutância estomática (g_s) e transpiração (*E*) não apresentaram diferenças significativas em relação ao

controle em ambas as amostragens, sugerindo a não interferência da composição das amostras de água neste processo. Apesar disso, na primeira amostragem em EA5, a concentração intracelular de CO_2 (C_i) (304,446 ± 7,118) e a razão entre concentrações de CO_2 intra e extracelular (C_i/C_a) (0,775 ± 0,018) apresentaram-se inferiores em relação ao controle (331,549 ± 7,118 / 0,844 ± 0,018), o que sugere menor disponibilidade de CO_2 para a fotossíntese. Todavia este fato não parece ter influenciado o valor de *A* constatado em EA5 (9,526 ± 0,286) que não diferiu do controle.

As estimativas dos teores de clorofila pelo SPAD-502 demonstraram que apenas EA6 (26,880 ± 0,567), na segunda amostragem, apresentou nível superior em relação ao controle (23,060 ± 0,567), sugerindo que os espécimes expostos à este tratamento apresentavam estado nutricional superior ao controle e demais tratamentos. De acordo com Amarante e outros (2008), as leituras por meio do SPAD-502 apresenta-se como método indireto não destrutivo que permite a avaliação em tempo real do estado nutricional da planta.

4. DISCUSSÃO GERAL

Na organização biológica, o nível de organismo situa-se no meio da escala hierárquica de resposta à estressores, integrando os níveis bioquímico, celular e fisiológico. Desse modo, a realização de bioensaios possibilita avaliar os efeitos dos estressores antes que estes possam se expressar nos níveis de populações, comunidades e ecossistemas (MAGALHÃES; FILHO, 2008). Neste aspecto, destaca-se a utilização dos biomarcadores que podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas em células, fluidos corpóreos, tecidos e órgãos de organismo, sendo estes indicativos da exposição ou efeito a xenobióticos (LAM; GRAY, 2003). Segundo Nigro e outros (2006), aqueles baseados em respostas ao nível molecular e celular refletem os primeiros sinais de alteração ambiental.

De acordo com Prasad (2013), diversos estudos demonstram que os metais podem causar estresse em plantas desde suas biomoléculas às suas relações ecológicas nos ecossistemas. Os índices citogenéticos avaliados neste estudo demonstraram efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico das amostras de água do Rio SMV sobre *L. sativa.* E considerando as concentrações quantificadas nas amostras do Rio SMV, os metais Ba, Mn, Pb, Cu e principalmente Al são os

potenciais agentes estressores. Segundo Pejchar e outros (2008), Al apresentam-se como metal altamente citotóxico para as plantas. Às concentrações de Al foram atribuídos IM reduzidos em *A. cepa* e *Zea mays* (CAMPOS; VICCINI, 2003), assim como potencial genotóxico pelo surgimento de alterações como aderências e C-metafases (RAJESHWARI et al., 2015). Avaliando amostras de água de uma lagoa, Duarte e outros (2017) relacionaram os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico aos metais quantificados, dentre eles Al e Cd. Em *L. sativa*, estudos como os de Andrade e outros (2010) e Freitas e outros (2016) indicam Al como um dos agente precursores dos danos citogenéticos.

Com relação aos outros metais, Qin e outros (2015) constaram diminuições da divisão celular e promoção de aberrações cromossômicas como C-mitoses e aderências cromossômicas ao expor *A. cepa* à soluções de Cu. Danos neste espécime foram observados após exposições à amostras de água e sedimento de áreas de mineração contaminadas com Ba (GERAS'KIN et al., 2011) e à água de ambientes lóticos contaminadas com Mn (SALLES et al., 2016). Além disso, constatou-se que concentrações de Pb diminuíram a divisão celular e aumentaram as aberrações cromossômicas de *L. sativa* (PEREIRA et al., 2013). Não bastasse, outros contaminantes como defensivos agrícolas, pesticidas, fertilizantes e efluentes domésticos presentes no Rio SMV podem ser considerados agentes causadores de danos citogenéticos em amostras de água deste ambiente (GRIPPA et al., 2012).

A fitotoxicidade dos metais em *L. sativa* foi relatada por Andrade e outros (2010) ao estudarem os resíduos SPL oriundos das indústrias de alumínio. Neste caso, os autores observaram efeitos fitotóxicos deste resíduo sobre *L. sativa* e os relacionaram aos componentes deste resíduo como Al, Cd, Pb, Fe, Cu, Mn e Zn. Já Bagur-González e outros (2011) observaram efeito fitotóxico de extratos de solo contaminados com As, Cu, Mn, Pb, Zn e destacaram o índice ER como mais sensível para áreas pouco contaminadas, e tanto IG quanto ER como bons indicadores da fitotoxicidade de solos muito contaminados. Especificamente em relação ao Al, sabe-se que os efeitos primários da sua toxicidade remetem-se às interferências no crescimento da raiz, afetando o alongamento celular (SIVAGURU; HORST, 1998; MATSUMOTO, 2000).

Além disso, segundo Mossor-Pietraszewska (2001) Al aparentemente não interfere de forma clara com a germinação de sementes, mas prejudica o

crescimento das raízes como observado no estudo de Silva e Matos (2016) ao expor *L. sativa* a concentrações deste metal.

Ao avaliar amostras de água e sedimento de um córrego urbano, Rodrigues e outros (2013) detectaram efeito fitotóxico sobre *L. sativa* e relacionaram este efeito aos contaminantes daquele ambiente, como Cd e Pb. Além de metais, outros contaminantes potencialmente fitotóxico podem ser encontrados em solos e corpos hídricos de áreas antropizadas, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, compostos organoclorados e outros poluentes orgânicos (GARCIA et al., 2009). Esses contaminantes podem ter origem do escoamento superficial de áreas agrícolas ou até mesmo de áreas pavimentadas (BOLLMANN; MARQUES, 2006).

Alguns metais como Cu, Zn, Co e Fe em quantidades traço são essenciais para várias processos metabólicos das plantas, todavia o excesso de todos os metais, essenciais ou não, afetam negativamente o metabolismo vegetal (HALL, 2002). Em relação ao metabolismo antioxidante, a produção de espécies reativas de oxigênio e os consequentes mecanismos enzimáticos de defesa estão relacionados às condições de estresse, como luminosidade elevada, radiação UV-B e metais (MITTLER, 2002; HAN et al., 2009; MAHESHWARI; DUBEY, 2009; MISHRA et al., 2011).

É bem documentado que o estresse causado por metais resultam em mudanças bruscas nas atividades de enzimas como SOD, CAT, APX e POD (SAI KACHOUT et al., 2009, HASHEM et al., 2013). Teklic e outros (2008) avaliaram os efeitos de Cu sobre *L. sativa* após exposições à 0,5 mM e constataram intensa atividade de POD, enquanto Moraes e outros (2015) observaram atividade significativa de SOD em *L. sativa* após exposição à soluções de $CuSO_4$ (250 e 500 µM). O efeito de Pb foi observado em dois cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) desenvolvidos em 500 e 1000 µM $Pb(NO_3)_2$, destacando-se os elevados níveis de atividade das enzimas SOD, POD e APX em relação ao controle (VERMA; DUBEY, 2003).

Também foram observados efeitos sobre as atividades de SOD e CAT após exposições à Ba em plantas de soja (MELO et al., 2011) e à Mn em *Phytolacca americana*, espécie acumuladora e tolerante aos metais (ZHAO et al. 2012), bem como em plântulas de arroz expostas a concentrações de $MnCl_2$ (3 e 6 mM) que também induziu as atividades de POD e APX (SRIVASTAVA; DUBEY, 2011).

Com relação a Al, a avaliação de doses crescentes de nanopartículas de Al_2O_3 (0,01 - 100 $\mu g.mL^{-1}$) em *A. cepa,* demonstrou aumento na atividade de SOD (RAJESHWARI et al., 2015). Efeito similar foi observado por Achary e outros (2008) ao exporem raízes de *A. cepa* à concentrações de $AlCl_3$ (1 - 200 µM) e constatarem atividades elevadas de SOD, APX e POD. Estudos realizados por Achary e outros (2012), Achary e Panda (2009) e Kultz (2005) relacionaram os danos oxidativos desencadeados por Al aos danos no material genético após o comprometimento dos mecanismos celulares de manutenção da homeostase e proteção do material genético contra as EROs.

Além dos efeitos sobre o metabolismo antioxidante, segundo Aggarwal e outros (2011), os metais apresentam toxicidade sobre a fotossíntese. Neste caso, este efeito está associado principalmente às modificações estruturais e funcionais das maquinarias fotossintéticas. Os autores ainda destacam as possibilidades de inibição de enzimas fotossintéticas e biossíntese de clorofila, assim como interferências nas membranas dos cloroplastos e no transporte de elétrons. Nesse sentido, a partir dos metais quantificados e das variáveis de trocas gasosas avaliadas, sugere-se que as concentrações de Cu das estações EA1, EA5 e EA6 interferiram na eficiência do processo fotossintético nestas estações.

Em concentrações acima das necessárias para o crescimento ótimo, Cu demonstrou interferir sobre processos metabólicos importantes como fotossíntese e respiração celular (PRASAD; STRZALKA, 1999). A toxicidade de Cu sobre a fotossíntese foi observada por Pätsikkä e outros (2002) ao demonstrar que concentrações de Cu (4 e 15 µM) predispõem a fotoinibição do fotossistema II em plantas de feijão, o que pode diminuir a fotossíntese e consequentemente a produtividade (ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

Outros efeitos de Cu baseiam-se na possibilidade de remoção de Mg da clorofila presente tanto nos complexo antena quanto nos centros de reação, prejudicando assim a estrutura e a função deste pigmento cloroplastídico (KUPPER et al., 2003). Segundo Baszynski e outros (1988), é evidente que o excesso de Cu apresenta forte efeito sobre a estrutura fina do cloroplasto, resultando na degradação das pilhas de grana e lamelas estromáticas.

Apesar destas constatações, ressalta-se que a avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos metais sobre a fotossíntese necessita de informações exatas sobre a concentração destes poluentes na folha e nos respectivos

compartimentos celulares (AGGARWAL et al., 2011). Além disso, tendo em vista as concentrações de Cu quantificadas nas amostras de água de SMV, estudos complementares acerca da acumulação deste metal nestas concentrações são necessários para constatações de possível bioacumulação e então toxicidade sobre o metabolismo fotossintético. Neste sentido, Simeoni e outros (1984) relataram que hortaliças folhosas como *L. sativa* apresentam capacidade de acumular metais e Baker (2008) classifica esta espécie como grande acumuladora, o que foi constatado pela bioacumulação de Cu em folhas de *L. sativa* expostas a efluentes e solos contaminados por Cu (ACHAKZAI et al., 2011; SACRISTÁN et al., 2015).

5. CONCLUSÕES

A avaliação das seis estações amostrais do Rio SMV indicaram que a sua qualidade ambiental pode estar comprometida. As amostras apresentaram concentrações de metais, principalmente Al que apresentou níveis acima dos estabelecidos pela legislação nacional. Possivelmente, influenciada pela precipitação e vazão do Rio SMV, a presença dos metais nas amostras avaliadas pode estar relacionada aos processos de erosão e lixiviação da bacia do Rio SMV bem como ao lançamento de efluentes e lixiviação de agroquímicos. Os ensaios realizados em *L. sativa* demostraram os efeitos das amostras de água de SMV sobre o material genético e divisão celular. Além disso, as amostras apresentaram potencial fitotóxico, interferindo do desenvolvimento radicular do espécime avaliado. Com relação ao metabolismo, foram observados atividades significativas da maioria das enzimas quantificadas assim como a diminuição da eficiência do processo fotossintético. Os resultados observados nos biomarcadores avaliados em *L. sativa* parecem estar relacionados aos metais quantificados. Entretando, considerando o uso e ocupação da bacia hidrográfica, outros contaminantes poderiam atuar como agentes causadores dos efeitos observados, sendo necessárias avaliações complementares. Espera-se que estes resultados estimulem a integração dos bioensaios e seus biomarcadores à avaliação da qualidade de água usualmente realizada pelos órgãos ambientais.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Agência Estadual de Recursos Hídricos – AGERH do estado do Espírito Santo pela apresentação das estações amostrais, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES pelas bolsas de estudo. Os autores também são gratos pela disponibilidade e estrutura do Grupo de Estudos de Mutagênese e Toxicologia (GEMUT), Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleos (LabPetro), Laboratório de Anatomia de Vegetal (LABAV), Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Plantas (LaBioPlant) e do Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

7. REFERÊNCIAS

ACHAKZAI, A.K.K; BAZAI, Z.A.; KAYANI, S. Accumulation of heavy metals by lettuce (*Lactuca sativa* L.) irrigated with different levels of wastewater of Quetta City. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 6, p. 2953-2960, 2011.

ACHARY, V.M.; JENA, S.; PANDA, K.K.; PANDA, B.B.; Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 20, p. 300-310, 2008. DOI:10.1016/j.ecoenv.2007.10.022

ACHARY, V.M.M.; PANDA, B.B. Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 201-209, 2009. DOI:10.1093/mutage/gep063

ACHARY, V.M.M.; PARINANDI, N.L.; PANDA, B.B. Aluminum Induces Oxidative Burst, Cell Wall NADH Peroxidase Activity and DNA Damage in Root Cells of *Allium cepa* L. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 7, p. 550-560, 2012 DOI:10.1002/em.21719

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984. DOI:10.1016/S0076-6879(84)05016-3

AGGARWAL, A.; SHARMA, I.; TRIPATHI, B.N.; MUNJAL, A.K.; BAUNTHIYAL, M.; SHARMA, V. Metal toxicity and Photosynthesis. *In:* ITOH, S.; MOHANTY, P.; GURUPRASAD, K.N. (Ed.). **Photosynthesis: Overviews on Recent Progress &**

Future Perspective, 1st edn. New Delhi: IK International Publishing House, p 229-236, 2011.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. 5 ed. Garland Publishing, New York2008

ALLOWAY, B.J. Cadmium. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons Inc., p 100-124, 1990.

AMARANTE, C.V.T.; BISOGNIN, D.A.; STEFFENS, C.A.; ZANARDI, O.Z.; ALVES, E.O. Quantificação não destrutiva de clorofilas em folhas através de método colorimétrico. **Horticultura Brasileira**, v. 26, p. 471-45, 2008. DOI:10.1590/S0102-05362008000400009

AMATO-LOURENCO, L.F.; LOBO, D.J.; GUIMARÃES, E.T.; MOREIRA, T.C.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; SAIKI, M.; SALDIVA, P.H.; MAUAD, T. Biomonitoring of genotoxic effects and elemental accumulation derived from air pollution in community urban gardens. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 1438-1444, 2017. DOI:10.1016/j.scitotenv.2016.09.221

ANA - Agência Nacional de Águas. **Bases de Dados Georreferenciadas; Ottobacias**, 2017. Disponível em: http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/solicitacaoBaseDados.asp Acesso em: 21 jun. 2017.

ANDRADE, L.F.; DAVIDE, L.C.; GEDRAITE, L.S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626-631, 2010. DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.12.012

ANTHONY, R.G.; HUSSEY, P.J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends in Plant Sciences**, v. 4, n. 3, p. 112-116, 1999. DOI:10.1016/S1360-1385(99)01378-3

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-99, 2004. DOI:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701

ARAGÃO, F.B.; PALMIERI, M.J.; FERREIRA, A.; COSTA, A.V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P.F.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAÚJO, S.A.C.; DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 7, n. 4, 463-472, 2009.

BAGUR-GONZÁLEZ, M.G.; ESTEPA-MOLINA, C.; MARTÍN-PEINADO, F.; MORALES-RUANO, S. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid)s As, Cu, Mn, Pb and Zn in soluble-in-water saturated soil extracts from an abandoned mining site. **Journal of Soils and Sediments**, v. 11, n. 2, p. 281-289, 2011. DOI:10.1007/s11368-010-0285-4

BASZYNSKI, T.; TUKENDORF, A.; RUSZKOWSKA, M.; SKORZYNSKA, E.; MAKSYMIEC, W. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non tolerant spinach exposed to excess copper. **Journal of Plant Physiology**, 1988, v. 132, n. 6, p. 708-713. DOI:10.1016/S0176-1617(88)80233-5

BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 850-859, 2011. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.07.002

BHATTACHARJEE, S. Sites of Generation and Physicochemical Basis of Formation of Reactive Oxygen Species in Plant Cell. In GUPTA, S.D. (Ed.). **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, Florida: Science Publishers / CRC Press, p 1-30, 2010.

BAKER, A.J.M. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, v. 3, n. 1-4, p. 643-654, 2008. DOI:10.1080/01904168109362867

BATISTA, N.J.; DE CARVALHO MELO CAVALCANTE, A.A.; DE OLIVEIRA, M.G.; MEDEIROS, E.C.; MACHADO, J.L.; EVANGELISTA, S.R.; DIAS, J.F.; DOS SANTOS, C.E.; DUARTE, A.; DA SILVA, F.R.; DA SILVA, J. Genotoxic and mutagenic evaluation of water samples from a river under the influence of different anthropogenic activities. **Chemosphere**, v. 164, p. 134-141, 2016. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.08.091

BOLLMANN, H.A.; MARQUES, D.M.L.M. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 11, n. 4, p. 343-352, 2006. DOI:10.1590/S1413-41522006000400007

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical**

Biochemistry,v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3

CAMPOS, J.M.S.; DAVIDE, L.C.; SOARES, G.L.G.; VICCINI, L.F. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**, v. 22, n. 1, p. 143-152, 2008

CAMPOS, J.M.S.; VICCINI, L.F. Cytotoxicity of aluminium on meristematic cells of *Zea mays* and *Allium cepa*. **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 65-73, 2003DOI:10.1080/00087114.2003.10589309

CARVALHO, D.F.; CRUE, E.S.; PINTO, M.F.; SIDA, L.D.B.; GUERRA, J.G.M. Características da chuva e perdas por erosão sob diferentes práticas de manejo de solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 1, p.3-9, 2009.

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.K.; MURTHY, R.C.; SAXENA, P.N.; PANDE, P.N.; GUPTA, S.K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Science of The Total Environment**, v. 347, n. 1-3, p. 46-52, 2005. DOI:10.1016/j.scitotenv.2005.01.002

CHUGHA, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 297-303, 1999. DOI:10.1016/S0981-9428(99)80028-X

DABROWSKA, G.; KATA, A.; GOC, A.; SZECHYNSKA-HEBDA, M.; SKRZYPEK, E. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. **ACTA BIOLOGICA CRACOVIENSIA Series Botanica**, v. 49, n. 1, p. 7-17, 2007.

DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; COELHO, E.J.R.; DIAS, M.C.; MATSUMOTO, S.T. Cytogenetic responses of *Allium cepa* L. after exposure to contaminated pond waters. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2017.

DUBEY, R.S. Metal Toxicity, Oxidative Stress and Antioxidative Defense System in Plants. In GUPTA, S.D. (Ed.). **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, Florida: Science Publishers / CRC Press, p. 177-203, 2010.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000. DOI:10.1016/S0027-5107(00)00065-8

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures.

Mutation Research, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003. DOI:10.1016/S1383-5718(02)00249-8

FERRARI, B.; RADETSKI, C.M.; VEBER, A.M.; FERARD, J.F. Ecotoxicological assessment of solid waste: a combined liquid and solid phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 1195-1202, 1999. DOI:10.1002/etc.5620180618

FERNANDES, T.C.; MAZZEO, D.E.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1680-1686, 2009. DOI:10.1016/j.ecoenv.2009.03.014

FERRAT, L.; PERGENT-MARTINI, C.; ROMÉO, M. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. **Aquatic Toxicology**, v. 65, n. 2, p. 187-204, 2003. DOI:10.1016/S0166-445X(03)00133-4

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. DOI:10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, n. 2, p. 139-149, 1993.

FISKESJÖ, G. Allium test for screening chemicals, evaluation of cytological parameters. *In:* WANG, W.; GORSUCH, J.W.; HUGHES, J.S. (Ed.). **Plants for Environmental Studies**, London: CRC Press LLC, p. 307–333, 1997.

FREITAS, A.S.; FONTES CUNHA, I.M.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; TECHIO, V.H. () Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426-434, 2016. DOI:10.1016/j.ecoenv.2015.11.017

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDOZA, G.; GAVILÁN, J.F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in Schroederichthys chilensis (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, v. 61, n. 2, p. 192-199, 2005. DOI:10.1016/j.chemosphere.2005.02.062

FURLANI, P.R.; SILVEIRA, L.C.P.; BOLONHEZI, D.; FAQUIN, V. **Cultivo Hidropônico de Plantas: Parte 3 - Produção de mudas para hidroponia**, 2009.

Disponível em: http://www.infobibos.com/artigos/2009_2/hidroponiap3/index.htm Acesso em: 27 ago. 2017.

GARCIA, J.C.; SIMIONATO, J.I.; ALMEIDA, V.C.; PALÁCIO, S.M.; ROSSI, F.L.; SCHNEIDER, M.V.; SOUZA, N.E. Evolutive Follow-up of the photocatalytic degradation of real textile effluents in TiO_2 and TiO_2/H_2O_2 systems and their toxic effects on *Lactuca sativa* seedlings. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1589-1597, 2009. DOI:10.1590/S0103-50532009000900005

GATTO, L.C.S.; RAMOS, V.L.S.; NUNES, B.T.A.; MAMEDE, L.; GÓES, M.H.; MAURO, C.A.; ALVARENGA, S.M.; FRANCO, E.M.S.; QUIRICO, A.F.; NEVES, L.B. **Geomorfologia.** Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

GERAS'KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1133-1146, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.01.008

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977. DOI: 10.1104/pp.59.2.309

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010. DOI:10.1016/j.plaphy.2010.08.016

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996. DOI:10.1016/0269-7491(95)00090-9

GIORGETTI, L.; TALOUIZTE, H.; MERZOUKI, M.; CALTAVUTURO, L.; GERI, C.; FRASSINETTI, S. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 8, p. 2275-2283, 2011. DOI:10.1016/j.ecoenv.2011.08.002

GLIŃSKA, S.; BARTCZAK, M.; OLEKSIAK, S.; WOLSKA, A.; GABARA, B.; POSMYK, M.; JANAS, K. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of Allium cepa L. roots treated with heavy metals.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 68, n. 3, p. 343-350, 2007. DOI:10.1016/j.ecoenv.2007.02.004

GOPALAN, H.N. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, n. 2, p. 99-102, 1999. DOI:10.1016/S0027-5107(99)00048-2

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982. DOI:10.1016/0165-1110(82)90046-X

GRIPPA, G.A.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 77, n. 1, p. 3-9, 2012. DOI:10.1508/cytologia.77.3

GUIMARÃES, C.F. Simulação hidrológica e hidrossedimentológica em uma bacia com reservatórios com o modelo soil and water assessment tool (SWAT). **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2016. 114p.

HAGHIGHI, M.; KAFI, M.; FANG, P.; GUI-XIAO, L. Humic acid decreased hazardous of cadmium toxicity on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Vegetable Crops Research Bulletin**, v. 72, p. 49-61, 2010. DOI:10.2478/v10032-010-0005-z

HALL, J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n.366, p. 1-11, 2002. DOI:10.1093/jexbot/53.366.1

HAN, C.; LIU, Q.; YANG, Y. Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 58, n. 2, p. 153-162, 2009. DOI:10.1007/s10725-009-9363-2

HEMACHANDRA, C.K.; PATHIRATNE, A. Cytogenotoxicity screening of source water, wastewater and treated water of drinking water treatment plants using two in vivo test systems: *Allium cepa* root based and Nile tilapia erythrocyte based tests. **Water Research**, v. 108, p. 320-329, 2017. DOI:10.1016/j.watres.2016.11.009

HARASHIMA, H.; SCHNITTGER, A. The integration of cell division, growth and differentiation. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 1, p. 66-74, 2010. DOI:10.1016/j.pbi.2009.11.001

HASHEM, H.A.; HASSANEIN, R.A.; EL-DEEP, M.H.; SHOUMAN, A.I. Irrigation with industrial wastewater activates antioxidant system and osmoprotectant accumulation in lettuce, turnip and tomato plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 95, p. 144-152, 2013. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.05.030

HONG, J.; RICO, C.M.; ZHAO, L.; ADELEYE, A.S.; KELLER, A.A.; PERALTA-VIDEA, J.R.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 1, p. 177-185, 2015. DOI:10.1039/c4em00551a

HU, A.; AMBREEN, S.; JAVED, M.; HINA, M.; RASUL, S.; ZAFAR, ZU.; MANZOOR, H.; OGBAGA, C.C.; AFZAL, M.; AL-QURAINY, F.; ASHRAF, M. Influence of sub-lethal crude oil concentration on growth, water relations and photosynthetic capacity of maize (Zea mays L.) plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 18, p. 18320-18331, 2016. DOI:10.1007/s11356-016-6976-7

HU, Y.; WU, J.; LUO, P.; MO, Y. Purification and partial characterization of peroxidase from lettuce stems. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2752-2756, 2012. DOI:10.5897/AJB11.3430

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual técnico de pedologia**. 3 ed. Manuais técnicos em geociências, Coordenação de Recursos Naturais e Estudos Ambientais, Rio de Janeiro, 2015.

IBRAHIM, MAR.; SROUR, H.A.M. Effect of solar UV radiation on antioxidant enzymes and phenols biosynthesis in lettuce (*Lactuca sativa*). **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 101-108, 2015.

JIAO, W.; CHEN, W.; CHANG, A.C.; PAGE, A.L. Environmental risks of trace elements associated with long-term phosphate fertilizers applications: a review. **Environmental Pollution**, v. 168, p. 44-53, 2012. DOI:10.1016/j.envpol.2012.03.052

JUCHIMIUK, J.; MALUSZYNSKA, J. Transformed roots of *Crepis capillaris* - a [corrected] sensitive system for the evaluation of the clastogenicity of abiotic agents. **Mutation Research**, v. 565, n. 2, p. 129-38, 2005. DOI:10.1016/j.mrgentox.2004.10.016

KLÁSTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A.T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromossome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, v. 83, n. 2, p. 153-62, 1976. DOI:10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x

KÖKSAL, E.; GÜLÇIN, I. Purification and characterization of peroxidase from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) buds. **Protein & Peptide Letters**, v. 15, n. 4, p. 320-326, 2008. DOI:10.2174/092986608784246506

KRUPA, Z.; MONIAK, M. The stage of leaf maturity implicates the response of the photosynthetic apparatus to cadmium toxicity. **Plant Science**, v. 138, n. 2, p. 149-156, 1998. DOI:10.1016/S0168-9452(98)00159-9

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225-57, 2005. DOI:10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635

KUPPER, H.; SETLIK, I.; SETLIKOVA, E.; FERIMAZOVA, N.; SPILLER, M.; KUPPER, F.C. Copper – induced inhibition of photosynthesis: Limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*. **Functional Plant Biology**, v. 30, n. 12, p. 1187-1196, 2003. DOI:10.1071/FP03129

LAGRIMINI, L.M. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. **Plant Physiology**, v. 96, n. 2, p. 577-583, 1991. DOI:10.1104/pp.96.2.577

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 2, p. 182-186, 2003. DOI:10.1016/S0025-326X(02)00449-6

LAROCQUE, A.C.L.; RASMUSSEN, P.E. An overview of trace metals in the environment from mobilization to remediation. **Environmental Geology**, v. 33, n. 2-3, p. 85-91, 1998. DOI:10.1007/s002540050227

LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, 773-787, 2002. DOI:10.1093/jexbot/53.370.773

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008. DOI:10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

LESAGE, E.; ROUSSEAU, D.P.L.; MEERS, E.; TACK, F.M.G.; DE PAUW, N. Accumulation of metals in a horizontal subsurface flow constructed wetland treating domestic wastewater in Flanders, Belgium. **Science of The Total Environment**, v. 380, n. 1-3, p. 102-115, 2007. DOI:10.1016/j.scitotenv.2006.10.055

LOCATO, V.; DE PINTO, M.C.; PARADISO, A.; DE GARA, L. Reactive Oxygen Species and Ascorbate-Glutathione Interplay in Signaling and Stress Responses. In GUPTA, S.D. (Ed.). **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants**, Florida: Science Publishers / CRC Press, p 45-64, 2010.

MACDONALD, H.C.; LAROQUE, C.P.; FLEMING, D.E.B.; GHERASE, M.R. Dendroanalysis of metal pollution from the Sydney steel plant in Sydney, Nova Scotia. **Dendrochronologia**, v. 29, n. 1, p. 9-15, 2011. DOI:10.1016/j.dendro.2010.08.001

MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis** , v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MARCANO, L.; DEL-CAMPO, A. Studio ultrestructural del nucléolo em poblaciones meristemáticas de cebola *Allium ce*pa L. tratadas com inhibitores metabólicos. **Ciencia**, v. 3, p. 73-82, 1995.

MAHESHWARI, R.; DUBEY, R.S. Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 59, n. 1, p. 37-49, 2009. DOI:10.1007/s10725-009-9386-8

MARCANO, L.; BRACHO, M.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; ATENCIO, L. Efectomitóxico y genotoxico del cadmio em problaciones meristemáticas de *Allium cepa* L. (cebola). **Ciencia**, v. 6, p. 93-99, 1998.

MARTINS, F.C.O.; FERNANDES, V.O. Biomassa e composição elementar (C, N e P) da comunidade perifítica no alto Rio Santa Maria da Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2011. DOI:10.14210/bjast.v15n1.p11-18

MATSUMOTO, H. Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. **International Review of Cytology**, v. 200, p. 1-46, 2000. DOI:10.1016/S0074-7696(00)00001-2

MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, n. 2, p. 157-166, 1974. DOI:10.1007/BF00331803

MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura,** v. 30, p. 665-676, 1978.

MELO, L.C.A.; ALLEONI, L.R.F.; CARVALHO, G.; AZEVEDO, R.A. Cadmium- and barium-toxicity effects on growth and antioxidant capacity of soybean (Glycine max L.) plants, grown in two soil types with different physicochemical properties. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 174, n. 5, p. 847-859, 2011. DOI:10.1002/jpln.201000250

MIRANDA, C.L.P. Preservação de mananciais sob a ótica da sobrevivência: história e sustentabilidade a partir do Rio Santa Maria da Vitória/ES. **Dissertação de Mestrado em Arquitetura e Urbanismo**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2009. 177p.

MISHRA, S.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S. Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 248, n. 3, p. 565-577, 2011. DOI:10.1007/s00709-010-0210-0

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002. DOI:10.1016/S1360-1385(02)02312-9

MONTEIRO, M.; SANTOS, C.; MANN, R.M.; SOARES, A.M.V.M.; LOPES, T. Evaluation of cadmium genotoxicity in *Lactuca sativa* L. using nuclear microsatellites. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, n. 3, p. 421-427, 2007. DOI:10.1016/j.envexpbot.2006.12.018

MORAES, R.M.; SANTOS FILHO, P.R.; CARVALHO, M.; NOGUEIRA, M.L.; BARBOSA, S. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673-86, 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant & Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981. DOI:10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232

NIGRO, M.; FALLENI, A.; BARGA, I.D.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**, v. 77, n. 4, p. 339-347, 2006. DOI:10.1016/j.aquatox.2005.12.013

NZIGUHEBA, G.; SMOLDERS, E. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 1, p. 53-57, 2008. DOI:10.1016/j.scitotenv.2007.09.031

O'CONNOR, G.A.; ELLIOT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C.; SMITH JR, J.E. Sustainable land application: An overview. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 7-17, 2005.

O'NEILL, P. Arsenic. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons, p 83-89, 1990.

ODEIGAH, P.G.C.; NURUDEEN, O.; AMUND, O.O. Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. **Hereditas**, v. 126, n. 2, p. 161-167, 1997. DOI:10.1111/j.1601-5223.1997.00161.x

OECD - Organization For Economic Cooperation And Development **Guidelines For The Testing Of Chemicals.** Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 2006. DOI:10.1787/9789264070066-en

OLIVEIRA, V. DE.; COSTA, A.M.R. DA.; AZEVEDO, W.P. DE.; CAMARGO, M.N.; LARACH, J.O.L. **Pedologia.** Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

PARIDA, A.K.; DAS, A.B.; MOHANTY, P. Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes. **Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 5, p. 531-542, 2004. DOI:10.1078/0176-1617-01084

PÄTSIKKÄ, E.; KAIRAVUO, M.; SERSEN, F.; ARO, E.M.; TYYSTJARVI, E. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in vivo by outcompeting Iron and causing decrease in leaf Chlorophyll. **Plant Physiology**, v. 129, n. 3, p. 1359-1367, 2002. DOI:10.1104/pp.004788

PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Impact of Heavy Metals on Photosynthesis. *In*: PRASAD, M.N.V; HAGEMEYER, J. (Ed.). **Heavy Metal Stress in Plant**. Berlin: Springer Publishers, p. 117-138, 1999.

PRASAD, M.N.V. **Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 2013.

PEJCHAR, P.; PLESKOT, R.; SCHWARZEROVÁ, K.; MARTINEC, J.; VALENTOVÁ, O.; NOVOTNÁ, Z. Aluminum ions inhibit phspholipase D in a microtubule-dependent manner. **Cell Biology International**, v. 32, n. 5, p. 554-556, 2008. DOI:10.1016/j.cellbi.2007.11.008

PEREIRA, M.P.; PEREIRA, F.J.; RODRIGUES, L.C.A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 1, p. 36-46, 2013. DOI:10.18227/1982-8470ragro.v7i1.895

QIN, R.; WANG, C.; CHEN, D.; BJÖRN, L.O.; LI, S. Copper-induced root growth inhibition of *Allium cepa* var. agrogarum L. involves disturbances in cell division and DNA damage. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34, n. 5, p. 1045-1055, 2015. DOI:10.1002/etc.2884

RAJESHWARI, A.; KAVITHA, S.; ALEX, S.A.; KUMAR, D.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on *Allium cepa* root tip-effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 11057–11066, 2015. DOI:10.1007/s11356-015-4355-4

RODRIGUES, L.C.A.; BARBOSA, S.; PAZIN, M.; MASELLI, B.S.; BEIJO, L.A.; KUMMROW, F. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa.* **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 10, p. 1099–1108, 2013. DOI:10.1590/S1415-43662013001000012

SACRISTÁN, D.; RECATALÁ, L.; VISCARRA ROSSEL, R.A. Toxicity and bioaccumulation of Cu in an accumulator crop (*Lactuca sativa* L.) in different Australian agricultural soils. **Scientia Horticulturae**, v. 193, p. 346-352, 2015. DOI:10.1016/j.scienta.2015.06.051

SAI KACHOUT, S.; BEN MANSOURA, A.; LECLERC, J.C.; MECHERGUI, R.; REJEB, M.N.; OUERGUI, Z. Effects of heavy metals on antioxidant activities of *Atriplex hortensis* and *A. rosea*. **Food, Agriculture and Environment**, v. 7, n. 3-4, p. 938-945, 2009.

SALLES, F.J.; DE TOLEDO, M.C.B.; CÉSAR, A.C.G.; FERREIRA, G.M.; BARBÉRIO, A. Cytotoxic and genotoxic assessment of surface water from São Paulo State, Brazil, during the rainy and dry seasons. **Ecotoxicology**, v. 25, n. 4, p. 633-645, 2016. DOI:10.1007/s10646-016-1622-1

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1-26, 2012. DOI:10.1155/2012/217037

SHISHKOVA, S.; ROST, T.L.; DUBROVSKY, J.G. Determinate root growth and meristem maintenance in Angiosperms. **Annals of Botany**, v. 101, n. 3, p. 319-340, 2008. DOI:10.1093/aob/mcm251

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z.; SAMUELSSON, G.; OQUIST, G.; GARDESTRO, P. Primary carbon metabolism in Phaseolus vulgaris plants under Cd/Fe interaction. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 951–957, 1997.

SILVA, P.; MATOS, M. Assessment of the impact of Aluminum on germination, early growth and free proline content in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 131, p. 151-156, 2016. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.05.014

SRIVASTAVA, S.; DUBEY, R.S. Manganese-excess induces oxidative stress, lowers the pool of antioxidants and elevates activities of key antioxidative enzymes in rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 64, n. 1, p. 1-16, 2011. DOI:10.1007/s10725-010-9526-1

SIMEONI, L.A.; BARBARICK, K.A.; SABEY, B.R. Effect of Small-Scale Composting of Sewage Sludge on Heavy Metal Availability to Plants. **Journal of Environmental Quality**, v. 13, n. 2, p. 264-268, 1984. DOI:10.2134/jeq1984.00472425001300020018x

SIVAGURU, M.; HORST, W.J. The Distal Part of the Transition Zone Is the Most Aluminum-Sensitive Apical Root Zone of Maize. **Plant Physiology**, v. 116, p. 155-163, 1998. DOI:10.1104/pp.116.1.155

TEKLIĆ, T.; ENGLER, M.; CESAR, V.; LEPEDUŠ, H.; PARAĐIKOVIĆ, N.; LONČARIĆ, Z.; ŠTOLFA, I.; MAROTTI, T.; MIKAC, N.; ŽARKOVIĆ, N. Influence of excess copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in soil and nutrient solution. **Food, Agriculture and Environment**, v. 6, n. 3-4, p. 439-444, 2008.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines.** OPPTS 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test, EPA 712-C-96-154, 2012.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines**. OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test, EPA 712-C-010, 2012.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Ecological Effects Test Guidelines**. OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth, EPA 712-C-012, 2012.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004. DOI:10.1016/j.phytochem.2003.10.022

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 645-655, 2003. DOI:10.1016/S0168-9452(03)00022-0

VESTENA, R.L. Análise da relação entre a dinâmica de áreas saturadas e o transporte de sedimentos em uma bacia hidrográfica por meio de monitoramento e modelagem. **Tese de Doutorado em Engenharia Ambiental**, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, 2008. 303p.

VIEIRA, V.S.; MENEZES, R.G. **Geologia e Recursos Minerais do Estado do Espírito Santo: texto explicativo do mapa geológico e de recursos minerais.** Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais-CPRM/Serviço Geológico do Brasil, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: http://www.cprm.gov.br/publique/media/rel_espirito_santo.pdf Acesso em: 12 out. 2017.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, 7 ed. New York: Cambridge University Press, 2010.

YANG, Y.; WEI, X.; LU, J.; YOU, J.; WANG, W.; SHI, R. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1982-1987, 2010. DOI:10.1016/j.ecoenv.2010.08.041

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 13, p. 1243-1252, 2012. DOI:10.1016/j.jplph.2012.04.016

ZORRIG, W.; ROUACHED, A.; SHAHZAD, Z.; ABDELLY, C.; DAVIDIAN, J.C.; BERTHOMIEU, P. Identification of Three Relationships Linking Cadmium

Accumulation to Cadmium Tolerance and Zinc and Citrate Accumulation in Lettuce. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 15, p. 1239-1247, 2010. DOI:10.1016/j.jplph.2010.04.012

CAPITULO 3 – TOXICOGENÉTICA DE AMOSTRAS DE SEDIMENTO E ELUTRIATO DO SEDIMENTO DO RIO SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL) EM *Allium cepa* L.

Autores: Ian Drumond Duarte[1] • Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro[2] • Silvia Tamie Matsumoto[1*]

(1) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Ciências Biológicas, CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil

(2) Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Química, CEP 29075-910, Vitoria, ES, Brasil.

*Autor para correspondência: siltamie@gmail.com

Periódico a ser submetido: *Journal of Soils and Sediments.*

RESUMO

Na avaliação dos ecossistemas aquáticos é importante analisar o sedimento, uma vez que este pode concentrar e atuar como fonte de contaminantes à coluna d'água. O Rio Santa Maria da Vitória (SMV) localiza-se no Estado do Espírito Santo (Brasil) e apresenta importância ecológica e socioeconômica, mas sofre diversos impactos antrópicos. Assim, este trabalho objetivou avaliar a concentração de metais no sedimento e elutriato do sedimento do Rio SMV, bem como analisar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos pelo teste do *Allium cepa*. Para tanto, a partir de três estações amostrais, foram coletados sedimentos e elaborado os elutriatos do sedimento. A partir destes foram realizados a quantificação elementar das amostras bem como o teste do *A. cepa*, expondo sementes às amostras de sedimento e bulbos às amostras de elutriato. A partir das células meristemáticas radiculares dos espécimes, foram avaliados os índices mitótico, de aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleo. Sendo este também avaliado nas células diferenciadas F1. A quantificação de metais indicou a presença de Al, Ba, Cr, Cu, Mn e Zn nas amostras, sendo Al o metal de maiores concentrações, chegando a 115,300 ± 9,904 $mg.g^{-1}$ no sedimento e 52596,810 ± 699,538 $\mu g.L^{-1}$ no elutriato do sedimento da estação amostral mais à jusante (EA3). Esta, encontra-se em região de sedimentação o que resulta na maior retenção de contaminantes. Assim, a contaminação por metais observada no Rio SMV parece relacionar-se aos aspectos geomorfológicos e pedológicos, bem como ao uso e ocupação da bacia hidrográfica. Além disso, observa-se possível relação entre as concentrações de metais e matéria orgânica dos sedimentos. Os metais quantificados nas amostras de elutriato do sedimento apresentam correlação direta àqueles quantificados no sedimento, evidenciando a atuação do sedimento como fonte de contaminantes. As amostras de sedimento e elutriato do sedimento apresentaram potenciais citotóxicos e genotóxicos, principalmente em EA3. Entre as aberrações cromossômicas observadas, destacam-se C-metafase e aderência cromossômica. A primeira decorre da inativação completa do fuso mitótico celular que interrompe a divisão celular e a segunda envolve tanto a porção proteica da cromatina quanto o DNA, resultando em dobras indevidas da fibra cromossômica. Ressalta-se que os danos observados em *A. cepa* também podem decorrer de

outros contaminantes, como agroquímicos e efluentes. Sendo assim, os resultados demonstram que as avaliações do sedimento e elutriato do sedimento por meio de variáveis abióticas e bioensaios são ferramentas importantes na avaliação dos ecossistemas aquáticos, bem como indicam que os compartimentos avaliados estão contaminados.

Palavras-chave: Citotoxicidade • genotoxicidade • geomorfologia • metais • sedimentação •

ABSTRACT

In aquatic ecosystems evaluation, it is important to analyze sediment, since it can concentrate and act as a source of contaminants to water column. Santa Maria da Vitória River (SMV) is located in the State of Espírito Santo (Brazil) and is ecologically and socioeconomically important, but it suffers from several anthropic impacts. Thus, this work aimed to evaluate metals concentrations on sediment and sediment elutriate from SMV River, as well as analyze cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials by the *Allium cepa* test. For that, from three sampling stations, sediments were collected and sediment elutriates were elaborated. From these, sample elemental quantification as well as *A. cepa* test exposing seeds to sediment and bulbs to the sediment elutriate samples were performed. From specimens meristematic root cells, the indexes of mitotic, chromosomal aberration and micronucleus frequency were evaluate. Being this also evaluated in F1 differentiated cells. Metals quantifications indicated Al, Ba, Cr, Cu, Mn and Zn in samples, with Al being the higher concentration metal, reaching 115,300 ± 9,904 $mg.g^{-1}$ in sediment and 52596,810 ± 699,538 $\mu g.L^{-1}$ in sediment elutriate on samples from downstream sampling station (EA3). This, is in sedimentation region which results in greater contaminants retention. Thus, metals contamination observed in SMV River seems to be related to geomorphological and pedological aspects, as well as to river basin's use and occupation. In addition, it is observed a relation between sediment metals and organic matter concentrations. The quantified sediment elutriate's metals present a direct correlation to those quantified in sediment, evidencing sediment performance as a contaminants source. The sediment and sediment elutriate samples presented cytotoxic and genotoxic potentials, mainly in EA3. Among chromosomal aberrations observed, C-metaphase and chromosome adhesion stood out. The first occurs due to complete inactivation of cellular mitotic spindle that interrupts cell division and the second involves both protein portion of chromatin and DNA, resulting in improper chromosome fiber folding. It should be noted that damages observed in *A. cepa* can also result from other contaminants, such as agrochemicals and effluents. Therefore, results indicate that sediment and sediment elutriate analyzes using abiotic variables and bioassays are important tools in aquatic ecosystems

evaluation, as well as indicate that the compartments evaluated are contaminated.
Key words: Cytotoxicity • genotoxicity • geomorphology • metals • sedimentation •

1. INTRODUÇÃO

O processo de ocupação da América Latina afetou muitas áreas por meio do desenvolvimento industrial e utilização intensiva dos recursos naturais pela agricultura e pecuária, liberando diversos contaminantes no ambiente que atingem as águas superficiais via efluentes, escoamentos superficiais e deposições atmosféricas. Nessas, os contaminantes podem se acumular em diferentes compartimentos ou sofrer transformações resultando em compostos com maior ou menor biodisponibilidade (BIRUK et al., 2017).

Diversos estudos utilizam o sedimento na avaliação da qualidade ambiental devido à capacidade deste compartimento concentrar os contaminantes, agindo assim como fonte secundária de contaminantes para a coluna d'água e, consequentemente, para a biota (VARGAS et al., 2001; CHEN; WHITE, 2004; MIRELES et al., 2011; PELUSO et al., 2013; WETZEL et al., 2013). Como exemplo, destacam-se os estudos toxicogenéticos de amostras de sedimento da bacia do rio Matanza-Ricahuelo na Argentina (BIRUK et al., 2017) e a avaliação da ecotoxicidade em sedimentos de ambientes aquáticos lóticos sob a influência de refinaria de petróleo (SUARES-ROCHA et al., 2015).

Complementar aos ensaios em sedimento, os testes de toxicidade realizados em elutriatos de sedimentos possibilitam avaliar os contaminantes presentes no sedimentos que podem ser liberados na coluna d'água durante a ressuspensão do sedimento (US EPA, 1991; THOMPSON et al., 1999; MCDONALD, 2005). Neste sentido, destacam-se estudos realizador por Frassinetti e outros (2012) que avaliaram elutriatos marinhos a partir de diversos bioensaios, e por Freitas e outros (2017) que realizaram a avaliação citogenética de lagoas sob influência de extração de carvão na região sul do Estado de Santa Catarina (Brasil).

Dentre os contaminantes presentes nos compartimentos dos ecossistemas aquáticos, os metais podem causar alterações metabólicas na biota local, modificações nocivas no DNA bem como danos mutagênicos irreversíveis (LEONARD et al., 2004; ALIMBA et al., 2016). Segundo Durán e outros (2012), os metais tendem a se acumular nos sedimentos ligados à matéria orgânica, sulfetos e outras frações do sedimento. O risco de poluição por metais pode estar relacionado à remobilização dos mesmos do sedimento à coluna d'água e,

consequentemente, por meio da cadeia alimentar. A remobilização dos metais à coluna d'água pode ocorrer por variações das condições ambientais como temperatura, pH e conteúdo de matéria orgânica (CZERNIAWSKA-KUSZA; KUSZA, 2011), ou ainda por perturbações naturais como a hidrodinâmica e biopertubações nos corpos hídricos, bem como perturbações antropogênicas como operações de dragagem (PACIFICO et al., 2007).

Na região centro serrana do Estado do Espírito Santo (Brasil), situa-se a bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória, recurso hídrico de suma importância socioeconômica e ambiental. Em termos ecológicos, esta bacia abriga remanescentes de Mata Atlântica, além de atuar na hidrodinâmica do estuário da Baía de Vitória (GARONCE; QUARESMA, 2014). De acordo com Miranda (2009), o Rio Santa Maria da Vitória apresenta papel importante para a produção industrial e agropecuária da região, além de possibilitar a geração de energia elétrica e o abastecimento público da região. Apesar disso, este recurso hídrico sofre diversos impactos antrópicos como desmatamentos, assoreamento de suas margens, utilização indiscriminada de agroquímicos e lançamentos inadequados de efluentes em sua bacia hidrográfica (MARTINS; FERNANDES, 2011; GRIPPA et al., 2012).

Segundo Carvalho e outros (2011), monitorar quantitativamente e qualitativamente as substâncias tóxicas que são constantemente descarregadas no meio ambiente são tarefas demoradas. Todavia, considerando a poluição do meio aquático, diferentes estratégias científicas para detectar e prevenir o impacto de poluentes nos ecossistemas aquáticos estão disponíveis. Neste sentido, as análises físico-químicas fornecem informações sobre a natureza dos contaminantes e suas concentrações no meio ambiente, mas não podem prever a biodisponibilidade ou os potenciais efeitos destes sobre a biota (SERIANI et al., 2015). Por outro lado, abordagens ecotoxicológicas são úteis na avaliação da qualidade ambiental, refletindo as condições reais das interações sinérgicas ou antagônicas e seus efeitos sobre os organismos (AZEVEDO et al., 2013; FUZINATTO et al., 2013).

Com relação à essas abordagens, destacam-se os ensaios com plantas cujas características possibilitam o estabelecimento de modelos genéticos para avaliar contaminantes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Como modelo estabelecido, *Allium cepa* L. apresenta aplicação bastante difundida nos

estudos em ecossistemas aquáticos (DA COSTA et al., 2011; BIRUK et al., 2017; DUARTE et al., 2017a, b). O teste do *A. cepa* destaca-se pela sua simplicidade e alta sensibilidade na predição de efeitos tóxicos e mutagênicos induzidos quimicamente sobre os organismos, constituindo alternativa importante para o monitoramento e avaliação da contaminação ambiental (GRANT, 1982; FISKESJÖ, 1995; KHANNA; SHARMA, 2013).

Nesse contexto, considerando a contaminação dos recursos hídricos, o risco potencial para a conservação ecológica e a saúde da população, assim como a importância da avaliação do sedimento dos ecossistemas aquáticos, este estudo objetivou avaliar a qualidade do sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória. Para tanto, a partir destes compartimentos, foram quantificados os metais dissolvidos e realizado o teste do *A. cepa* para a investigação dos potencias citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Área de estudo e período de amostragem

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) apresenta área de drenagem de aproximadamente 1876 km^2 e extensão de 122 Km até a sua foz, na Baía de Vitória (ES, Brasil). O Rio SVM enquadra-se na classe 2 da resolução brasileira de nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA que estabelece os critérios para o enquadramento dos corpos de água superficiais, e segundo a Agência Nacional de Águas (ANA, 2017) sua bacia hidrográfica enquadra-se no nível 4 de dimensão.

Três estações amostrais georreferênciadas foram estabelecidas (GPS, Garmin Nüvi) para a avaliação do sedimento e elutriato do sedimento do Rio SMV: EA1 (20° 3.333'S / 40° 46.447'O), localizada à montante do centro do Município de Santa Maria de Jetibá; EA2 (20° 6.080'S / 40° 31.067'O), localizada à jusante de EA1 na região central do Município de Santa Leopoldina e EA3 (20° 10.283'S / 40° 23.656'O), estação mais à jusante, situada próxima à estação de captação da companhia de abastecimento da região, localizada no Município de Cariacica. Por meio do software SIG ArcMap 10.1 e dados vetoriais (*shapefille*) adquiridos nos sites do IBGE e GEOBASES, foi elaborado o mapa de hipsometria e localização da área de estudo, assim como o perfil de elevação da região (Figura 1).

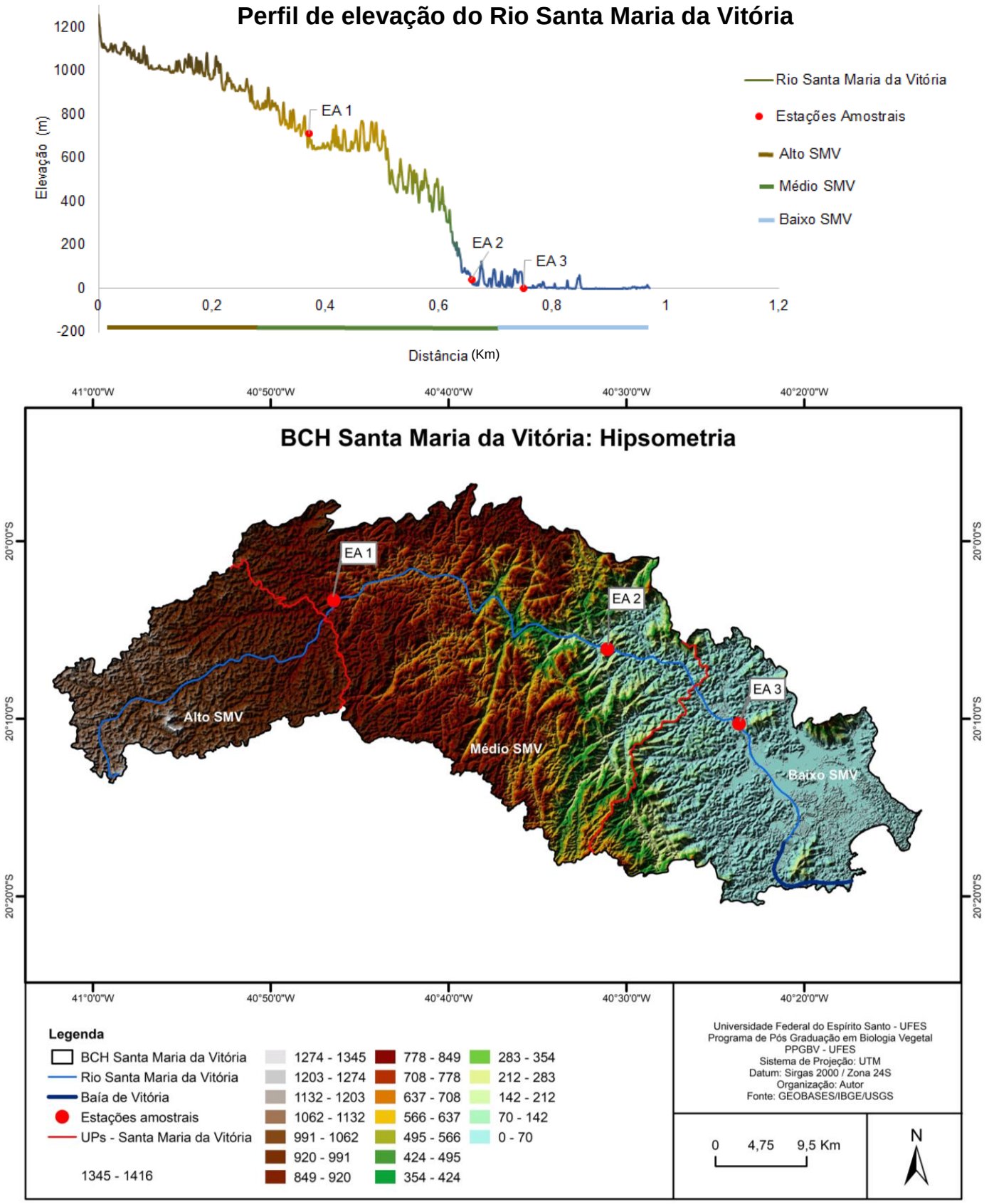

Figura 1: Perfil de elevação e Mapa hipsométrico da Bacia Hidrográfica (BCH) do Rio Santa Maria da Vitória (SMV) e suas Unidades de Planejamento (UPs), situando a sua bacia de nível 4 entre as bacias de nível 6 no Estado do Espírito Santo (Brasil). Em destaque, a localização das estações amostrais.

As amostragens foram realizadas no início de Abril/2015 e no início de Outubro/2015. Para tanto, amostras de sedimento foram coletadas a partir de draga Ekman ao longo da seção transversal de cada estação e então acondicionadas em embalagens plásticas previamente higienizadas. A partir das amostras de sedimento homogeneizadas, foi elaborado o elutriato do sedimento conforme a recomendação técnica ABNT NBR15469. As amostras de sedimento utilizadas na quantificação elementar foram acondicionadas em embalagens plásticas previamente higienizadas em solução ácida (H_3NO_2 10 % v/v), sendo o elutriato do sedimento acidificado com H_3NO_2 a 2 % (v/v). Em ambos os casos as amostras foram armazenadas sob refrigeração (-6 °C) até análise.

2.2. Quantificação elementar

Para a avaliação elementar do sedimento, as amostras foram quarteadas e secas a 60 ºC até massa constante. Posteriormente foram digeridas em meio ácido, em triplicata, utilizando aquecimento em sistema fechado por micro-ondas (Multiwave Go, Anton Paar), baseado no método U.S. EPA 3051A. A quantificação de Al ocorreu por Espectrometria de Absorção Atômica com chama (F AAS) em aparelho AAS ZEEnit 700 BU (Analytik Jena). Enquanto que para a quantificação de Ba, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa azul e avolumadas a 50 mL, seguindo de diluição (duas vezes) e então submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. Neste caso, os metais foram quantificados a partir de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) utilizando o equipamento Optima 7000 DV (Perkin Elmer).

Para a avaliação elementar do elutriato do sedimento, as amostras foram filtradas em papel filtro quantitativo faixa azul e então submetidas ao procedimento baseado no método U.S. EPA 200.8. Desse modo, os metais Al, Ba, Mn e Zn foram quantificados a partir de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) utilizando o equipamento Optima 7000 DV (Perkin Elmer). Enquanto os metais Cr, Cu e Ni foram quantificados por meio de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP MS) em aparelho Nexlon 300 D (Perkin Elmer).

2.3. Teste do Allium cepa

O ensaio do *A. cepa,* seguindo o protocolo de Fiskesjö (1994), com o sedimento foi realizado a partir de sementes da variedade Baia Periforme onde 50 sementes foram dispostas em placa de Petri contendo amostras de sedimento bruto das estações amostrais. A fim de se estabelecer condições similares de germinação, os controles foram realizados com vermiculita expandida, tendo o controle negativo recebido 5 mL de água deionizada e o positivo, 5 mL de solução de Trifluralina (0,84 $g.L^{-1}$). O experimento foi realizado em triplicata, a partir de tratamento descontínuo, ou seja, com as sementes pré-enraizadas por 96 horas e expostas aos tratamentos por 72 horas.

Para o ensaio com o elutriato do sedimento, sete bulbos de *A. cepa* previamente selecionados e com catafilos externos e raízes retirados, foram lavados e então expostos em tubos de ensaio contendo 15 mL de amostras do elutriato do sedimento das estações amostrais. O controle negativo foi realizado com o mesmo volume de água deionizada e o controle positivo com solução de Metil-metanosulfonato - MMS (4×10^{-4} mM). Após cinco dias de exposição, período cujo crescimento radicular alcançou aproximadamente 2 cm, cinco bulbos foram selecionados para a retirada das raízes.

Em ambos os casos, as raízes foram lavadas e fixadas em solução Carnoy (3 etanol: 1 ácido acético v/v) para armazenamento. Para a confecção das lâminas, as raízes passaram pela coloração de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978), onde os meristemas foram submetidos à hidrólise em HCl 1M (60 °C) por 7 minutos seguida de imersão em reativo de Schiff na ausência de luz e método do esmagamento. Foram analisadas cinco mil células meristemáticas por tratamento em microscópio de luz Nikon E200, sendo as fases do ciclo celular e alterações observadas nos cromossomos registradas e utilizadas para os cálculos de índice mitótico (IM), taxa de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) (LEME; MARIN-MORALES, 2008).

O potencial citotóxico, mensurado por IM, foi avaliado pela razão do número total de células em divisão pelo número total de células analisadas. O potencial genotóxico, mensurado por AC, foi avaliado pelo número de células com alterações nos diferentes estágios da divisão celular pelo total de células avaliadas. Considerando neste caso, alterações como a presença de ponte cromossômica, quebra cromossômica, C-metáfase, anáfase multipolar, atraso

cromossômico, aderência cromossômica, perda cromossômica, núcleo fragmentado e broto nuclear. E por meio do MN, foi avaliado o potencial mutagênico a partir da frequência de células meristemáticas contendo o micronúcleo (Figura 2). Além das células meristemáticas, também foi avaliado o potencial mutagênico observado nas células diferenciadas F1 (F1-MN).

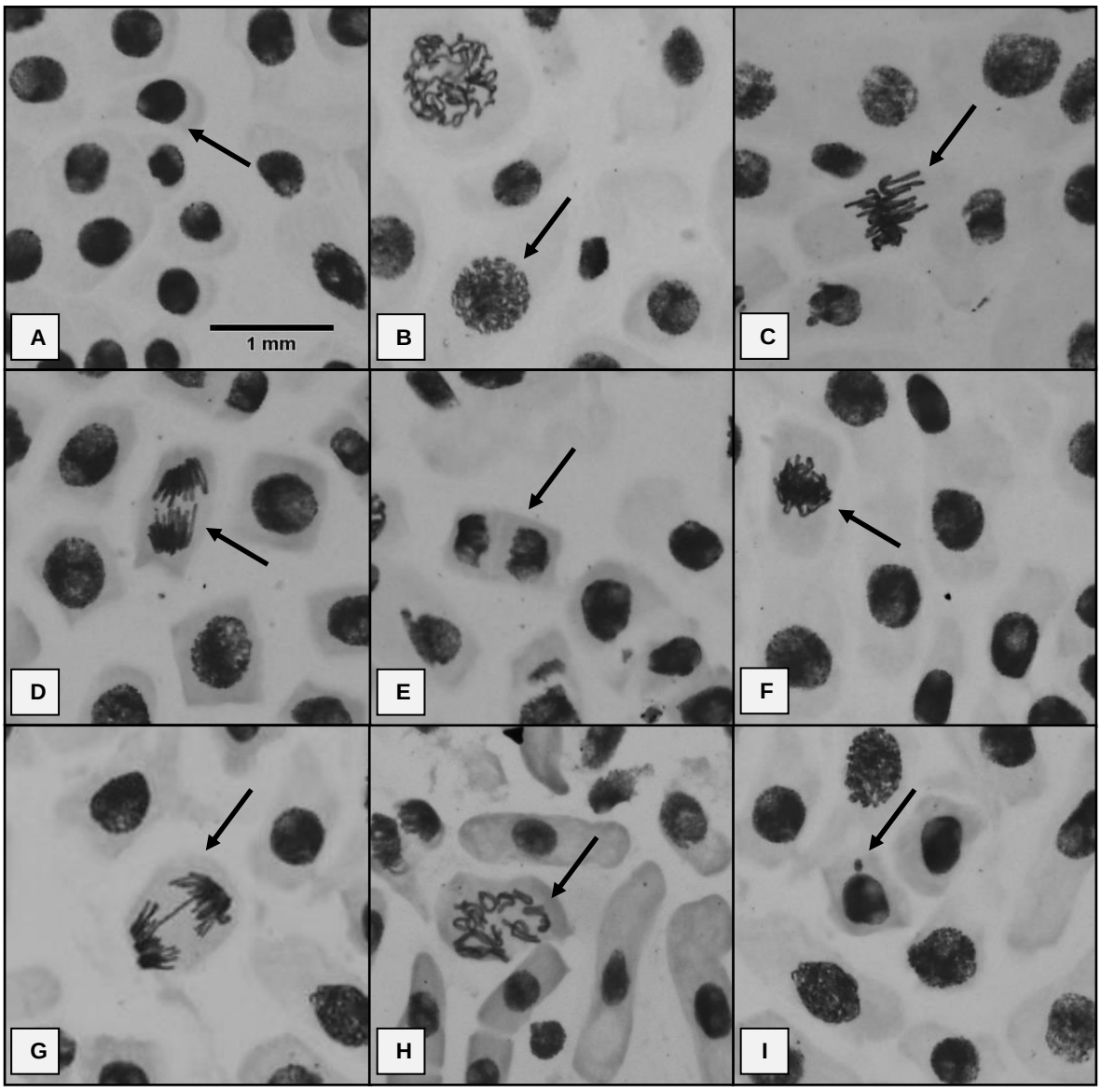

Figura 2: Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*. (A) Intérfase normal; (B) Prófase normal; (C) Metáfase normal; (D) Anáfase normal; (E) Telófase normal; (F) Aderência cromossômica; (G) Ponte cromossômica anafásica; (H) C-metáfase; (I) Intérfase com micronúcleo.

2.4. Análises estatísticas

Os dados foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Os dados de metais não seguiram a distribuição

normal, sendo assim foram analisados pelo teste de Kruskal Wallis (*P <0,05*) e expressos em média ± desvio padrão. Os índices IM, AC, MN e F1-MN seguiram a distribuição normal e foram avaliados por ANOVA seguido pelo teste de Tukey (*P <0,05*), sendo expressos em média ± erro padrão. Nesse caso foi utilizado o programa InfoStat (Versão para estudantes). Além disso, foi determinado o coeficiente de correlação de Pearson entre metais quantificados no sedimento e no elutriato do sedimento para avaliar correlações significativas (*P <0,05*; *P <0,01*), bem como foi realizada a análise de componentes principais (PCA) pelo programa Minitab® (Versão para estudantes).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Metais

As quantificações de metais nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento indicaram a presença dos metais Al, Ba, Cr, Cu, Mn, Ni e Zn nas duas amostragens realizadas. Com relação às amostras de sedimento (Tabela 1), em ambas as amostragens foram quantificadas concentrações elevadas de Al, Ba, Cr, Cu, Mn e Zn na estação mais à jusante (EA3). Assim, destacam-se as concentrações de Al (115,300 ± 9,904) e Mn (558,790 ± 28,442) de EA3 em relação à EA1 (Al - 31,560 ± 1,048, Mn - 50,250 ± 0,387) na primeira amostragem, bem como as concentrações de Cr (85,590 ± 7,618) e Cu (28,960 ± 0,191) de EA3 em relação à EA1 (Cr - 18,410 ± 0,340, Cu - 5,790 ± 0,129) na segunda amostragem.

Tendo em vista o estudo realizado por McDonald e outros (2000) que apresenta diretrizes consensuais para a qualidade de sedimento de ecossistemas de água doce, as concentrações de Cr em EA3 apresentaram-se acima do nível denominado *threshold effect level* que representa a concentração abaixo da qual os efeitos tóxicos em organismos aquáticos raramente ocorrerão. Por outro lado, as concentração de Mn foram cinco vezes superiores ao indicado pelo nível denominado *severe effect level* que representa a concentração acima da qual os efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos são severos.

Tabela 1: Metais quantificados nas amostras de sedimento do Rio Santa Maria da Vitória nas duas amostragens.

	Primeira amostragem			Segunda amostragem					MacDonald *et al.* 2000		
	EA1	EA2	EA3	EA1	EA2	EA3	LD	LQ	TEL[1]	PEL[2]	SEL[3]
Al (mg.g^{-1})	31,560 ± 1,048^{A}	50,380 ± 3,164^{AB}	115,300 ± 9,904^{B}	39,380 ± 2,319^{AB}	31,930 ± 2,449^{A}	93,080 ± 7,065^{B}	-	-	-	-	-
Ba (µg.g^{-1})	26,690 ± 1,262^{A}	117,330 ± 6,078^{AB}	217,440 ± 2,457^{B}	33,440 ± 2,478^{A}	68,290 ± 3,735^{AB}	203,030 ± 11,085^{B}	0,08	0,26	-	-	-
Cr (µg.g^{-1})	24,750 ± 0,574^{A}	49,220 ± 1,723^{AB}	77,820 ± 1,642^{B}	18,410 ± 0,340^{A}	21,900 ± 0,326^{AB}	85,590 ± 7,618^{B}	0,08	0,26	37,3	90,0	110,0
Cu (µg.g^{-1})	4,730 ± 0,044^{A}	12,820 ± 0,528^{AB}	28,690 ± 0,519^{B}	5,790 ± 0,129^{A}	7,590 ± 0,122^{AB}	28,960 ± 0,191^{B}	0,16	0,53	35,7	197,0	110,0
Mn (µg.g^{-1})	50,250 ± 0,387^{A}	156,210 ± 15,090^{AB}	558,790 ± 28,442^{B}	81,430 ± 2,565^{A}	99,990 ± 2,080^{AB}	570,550 ± 15,462^{B}	0,16	0,53	-	-	100,0
Ni (µg.g^{-1})	2,170 ± 0,180	<LD	20,260 ± 0,051	<LQ	3,790 ± 0,109	24,020 ± 0,699	0,40	1,32	18,0	36,0	75,0
Zn (µg.g^{-1})	8,420 ± 0,056^{A}	40,330 ± 2,900^{AB}	73,590 ± 2,899^{B}	6,980 ± 0,057^{A}	13,280 ± 0,219^{AB}	78,460 ± 1,428^{B}	0,16	0,53	123,0	315,0	820,0

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$). LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. [1] *threshold effect level,* [2] *probable effect level,* [3] *severe effect level*.

Assim como observado nas amostras de sedimento, a quantificação dos metais nas amostras de elutriato do sedimento de EA3 apresentou níveis elevados de Al, Ba, Cr, Cu, Mn e Zn em relação à EA1, na primeira amostragem, e em relação à EA2 na segunda amostragem (Tabela 2). Considerando a legislação brasileira CONAMA 357 como parâmetro de comparação pelo fato de o elutriato do sedimento ser fração aquosa do ecossistema aquático, observa-se que grande parte dos metais quantificados apresentaram níveis acima dos limites estabelecidos por esta legislação. Assim, destaca-se as elevadas concentrações de Al (52596,810 ± 699,538), Cr (150,817 ± 0,905), Cu (110,000 ± 3,520) e Mn (4250,600 ± 182,351) de EA3 na primeira amostragem que foram superiores ao estabelecido pela legislação. Além destes, Zn também apresentou concentração acima do preconizado pela legislação em EA3 (203,880 ± 0,917) na primeira amostragem.

Segundo Rambo e outros (2017), as condições de ecossistemas aquáticos como os rios são suscetíveis aos ambientes em seu entorno. Nesse aspecto, destaca-se que as atividades humanas ao longo dos corpos hídricos podem levar à descargas de vários contaminantes, como pesticidas, matéria orgânica e metais. Estes últimos, segundo o levantamento do *Millennium Ecosystem Assessment* (MEA, 2005), são considerados um dos contaminantes antropogênicos mais relevantes que ameaçam os ecossistemas de água doce.

O Al é o terceiro metal mais comum e abundante da Terra, após o oxigênio e o silício (ŠČANČAR et al., 2004; CAMARGO et al., 2009). Apesar de não apresentar função biológica estabelecida, o Al pode ser extremamente tóxico quando solubilizado sob condições ácidas (pH < 6) ou alcalinas (pH > 8) (WILSON, 2012). Dessa forma, segundo Correia e outros (2010), Al é nocivo para os ecossistemas aquáticos, provocando eventos de toxicidade com graves consequências ecológicas.

O Ba é relativamente comum no meio ambiente, perfazendo 0,04% da crosta terrestre. Sendo o composto mais comum a barita ou sulfato de bário (MENZIE et al., 2008). Segundo Donald (2017), os estudos com Ba demostram que este metal é relativamente não tóxico, tendo as diretrizes estabelecidas deste elemento para água potável variando de 700 a 2000 $\mu g.L^{-1}$ de tolerância.

Tabela 2: Metais quantificados no elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória nas duas amostragens.

	Primeira amostragem			Segunda amostragem					
	EA1	EA2	EA3	EA1	EA2	EA3	LD	LQ	CONAMA**
Al ($\mu g.L^{-1}$)	1059,090 ± 14,510^{A}	4051,190 ± 22,282^{AB}	52596,810 ± 699,538^{B}	3001,26 ± 19,508^{AB}	585,63 ± 3,619^{A}	31842,55 ± 363,005^{B}	0,700	2,340	100,000
Ba ($\mu g.L^{-1}$)	26,330 ± 0,137^{A}	66,700 ± 0,213^{AB}	524,550 ± 4,406^{B}	54,37 ± 0,207^{AB}	26,89 ± 0,304^{A}	367,58 ± 0,331^{B}	0,350	1,150	700,000
Cr ($\mu g.L^{-1}$)	2,891 ± 0,014^{A}	4,564 ± 0,023^{AB}	150,817 ± 0,905^{B}	4,944 ± 0,054^{AB}	2,164 ± 0,026^{A}	11,165 ± 0,033^{B}	0,134	0,448	50,000
Cu ($\mu g.L^{-1}$)	3,500 ± 0,063^{A}	21,400 ± 1,990^{AB}	110,000 ± 3,520^{B}	6,3 ± 0,851	<LD	66,400 ± 2,590	0,800	2,600	9,000
Mn ($\mu g.L^{-1}$)	45,220 ± 1,886^{A}	936,180 ± 7,583^{AB}	4250,600 ± 182,351^{B}	775,65 ± 17,685^{AB}	103,64 ± 7,244^{A}	2205,99 ± 74,121^{B}	7,240	24,140	100,000
Ni ($\mu g.L^{-1}$)	0,768 ± 0,002^{A}	1,928 ± 0,025^{AB}	22,857 ± 0,114^{B}	1,142 ± 0,010^{AB}	0,801 ± 0,017^{A}	20,034 ± 0,006^{B}	3,935*	13,117*	25,000
Zn ($\mu g.L^{-1}$)	<LD	21,250 ± 0,474	203,880 ± 0,917	4,5 ± 0,391	<LD	131,2 ± 0,485	0,570	1,900	180,000

Valores expressos em média ± desvio padrão. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0.05$) realizado entre as estações de cada campanha. LD - Limite de Detecção na amostra, LQ - Limite de Quantificação na amostra. *Concentração expressa em $ng.L^{-1}$. **CONAMA 357, limites para ambientes Classe 2.

Por outro lado, o Cr tem causado crescente preocupação quanto à saúde ambiental (WISE SR et al., 2009). Sendo o sexto metal mais abundante da Terra, Cr apresenta-se incorporado a minerais e possui baixa mobilidade e transporte durante processos de erosão, por exemplo. Devido à crescente contaminação antropogênica, a descarga global de Cr é superior à do chumbo, mercúrio e cádmio (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007). O Cr ocorre em estados de oxidação altamente variáveis, sendo os compostos de cromato trivalente (Cr^{3+}) e cromato hexavalente (Cr^{6+}) produtos químicos industriais amplamente utilizados e importantes contaminantes do solo e da água (AUGUSTYNOWICZ et al., 2013).

Considerado micronutriente essencial, necessário para diversos processos metabólicos, o Cu compreende menos que 0,1 $mg.Kg^{-1}$ da crosta terrestre (Flemming e Trevors 1988), podendo existir no estado oxidado denominado cíprico (Cu^{2+}) ou reduzido, denominado cuproso (Cu^{+}) (LINDER; HAZEGH-AZAM, 1996). Segundo Gaetke e Chow (2003), a exposição às elevadas concentrações de Cu é prejudicial, dentre outros fatores, devido ao aumento do dano oxidativo aos lipídios, proteínas e DNA, bem como à contribuição em distúrbios neurodegenerativos.

O Mn ocorre em todo mundo, sendo elemento essencial para plantas e animais (LASIER et al., 2000). Em águas superficiais, com pH acima de 7,0, as concentrações de Mn dissolvido normalmente são baixas devido às reações de equilíbrio que favorecem a conversão para as espécies Mn (IV) que é sequestrada em óxidos de Mn insolúveis (STONE; MORGAN, 1984). Por outro lado, segundo Stokes e outros (1988), o Mn (IV) é facilmente reduzido sob condições anaeróbicas para espécies solúveis, como o Mn (II) cuja toxidez é elevada para a biota aquática (KAISER, 2003).

O Zn é considerado elemento traço essencial, todavia em concentrações excessivas, Zn pode causar efeitos adversos à biota devido combinação com macromoléculas biológicas. Neste aspecto destacam-se efeitos como reduções de atividades enzimáticas, alterações da expressão gênica bem como da reprodução e do desenvolvimento (POYNTON et al., 2008; WU, 2012).

3.2. Toxicogenética em Allium cepa *L.*

A análise das células meristemáticas e células F1 dos espécimes de *A. cepa* expostos às amostras de sedimento do Rio SVM (Tabela 3, Figura 3) coletadas

na primeira amostragem, demonstrou que o IM das estações EA1 (0,315 ± 0,010) e EA2 (0,341 ± 0,010) apresentam-se superior em relação ao controle negativo (0,250 ± 0,010). EA3 não apresentou valor de IM, indicando a presença majoritária de células em interfase (Figura 2). Os resultados de IM para as amostras de elutriato do sedimento (Tabela 3, Figura 4) referentes à esta amostragem demonstraram IM inferior nas três estações avaliadas em relação ao controle (0,095 ± 0,006).

Tabela 3: Índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular e da região F1 de *Allium cepa*, após exposição às amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo e positivo nas duas amostragens.

	SEDIMENTO				
	Controle negativo	Trifluralina 1,90x10^{-6} M	EA1	EA2	EA3
			Primeira amostragem		
IM	0,250 ± 0,010^{C}	0,132 ± 0,010^{B}	0,315 ± 0,010^{D}	0,341 ± 0,010^{D}	0,000 ± 0,010^{A}
AC	0,001 ± 0,002^{A}	0,025 ± 0,002^{B}	0,019 ± 0,002^{B}	0,041 ± 0,002^{C}	0,000 ± 0,002^{A}
MN	0,000 ± 0,000^{A}	0,001 ± 0,000^{B}	0,000 ± 0,000^{A}	0,000 ± 0,000^{AB}	0,000 ± 0,000^{A}
F1-MN	0,000 ± 0,000^{A}	0,001 ± 0,000^{A}	0,000 ± 0,000^{A}	0,002 ± 0,000^{B}	0,000 ± 0,000^{A}
			Segunda amostragem		
IM	0,281 ± 0,009^{D}	0,134 ± 0,009^{B}	0,152 ± 0,009^{B}	0,238 ± 0,009^{C}	0,000 ± 0,009^{A}
AC	0,002 ± 0,000^{A}	0,032 ± 0,000^{C}	0,014 ± 0,000^{B}	0,028 ± 0,000^{C}	0,000 ± 0,000^{A}
MN	0,000 ± 0,001^{A}	0,003 ± 0,001^{B}	0,000 ± 0,001^{A}	0,000 ± 0,001^{A}	0,000 ± 0,001^{A}
F1-MN	0,000 ± 0,000^{A}	0,002 ± 0,000^{B}	0,000 ± 0,000^{A}	0,000 ± 0,000^{A}	0,000 ± 0,000^{A}
	ELUTRIATO DO SEDIMENTO				
	Controle negativo	MMS 4x10-4 mM	EA1	EA2	EA3
			Primeira amostragem		
IM	0,095 ± 0,006^{B}	0,055 ± 0,006^{A}	0,064 ± 0,006^{A}	0,047 ± 0,006^{A}	0,064 ± 0,006^{A}
AC	0,001 ± 0,002^{A}	0,014 ± 0,002^{B}	0,010 ± 0,002^{B}	0,010 ± 0,002^{B}	0,009 ± 0,002^{B}
MN	0,000 ± 0,001^{A}	0,010 ± 0,001^{B}	0,002 ± 0,001^{A}	0,001 ± 0,001^{A}	0,000 ± 0,001^{A}
F1-MN	0,000 ± 0,001^{A}	0,004 ± 0,001^{B}	0,002 ± 0,001^{A}	0,004 ± 0,001^{A}	0,002 ± 0,001^{AB}
			Segunda amostragem		
IM	0,114 ± 0,008^{B}	0,050 ± 0,008^{A}	0,073 ± 0,008^{A}	0,109 ± 0,008^{B}	0,122 ± 0,008^{B}
AC	0,002 ± 0,001^{A}	0,013 ± 0,001^{B}	0,012 ± 0,001^{B}	0,015 ± 0,001^{B}	0,012 ± 0,001^{B}
MN	0,000 ± 0,001^{A}	0,014 ± 0,001^{C}	0,002 ± 0,001^{AB}	0,003 ± 0,001^{B}	0,002 ± 0,001^{AB}
F1-MN	0,001 ± 0,000^{A}	0,008 ± 0,000^{B}	0,001 ± 0,000^{A}	0,001 ± 0,000^{A}	0,002 ± 0,000^{A}

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com ANOVA seguido pelo teste de Tukey (*P <0.05*). EP: Erro padrão.

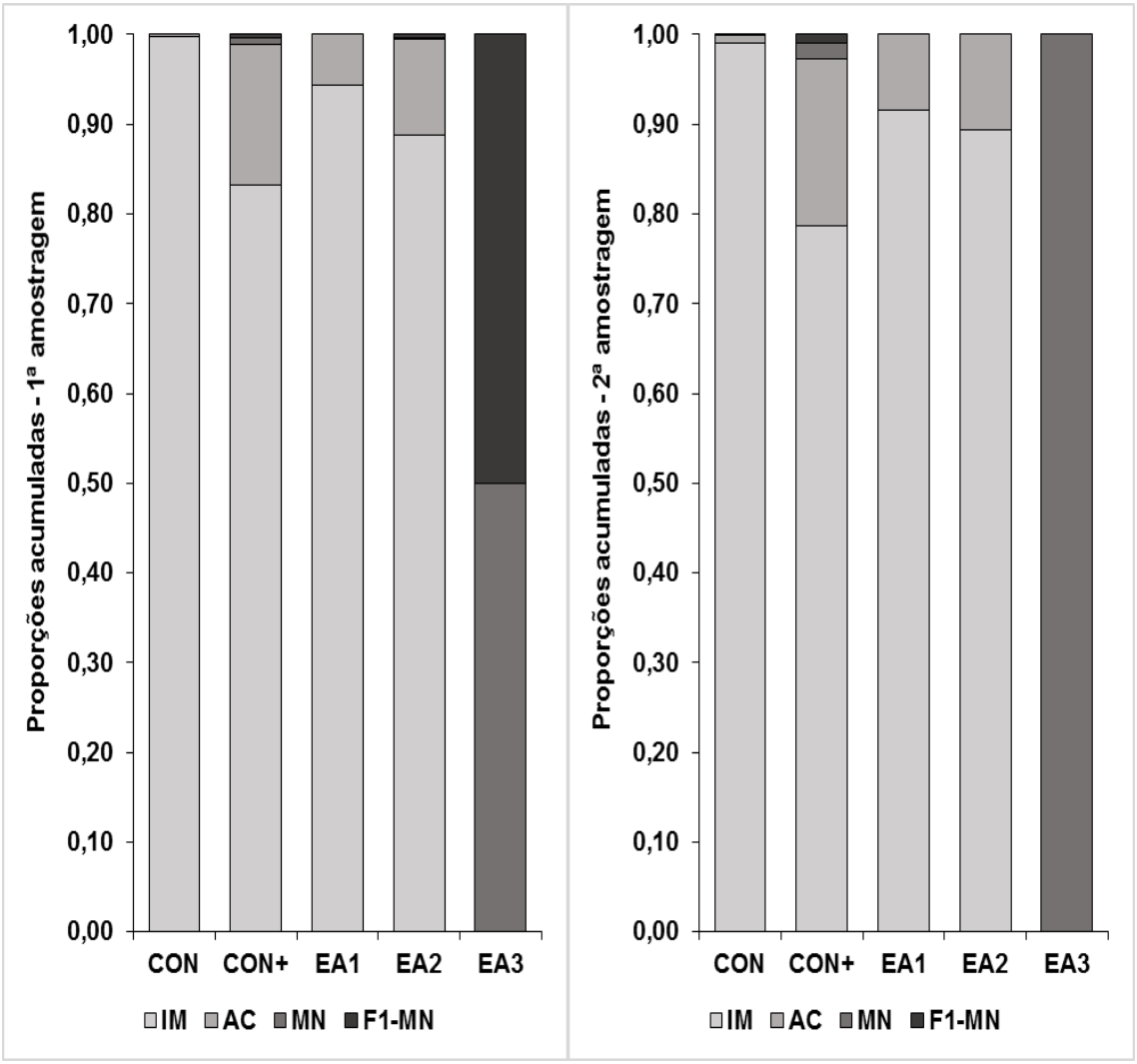

Figura 3: Pproporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular e da região F1 de *Allium cepa*, após exposição às amostras de sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.

Na segunda amostragem, o IM de EA1 (0,152 ± 0,009) e EA3 (0,238 ± 0,009) avaliados nas amostras de sedimento apresentou-se menor em relação ao controle negativo (0,281 ± 0,009), e assim como na primeira amostragem, EA3 não apresentou valor de IM (Tabela 3, Figura 3). Já com relação à avaliação do elutriato do sedimento na segunda amostragem (Tabela 3, Figura 4), apenas em EA1 (0,073 ± 0,008) o valor de IM foi inferior em relação ao controle negativo (0,114 ± 0,008). Os resultados de IM nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento em EA3 indicam menor potencial citotóxico deste compartimento em relação àquele, possivelmente devido à sua diluição com a coluna d'água.

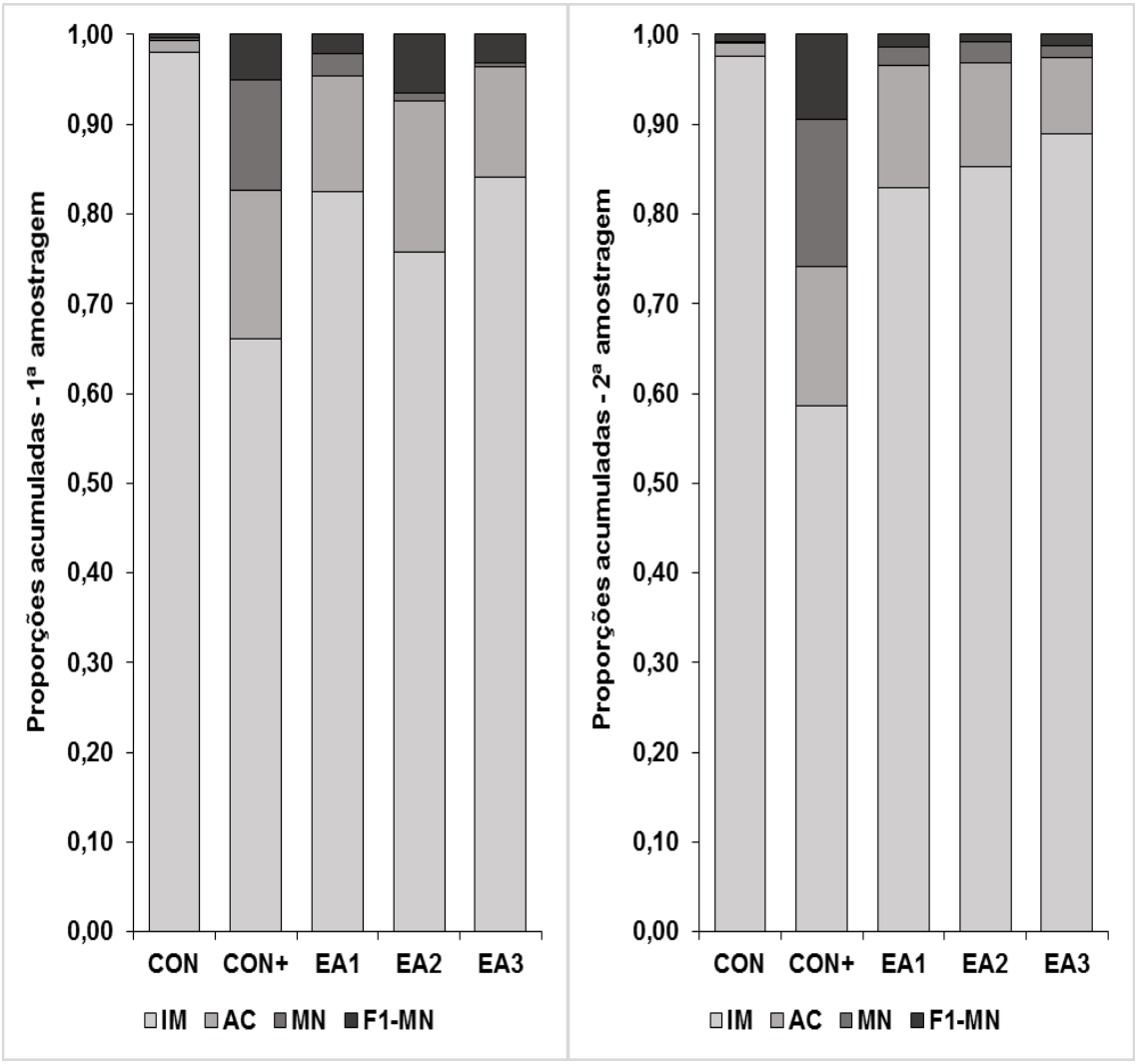

Figura 4: Proporção acumulada do índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN) avaliados por meio de células do meristema radicular e da região F1 de *Allium cepa*, após exposição às amostras de elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória e aos controles negativo (CON) e positivo (CON +) nas duas amostragens.

O IM observado tanto nas amostras de sedimento quanto nos elutriados do sedimento refletem o potencial citotóxico observado nestes compartimento. Níveis reduzidos de IM podem indicar que o crescimento e desenvolvimento do organismo teste está sendo afetado (FENECH, 2000), apresentando relações com distúrbios no ciclo celular e disfunções da cromatina (CHANDRA et al., 2005; GLINSKA et al., 2007). Esta redução, sobretudo na estação EA3 em ambas as amostragens, pode apresentar relação à ação dos pontos de checagem G1/S e G2 do ciclo celular que inibem a síntese de DNA e/ou bloqueiam o ciclo após a detecção de danos sobre o material genético (ALBERTS et al., 2008). Por outro lado, os valores de IM elevados em relação ao controle negativo podem indicar

eventos de proliferação celular descontrolada (FENECH et al., 2003) e resultar na promoção de aberrações cromossômicas (ARAGÃO et al., 2015).

O potencial genotóxico das amostras de sedimento (Tabela 3, Figura 3) avaliado por AC em ambas as amostragens, apresentou níveis superiores nas estações EA1 e EA2 em relação aos controles negativo. Nestes casos, AC chegou a 0,041 ± 0,002 e 0,028 ± 0,00 em EA2 na primeira e segunda amostragens, respectivamente. A estação EA3 não apresentou AC significativo, uma vez que não apresentou divisão celular. Por outro lado, a avaliação do elutriato do sedimento demonstrou AC superior em relação aos controles negativos em todas as estações avaliadas (Tabela 3, Figura 4). Neste caso, os valores variaram de 0,009 ± 0,002, observado em EA3 na primeira amostragem, até 0,015 ± 0,001, observado em EA2 na segunda amostragem.

O potencial genotóxico observado tanto nas amostras de sedimento quanto elutriato do sedimento relacionaram-se às elevadas frequências das aberrações cromossômicas tipo C-metáfase e aderência cromossômica (Figura 2). Estudos sugerem que os eventos de C-metafases decorrem da inativação completa do fuso mitótico celular que impossibilita a formação da placa equatorial, interrompendo a divisão celular (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ; LEVAN, 1993).

Segundo Anthony e Hussey (1999) e Fernandes e outros (2009), a metáfase é interrompida por alterações nas moléculas de tubulinas do fuso mitótico, interferindo na polimerização dos microtúbulos. Os eventos de aderência cromossômica envolvem tanto a porção proteica da cromatina quanto o DNA (FISKESJÖ, 1995, 1997). Segundo McGill e outros (1974) e Klásterská e outros (1976), a aderência cromossômica surge devido à dobra indevida da fibra cromossômica em cromátides simples, resultando em pontes subcromáticas entre os cromossomos.

Além dessas alterações, foram observadas frequências elevadas de pontes cromossômicas anafásicas (Figura 2) durante a avaliação do meristema de *A. cepa* exposto às amostras de sedimento. Segundo Hall (1994), as pontes anafásicas podem surgir a partir de quebras durante G2 após a replicação cromossômica. Nesse sentido, Fiskejö (1993) relata que o surgimento de pontes anafásicas devido às quebras cromossômicas relacionam-se com eventos de translocações ou ligações de extremidades coesivas.

Além disso, o surgimento de pontes anafásicas pode estar relacionado às ocorrências de aderências cromossômicas, uma vez que os cromossomos tendem à permanecer juntos (MARCANO et al., 2004). Nestes casos, as pontes cromossômicas podem ser múltiplas e persistirem até a telófase (GIACOMELLI, 1999). Segundo Barbério (2013), as pontes cromossômicas podem envolver mais de um cromossomo e quando associadas às aderências cromossômicas, apresentam efeitos tóxicos irreversíveis.

Com relação ao potencial mutagênico avaliado pela frequência de micronúcleos (Figura 2), as amostras de sedimento não apresentaram MN com diferenças significativas entre as estações amostrais e controles negativos em ambas as amostragens (Tabela 3, Figura 3). As mesmas constatações foram observadas na avaliação do elutriato do sedimento, exceto em EA2 (0,003 ± 0,001) na segunda amostragem em que MN foi superior em relação ao controle negativo (0,000 ± 0,001) (Tabela 3, Figura 4). A avaliação da frequência de micronúcleos nas células diferenciadas F1 demonstrou diferença significativa apenas em EA2 na primeira amostragem, em relação ao controle negativo.

Os micronúcleos podem ser originados tanto a partir de cromossomos incorretamente alinhados durante a metafase quanto por atrasos cromossômicos ou pontes cromossômicas quebradas durante os estágios mitóticos posteriores (MA et al., 1995; FERNANDES et al., 2007). A ausência de MN significativo nas outras estações avaliadas pode estar relacionada ao elevado potencial citotóxico observado que resultaria na menor transferência dos danos entre gerações de células meristemáticas e F1, e consequentemente na menor formação de micronúcleos.

3.3. Discussão geral

A avaliação da qualidade ambiental dos ecossistemas aquáticos não deve ser pautada apenas na coluna d'água como a única fonte em potencial de contaminantes, uma vez que o sedimento presente nestes ambientes podem representar forte ameaça à biota, sobretudo aos organismos bentônicos que vivem neste compartimento (USEPA, 2000). Nesse sentido, segundo Viganò (2000), muitos contaminantes podem atingir concentrações bem mais elevadas no sedimento do que na coluna d'água, tendo em vista os processos de adsorção

dos contaminantes nas partículas do sedimento. Assim, o sedimento pode atuar armazenando ou mesmo fornecendo contaminantes à biota.

Nesta avaliação do sedimento e elutriato do sedimento do Rio SMV, estas relações ficam claras ao se observar as concentrações de metais quantificadas nos compartimentos em questão, com destaque à grande concentração de metais no sedimento bem como os potenciais citotóxico e genotóxicos avaliados pelo teste do *A. cepa*. Estes apresentaram, em geral, maior intensidade nas amostras de sedimento, principalmente em EA3 que apresentou-se como estação de maior concentração de metais e maior potencial citotóxico. Segundo Gaur e outros (2005), devido aos processos de adsorção, hidrólise e co-precipitação, apenas uma porção de íons metálicos livres permanecem dissolvidas em água, enquanto a grande quantidade deles encontra-se depositada no sedimento.

Tendo em vista os processos de incorporação e disponibilização de substâncias entre os compartimentos sedimento e coluna d'água, a quantificação de metais e a realização de ensaios no elutriato do sedimento são abordagens importantes, pois simulam a dinâmica dos contaminantes ora existentes no sedimento, ora na coluna d'água que estejam biodisponíveis via contato direto (GEFFARD et al., 2003; ARAÚJO, 2008). Assim, o método do elutriato simula a ressuspensão de sedimentos, como em situações de dragagem, tempestade ou grandes fluxos de água que possam causar distúrbios nos sedimentos de fundo (ALEGRE, 2009). A relação entre os compartimentos sedimento e elutriato do sedimento do Rio SMV ficam evidenciadas a partir das correlações significativas entre os metais quantificados nestes compartimentos (Tabela 4): Al ($r = 0,978$), Ba ($r = 0,921$), Cr ($r = 0,560$), Cu ($r = 0,934$), Mn ($r = 0,895$) e Zi ($r = 0,871$), sugerindo que o sedimento seja a principal fonte destes contaminantes nas estações avaliadas no Rio SMV.

Tabela 4: Correlação de Pearson entre os metais quantificados nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória.

Variável 1	Variável 2	n	Pearson	*p-value*
Al S	Al E	18	0,978**	0,000
Ba S	Ba E	18	0,921**	0,000
Cr S	Cr E	18	0,560*	0,016
Cu S	Cu E	15	0,934**	0,000
Mn S	Mn E	18	0,895**	0,000
Ni S	Ni E	12	0,506	0,093
Zn S	Zn E	12	0,871**	0,000

Coeficientes seguidos de * são significantes a $P < 0,05$; e de ** são significantes a $P < 0,01$. Variáveis seguidas pelo caractere “S” remetem-se às amostras de sedimento, enquanto que “E” às amostras de elutriado do sedimento.

Araújo (2008) ressalta que nem sempre os contaminantes presentes no sedimento estarão biodisponíveis em sua fração líquida ou na coluna d’água, e por este motivo, faz-se necessário também a realização de estudos com a fase sólida do sedimento. A estação EA3 destacou-se como a de maior contaminação por metais nas amostragens, tanto no sedimento quanto no elutriato do sedimento, sugerindo que esta estação atua como região de sedimentação do Rio SMV, inclusive de contaminantes (Figura 5). Este fato pode estar relacionado às características geomorfológicas presentes na região na qual está inserida a bacia hidrográfica do Rio SMV.

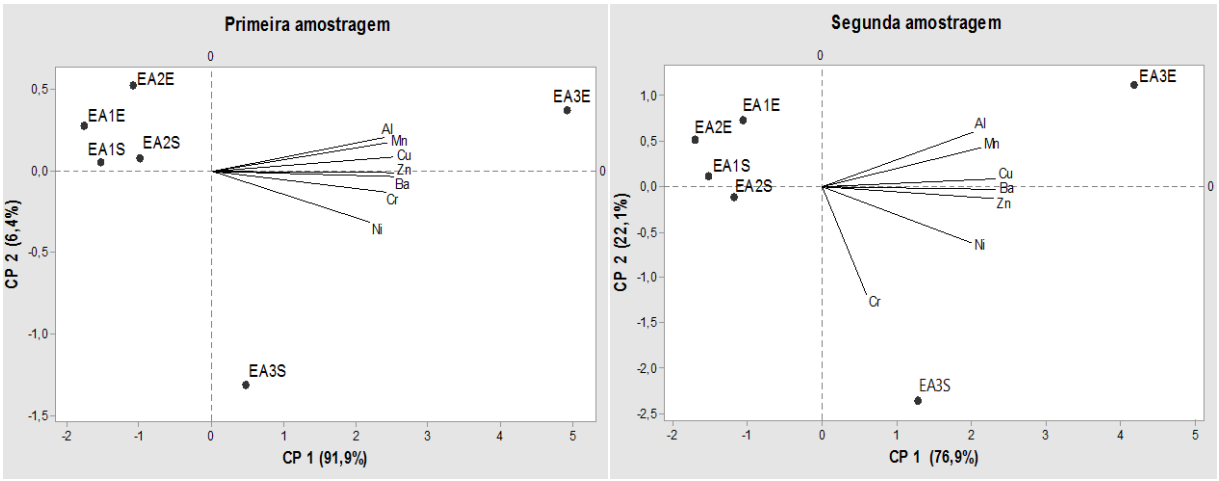

Figura 5: Análise de componentes principais dos metais quantificados nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio Santa Maria da Vitória. *Estações seguidas pelo caractere “S” remetem-se às amostras de sedimento, enquanto que “E” às amostras de elutriado do sedimento.

A partir do estudo de Gatto e outros (1983), constata-se que as estações EA1 e EA2 situam-se na região geomorfológica do Planalto da Mantiqueira

Setentrional, enquanto EA3 na região geomorfológica de Acumulação fluvial. Observando as altitudes do revelo das regiões nas quais as estações estão situadas, EA1 está na faixa hipsométrica de 708 - 778 metros de elevação, enquanto EA2 e EA3 estão na faixa 0 - 70. Em termos de altitude, EA1 situa-se à 710,95 m, EA2 à 39,62 m e EA3 à 4,59 m (Figura 1). Com relação à produção de sedimentos nas bacias hidrográficas, Moro (2005) relata que este processo varia entre as partes mais elevadas e planícies. Segundo o autor, entre os aspectos que influenciam este processo, estão o tipo de solo, cobertura vegetal e clima. Apesar disso, normalmente nas porções mais altas há maior erosão e transporte de sedimentos. E a medida que a declividade diminui, a erosão vai diminuindo.

De acordo com Carvalho (2008), a carga em suspensão é predominantemente maior que a de fundo (90% a 95%) no alto dos curso d'água. Todavia, a carga de fundo vai crescendo à medida que a erosão da bacia e a declividade do curso vão diminuindo (65% a 90% de sedimento em suspensão). Outro fator determinante para a alta concentração de metais em EA3 parece ser o conteúdo de matéria orgânica no sedimento. Além dos processos de sedimentação que concentram os contaminantes nesta estação, o sedimento coletado em EA3 nas duas amostragens mostrou-se argiloso, de granulometria fina e rico em matéria orgânica. O conteúdo de matéria orgânica do sedimento é resultado da decomposição de plantas e outros organismos por ação bacteriana, além de depósitos sedimentares. Além disso, normalmente é composto por materiais leves cuja sedimentação segue as mesmas leis que as partículas finas, ou seja, ambas acumuladas em zonas tranquilas (SALEM et al., 2014).

Segundo Aiken e outros (2011), na última década os estudos apontaram que a matéria orgânica dissolvida atua no ciclo biogeoquímico dos metais. Devido às suas propriedades coloidais, a matéria orgânica desempenha importante papel na retenção dos metais (CITEAU, 2004), o que foi constatado por Ekengele e outros (2017) ao avaliarem amostras de sedimento do Lago Lere, em Chade, e por Mohiuddin e outros (2012) ao sugerirem que a presença de matéria orgânica pode ter influenciado a acumulação de Zn, Cu, Pb e As no sedimento do Rio Tsurumi, no Japão.

Dentre os metais quantificados, Al se destaca por sua elevada concentração no elutriato do sedimento e principalmente no sedimento avaliado do Rio SMV. Este fato parece estar relacionado às características pedológicas e geológicas da

bacia hidrográfica, aos potenciais processos de erosão bem como ao uso e ocupação da bacia hidrográfica do Rio SMV (Figura 1), já que 22,08 % apresenta-se relacionado às atividades agrícolas e 6,87 % às pastagens (GUIMARÃES, 2016).

A bacia do Rio SMV apresenta o predomínio dos solos do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo e o Cambissolo, sendo estes classificados como distróficos por apresentarem saturação de alumínio de até 50% (OLIVEIRA et al., 1983). Além disso, o alto e médio SMV possui relevo montanhoso e fortemente ondulado, formado por substrato geológico composto por rochas graníticas ricas em alumínio (GATTO et al., 1983; VIEIRA; MENEZES, 2015). Tendo em vista o uso e ocupação dessa bacia, diversos estudos associam a utilização de insumos agrícolas de origem animal, aditivos alimentares, fertilizantes fosfatados e agrotóxicos à contaminação do ambiente por metais como As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb e Zn (ALLOWAY, 1990; O' NEILL, 1990; GIMENO-GARCIA et al., 1996; O' CONNOR, 2005; NZIGUHEBA; SMOLDERS, 2008).

Os efeitos dos metais sobre o *A. cepa* tem sido extensamente reportado em avaliações de ecossistemas aquáticos. A avaliação de amostras do Rio Sinos (RS, Brasil) realizada por Oliveira e outros (2012) relacionou os efeitos tóxicos e citotóxicos em *A. cepa* às concentrações de Cr entre 45 e 75 $\mu g.L^{-1}$. Já a avaliação do Rio Poti destacou a contaminação das amostras de água por Fe, Zn, Cr, Cu e Al e os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dessas amostras em *A. cepa* (MATOS et al., 2017). Neste caso, as concentrações de Cu, Cr, Fe e Al apresentaram-se acima do estabelecido pela legislação brasileira. Rambo e outros (2017) ao avaliarem o elutriato do sedimento de quatro reservatórios para a produção de energia hidroelétrica, constaram concentrações elevadas de pesticidas e metais (Cd, Cr, Pb), bem como aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares em *A. cepa*. Já Biruk e outros (2017) ao avaliarem amostras de sedimento da bacia hidrográfica do Rio Matanza-Riachuelo detectaram contaminantes como Zn, Cr, Pb e Cu, e constataram efeitos genotóxicos em *A. cepa*, tanto nas extrações inorgânicas quanto orgânicas das amostras de sedimento.

Em relação a outros metais, na avaliação da qualidade da água do Rio da Ilha (RS, Brasil) foram detectadas concentrações de Pb, Fe, Ni e Al acima da legislação brasileira, tendo Al apresentado níveis entre 1300 a 1600 $\mu g.L^{-1}$

(RODRIGUES et al., 2016). Neste caso, os autores observaram elevados níveis de citotoxicidade nas amostras de água em *A. cepa*. Geraskin e outros (2011) ao avaliarem regiões sob influência de extração de minérios, observaram efeito genotóxico em *A. cepa*, relacionando-o à diversos contaminantes, dentre eles Ba e Mn que apresentaram, respectivamente, concentrações de até 1330000 e 850 $\mu g.L^{-1}$ nas amostras de água, e 1065 e 8262 $mg.Kg^{-1}$ nas amostras de sedimento.

Além disso, as alterações citotóxicas e genotóxicas observadas nas amostras de sedimento e elutriato do Rio SMV podem estar relacionadas ao lançamento de efluentes neste ecossistema. Este efeito também foi relatado por Gomes e outros (2015) ao avaliarem amostras de água do rio Guandu (RJ, Brasil) e constatarem potenciais citotóxicos e genotóxicos sobre *A. cepa* variáveis em função do tempo e das emissões de efluentes contaminados. O mesmo foi constatado por Brunchchen e outros (2013) ao avaliar o Rio Criciúma por diversos ensaios ecotoxicológicos, entre eles *A. cepa*, e relacionar o comprometimento da qualidade da água neste ecossistema ao lançamento de contaminantes de diversas fontes antrópicas.

4. CONCLUSÕES

Avaliação das amostras de sedimento e elutriato do sedimento do Rio SMV indicam possível o comprometimento da qualidade ambiental do ambiente avaliado, principalmente em EA3. Nesta estação, a análise dos metais demonstrou elevadas concentrações de Ba, Cr, Cu, Mn, Zn e principalmente Al que podem estar relacionadas às características geomorfológicas da região, favorecendo os processos de sedimentação. Os resultados do teste do *A. cepa* indicam potenciais citotóxicos e genotóxicos nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento avaliados, destacando-se as frequências de danos do tipo C-metáfase, aderência cromossômica e ponte cromossômica anafásica. Estes resultados parecem estar relacionados aos metais quantificados. Entretanto, considerando o uso e ocupação da bacia, outros contaminantes como agroquímicos e misturas complexas de efluentes podem ter contribuído para os resultados observados, assim como para o lançamento de metais no Rio SMV. Assim, sugere-se análises complementares para avaliar a presença de outras classes de contaminantes. Tendo em vista a característica dos compartimentos avaliados em acumular contaminantes, espera-se que os resultados deste estudo

estimulem as análises do sedimento e elutriato do sedimento por meio de avaliações abióticas e bioensaios como ferramenta para a avaliação dos ecossistemas aquáticos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Agência Estadual de Recursos Hídricos - AGERH do estado do Espírito Santo pela apresentação das estações amostrais, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo - FAPES pelas bolsas de estudo. Os autores também são gratos pela disponibilidade e estrutura do Grupo de Estudos de Mutagênese e Toxicologia (GEMUT) e Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Metodologias para Análise de Petróleos (LabPetro) da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil.

6. REFERÊNCIAS

AIKEN, G.R.; HSU-KIM, H.; RYAN, J.N. Influence of dissolved organic matter on the environmental fate of metals, nanoparticles, and colloids. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 8, p. 3196-3201, 2011. DOI:10.1021/es103992s

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 5 ed. New York: Garland Publishing, 2008.

ALEGRE, G.F. Avaliação ecotoxicológica de sedimentos do Rio Tietê entre os municípios de Salesópolis e Suzano, SP. **Dissertação de Mestrado em Ciência na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo - USP, 2009. 121p.

ALIMBA, C.G.; DHILLON, V.; BAKARE, A.A.; FENECH, M. Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. **Mutation Research**, v. 798-799, p. 35-47, 2016. DOI:10.1016/j.mrgentox.2016.02.002

ALLOWAY, B.J. Cadmium. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons Inc., p. 100-124, 1990.

ANA - Agência Nacional de Águas. **Bases de Dados Georreferenciadas; Ottobacias**, 2017. Disponível em: http://www.ana.gov.br/bibliotecavirtual/solicitacaoBaseDados.asp Acesso em: 21 jun. 2017.

ARAGÃO, F.B.; PALMIERI, M.J.; FERREIRA, A.; COSTA, A.V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P.F.; ANDRADE-VIEIRA, L.F. Phytotoxic and cytotoxic effects of Eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAÚJO, R.J.V. Avaliação toxicológica da água e utilização de diferentes métodos na avaliação toxicológica de sedimentos do complexo estuarino de Suape, PE, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Oceanografia**, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, 2008. 78p.

AUGUSTYNOWICZ, J.; KYZIOŁ-KOMOSIŃSKA, J.; SMOLEŃ, S.; WALOSZEK, A. Study on Chromium-Binding Capacity of Callitriche cophocarpa in an Aquatic Environment. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, n. 3, p. 410–418, 2013. DOI:10.1007/s00244-012-9853-5

AZEVEDO, J.S.; BRAGA, E.S.; ASSIS, H.C.E.; RIBEIRO, C.A.O. Biochemical changes in the liver and gill of Cathorops spixii collected seasonally in two Brazilian estuaries under varying influences of anthropogenic activities. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 96, p. 220-230, 2013. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.06.021

BARBÉRIO, A. Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality. *In:* ELSHORBAGY, W.; CHOWDHRY, R.K. (Ed.). **Water Treatment**. InTech, p 317-334, 2013.

BIRUK, L.N.; MORETTON, J.; FABRIZIO DE IORIO, A.; WEIGANDT, C.; ETCHEVERRY, J.; FILIPPETTO, J.; MAGDALENO, A. Toxicity and genotoxicity assessment in sediments from the Matanza-Riachuelo river basin (Argentina) under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 302-311, 2017. DOI:10.1016/j.ecoenv.2016.09.024

BRUCHCHEN, L.M.; SILVA, O.S.; SILVEIRA, F.Z.; DEFAVERI, T.M.; PICH, C.T.; GEREMIAS, R. Avaliação da toxicidade das águas do Rio Criciúma (Criciúma, Santa Catarina, Brasil), utilizando parâmetros físico-químicos e abordagens ecotoxicológicas. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p. 23-30, 2013. DOI:10.5132/eec.2013.02.004

CAMARGO, M.M.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish

Prochilus lineatus. **Aquatic Toxicology**, v. 94, n. 1, p. 40-46, 2009. DOI: 10.1016/j.aquatox.2009.05.017

CARVALHO, N.O. **Hidrossedimentologia prática**, 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

CARVALHO, I.M.C.M.M.; CAVALCANTE, A.A.; DANTAS, A.F.; PEREIRA, D.L.; ROCHA, F.C.; OLIVEIRA, F.M.; DA SILVA, J. Environmental mutagenicity and toxicity caused by sodium metabisulfite in sea shrimp harvesting in Piauí, Brazil. **Chemosphere**, v. 82, n. 7, p. 1056-1061, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.10.042

CHANDRA, S.; CHAUHAN, L.K.; MURTHY, R.C.; SAXENA, P.N.; PANDE, P.N.; GUPTA, S.K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Science of The Total Environment**, v. 347, n.1-3, p. 46-52, 2005. DOI:10.1016/j.scitotenv.2005.01.002

CHEN, G.; WHITE, P.A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation Research**, v. 567, n. 2-3, p. 151-225, 2004. DOI:10.1016/j.mrrev.2004.08.005

CITEAU, L. Etude des colloïdes naturels présents dans les eaux gravitaires de sols contaminés: relation entre nature des colloïdes et réactivité vis-à-vis des métaux (Zn, Cd, Pb, Cu). **Thèse**, l'Institut National d'Agronomie Paris Grignon, 2004. 236p.

CORREIA, T.G.; NARCIZO, A.M.; BIANCHINI, A.; MOREIRA, R.G. Aluminum as an endocrine disruptor in female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 151, n. 4, p. 461-466, 2010. DOI:10.1016/j.cbpc.2010.02.002

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; KUSZA, G. The potential of the Phytotoxkit microbiotest for hazard evaluation of sediments in eutrophic freshwater ecosystems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 179, n. 1-4, p. 113-121, 2011. DOI:10.1007/s10661-010-1722-y

DA COSTA, T.C.; DE BRITO, K.C.; ROCHA, J.A.; LEAL, K,A.; RODRIGUES, M.L.; MINELLA, J.P.; MATSUMOTO, S.T.; VARGAS, V.M. Runoff of genotoxic compounds in river basin sediment under the influence of contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 1, p. 63-72, 2012. DOI:10.1016/j.ecoenv.2011.08.007

DONALD, D.B. Trophic decline and distribution of barium in a freshwater ecosystem. **Hydrobiologia**, v. 784, n. 1, p. 237-247, 2017. DOI:10.1007/s10750-016-2878-4

DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; COELHO, E.J.R.; DIAS, M.C.; MATSUMOTO, S.T. Cytogenetic responses of *Allium cepa* L. after exposure to contaminated pond waters. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 15, n. 1, p. 1-6, 2017.

DUARTE, I.D.; SILVA, N.H.; DA COSTA SOUZA, I.; DE OLIVEIRA, L.B.; ROCHA, L.D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; DE ALMEIDA PEREIRA, T.; DIAS, M.C.; DE OLIVEIRA FERNANDES, V.; MATSUMOTO, S.T. Water quality of a coastal lagoon (ES, Brazil): abiotic aspects, cytogenetic damage, and phytoplankton dynamics. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p. 10855-10868, 2017. DOI:10.1007/s11356-017-8721-2

DURÁN, I.; SÁNCHEZ-MARÍN, P.; BEIRAS, R. Dependence of Cu, Pb and Zn remobilization on physicochemical properties of marine sediments. **Marine Environmental Research**, v. 77, p. 43-49, 2012. DOI:10.1016/j.marenvres.2012.02.001

EKENGELE, L.N.; BLAISE, A.; JUNG, M.C. Accumulation of heavy metals in surface sediments of Lere Lake, Chad. **Geosciences Journal**, v. 21, n. 2, p. 305-315, 2017. DOI:10.1007/s12303-016-0047-4

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n.1-2, p. 81-95, 2000. DOI:10.1016/S0027-5107(00)00065-8

FENECH, M.; CHANG, W.P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003. DOI:10.1016/S1383-5718(02)00249-8

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007. DOI:10.1016/j.pestbp.2006.12.003

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985. DOI:10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x

FISKESJÖ, G. The allium test in wastewater monitoring. **Environmental Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 291-298, 1993. DOI:10.1002/tox.2530080306

FISKESJÖ, G.; LEVAN, A. Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the *Allium cepa*. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 21, n. 2, p. 139-149, 1993.

FISKESJÖ, G. Allium Test II: Assessment of a Chemical's Genotoxic Potential by Recording Aberrations in Chromosomes and Cell Divisions in Root Tips of *Allium cepa* L. **Environmental Toxicology**, v. 9, n. 3, p. 235-241, 1994. DOI:10.1002/tox.2530090311

FISKESJÖ, G. Allium Test. *In:* O'Hare, S.; Atterwill, C.K. (Ed.) **In Vitro Toxicity Testing Protocols. Methods in Molecular Biology™**, vol 43. Totowa: Humana Press, p 119-127, 1995. DOI:10.1385/0-89603-282-5:119

FISKESJÖ, G. Allium test for screening chemicals, evaluation of cytological parameters. *In:* Wang, W.; Gorsuch, J.W.; Hughes, J.S. (Ed.) **Plants for Environmental Studies**, NewYork: Lewis Publishers, p 307-333, 1997.

FLEMMING, C.A.; TREVORS, J.T. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review**. Water, Air, and Soil Pollution**, v. 44, n. 1-2, p. 143-158, 1989. DOI:10.1007/BF00228784

FRASSINETTI, S.; PITZALIS, E.; MASCHERPA, M.C.; CALTAVUTURO, L.; MORELLI, E. A multidisciplinary approach for assessing the toxicity of marine sediments: analysis of metal content and elutriate bioassays using metal bioavailability and genotoxicity biomarkers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 62, n.1, p. 13-21, 2012. DOI:10.1007/s00244-011-9667-x

FREITAS, L.A.; RAMBO, C.L.; FRANSCESCON, F.B.; ANTÔNIO, F.P.; LUCCA, G.S.; SIEBEL, A.M.; SCAPINELLO, J.; LUCAS, E.M.; MAGRO, J.D. Coal extraction causes sediment toxicity in aquatic environments in Santa Catarina, Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, n. 4, p. 591-604, 2017. DOI:10.4136/ambi-agua.2036

FUZINATTO, C.F.; FLOHR, L.; MELEGARI, S.P.; MATIAS, W.G. Induction of micronucleus of *Oreochromis niloticus* exposed to waters from the Cubatão do Sul River, southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 98, p. 103-109, 2013. DOI:10.1016/j.ecoenv.2013.09.016

GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v. 189, n. 1-2, p. 147-163, 2003. DOI:10.1016/S0300-483X(03)00159-8

GARONCE, F.A.A.; QUARESMA, V.S. Hydrodynamic Aspects at Vitória Bay Mouth, ES. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 555-570, 2014. DOI:10.1590/0001-37652014114012

GATTO, L.C.S.; RAMOS, V.L.S.; NUNES, B.T.A.; MAMEDE, L.; GÓES, M.H.; MAURO, C.A.; ALVARENGA, S.M.; FRANCO, E.M.S.; QUIRICO, A.F.; NEVES, L.B. **Geomorfologia.** Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

GAUR, V.K.; GUPTA, S.K.; PANDEY, S.D.; GOPAL, K.; MISRA, V. Distribution of heavy metals in sediment and water of River Gomti. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 102, n. 1-3, p. 419–433, 2005. DOI:10.1007/s10661-005-6395-6

GEFFARD, O.; GEFFARD, A.; HIS, E.; BUDZINSKI, H. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polyciclic aromatic hyrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 4, p. 481-490, 2003. DOI:10.1016/S0025-326X(02)00451-4

GERAS'KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. Geno-toxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means of Allium-test. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1133-1146, 2011. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.01.008

GIACOMELLI, F.R.B. Avaliação do comportamento meiotico em variedades de aveia (Avena sativa) recomendadas para a Região Sul. **Dissertação de Mestrado em Agronomia**, Universidade Estadual de Maringá – UEM, 1999. 66p.

GIMENO-GARCÍA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. **Environmental Pollution**, v. 92, n. 1, p. 19-25, 1996. DOI:10.1016/0269-7491(95)00090-9

GLIŃSKA, S.; BARTCZAK, M.; OLEKSIAK, S.; WOLSKA, A.; GABARA, B.; POSMYK, M.; JANAS, K. Effects of anthocyanin-rich extract from red cabbage leaves on meristematic cells of Allium cepa L. roots treated with heavy metals.

Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 68, n. 3, p. 343-350, 2007. DOI:10.1016/j.ecoenv.2007.02.004

GOMES, J.V.; TEIXEIRA, J.T.; DOS, S.; LIMA, V.M. DE.; BORBA, H.R. Induction of cytotoxic and genotoxic effects of Guandu River waters in the *Allium cepa* system. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 1, p. 48-58, 2015. DOI:10.4136/ambi-agua.1487

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982. DOI:10.1016/0165-1110(82)90046-X

GRIPPA, G.A.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. **Cytologia**, v. 77, n. 1, p. 3-9, 2012. DOI:10.1508/cytologia.77.3

GUIMARÃES, C.F. Simulação hidrológica e hidrossedimentológica em uma bacia com reservatórios com o modelo soil and water assessment tool (SWAT). **Dissertação de Mestrado em Engenharia Ambiental**, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2016. 114p.

HALL, J.B. **DNA Strand Breaks and Chromosomal Aberrations**: Radiobiology for the Radiologist, 4 Ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.

KAISER, J. Manganese: A High-Octane Dispute. **Science**, v. 300, n. 5621, p. 926-928, 2003. DOI:10.1126/science.300.5621.926

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A.B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer, 2007.

KHANNA, N.; SHARMA, S. *Allium cepa* Root Chromosomal Aberration Assay: A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research**, v. 1, n. 3, p. 105-119, 2013.

KLÁSTERSKÁ, I.; NATARAJAN, A.T.; RAMEL, C. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromossome stickiness as a category of chromatid aberrations. **Hereditas**, v. 83, n.2, p. 153-162, 1976. DOI:10.1111/j.1601-5223.1976.tb01581.x

LASIER, P.J.; WINGER, P.V.; BOGENRIEDER, K.J. Toxicity of manganese to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 298-304, 2000. DOI:10.1007/s002449910039

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Researsh**, v. 650, n. 1, p. 80-6, 2008. DOI:10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

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. DOI:10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LEONARD, S.S.; BOWER, J.J.; SHI, X. Metal-induced toxicity, carcinogenesis, mechanisms and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 255, n. 1-2, p. 3-10, 2004. DOI:10.1023/B:MCBI.0000007255.72746.a6

LINDER, M.C.; HAZEGH-AZAM, M. Copper biochemistry and molecular biology. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 5, p. 797-811, 1996.

MA, T.H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995. DOI:10.1016/0165-1161(95)90010-1

MACDONALD, D.D.; INGERSOLL, C.G.; BERGER, T.A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 20-31, 2000. DOI:10.1007/s002440010075

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of actino of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221-226, 2004. DOI:10.1016/S0013-9351(03)00121-X

MARTINS, F.C.O.; FERNANDES, V.O. Biomassa e composição elementar (C, N e P) da comunidade perifítica no alto Rio Santa Maria da Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Brazilian Journal of aquatic Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 11-18, 2011. DOI:10.14210/bjast.v15n1.p11-18

MATOS, L.A.; CUNHA, A.C.S.; SOUSA, A.A.; MARANHÃO, J.P.R.; SANTOS, N.R.S.; GONÇALVES, M.M.C.; DANTAS, S.M.M.M.; SOUSA, J.M.C.E.; PERON, A.P.; SILVA, F.C.C.D.; ALENCAR, M.V.O.B.; ISLAM, M.T.; AGUIAR, R.P.S.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; BONECKER, C.C.; JUNIOR, H.F.J. The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river. **Chemosphere**, v. 185, p. 852-859, 2017. DOI:10.1016/j.chemosphere.2017.07.103

MCDONALD, B.G. Comparison of porewater and elutriate bivalve larval development toxicity testing in a sediment quality triad framework. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 3, p. 383-390, 2005. DOI:10.1016/j.ecoenv.2005.03.008

MCGILL, M.; PATHAK, S.; HSU, T.C. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: A possible material basis for chromosome stickiness. **Chromosoma**, v. 47, n. 2, 157-166, 1974. DOI:10.1007/BF00331803

MEA - Millennium Ecosystem Assessment. **Ecosystems and Human Well-being: Synthesis**. Washington: Island Press, 2005.

MENZIE, C.A.; SOUTHWORTH, B.; STEPHENSON, G.; FEISTHAUER, N. The importance of understanding the chemical form of a metal in the environment: the case of barium sulfate (barite). **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 14, n. 5, p. 974-991, 2008. DOI:10.1080/10807030802387622

MIRANDA, C.L.P. Preservação de mananciais sob a ótica da sobrevivência: história e sustentabilidade a partir do Rio Santa Maria da Vitória/ES. **Dissertação de Mestrado em Arquitetura e Urbanismo**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2009. 177p.

MIRELES, F.; PINEDO, J.L.; DACILA, J.I.; OLIVA, J.E.; SPEAKMAN, R.J.; GLASCOCK, M.D. Assessing sediment pollution from the Julian Adame-Alatorre dam by instrumental neutron activation analysis. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 20-25, 2011. DOI:10.1016/j.microc.2011.03.014

MOHIUDDIN, K.M.; OTOMO, K.; OGAWA, Y.; SHIKAZONO, N. (2012) Seasonal and spatial distribution of trace elements in the water and sediments of the Tsurumi river in Japan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 184, n. 1, p. 265-279, 2012. DOI:10.1007/s10661-011-1966-1

MORO, M.A. Utilização da Interface SWAT: SIG no Estudo da Produção de Sedimentos e do Volume de Escoamento Superficial com Simulação de Cenários Alternativos. **Dissertação de Mestrado em Agronomia**, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo – USP, 2005. 101p.

NZIGUHEBA, G.; SMOLDERS, E. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. **Science of The Total Environment**, v. 390, n. 1, p. 53-57, 2008. DOI:10.1016/j.scitotenv.2007.09.031

O'CONNOR, G.A.; ELLIOT, H.A.; BASTA, N.T.; BASTIAN, R.K.; PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, R.C.; SMITH JR, J.E. Sustainable land application: An overview. **Journal of Environmental Quality**, v. 34, p. 7-17, 2005.

O'NEILL, P. Arsenic. *In:* ALLOWAY, B.J. (Ed.). **Heavy Metals in Soils**. New York: John Wiley and Sons, p 83-89, 1990.

OLIVEIRA, V. DE.; COSTA, A.M.R. DA.; AZEVEDO, W.P. DE.; CAMARGO, M.N.; LARACH, J.O.L. **Pedologia.** Projeto RadamBrasil, vol. 32, folhas 23/24, Rio de Janeiro-Vitória, Rio de Janeiro, 1983.

OLIVEIRA, J.P.; 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. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012. DOI:10.5433/2316-5200.2012v1n1p15

PACIFICO, R.; ADAMO, P.; CREMISINI, C.; SPAZIANI, F.; FERRARA, L. A geochemical analytical approach for the evaluation of heavy metal distribution in lagoon sediments. **Journal of Soils and Sediments**, v. 7, n. 5, p. 313–325, 2007. DOI:10.1065/jss2007.06.231

PELUSO, L.; BULUS ROSSINI, G.; SALIBIÁN, A.; RONCO, A. Physicochemical and ecotoxicological based assessment of bottom sediments from the Luján River basin, Buenos Aires, Argentina. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 7, p. 5993-6002, 2013. DOI:10.1007/s10661-012-3000-7

POYNTON, H.; LOGUINOV, A.; VARSHAVSKY, J.; CHAN, S.; PERKINS, E.; VULPE, C. Gene expression profiling in *Daphnia magna* Part I: concentration-dependent profiles provide support for the no observed transcriptional effect level. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 16, p. 6250-6256, 2008. DOI:10.1021/es8010783

RAMBO, C.L.; ZANOTELLI, P.; DALEGRAVE, D.; DE NEZ, D.; SZCZEPANIK, J.; CARAZEK, F.; FRANSCESCON, F.; ROSEMBERG, D.B.; SIEBEL, A.M.; MAGRO, J.D. Hydropower reservoirs: cytotoxic and genotoxic assessment using the *Allium cepa* root model. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 9, p. 8759-8768, 2017. DOI:10.1007/s11356-017-8509-4

RODRIGUES, Z.P.G.; DALZOCHIO, T.; GEHLEN, G. Uso do bioensaio com *Allium cepa* L. e análises físico-químicas e microbiológicas para avaliação da

qualidade do Rio da Ilha, RS, Brasil. **Acta toxicológica argentina**, v. 42, n. 2, p. 97-104, 2016.

SALEM, D.M.S.; KHALED, A.; EL NEMR, A.; EL-SIKAILY, A. Comprehensive risk assessment of heavy metals in surface sediments along the Egyptian Red Sea coast. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 4, p. 349-362, 2014. DOI:10.1016/j.ejar.2014.11.004

ŠČANČAR, J.; STIBILJ, V.; MILAČIČ, R. Determination of aluminium in Slovenian foodstuffs and its leachability from aluminium-cookware. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 151-157, 2004. DOI:10.1016/j.foodchem.2003.07.028

SERIANI, R.; ABESSA, D.M.S.; PEREIRA, C.D.S.; KIRSCHBAUM, A.A.; ASSUNÇÃO, A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish Centropomus parallelus. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 61, n. 2, p. 105-111, 2013. DOI:10.1590/S1679-87592013000200003

STOKES, P.M.; CAMPBELL, P.G.C.; SCHROEDER, W.H.; TRICK, C.; FRANCE, R.L.; PUCKETT, K.J.; LAZERTE, B.; SPEYER, M.; HANNA, J.E.; DONALDSON, J. **Manganese in the Canadian environment**. Ottawa, Ontario: National Research Council of Canada, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality (NRCC No. 26193), 1988.

STONE, A.T.; MORGAN, J.J. Reduction and dissolution of manganese (III) and manganese(IV) oxides by organics: 2. Survey of the reactivity of organics. **Environmental Science & Technology**, v. 18, n. 8, p. 617-624, 1984. DOI:10.1021/es00126a010

SUARES-ROCHA, P.; BRAUNBECK, T.; DE ANGELIS, D.DE.F, MARIN-MORALES, M.A. Assessment of cytotoxicity and AhR-mediated toxicity in tropical fresh water sediments under the influence of an oil refinery. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 16, p. 12566-12575, 2015. DOI:10.1007/s11356-015-4431-9

THOMPSON, B.; ANDERSON, B.; HUNT, J.; TABERSKI, K.; PHILIPS, B. Relationship between sediment contamination and toxicity in San Francisco Bay. **Marine Environmental Research**, v. 48, n. 4-5, p. 285-309, 1999. DOI:10.1016/S0141-1136(99)00060-4

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal: testing manual**, EPA-503/8-1/001, 1991.

US EPA - United States Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. 2 Ed. EPA 600/R-99/064, 2002.

VARGAS, V.M.; MIGLIAVACCA, S.B.; DE MELO, A.C.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R.R.; DE SÁ FERREIRA, I.C.; PESTANA, M.H. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. **Mutation Research**, v. 490, n. 2, p. 141-158, 2001. DOI:10.1016/S1383-5718(00)00159-5

VIEIRA, V.S.; MENEZES, R.G. **Geologia e Recursos Minerais do Estado do Espírito Santo: texto explicativo do mapa geológico e de recursos minerais.** Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais-CPRM/Serviço Geológico do Brasil, Belo Horizonte, 2015. Disponível em: http://www.cprm.gov.br/publique/media/rel_espirito_santo.pdf Acesso em: 12 out. 2017.

VIGANÒ, L. Assessment of the toxicity of River Po sediments with *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology**, v. 47, n. 3-4, p. 191-202, 2000. DOI:10.1016/S0166-445X(99)00019-3

WETZEL, M.A.; WAHRENDORF, D.S.; VON DER OHE, P.C. Sediment pollution in the Elbe estuary and its potential toxicity at different trophic levels. **Science of The Total Environment**, v. 449, p. 199-207, 2013. DOI:10.1016/j.scitotenv.2013.01.016

WILSON, R. Aluminum. **Fish Physiology**, v. 31, p. 67-123, 2011. DOI:10.1016/S1546-5098(11)31024-2

WISE JP, S.R.; PAYNE, R.; WISE, S.S.; LACERTE, C.; WISE, J.; GIANIOS, C. JR.; THOMPSON, W.D.; PERKINS, C.; ZHENG, T.; ZHU, C.; BENEDICT, L.; KERR, I. A global assessment of chromium pollution using sperm whales (*Physeter macrocephalus*) as an indicator species. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1461-1467, 2009. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.02.044

WU, F.C. **Theory, Methodology and Case Study of Water Quality Criteria**. Beijing: Science Press, 2012.

6. CONCLUSÃO GERAL

As amostras de água, sedimento e elutriato do sedimento avaliadas no Rio Santa Maria da Vitória apresentaram concentrações de Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Se e Zn. Possivelmente, estes metais são oriudos de processos como lixiviação do solo, lançamento de efluentes e agroquímicos diversos. Entre os metais quantificados, o Al apresentou as maiores concentrações. Este fato pode estar relacionado às características pedológicas e geológicas da região, bem como ao uso e ocupação. As estações mais à montante, como EA1, apresentaram as maiores concentrações de metais nas amostras de água, enquanto que a estação mais à jusante, EA6, apresentaram as maiores concentrações de metais nas amostras de sedimento e elutriato do sedimento. A avaliação das amostras de água do Rio Santa Maria da Vitória pelos ensaios em *Allium cepa* e cultura celular em células CHO-K1 indicaram potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. O mesmo foi observado na avaliação das amostras de água por *Lactuca sativa* e das amostras de sedimento e elutriato de sedimento por *A. cepa.* Entre as aberrações cromossômicas observadas, destacam-se C-metafase, aderência cromossômica e ponte cromossômica anafásica. Estas e os consequentes potenciais genotóxico das amostras podem ser atribuídos aos metais quantificados nas amostras, principalmente Al. Em *L. sativa,* as amostras de água promoveram o efeito fitotóxico e a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, peroxidase do ascorbato e peroxidase do guaiacol. A análise das trocas gasosas em *L. satica* expostos à amostras de água indicaram menor eficiência fotossintéticas nas estações em que foram detectadas concentrações de Cu, sugerindo a presença deste metal como possível desencadeador das respostas observadas. Além dos metais quantificados, sugere presença de outros contaminantes como agroquímicos e misturas complexas de contaminantes presentes em efluentes domésticos como os agentes promotores das alterações observadas nos biomarcadores utilizados. Considerando os compartimentos analisados, os bioensaios realizados e as variáveis avaliadas, observa-se o comprometimendo da qualidade ambiental do Rio Santa Maria da Vitória devido à contaminação por metais. Espera-se que os resultados alcançados estimulem o biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos, bem como a realização de outros bioensaios e análises no Rio Santa Maria da Vitória.