

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

EDVAR JUNIOR RONCETTI COELHO

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)

VITÓRIA - ES

2017

EDVAR JUNIOR RONCETTI COELHO

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E CITOGENÉTICAS EM RAÍZES DE
Allium cepa L. EXPOSTAS ÀS AMOSTRAS DE ÁGUA E
SEDIMENTO DE TRÊS REPRESAS AO LONGO DA BACIA DO RIO
SANTA MARIA DA VITÓRIA (ES, BRASIL)**

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Tamie Matsumoto

VITÓRIA - ES

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

C672r Coelho, Edvar Junior Roncetti, 1987-
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) / Edvar Junior Roncetti Coelho. – 2017.
86 f. : il.

Orientador: Sílvia Tamie Matsumoto.
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais.

1. Citogenética vegetal. 2. Citotoxicidade de mediação celular. 3. Toxicologia genética. 4. Testes de mutagenicidade. 5. Stress oxidativo. 6. Enzimas. 7. Testes de toxicidade. I. Matsumoto, Sílvia Tamie. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

**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)**

EDVAR JUNIOR RONCETTI COELHO

Dissertação de Mestrado 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 Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 23 de fevereiro de 2017

**Comissão
Examinadora:**

Dr.ª Silvia Tamie Matsumoto - UFES
Orientadora e Presidenta da Comissão

Dr.ª Maria Do Carmo Pimentel Batitucci - UFES
Examinadora Interna

Dr.ª Tatiana da Silva Souza – UFES
Examinadora Externa

*Dedico aos meus pais Edvar e Joana e
à minha irmã Marcela, pelo apoio e
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pelo ensino e infraestrutura disponibilizados;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida;

Aos professores e profissionais do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pelo conhecimento transmitido, dedicação e valiosas contribuições;

À Prof.^a Dr.^a Silvia Tamie Matsumoto pela amizade e por ter aceitado orientar este trabalho e pela minha formação científica e profissional;

Ao Prof. Ph.D. Gilberto Fonseca Barroso pelo apoio na execução deste trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Marisa Narciso Fernandes por disponibilizar seu laboratório para realização de parte do projeto.

À Msc. Roberta Chechetto pela ajuda com as análises químicas.

À banca, Prof.^a Dr.^a Maria Do Carmo Batitucci, Prof.^a Dr.^a Tatiana Souza, Prof.^a Dr.^a Viviana Borges e Prof. Gilberto Barroso, por aceitarem compor a banca examinadora.

Aos amigos do GEMUT por terem feito parte desse projeto, por suas contribuições, apoio e amizade.

Aos colegas do PPGBV, pelo apoio e pelos momentos que passamos juntos.

Aos meus amigos, pelo apoio, conselhos e momentos de diversão.

À minha família, por todo o apoio, dedicação, confiança, carinho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da classificação das regiões da Bacia do rio Santa Maria da Vitória/ES - Brasil	14
Figura 2: Formação de Micronúcleos em células. A - formação de MN por quebra cromossômica; B - formação de MN por perda cromossômica.	26
Figura 3: Estação amostral da represa de Duas Bocas, localizada no município de Cariacica/ES.....	33
Figura 4: Estações amostrais ao longo da represa de Rio Bonito, Santa Maria de Jetibá/ES.	34
Figura 5: Estações amostrais ao longo da represa Suíça, Santa Leopoldina/ES.	35
Figura 6: Precipitação mensal acumulada na região da estação meteorológica de Vitória/ES. Ano 2016.	42
Figura 7: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral RB2, na represa de Rio Bonito/ES.	44
Figura 8: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral RB3, na represa de Rio Bonito/ES.	44
Figura 9: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral SU2, da represa Suíça/ES.	45
Figura 10: Células de A. cepa tratadas com amostras de água e sedimento coletadas nas represas de Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, na bacia do Rio Santa Maria da Vitória/ES	49
Figura 11: Frequência das alterações cromossômicas (AC) em células de raízes de A. cepa expostas às amostras de água das estações de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU) e aos controles negativo (CN) e positivo (CP).	52
Figura 12: Análise de PCA integrando dados de elementos-traço e bioquímicos às amostras de água coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.....	55
Figura 13: Análise de PCA integrando dados de elementos-traço e bioquímicos às amostras de sedimento coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos de água aferidos durante a segunda campanha (nov/2016), nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.	43
Tabela 2: Concentração dos elementos-traço em $\mu\text{g/L}^{-1}$ e suas respectivas incertezas nas amostras de água, da primeira (mar/16) e segunda (nov/16) campanha, coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.	46
Tabela 3: Concentração dos elementos-traço (mg/Kg^{-1} de massa seca) e suas respectivas incertezas nas amostras de sedimento, da primeira (mar/16) e segunda (nov/16) campanha, coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.....	47
Tabela 4: Avaliação citogenética das amostras de água e sedimento da primeira e segunda campanha das estações amostrais de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.	50
Tabela 5: Avaliação da frequência de aberrações cromossômicas avaliadas pelo ensaio com Allium cepa após exposição às amostras de água e sedimento da primeira e segunda campanha das estações amostrais de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.	51
Tabela 6: Atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione s-transferase (GST), peroxidação lipídica (LPO) e glutathione reduzida (GSH) em raízes de Allium cepa após exposição às amostras de água e sedimento coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.	57

RESUMO

O aumento da população humana e o desenvolvimento de suas atividades rurais, industriais e urbanas estão intimamente ligados a impactos gerados ao meio ambiente e os corpos d'água são os principais ecossistemas afetados. Bioensaios com plantas superiores são muito comuns para determinar a qualidade ambiental de um ecossistema poluído. Assim, este trabalho propôs realizar estudos para avaliação da qualidade de amostras de água e sedimento das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, presentes na bacia do Rio Santa Maria da Vitória/ES, empregando parâmetros físico-químicos e ensaios toxicológicos e bioquímicos em *Allium cepa*. Foram definidas uma estação amostral na represa Duas Bocas (DB), três na represa Rio Bonito (RB1, RB2 e RB3) e duas na represa Suíça (SU1 e SU2). Foram analisados parâmetros físicos e químicos e quantificação de elementos-traço. Das amostras de sedimento foi extraído o solubilizado para realização dos ensaios. Os bioensaios com *Allium cepa* foram realizados por meio de sementes germinadas em exposição às amostras de água e sedimento de cada estação amostral e aos controles negativo (água destilada) e positivo (MMS 4×10^{-4} mM). A avaliação de parâmetros de toxicidade se deram por meio de análise de crescimento radicular e germinação. A avaliação citogenética envolveu a análise dos índices mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC), Índice de mutagenicidade (IMUT) em raízes meristemáticas e frequência de micronúcleos em F_1 de *A. cepa*. Para análise bioquímica de estresse oxidativo, foram quantificadas SOD, CAT, GST, GSH e LPO. Na análise estatística foi utilizado Shapiro-Wilk para testar a normalidade, seguido de ANOVA e Scott Knott ($p < 0,05$). Os resultados físicos e químicos indicam que a represa Rio Bonito apresenta indícios de eutrofização. Foram quantificados elementos-traços acima da legislação em Duas Bocas (Zn), Rio Bonito (Fe, Zn e As), e na Suíça (Zn, Ni e Fe), principalmente nas amostras da primeira campanha. As represas de Rio Bonito e Suíça revelaram potencial citotóxico, mutagênico e genotóxico nas campanhas tanto para as amostras de água, quanto sedimento. A represa de Duas bocas apresentou potencial citotóxico e genotóxico. Os danos citogenéticos observados foram maiores nas amostras de sedimento, principalmente em SU2 durante a primeira campanha, sugerindo relação com as concentrações de Ni e Zn nessa estação amostral. Na análise dos biomarcadores bioquímicos, as amostras da segunda campanha apresentaram maior atividade. Dentre elas, Duas Bocas apresentou alta atividade de CAT e RB3 para LPO. Podemos afirmar que os bioensaios com *Allium cepa* são uma ótima ferramenta para verificar a qualidade ambiental, complementando as análises físicas e químicas realizadas em biomonitoramentos de ambientes poluídos.

Palavras-chave: citotoxicidade • estresse oxidativo • enzimas • genotoxicidade • mutagenicidade • toxicidade

ABSTRACT

The environmental impacts caused to the water bodies are directly related to the human population increase and therefore their anthropic activities. Bioassays with higher plants are very common to determine the environmental quality of a polluted ecosystem. Thus, this study aim to evaluate the quality of water and sediment samples from Duas Bocas, Rio Bonito and Suíça dam in the Santa Maria da Vitória river basin, using physicochemical parameters, toxicological and biochemical tests in *Allium cepa* L. Two campaigns were carried out (March and November 2016) and one sampling station was defined at the Duas Bocas dam (DB), three at the Rio Bonito dam (RB1, RB2 and RB3) and two at the Suíça dam (SU1 and SU2). Limnological parameters and trace element quantification were analyzed. From the sediment samples the solubilized was extracted for the accomplishment of tests. The bioassays with *A. cepa* were carried out by means of germinated seeds in exposure to water and sediment samples from each sampling station and negative (distilled water) and positive (MMS 4×10^{-4} mM) controls. The evaluation of toxicity parameters were obtained through analysis of germination and root growth and the cytogenetics evaluation involved the analysis of mitotic index, chromosomal aberration index, mutagenicity index in meristematic roots and frequency of micronuclei in F_1 of *A. cepa*. For biochemical analysis of oxidative stress, SOD, CAT, GST, GSH and LPO were quantified. In the statistical analysis, Shapiro-Wilk was used followed by ANOVA and Scott Knott ($p < 0.05$) and PCA to relate trace element data to biochemical data. Trace elements above the legislation were quantified in Duas Bocas (Zn), Rio Bonito (Fe, Zn and As), and Suíça (Zn, Ni and Fe), mainly in samples from the first campaigns. Rio Bonito and Suíça dams revealed a possible cytotoxic, mutagenic and genotoxic potential in the campaigns for both water and sediment samples. Duas Bocas dam presented cytotoxic and genotoxic potential. The cytogenetic damages were higher in the sediment samples, especially in SU2 during the first campaign, suggesting relation with the concentrations of Ni and Zn in this sampling station. In the biochemical analysis, the samples of the first campaign shows higher activity, and according to PCA, the activity of these enzymes were possibly related to the concentrations of certain metals in the samples. The relation between cytogenetic data and biochemical biomarkers was close, especially in water samples, and we can affirm that *A. cepa* is an excellent organism test to verify environmental quality, complementing the physical and chemical analyzes performed in biomonitoring polluted environments.

Keywords: cytotoxicity • enzymes • genotoxicity • mutagenicity • oxidative stress • toxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 <i>Bacia do Rio Santa Maria da Vitória e Área de Estudo</i>	13
2.2 <i>Classificação dos Corpos Hídricos</i>	16
2.3 <i>Biomonitoramento Ambiental</i>	18
2.4.1 <i>Taxa de germinação e crescimento radicular</i>	23
2.4.2 <i>Testes citogenéticos</i>	24
2.5 <i>Estresse Oxidativo</i>	27
3. OBJETIVO GERAL	30
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 <i>Área de estudo e delineamento experimental</i>	31
5.2 <i>Parâmetros limnológicos</i>	32
5.3 <i>Quantificação dos elementos-traço</i>	36
5.4 <i>Análise do índice de germinação (GI) e índice de crescimento radicular (CR)</i>	36
5.5 <i>Avaliação citogenética em Allium cepa L.</i>	37
5.6 <i>Análise dos Biomarcadores Bioquímicos</i>	38
5.6.1 <i>Concentração de Proteína</i>	38
5.6.2 <i>Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)</i>	38
5.6.3 <i>Atividade da Enzima Catalase (CAT)</i>	39
5.6.4 <i>Atividade da Glutathione s-transferase (GST)</i>	39
5.6.5 <i>Quantificação da Glutathione Reduzida (GSH)</i>	40
5.6.6 <i>Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO)</i>	41
5.7 <i>Análises Estatísticas</i>	41
6 RESULTADOS	42
6.1 <i>Parâmetros limnológicos</i>	42
6.2 <i>Quantificação dos elementos-traço</i>	43
6.2 <i>Análise do índice de germinação (GI) e índice de crescimento radicular (CR)</i>	48
6.3 <i>Avaliação citogenética em Allium cepa L.</i>	48
6.4 <i>Análise dos biomarcadores bioquímicos</i>	53
7. DISCUSSÃO	58
7.1 <i>Represa de Duas Bocas</i>	58
7.2 <i>Represa de Rio Bonito</i>	60
7.3 <i>Represa Suíça</i>	65
8. CONCLUSÃO	68
9. REFERÊNCIAS	69

1. INTRODUÇÃO

O aumento da quantidade de matéria orgânica e de poluentes nas águas e sedimentos está relacionado ao crescimento da população e seus efeitos antropogênicos de diversas fontes poluidoras, como efluentes industriais, domésticos e agroindustriais, reduzindo substancialmente a biodiversidade e a potencialidade de seus usos múltiplos (BAPTISTA; CARDOSO, 2013). Esses poluentes podem ser carregados para os cursos d'água, desaguando em reservatórios maiores, onde, devido à menor velocidade hidrodinâmica, poderão ficar depositados no sedimento ou na coluna d'água (CARDOSO-SILVA, 2014).

Dentre os ambientes hídricos passíveis de contaminação estão as três represas presentes na bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória: Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça. A represa de Duas Bocas está localizada dentro da Reserva Biológica de Duas Bocas, no município de Cariacica/ES e é utilizada para captação e abastecimento de água para o município (NOVELLI, 2010). As represas de Rio Bonito e Suíça estão localizadas nos municípios de Santa Maria de Jetibá e Santa Leopoldina, respectivamente, e atuam na geração de energia, além de regular o fluxo de água nos rios até a área de captação para abastecimento da população dos municípios da Grande Vitória (AGERH, 2016).

Para averiguar a qualidade ambiental desses corpos hídricos, os órgãos ambientais monitoram por meio de análise abiótica de amostras coletadas, não levando em consideração os testes de toxicidade, assim, pesquisas vêm sendo realizadas para detectar os efeitos dos poluentes em seres vivos, de forma complementar às análises abióticas (GROVER; KAUR, 1999; DUARTE et al., 2012; GALTER, 2016).

Estudos de toxicidade genética com vegetais superiores, por exemplo, oferecem informações importantes sobre os efeitos de poluentes sobre a molécula do DNA, mesmo quando expostos a curto prazo. Além disso, diversos estudos discutem a sua eficácia para o monitoramento e avaliação de danos causados à molécula de DNA por poluentes ambientais (MAZIVIEIRO, 2011; RODRIGUES et al., 2015; HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2017).

Dentre os vegetais superiores, o bioensaio com *Allium cepa* L é o mais utilizado na análise dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de poluentes presentes no ambiente. Além de ser considerado um teste rápido, sensível e de baixo custo, é indicado por suas células apresentarem cromossomos grandes, de número reduzido ($2n = 16$), com fácil visualização da atividade mitótica e dos danos nos cromossomos durante o ciclo celular em células meristemáticas de raízes (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Ainda em complementação às análises bióticas, os estudos da fisiologia do estresse oxidativo e atividade enzimática, que são determinadas pelas enzimas que atuam na maquinaria de reparo, como lipoperoxidação (LPO), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GSH), atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (FATIMA; AHMAD, 2005; SAKURAGUI et al., 2013) podem servir como biomarcadores da poluição ambiental.

Assim, integrando o monitoramento físico-químicos e limnológicos aos bioensaios, pode-se ter uma melhor caracterização ecotoxicológica do ambiente em estudo. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo a avaliação da contaminação das amostras de águas e sedimentos das represas presentes na bacia do Rio Santa Maria da Vitória, pelos parâmetros físico-químicos e ensaios toxicológicos em *A. cepa*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacia do Rio Santa Maria da Vitória e Área de Estudo*

A bacia do Rio Santa Maria da Vitória está localizada na região Centro-Sul do Estado do Espírito Santo e abrange 1.876 km², contemplando cinco municípios capixabas: Santa Maria de Jetibá e parte dos municípios de Cariacica, Santa Leopoldina, Serra e Vitória. A bacia é formada por diversos rios e córregos, sendo a nascente do Rio Santa Maria da Vitória (RSMV) considerada a do córrego Santa Maria, que nasce a aproximadamente 1.300 m de altitude, próximo ao povoado de Alto de Santa Maria, no município de Santa Maria de Jetibá, percorrendo cerca de 122 km até a sua foz, na baía de Vitória (OLIVEIRA, 2011).

De acordo com a Agência Estadual de Recursos Hídricos (AGERH) do Espírito Santo, a bacia do RSMV é dividida em três regiões (Figura 1):

- Alto Santa Maria da Vitória;
- Médio Santa Maria da Vitória;
- Baixo Santa Maria da Vitória.

A bacia possui três principais represas: a represa de Duas Bocas, que funciona como um reservatório para fins de abastecimento público, e duas represas que atuam como reservatório para usinas hidrelétricas, Rio Bonito e Suíça.

A represa de Duas Bocas foi construída nos anos de 1949 a 1954 e está localizada dentro da Zona Núcleo da Reserva Biológica de Duas Bocas, dentro da região do baixo Santa Maria da Vitória (SMV), possui uma área de 0,5 km² e uma vazão máxima regularizada de 0,25 m³/s, garantindo o abastecimento de toda a região da Grande Vitória por vários anos, mas hoje supre a necessidade de água para parte da população do município de Cariacica, sendo operado pela Companhia Espírito Santense de Saneamento - CESAN (AGERH, 2016). É importante ressaltar que a REBIO de Duas Bocas apresenta ecossistemas onde o homem pouco interferiu, dadas as limitações impostas pela topografia local, e também, porque é protegida para produção de água com fins de consumo humano (NOVELLI, 2010).

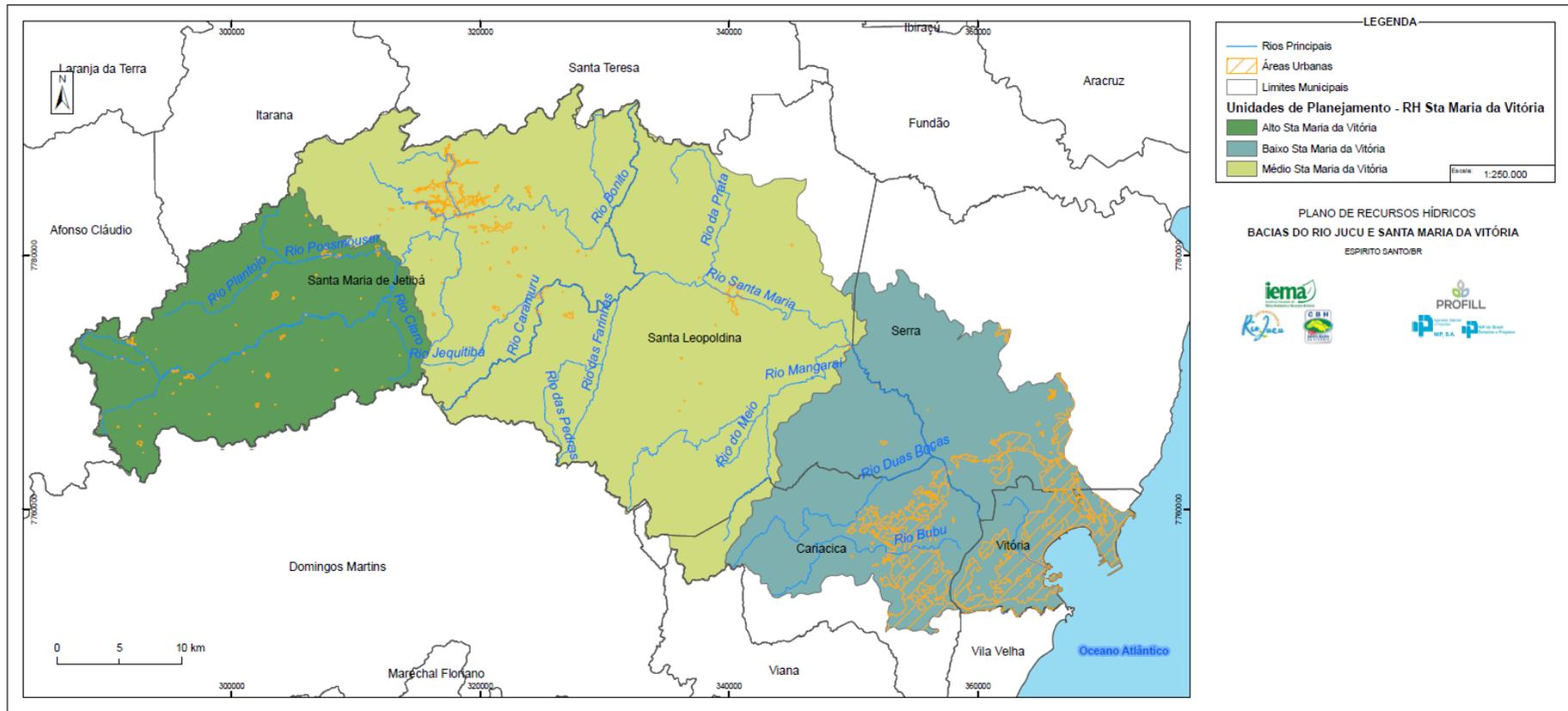


Figura 1: Mapa da classificação das regiões da Bacia do rio Santa Maria da Vitória/ES - Brasil

A represa Rio Bonito está localizada no município de Santa Maria de Jetibá, dentro da região do médio SMV e foi construída objetivando o aproveitamento do potencial hidráulico do RSMV para produção de energia, por sua acentuada declividade e proximidade (60 km de distância) com a capital do estado, Vitória. A construção da represa de Rio Bonito teve início em 1952 e foi inaugurada em 1959, gerando energia para o sistema Escelsa (Espírito Santo Centrais Elétricas S.A). Com área inundada de 2,2 km² e volume de 26.350.000 m³, tem capacidade instalada para geração de 22,5 MW de energia. A região da represa é cercada de uma vegetação densa e bem preservada, com pequenas propriedades produtoras de hortifrutigranjeiros (RUBIM, 2006).

A represa Suíça está localizada no médio SMV no município de Santa Leopoldina, cerca de 11 km da barragem da represa de Rio Bonito. Foi inaugurada em 1965 e possui área inundada de 0,6 km², volume de 1.300.000 m³, e capacidade instalada para geração de 34,5 MW de energia. Está cercada por região de pastagem, pequenas propriedades rurais e área de vegetação florestal (AGERH, 2016).

Uma característica importante observada em reservatórios é a existência de gradientes horizontais e verticais e um fluxo contínuo de água em direção à barragem. Esses gradientes são altamente influenciados pelo fluxo da água e as diferenças de nível que variam dependendo da sazonalidade na sua bacia de drenagem (TUNDISI, 1985). A maior parte da água, nutrientes e sedimento são provenientes de um ou dois tributários principais. Assim, ao longo desse gradiente em direção à barragem, ela é compartimentada em três zonas que apresentam peculiaridades físicas, químicas e biológicas distintas: a zona de rio, zona de transição e zona lacustre (THORTON et al., 1990).

A zona de rio é estreita, bem difundida e a força da água que chega auxilia no transporte de material fino particulado, como silte e argila. Devido à quantidade de nutrientes, sedimento e matéria orgânica que chegam nessa região da represa, a penetração da luz é reduzida e pode limitar o crescimento dos produtores primários (THORTON et al., 1990). A zona de transição apresenta um aumento da sedimentação e, conseqüentemente, a elevação da penetração da luz. A zona lacustre possui características semelhantes aos lagos, com baixa sedimentação de partículas inorgânicas e boa penetração de luz, propiciando a produção primária,

podendo apresentar estratificação (THORTON et al., 1990). Dessa forma, segundo Esteves (2011), os reservatórios são considerados ecossistemas híbridos, entre rios e lagos suas características específicas e posição na bacia de drenagem fazem dos reservatórios acumuladores de informações que são refletidas na composição da biota.

Assim, diversos estudos realizados em reservatórios indicam que atividades como agropecuárias, agrícolas, lançamentos de efluentes industriais e domésticos, ocupação desordenada das margens, diminuição da mata ciliar e outros fatores, ocasionam a perda da qualidade e disponibilidade da água (CUNHA-SANTINO et al., 2010; BUZELLI; CUNHA-SANTINO, 2013; FRASCARELI et al., 2015). Além disso, juntamente com todos esses fatores, e até mesmo por influência de alguns deles, ocorre a contaminação por elementos-traço desses corpos hídricos, comprometendo não somente a qualidade da água dos reservatórios, como os organismos que dele dependem (PEDRAZZI et al. 2013).

2.2 Classificação dos Corpos Hídricos

A Resolução do nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005) estabelece classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como designa as condições e padrões de lançamento de efluentes para todo o Território Nacional, de acordo com a origem, característica, componentes, destino e uso das águas de ambientes.

Art. 4º As águas doces são classificadas em:

I - classe especial: águas destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção;
- b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e,
- c) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

II - classe 1: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;
- d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e
- e) à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

III - classe 2: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA nº 274, de 2000;
- d) à 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; e
- e) à aquicultura e à atividade de pesca.

IV - classe 3: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) à pesca amadora;
- d) à recreação de contato secundário; e
- e) à dessedentação de animais.

V - classe 4: águas que podem ser destinadas:

- a) à navegação; e
- b) à harmonia paisagística

Ainda segundo o CONAMA (BRASIL, 2012), por meio da Resolução de nº 454/2012, que define diretrizes gerais e os procedimentos referenciais para o gerenciamento do material a ser dragado em águas sob jurisdição nacional e a sua disposição final, determina que:

Art. 10. Após a caracterização química do material a ser dragado, proceder-se-á sua classificação química, para fins de avaliar as condições de sua disposição observando os seguintes critérios:

II - para avaliação das alternativas de disposição em águas sob jurisdição nacional, os resultados da caracterização química devem ser comparados com os valores orientadores previstos na Tabela III do Anexo desta Resolução e classificados em dois níveis:

- a. Nível 1- limiar abaixo do qual há menor probabilidade de efeitos adversos à biota;
- b. Nível 2 - limiar acima do qual há maior probabilidade de efeitos adversos à biota

O Comitê da Bacia do Rio Santa Maria (CBH-SMV, 2016), com base na resolução nº 357/2005 do CONAMA, classifica as águas das represas na Bacia do Rio Santa Maria da Vitória como classe 2 e o sedimento das represas, com base na resolução nº 454/2012, são classificados como nível 1.

2.3 *Biomonitoramento Ambiental*

Ambientes aquáticos estão constantemente expostos a variações que podem resultar de ações naturais e/ou antrópicas, influenciando diretamente na qualidade ambiental do ecossistema. Grande parte dessas alterações de origem antrópica ocorrem na forma de contaminação e, na maioria das vezes, esses poluentes provêm de fontes não pontuais, dificultando os estudos para identificação das causas e avaliação dos impactos (TUCCI et al., 2001; SOUZA, 2014).

2.3.1 *Variáveis limnológicas*

Vários métodos são utilizados para avaliar a qualidade da água, onde os mais frequentes são os parâmetros limnológicos como: temperatura, potencial hidrogeniônico (pH), turbidez, oxigênio dissolvido, potencial de oxirredução e condutividade elétrica (CAMPOS, 2009).

Na água, a temperatura influencia os processos físico-químicos, oxidativo (decomposição da matéria orgânica) e na atividade dos organismos (respiração), sendo explicado pela regra de Van T'Hoff, onde a elevação da temperatura em 10 °C pode duplicar ou triplicar a velocidade das reações. A diferença de temperatura na coluna d'água causa diferentes camadas de água com diferentes densidades, distintas física, química e biologicamente, formando uma barreira física e impedindo a mistura entre as camadas (ESTEVES, 2011). Assim, a estratificação da coluna d'água é, na maioria das vezes, um efeito direto da temperatura na densidade da água.

A resolução CONAMA nº 357/2005 estabelece que para a proteção da vida aquática, o pH deve estar entre 6 e 9. Alterações nesses valores pode afetar o metabolismo de diversas espécies aquáticas, além de influenciar no efeito de substâncias químicas tóxicas para os organismos aquáticos, como elementos-traço (CETESB, 2009). Geralmente, um pH muito ácido ou muito alcalino, está associado à presença de despejos industriais (RODRIGUES et al. 2015) e também reflete o tipo de solo onde a água percorre (FRASCARELI, 2016). Em ambientes ácidos, os valores de pH podem estar relacionados à presença de ácidos orgânicos na água, como ácidos húmicos e fúlvicos, encontrados em águas escuras e ricas em substâncias húmicas (ESTEVES, 2011).

A turbidez é o grau de dificuldade de um feixe de luz em atravessar a coluna d'água, uma medida indireta para a quantidade de partículas presentes na água (CETESB, 2009). O grau de turbidez é influenciado principalmente pela estação chuvosa, como consequência da ressuspensão do sedimento para a coluna d'água, erosão das margens, levando matéria orgânica e nutrientes para dentro dos rios e lagos. Detritos orgânicos (algas, bactérias, plâncton), despejo de esgoto doméstico, efluentes industriais, agropecuários e mineração também podem aumentar a turbidez da água, provocando alterações no ecossistema aquático, principalmente na produção primária (CETESB, 2009; BUZELLI; CUNHA-SANTINO, 2013).

O oxigênio dissolvido (OD) é a concentração de oxigênio contido na água, sendo suas principais fontes a atmosfera (interface água – ar) e a atividade fotossintética dos organismos. Sua solubilidade depende basicamente da temperatura e pressão e sais presentes (CETESB, 2009). O OD na água também pode ser influenciado pela concentração de matéria orgânica dissolvida (MOD), que em contato com a luz solar é fotooxidada, consumindo grandes quantidades de oxigênio e reduzindo a concentração de OD, o que pode resultar no esgotamento de oxigênio do sistema (LINDELL; RAI, 1994; ESTEVES, 2011). Segundo Esteves (2011), em lagos tropicais a circulação da água pelo vento influencia a estratificação termal e química, movendo a água oxigenada para outras regiões da coluna d'água. Com a desestratificação da coluna d'água, o epilímnio (maior concentração de oxigênio) e o hipolímnio (pobre em oxigênio) se misturam. No epilímnio, a perda de oxigênio é compensada pela produção primária (fotossíntese) ou pela difusão a partir da atmosfera. No hipolímnio, ocorre grandes perdas de oxigênio por processos de decomposição aeróbica e de respiração dos organismos. A determinação da concentração de OD é fundamental na avaliação da qualidade das águas, estando envolvido em diversos processos químicos e biológicos (CETESB, 2009).

A medida do potencial de oxirredução foi ganhando importância no monitoramento ambiental nas últimas décadas, por ser uma análise de baixo custo e sua interpretação e medição exigem uma análise criteriosa (JARDIM, 2014). O potencial de oxirredução é influenciado por inúmeros fatores, como oxigênio dissolvido, pH e temperatura, em diferentes ambientes (águas subterrâneas, águas superficiais, sedimentos, etc.) e indica a medida da tendência de espécies químicas em receber (reduzir) ou doar elétrons (oxidar) (TEIXEIRA et al., 1999). Segundo

Esteves (2011), o processo de oxidação e redução dos compostos é mais óbvio na interface sedimento-água dos ecossistemas aquáticos. Esses processos são influenciados principalmente pelas concentrações de oxigênio da coluna d'água, que por sua vez, é dependente do nível de estratificação. Ainda segundo o autor, quando a coluna d'água encontra-se estratificada, a tendência é apresentar baixo teor de oxigênio dissolvido e baixo potencial redox na região próxima ao sedimento, criando condições físicas e químicas favoráveis à liberação de compostos (manganês, ferro, enxofre, carbono, compostos nitrogenados e etc.) para a coluna d'água a partir do sedimento. Em contrapartida, quando o consumo de oxigênio na parte inferior da coluna d'água diminui, proporciona um ambiente aeróbico e favorece a precipitação de íons, principalmente na forma de óxidos.

A condutividade elétrica é a capacidade de uma solução em conduzir corrente elétrica, assim, quanto maior a concentração de íons presentes na solução, espera-se uma maior condutividade elétrica. A atividade iônica também depende da temperatura, pH e da concentração de substâncias orgânicas que podem ser ionizáveis, fornecendo informações acerca do metabolismo do ecossistema aquático, como magnitude da concentração iônica, produção primária (redução dos valores, decomposição (aumento dos valores), diferenças geoquímicas dos afluentes de rios e lagoas, além de auxiliar na detecção de fontes poluidoras (ESTEVES, 2011). Segundo a CETESB (2009), em geral, níveis superiores a $100 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ indicam ambientes compactados. Os valores de condutividade em ambientes aquáticos de regiões tropicais são mais influenciados pelas características geoquímicas da região, condições climáticas e, principalmente em ambientes sobre ação antrópica, também podem estar relacionados ao estado trófico (ESTEVES, 2011).

2.3.2 Elementos-traços

Os elementos-traço são elementos químicos que estão presentes na natureza, normalmente em pequenas concentrações e inclui elementos de diferentes propriedades químicas, podendo ser um elemento traço em um determinado ambiente e abundante em outro, como o caso do alumínio, em que é abundante nas rochas e traço na água (ESTEVES, 2011). Ainda, alguns desses elementos são essenciais aos seres vivos, participando de importantes processos fisiológicos, como fotossíntese (Mg na formação da clorofila), cadeia respiratória (Fe e Cu formando o citocromo e Fe

a ferredoxina), fixação de nitrogênio (Mo atua na nitrogenase), cofatores enzimáticos e etc. Porém, quando em concentrações altas ou quando não possuem função na fisiologia dos organismos, podem apresentar toxicidade e até mesmo acumulação na cadeia trófica (FERREIRA et al., 2010; ESTEVES, 2011; CÉLICO, 2015).

Nos últimos anos, a emissão de elementos-traço no ambiente tem aumentado, causando impacto severo nos ecossistemas e comprometimento grave à saúde humana (MAJER et al., 2002; SEYLER; BOAVENTURA, 2008; SANTOS-FILHO, 2001). As principais atividades responsáveis pela contaminação por elementos-traços em solos e águas são por atividades industriais, agrícolas e urbanas, decorrendo em sérios problemas ambientais (BRIAT; LEBRUN, 1999; CAMPOS, 2009). Segundo Pascalicchio (2002) e Gomes e Sato (2011), além das atividades industriais, emissões naturais também podem estar relacionadas com a contaminação ambiental por elementos-traço.

Os elementos-traço são potencialmente mutagênicos e estão seriamente envolvidos com a poluição ambiental. Alguns elementos-traço induzem, comprovadamente, a formação de tumores em organismos experimentais e em seres humanos eventualmente expostos (FRIBERG et al., 1985; MATSUMOTO, 2004). Os elementos Fe, Se, Cd, Cr e Ni, por exemplo, são encontrados normalmente na alimentação em quantidades baixas, mas, quando em excesso, são considerados mutagênicos e/ou carcinogênicos (MINISSI; LOMBI, 1997). Os elementos-traço e seus metabólitos induzem alterações nas estruturas dos cromossomos, promovendo mutações de pontos em procariotos e eucariotos *in vivo* e *in vitro* (PASCALICCHIO, 2002).

Nas plantas, os elementos-traço são absorvidos preferencialmente pelas raízes, e depende da concentração dos elementos no solo e sua biodisponibilidade, além de ser modulada pelo pH, quantidade de matéria orgânica, pela temperatura, potencial redox e a presença de outros elementos (GREGER, 2004)

2.3.3 Biomarcadores e o monitoramento ambiental

O monitoramento e a avaliação de riscos ambientais das áreas impactadas não devem ser baseados apenas por dados de análises químicas, pois não avaliam os

efeitos desses fatores nos organismos que vivem e dependente daquele ecossistema (CAJARAVILLE et al., 2000; BARŠIENĖ et al., 2006; DUARTE et al., 2017).

Alguns autores (BUSS et al. 2003; BUSS et al., 2008; DUARTE et al, 2017) relatam a necessidade da integração dos aspectos físico-químicos com as características bióticas dos ecossistemas, podendo aumentar o potencial de identificação das causas e efeitos de estressores sobre o ambiente. A utilização de biomarcadores são utilizados com o objetivo de quantificar o impacto dessa exposição de organismos a xenobióticos. A definição de biomarcador é empregada como sendo uma modificação produzida por xenobióticos em componentes, processos celulares, bioquímicos, estruturais ou funções, mensurável em um sistema ou em uma amostra (HUGGETT et al., 1992). Assim, são utilizados com o objetivo de se ter melhor conhecimento sobre os efeitos e respostas fisiológicas de um organismo exposto a poluentes.

Um efeito tóxico se manifesta a nível subcelular antes de se tornar visível em níveis mais elevados de organização biológica. Os biomarcadores, por serem sensíveis a essas respostas, auxiliam na avaliação do risco de efeitos sobre a saúde e a sobrevivência de populações expostas aos compostos químicos (FATIMA; AHMAD, 2005), bem como, fornece informações sobre fatores que atuam na conservação, preservação, e recuperação ambiental da região monitorada (CETESB, 2009).

A avaliação ambiental utilizando bioensaios com *A. cepa* e cultura celular de fígado humano foi realizada por Segura et al. (2016), ao trabalhar com água e sedimento do Rio Doce após o desastre ambiental em decorrência do rompimento de uma barragem de rejeitos de minério que ocorreu em 2015 na região de Bento Rodrigues/MG, avaliaram aspectos físico-químicos e bióticos das amostras coletadas. Os autores observaram potencial citotóxico e dano no DNA provocado por compostos presentes nas amostras coletadas. Os autores ainda ressaltam que o isolamento e a identificação de todos os poluentes presentes nas amostras de sedimento e água são difíceis de serem observados, um problema que mostra a importância do uso de biomarcadores auxiliando as técnicas analíticas complexas para avaliar a qualidade dos recursos naturais poluídos.

A análise integrada de aspectos abióticos e bioensaios toxicogenéticos em *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* (tilápia) e células de mamíferos, foram realizadas por Galter (2016), com o objetivo de avaliar a qualidade de amostras de água do Rio Itapemirim/ES, onde observou-se que as variáveis abióticas estavam de acordo com a legislação brasileira do Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) (Resolução CONAMA nº 357/2005), porém, pelos bioensaios constatou que os compostos presentes nas amostras de água apresentaram potencial fitotóxico, genotóxico e mutagênico.

Em outro estudo realizado por Souza et al. (2013a) em estuários neotropicais afetados por diferentes fatores antrópicos, foi observada a relação de biomarcadores genéticos, bioquímicos e morfológicos com a saúde de uma espécie de peixe nativo da região (*Centropomus parallelus*). Os autores ressaltaram que as estatísticas multivariadas, incluindo parâmetros físicos, químicos e biológicos, apresentam-se como uma ferramenta adequada, integrando dados de diferentes origens presentes no mesmo estuário.

2.4 Bioensaios em *Allium cepa* L.

2.4.1 Taxa de germinação e crescimento radicular

O ensaio de toxicidade em sementes de plantas superiores avalia, ao mesmo tempo, o efeito fitotóxico dos processos de germinação e desenvolvimento da raiz. Nos primeiros dias da germinação, o embrião da semente pode ter sua fisiologia e morfologia alterada negativamente por fatores externos (ambientais, substâncias tóxicas) e fatores internos (dormência, hormônios inibidores), influenciando no desenvolvimento e crescimento normal da planta (DUTKA, 1989; LEWIS, 1995; CASTILLO, 2004). A análise da germinação (GE) e do crescimento radicular (CR) é rápida, barata, confiável e fundamenta-se em quantificar as sementes germinadas e mensurar a elongação radicular durante a exposição a poluentes tóxicos, sendo um dos testes mais utilizados para avaliar o potencial toxicológico de substâncias (GOPALAN, 1999; VALERIO et al., 2007; PALMIERI, 2012; BERNARDES, 2014; GALTER, 2016).

A avaliação da taxa de germinação da semente e comprimento da raiz pode ser relacionada com a toxicidade, quando mantidas as mesmas condições de

germinação do teste-controle, avaliando o potencial tóxico de um composto e sua influência no processo de germinação. Em alguns casos, a concentração das substâncias tóxicas ou efluentes pode não ser suficiente para inibir a germinação, mas se a concentração for alta o suficiente, pode comprometer o processo de crescimento da radícula (SOUZA, 2011). Desta forma, o efeito fitotóxico observado na germinação e alongamento da radícula aponta boa sensibilidade e se complementam no que se refere aos efeitos biológicos em organismos vegetais (ANDRADE et al., 2010; SOUZA, 2011; YOUNG et al. 2012).

2.4.2 Testes citogenéticos

Desde a década de 70, bioensaios com plantas superiores são utilizados como indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos na detecção de poluentes ambientais (GRANT, 1994). Dentre as espécies de plantas superiores, *A. cepa* (cebola) é indicada para avaliar diversos parâmetros genéticos, como mutações e aberrações cromossômicas, pois possui grandes cromossomos em número reduzido ($2n = 16$), facilitando a visualização das alterações citogenéticas. Essas alterações observadas durante o ciclo mitótico podem ser classificadas como genotóxicas e mutagênicas, por meio das anormalidades cromossômicas e formação de micronúcleos, respectivamente (FISKESJÖ, 1985; LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A análise do ciclo celular permite determinar a atividade citotóxica de compostos quando este diminui a da frequência de divisão celular e, quando ocorre o aumento da frequência de divisão, pode resultar na formação de tumores (HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009).

As aberrações cromossômicas podem ocorrer por alterações na estrutura cromossômica ou no número de cromossomos, de forma natural ou como consequência da exposição a agentes físicos ou químicos (HOUK, 1992). As alterações induzidas podem ser classificadas como:

Aderência cromossômica ocorre quando uma alteração estrutural ou no número de cromossomos, causando perda das características normais de condensação, como uma maior contração cromossômica, ocasionando uma aderência dos cromossomos (BABICH et al., 1997; LEME; MARIN-MORALES, 2009; FERNANDES et al., 2009). De acordo com Fiskesjö e Levan (1993), Marcano e Del-

Campo (1995) e Marcano et al. (1998), a ocorrência de aderência cromossômica é frequente em casos de danos tóxicos no material genético e é, provavelmente, um efeito irreversível, pois envolve a matriz protéica da cromatina e não o próprio DNA, levando a morte celular.

A C-metáfase ocorre por alteração nas tubulinas no fuso mitótico durante a metáfase, interferindo na polimerização dos microtúbulos e, conseqüentemente, impedindo a formação dos fusos mitóticos na migração dos cromossomos para os polos (ANTHONY; HUSSEY, 1999; BOGITSH et al., 1999; FERNANDES et al., 2009). Assim, nenhuma placa equatorial é montada, levando a uma interrupção da divisão celular e os cromossomos são observados espalhados pela célula, condensados e com o centrômero bem definido (FISKESJÖ, 1985; FISKESJÖ; LEVAN, 1993; FERNANDES et al., 2009).

As pontes, quebras cromossômicas são, de acordo com Marcano et al. (2004), consequência da aderência cromossômica. A aderência determina pontes cromossômicas, uma vez que seus cromossomos tendem a permanecer juntos e, se separados, causam quebras cromossômicas. Quando surge com a quebra terminal no cromossomo de ambas as cromátides e a re-associação delas logo após a quebra.

Perdas cromossômicas são resultado de alterações no fuso mitótico, sendo observadas principalmente em metáfases, anáfases e telófases (FERNANDES et al. 2007). A inibição da polimerização do fuso mitótico, durante a anáfase, pode induzir uma ligação unilateral do fuso aos cromossomos, impedindo o seu movimento para os pólos. O cromossomo tende a permanecer disperso no citoplasma, caracterizando perdas genéticas (SHAMINA et al., 2003). Esse material genético, sem uma orientação de fuso adequada, migra de forma aleatória para cada célula filha e assim são formadas células com alterações no número cromossômicos (aneuploidia) (FERNANDES et al., 2009).

A mitose multipolar pode ser definida pela presença de mais de um fuso acromático durante o ciclo mitótico. Provavelmente ocorre quando dois centrossomos dividem-se duas vezes durante o ciclo (FERNANDES et al., 2007; MALUF; RIEGEL, 2009). A ocorrência de mais de um centro organizador de microtúbulos acompanhada pela inibição da citocinese e restrições na formação do fuso mitótico, contribui para uma segregação desigual dos cromossomos, induzindo a formação de anafas

multipolar e, conseqüentemente, a presença de células polinucleadas (OCHI et al., 2003; FERNANDES et al., 2009)

O efeito mutagênico pode ser observado por danos ao DNA quando a molécula está exposta a agentes mutagênicos, resultando em uma fragmentação cromossômica acêntrica (origem clastogênica) ou perda de cromossomos inteiros (aneugênica) que quando não reparados, o dano poderá ser fixado e expresso em micronúcleo (MN) após um ciclo de divisão celular (Figura 2) (FENECH et al., 1997; FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003, SOUZA et al., 2013b). O MN caracteriza-se por uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal e sua formação também pode ocorrer a partir de pontes cromossômicas que quando se rompem e ocorre uma quebra, podem originar um micronúcleo (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Além da análise de aberrações cromossômicas em raízes meristemáticas pelo teste do *A. cepa*, diversos pesquisadores (CARITÁ, 2010; BONOMO, 2014; MOROZESK, 2014; GALTER, 2016) também realizaram a análise na região F₁ da raiz, onde é avaliada a frequência de MN, pois, quando comparadas às células meristemáticas, apresentam um índice mitótico bem inferior e um alto grau de sincronia em intérfase. A região F₁ das raízes é a região imediatamente acima da região meristemática da raiz. Após a mitose nas células meristemáticas, os possíveis danos causados ao DNA dessas células, quando não reparados, serão observados na forma de MN nas suas células filhas (MA et al., 1995).

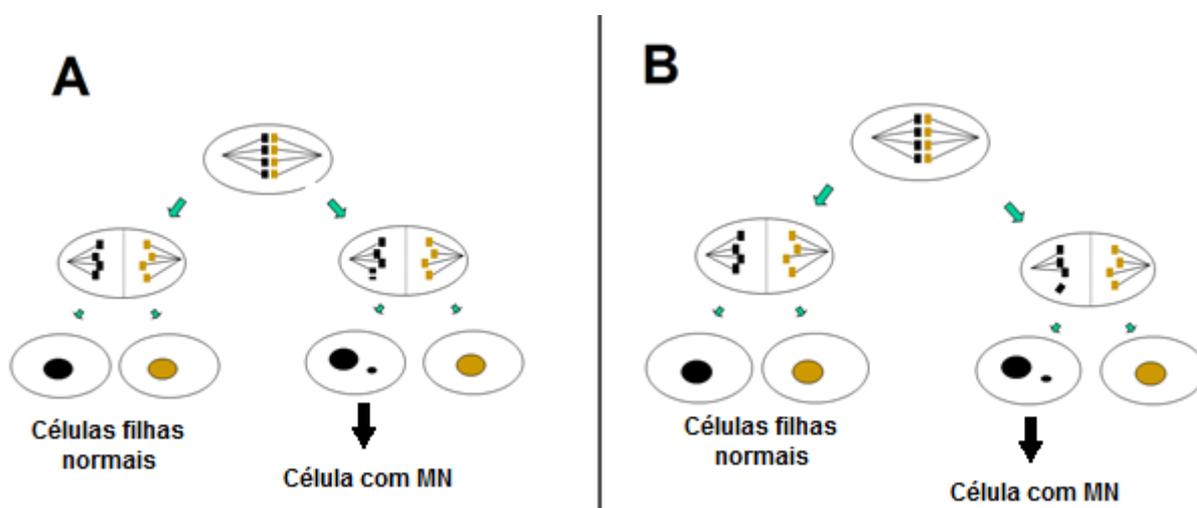


Figura 2: Formação de Micronúcleos em células. A - formação de MN por quebra cromossômica; B - formação de MN por perda cromossômica.

Estudos da qualidade da água, utilizando *A. cepa* como organismo teste foram realizados por Manan e Malakahman (2016) com as amostras de água do rio Perak, na Malásia. Os autores relataram que presença de substâncias genotóxicas e mutagênicas nas amostras de água coletadas foram baseadas em deformações na morfologia da raiz, crescimento radicular e alterações citogenéticas em células meristemáticas de *A. cepa*. Resultados semelhantes foram observados por Gomes et. al (2015), quando analisaram amostras do rio Guandu, no Rio de Janeiro e encontraram diferenças significativas no índice mitótico, crescimento radicular, alterações no ciclo celular, formação de micronúcleos e ainda relataram diferença nas amostras entre períodos de estiagem e chuvoso. Evidenciando que o sistema teste do *A. cepa* funciona como ótimo indicativo de poluição e degradação de ambientes aquáticos.

2.5 Estresse Oxidativo

A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) ocorre naturalmente durante a respiração e fotossíntese, porém, estressores abióticos podem aumentar a concentração de EROs produzidos pela planta. São muitos os fatores estressores, como radiação UV, luminosidade intensa, herbicidas, seca, elementos-traço, concentração elevada de sais, poluições diversas e outros (SCANDALIOS et al, 2000; MALLICK; MOHN, 2000). Para combater e minimizar as EROs, as plantas possuem mecanismos de proteção antioxidante enzimático, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione s-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e processos não enzimáticos, como os compostos secundários: carotenos, xantofilas e etc. (MITTLER, 2002; ASHRAF, 2009).

As superóxidos dismutases (SOD) são responsáveis pela conversão dos íons superóxido em peróxido de hidrogênio, permitindo que ele seja eliminado pela ação das peroxidases do ascorbato, atenuando os efeitos tóxicos destes íons (LEE et al., 2000). Elas constituem uma família de metaloenzimas que são classificadas de acordo com seu sítio ativo para metais, como por exemplo, cobre/zinco (Cu/ZnSOD), presente no cloroplasto e ferro (FeSOD) ou manganês (MnSOD), presentes na matriz mitocondrial (SCANDALIOS, 1993). Ela atua como a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das espécies reativas de oxigênio (GILL; TUTEJA, 2010).

As catalases (CAT) podem ser encontradas nos glioxissomos durante o processo de germinação das sementes, em peroxissomos e também podem estar presentes em mitocôndrias e no citoplasma (MONTAVON et al., 2007). Elas são a principal via de decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 , removendo este peróxido gerado por oxidases envolvidas na oxidação de ácidos graxos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (GILL; TUTEJA, 2010).

A glutatona reduzida (GSH) está presente em todos os organismos aeróbicos e possui um papel essencial na biotransformação e eliminação de compostos químicos e na defesa de células contra o estresse oxidativo. A GSH possui um agrupamento sulfidril (SH) em sua composição e isso permite que ela seja um excelente redutor de EROs (HUBER et al., 2008). Em ação com a GSH, as glutatona transferases (GST) atuam catalisando a conjugação de GSH a xenobióticos (DIXON et al., 2012). As GSTs são proteínas encontradas preferencialmente no citoplasma (MARRS, 1996). Várias classes de GST foram identificadas em plantas respondendo aos mais diversos tipos de estressores bióticos ou abióticos, principalmente herbicidas (DIXON et al., 2012).

A produção de EROs também pode iniciar o processo de peroxidação lipídica (LPO) nas membranas celulares, ou seja, radicais livres capturam elétrons dos lipídios nas membranas celulares, formando hidroperóxidos de lipídeos. Esse processo de peroxidação lipídica de membrana é um dos eventos mais significativos do estresse oxidativo, pois causa alterações importantes nas membranas, diminuindo sua fluidez, alterando a permeabilidade iônica e outras funções (QUEIROZ et al., 1998). Os eventos que podem decorrer da diminuição da fluidez das membranas incluem perturbação nas funções das proteínas, a perda de compartimentalização da célula, desregulação na liberação de íons e outros eventos que alteram o metabolismo normal, levando ao desequilíbrio e perda das funções essenciais (AZIZ; LARHER, 1998). A formação desses hidroperóxidos devido à peroxidação lipídica pode ser controlada pela ação das GSTs, auxiliando na detoxificação de compostos endógenos (PRABHU et al., 2004). Pesquisas utilizando biomarcadores de peroxidação lipídica e DNA tem demonstrado que o estresse oxidativo pode ser um parâmetro de ligação entre a toxicidade ambiental e processos de múltiplos estágios carcinogênicos (ZIECH et al., 2010).

A análise de biomarcadores bioquímicos na avaliação do estresse oxidativo em estudos ecotoxicológicos torna-se importante, pois, diversos poluentes ambientais induzem a formação de EROS por meio de diferentes mecanismos bioquímicos (reações redox, reação de Fenton, metabolismo oxidativo), levando a um desequilíbrio fisiológico e uma diminuição nas defesas oxidantes de um organismo (REGOLI et al., 2002; SOHAL et al., 2002; VALAVANIDIS et al. 2006).

A quantificação de biomarcadores bioquímicos antioxidantes como GST, SOD e CAT, para avaliar poluição de elementos-traços utilizando o sistema teste do *Allium cepa* foi realizada por Fatima e Ahmad (2005), e os autores observaram que a atividade da GST aumentou consideravelmente após o tratamento de bulbos de *A. cepa* com os elementos-traços Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn. No entanto, quando aumentada a concentração dos elementos individuais, a atividade da SOD e da CAT demonstraram um declínio acentuado, enquanto a atividade da GST continuou aumentando. Ainda no mesmo trabalho, bulbos de *A. cepa* tratados com resíduos industriais demonstraram reação semelhante às concentrações individuais dos elementos, sugerindo haver elementos-traço nas amostras de água residuais. Quando realizada a espectrofotometria nas amostras, detectou a presença de grandes quantidades de Cd, Cr, Cu, Hg, Pb e Zn, confirmando que enzimas antioxidantes podem atuar como biomarcadores para detecção de elementos-traço em águas residuais.

Estudos realizados por Patnaik et al. (2013) na investigação da genotoxicidade do cromo (Cr) em bioensaios com *A. cepa* em diferentes concentrações por cinco dias, os autores observaram que em doses elevadas (25-200 μM), ocorreu a inibição do crescimento radicular, que foi correlacionada com o aumento dependente da dose na geração de EROs, na peroxidação lipídica e na repressão da CAT, SOD, APX, além de induzir danos no DNA, aberrações nucleares e formação de micronúcleos em células radiculares. Os autores também notaram que quando a duração do tratamento com Cr foi limitada a 3-24h, seguida por recuperação em água de torneira por quatro dias, o efeito foi inverso. Os autores concluíram que o Cr tem função dose-dependente (concentração x tempo) na inibição ou aumento da atividade das enzimas antioxidantes e consequentemente, nos danos citogenéticos, evidenciando a eficiência das enzimas antioxidantes na inibição de danos ao DNA causados pelo estresse oxidativo.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade das amostras de águas e sedimento das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, pertencentes à bacia Rio Santa Maria da Vitória, pela análise integrada de parâmetros abióticos e ecotoxicológicos a partir de estudos citogenéticos e fisiológicos em *Allium cepa*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar os parâmetros limnológicos e concentração de elementos-traço das amostras de águas e sedimentos das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça.

- b. Averiguar o potencial de toxicidade das amostras de água e sedimento das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, por meio da taxa de germinação e crescimento radicular em sementes de *A. cepa*.

- c. Avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das amostras de água e sedimento das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, por meio de testes citogenéticos em ensaios com espécimes de *A. cepa*.

- d. Analisar as alterações no metabolismo fisiológico de *A. cepa* expostas às amostras de água e sedimento das represas Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça.

- e. Comparar as alterações citogenéticas e fisiológicas entre as estações amostrais e campanhas realizadas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Área de estudo e delineamento experimental

A bacia hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória ($A = 1.563 \text{ km}^2$), possui três represas (Figura 1). A represa de Duas Bocas – DB ($A = 0,5 \text{ km}^2$ e $Z_{\text{max}} = 10,0 \text{ m}$), na Reserva Biológica (ReBio) de Duas Bocas ($A = 29,1 \text{ km}^2$), abastece uma parcela da população do município de Cariacica (ES) por meio da Estação de Tratamento de Água, operada pela Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN). As represas de Rio Bonito – RB ($A = 2,2 \text{ km}^2$ e $Z_{\text{max}} = 30,0 \text{ m}$) e Suíça – SU ($A = 0,6 \text{ km}^2$ e $Z_{\text{max}} = 5,0 \text{ m}$) produzem água para as usinas hidrelétricas – UHEs controladas pela empresa EDP. O padrão limnológico da represa da ReBio de Duas Bocas é mesoeutrófico, monomítico com estratificação na primavera e verão, com fundo anóxico e máximo metalimnético com cianobactérias (DELAZARI-BARROSO et al., 2009). Enquanto a bacia hidrográfica da represa DB é coberta por floresta as bacias das represas RB e SU são caracterizadas por fragmentos de florestas e atividades agropastoris, sendo que o córrego São Luiz que drena a área urbana do Município de Santa Maria de Jetibá (31.176 habitantes em 2010) (IBGE, 2011) desagua na porção superior da represa de RB. Para caracterização da água e sedimento das represas, foram definidas estações amostrais ao longo das represas, observando as zonas de compartimentação de cada uma (zona de rio, zona de transição e zona lacustre):

- Represa de Duas Bocas (Figura 3):

DB (zona de rio): latitude -20.265041 e longitude -40.489189

- Represa Rio Bonito (Figura 4):

RB1 (zona de rio - chuvoso): latitude -20.031403 e longitude -40.687811

RB1 (zona de rio – seco): latitude -20.025408 e longitude -40.670096

RB2 (zona de transição): latitude -20,0356538 e longitude -40,6537538

RB3 (zona lacustre): latitude -20,0567542 e longitude -40,6471418

- Represa Suíça (Figura 5):

SU1 (zona de rio): latitude -20.081425 e longitude -40.584545

SU2 (zona de rio): latitude -20.082619 e longitude -40.579105

Foram realizadas coletas de amostras de água subsuperficial e de sedimento, em duas campanhas amostrais, Março e Novembro de 2016. Durante as coletas, foram aferidos parâmetros limnológicos em campo.

As amostras de água coletadas para quantificação de elementos-traço e realização dos bioensaios com *Allium cepa*, foram armazenadas em frascos de polietileno previamente descontaminados com Extran 2% e ácido nítrico, acondicionadas em refrigeração até a realização dos ensaios. As amostras de sedimento foram coletadas por meio do equipamento Draga Ekman aço inox, sendo armazenados em sacos plásticos e mantidos congelados em freezer a -15°C. Posteriormente, as amostras de sedimento foram processadas para obtenção do solubilizado para realização dos ensaios.

Para obtenção do solubilizado, seguiram-se as normas da ABNT NBR ISO 10006. As amostras foram secas em estufa à temperatura de 42°C até peso constante e, posteriormente, peneiradas em malha 9,5mm. Foram adicionados 250 g de amostra seca em 1000 mL de água destilada. A solução foi agitada em baixa velocidade por 5 min e mantida em repouso por 7 dias na temperatura de 25°C. Passado esse período, o sobrenadante foi coletado e filtrado em membrana filtrante com 0,45 µm de porosidade.

Sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme, de mesmo lote (TOPSEED - Lote 047138, Germinação 85%, Pureza 99%) foram utilizadas objetivando a homogeneidade genética e fisiológica.

5.2 Parâmetros limnológicos

Durante a amostragem os dados foram obtidos por meio de uma sonda multiparâmetro do tipo Horiba U53 e foram aferidos parâmetros como condutividade (µS/cm), temperatura (° C), oxigênio dissolvido (mg/L), turbidez da água, pH e potencial de oxirredução por meio de sonda multiparâmetro.

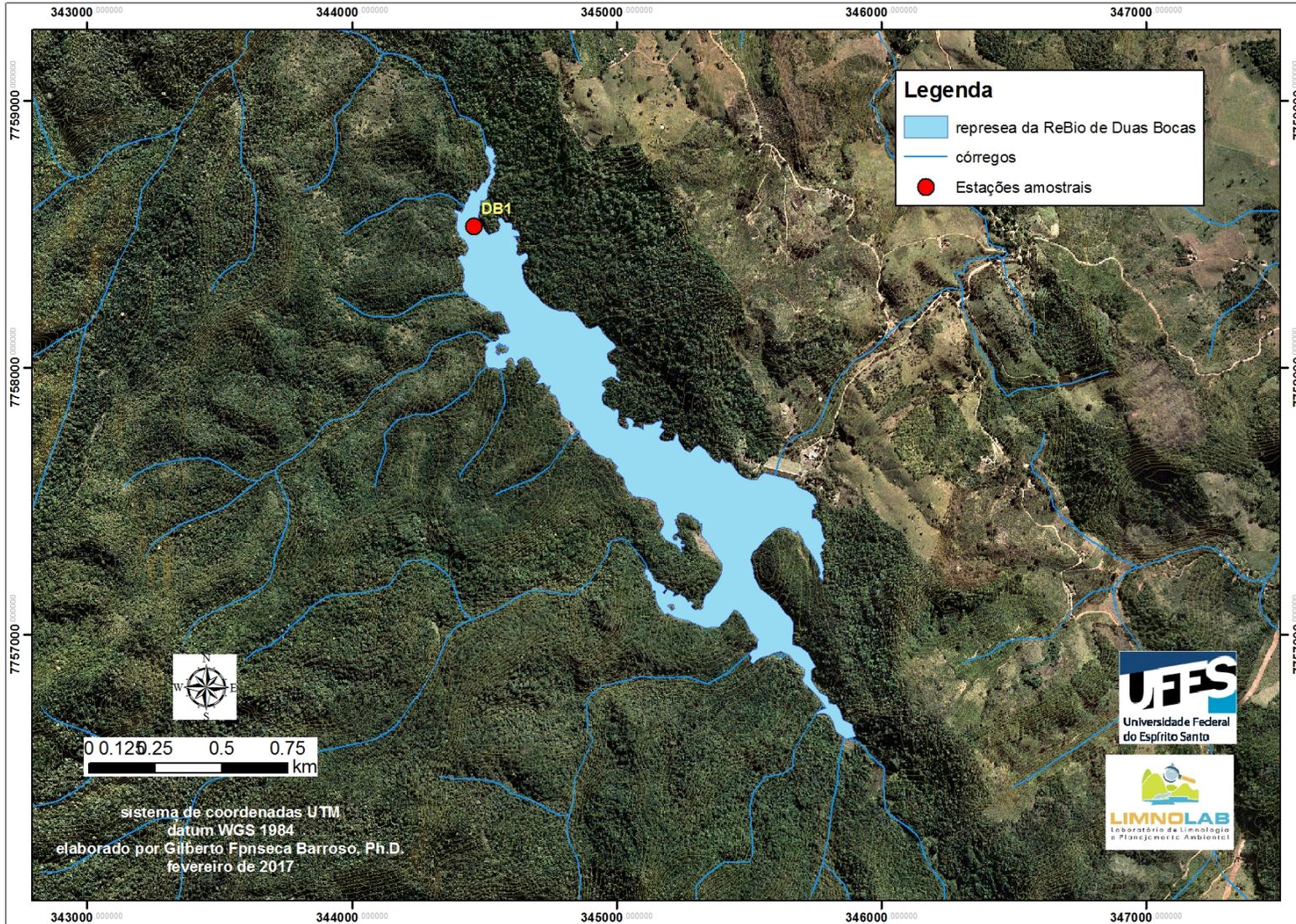


Figura 3: Estação amostral da represa de Duas Bocas, localizada no município de Cariacica/ES

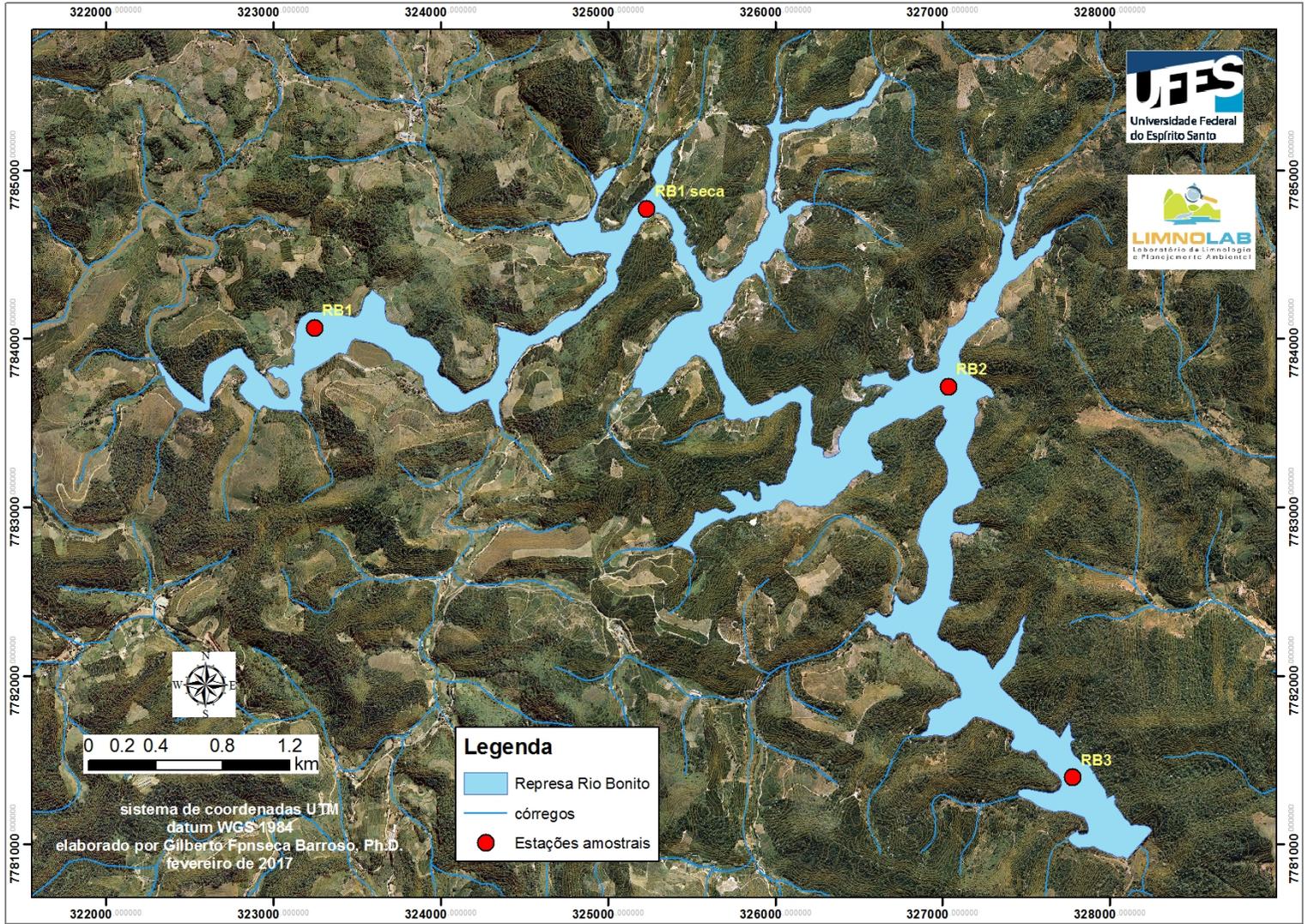


Figura 4: Estações amostrais ao longo da represa de Rio Bonito, Santa Maria de Jetibá/ES.

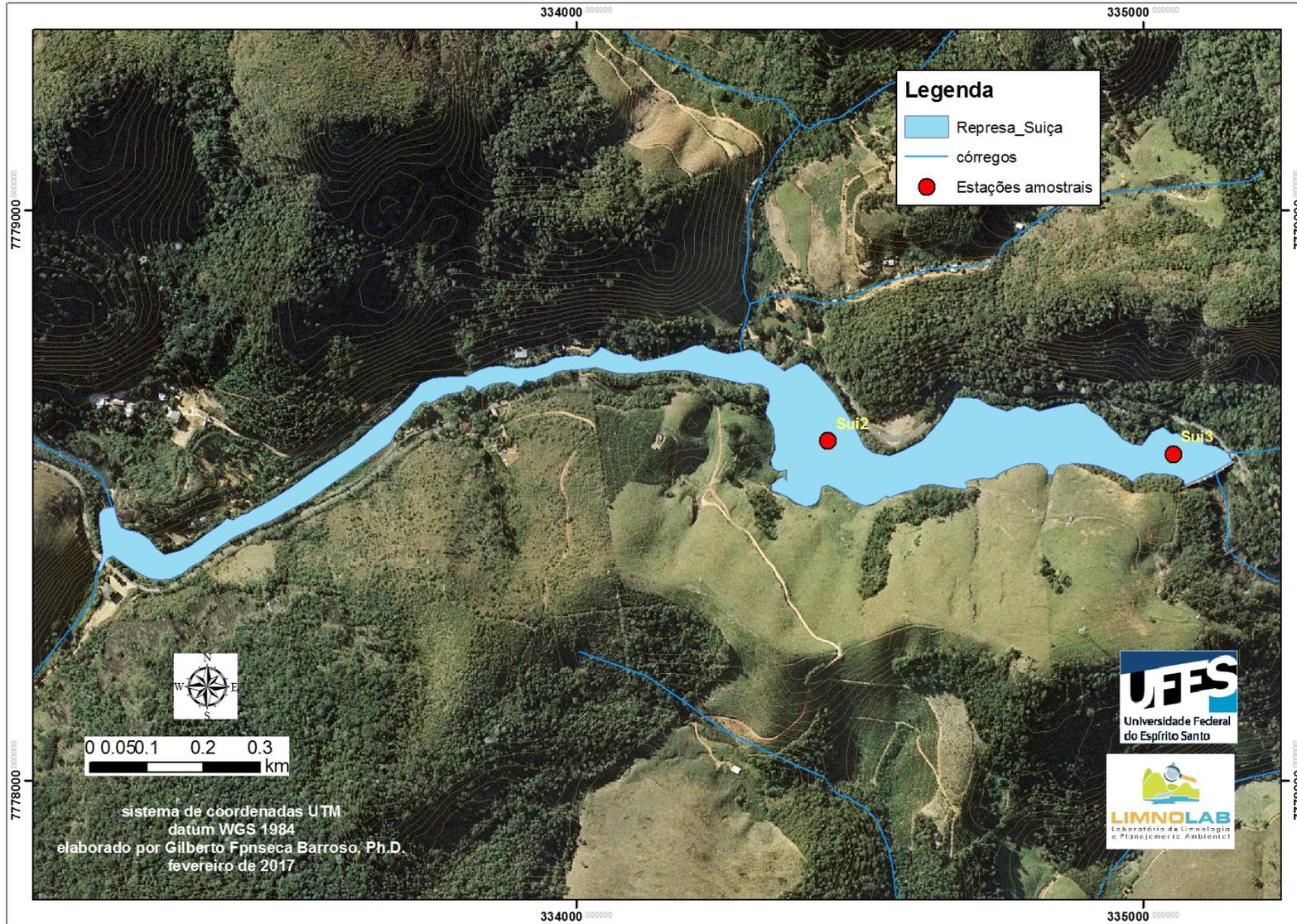


Figura 5: Estações amostrais ao longo da represa Suíça, Santa Leopoldina/ES.

5.3 Quantificação dos elementos-traço

A quantificação dos elementos-traço foi realizada no Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA) do LabPetro, na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

As amostras de água foram filtradas e acidificadas com HNO₃ concentrado até 2%, armazenadas em tubo falcon e guardadas em geladeira. As amostras de sedimento foram secas em estufa a 60°C até peso constante e peneiradas em uma tela de nylon com 2mm de abertura; posteriormente foram armazenadas em sacolas descontaminadas e hermeticamente fechadas. O branco de preparo foi submetido aos mesmos procedimentos que as amostras. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

A quantificação dos elementos-traço (mg/L⁻¹) Chumbo (Pb), Cádmio (Cd), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Níquel (Ni) e Arsênio (As) foram determinados por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), em aparelho Optima 7000DV (PerkinElmer, Alemanha). E os elementos-traço Ferro (Fe), Manganês (Mn), Alumínio (Al), Zinco (Zn) foram determinados por Espectrometria de Emissão de Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), modelo Optima 7000DV (PerkinElmer, Alemanha).

5.4 Análise do índice de germinação (GI) e índice de crescimento radicular (CR)

Foram colocadas para germinação, em tratamento contínuo e delineamento inteiramente casualizado, 50 sementes de *A. cepa* da variedade Baia Periforme por placa de Petri, sendo três placas por tratamento como repetições. As placas foram forradas com papel filtro e as sementes foram expostas às amostras de água e solubilizado correspondentes às estações amostrais descritas no item 5.1 e aos controles por 120 horas e 24°C. Para o controle negativo (CON), foi utilizada água destilada e para o controle positivo (CON+), Metil Metano Sulfonato - MMS - na concentração final de 4x10⁻⁴mM).

Após o período de germinação, as sementes germinadas contabilizadas e as radículas foram medidas com auxílio de paquímetro digital. As raízes foram, então,

fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma de ácido acético) por 24 horas para realização dos ensaios citogenéticos.

5.5 Avaliação citogenética em *Allium cepa* L.

O teste do *A. cepa* utilizando células meristemáticas e da região F₁ foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com modificações. Após a fixação das raízes em Carnoy 3:1 (metanol: ácido acético), elas foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N (60°C) por 11 minutos, seguido por lavagem em água destilada. A coloração foi realizada pelo método de Feulgen, na qual as raízes foram expostas ao reativo de Schiff, por duas horas na ausência de luz.

Para a confecção das lâminas foram isolados o meristema e a região F₁ das raízes. O material foi colocado na lâmina com uma gota de carmim acético (1%), recoberto por lamínula e, em seguida, o material foi espalhado na lâmina pelo método de esmagamento suave. Posteriormente, as lamínulas foram destacadas em nitrogênio líquido e as lâminas fixadas com lamínula e Bálsamo do Canadá.

Foram analisadas, em microscópio de luz, cinco lâminas por tratamento de cada campanha, sendo avaliadas 1000 células por lâmina, no total de 5000 células por tratamento. As fases celulares e as alterações durante a mitose foram listadas para realização do cálculo do índice mitótico (MI), o índice de aberrações cromossômicas (CA) e a frequência de quebras cromossômicas e micronúcleos (IMUT), segundo Leme e Marin-Morales (2009). Para a análise do índice mitótico, que avalia a citotoxicidade, foi calculada a razão:

$$MI = \left(\frac{n^{\circ} \text{ total de células em divisão}}{n^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \right) \times 100$$

Para determinar a genotoxicidade, medida pelo CA, foram consideradas as alterações nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como: ponte, c-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência e perda cromossômica:

$$CA = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{n^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \right) \times 100$$

O índice de mutagenicidade (IMUT) foi obtido por meio da frequência de células portadoras de quebras cromossômicas e micronúcleos:

$$IMUT = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células com MN e quebra cromossômica}}{n^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \right) \times 100$$

Após a análise da região F₁ foi calculada a frequência de micronúcleos em células F₁:

$$MN - F1 = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de células com MN em células F1}}{n^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \right) \times 100$$

5.6 Análise dos Biomarcadores Bioquímicos

Para avaliação da atividade dos biomarcadores bioquímicos, foram germinadas 50 sementes em 5 placas de Petri por tratamento, até que as raízes atingissem 1cm de comprimento. Após a germinação, as raízes foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, sendo mantida refrigerada (-80 °C) até o momento da análise. As análises foram realizadas no Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa da Universidade Federal de São Carlos/SP.

5.6.1 Concentração de Proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), adaptado para microplaca, onde 2 µL do homogeneizado foi adicionado em 240 µL de Coomassie Blue. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a λ= 595 nm, utilizando-se, como padrão, a curva de albumina sérica bovina.

5.6.2 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi realizada por espectrofotometria com base no protocolo descrito por McCord e Fridovich (1969), no qual o radical superóxido é gerado por meio do sistema xantina/xantina oxidase e a redução do citocromo *c* é monitorada a 550 nm. Foram pesados 0,3 g de amostra vegetal (raiz) e adicionados 900 µL de tampão fosfato com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi

homogeneizada (ULTRA- TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 5 µL do sobrenadante a 288 µL de meio de reação (Xantina 50 µM, KCN 20 µM, Citocromo c 10 µM, EDTA 100 µM) em cada poço. Para o branco, utilizou-se 2 µL de meio de reação. A leitura foi realizada durante um minuto, em intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). O volume de xantina oxidase foi determinado a partir da leitura do branco, com uma leitura a cada sete amostras lidas.

A atividade enzimática foi expressa por unidade de SOD, sendo que uma unidade de SOD corresponde a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do citocromo c, por minuto, por mg de proteína a 25°C e pH 7,8.

5.6.3 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada pelo método descrito por Beutler (1975), no qual a decomposição enzimática de H₂O₂ é mensurada pelo decaimento da absorbância a 240 nm. O extrato foi preparado com 0,2 g de amostra vegetal (raiz) e adicionados 600 µL de tampão de homogeneização (Tris-base 20 mM, EDTA 1mM, Sacarose 0,5 M e Ditioneitol - DTT 1 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX®, IKA), centrifugada a 9000 g por 30 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca, foram adicionados 10 µL do sobrenadante a 245 µL de meio de reação (45 µL de H₂O₂, 47 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de reação - Tris-base 1 M, EDTA 5 mM). Para o branco, utilizou-se 5 µL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante dois minutos, em intervalos de 15 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi expressa em nmol mg⁻¹ de proteína min⁻¹.

5.6.4 Atividade da Glutathione s-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada pelo método descrito por Habig e Jakoby (1981) com modificações realizadas por Gallagher et al. (1992), no qual a unidade da atividade da enzima foi definida como a relação da taxa inicial da reação, com o valor do coeficiente de extinção molar para o 1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene Solution (CDNB) de 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹, com valor de absorbância a 340 nm. O extrato foi preparado com

0,3 g de amostra vegetal (raiz) e adicionados 900 µL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e MgCl₂ x 6 H₂O 5 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA- TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 15 µL do sobrenadante a 235 µL de meio de reação (tampão fosfato e CDNB 0,05 M) e 10 µL de GSH a 25 mM. Para o branco, utilizou-se 15 µL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada durante quatro minutos, em intervalos de 30 segundos, em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A atividade específica foi definida como a unidade da atividade da enzima por mg de proteína.

5.6.5 Quantificação da Glutathiona Reduzida (GSH)

A quantificação da concentração de GSH foi realizada como descrito por White et al. (2003) com modificações por Gallagher et al. (1992). A determinação da concentração de GSH se dá pela separação dos dipeptídeos através de centrifugação e a posterior reação dos complexos dipeptídicos com o 2,3 naftalenedicarboxialdeído (NDA), o qual gera um complexo fluorescente que é medido a 528 nm após excitação a 472 nm. O extrato foi preparado com 0,3 g de amostra vegetal (raiz) e adicionados 900 µL de tampão de homogeneização (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2 mM e MgCl₂ x 6 H₂O 5 mM) com PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) a 1 mM. A mistura foi homogeneizada (ULTRA-TURRAX, IKA, China), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade, inicialmente foram adicionados 20 µL do sobrenadante a 20 µL de ácido sulfosalicílico (200 mM) em microplaca para centrifugação e incubados por 20 minutos. Após esse período, a placa foi centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. Em seguida, 20 µL do sobrenadante foram transferidos para microplaca branca, adicionados 180 µL de solução fluorescente (Trisbase 50 mM, NaOH 500 mM e 2,3-naftalenedicarboxialdeído - NDA 10 mM) e a placa foi incubada por 30 minutos. Para o branco, utilizou-se 20 µL de tampão de homogeneização. Utilizou-se, para confecção da curva padrão, diferentes diluições de GSH (40, 20, 10, 5 e 2,5 nM). A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation). A concentração de GSH foi expressa µM por mg de proteína.

5.6.6 Taxa de Peroxidação de Lipídios (LPO)

A taxa de Peroxidação Lipídica foi realizada pelo método de FOX (Ferrous Oxidation / Xylenol Orange Method), com base no protocolo de Jiang et al. (1991, 1992). O método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} -laranja de xilenol, na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm. Amostras de aproximadamente 3g de tecido vegetal (raiz) foram homogeneizadas (ULTRA- TURRAX®, IKA), centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante aliquoteado para análise. Para leitura da atividade em microplaca foram adicionados 60 μL do sobrenadante a 240 μL de meio de reação sob 15 μL de PBS; para o branco foram adicionados 60 μL de tampão de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biomete 3, Thermo Eletron Corporation).

5.7 Análises Estatísticas

Os dados estão representados como média \pm desvio padrão e as análises estatísticas foram realizadas pelos programas Infostat e Minitab (Versão teste para estudantes). Para testar a distribuição normal das médias, todos os dados foram testados utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Foi aplicada a análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Scott Knott (significância $p < 0,05$). A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada cruzando os dados de concentrações dos elementos-traço e biomarcadores bioquímicos para identificar possíveis relações entre essas variáveis e áreas estudadas.

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros limnológicos

Os dados pluviométricos referentes ao ano de 2016 (Figura 6) foram obtidos pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER - e caracterizam a primeira campanha (Março/2016) como a de menor precipitação (85mm) e a segunda campanha (Novembro/2016) como a de maior precipitação (105mm). Apesar de a segunda campanha ter sido realizada no mês de novembro (mês de alta pluviosidade), os meses anteriores foram de baixa precipitação e os níveis da água nas represas eram bem inferiores aos da primeira campanha. A estação amostral RB1 na represa de Rio Bonito, por exemplo, teve sua posição geográfica alterada devido ao baixo nível da água na represa, porém, mantendo a zona de rio da estação amostral.

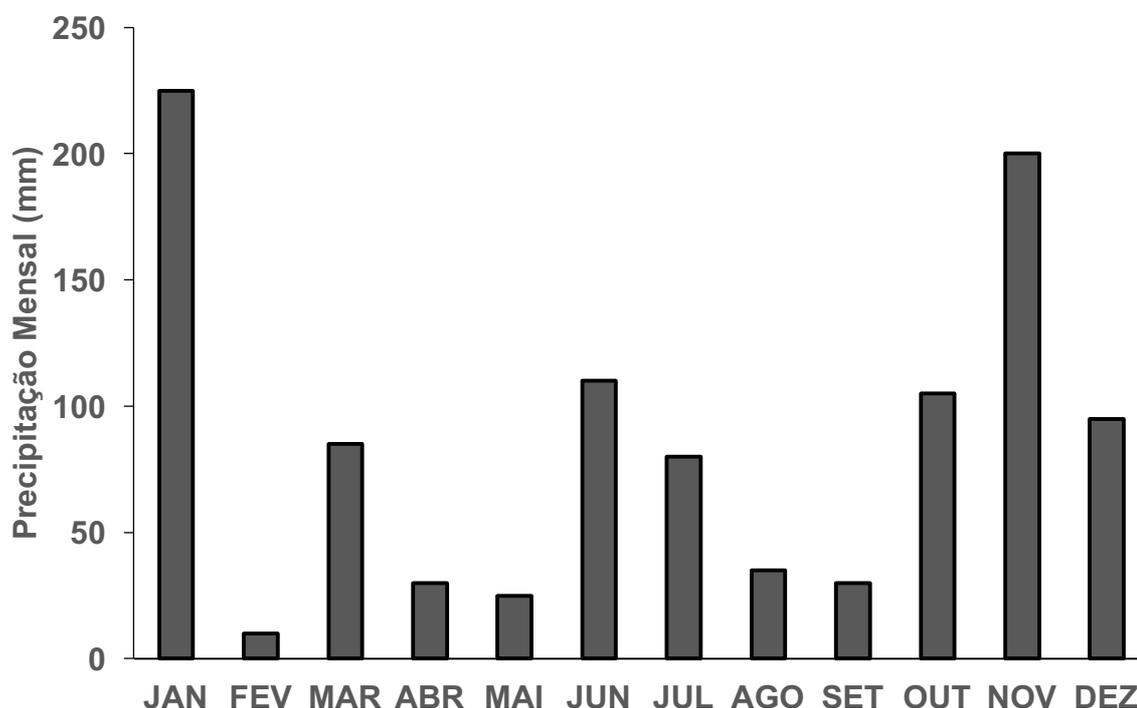


Figura 6: Precipitação mensal acumulada na região da estação meteorológica de Vitória/ES. Ano 2016.

As análises limnológicas (Tabela 1) foram realizadas apenas para a segunda campanha, pois durante a primeira campanha houve problema técnico com a sonda multiparâmetro.

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos de água aferidos durante a segunda campanha (nov/2016), nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

	VP*	DB	RB1	RB2	RB3	SU1	SU2
Profundidade (m)	-	2,5	1,0	11,6	21,6	3,2	5,9
Temperatura (°C)	-	23,53	23,34	23,94	24,4	25,08	24,49
Turbidez (UNT)	100	14,8	117	19,2	15,3	-	14,2
Condutividade elétrica (µS/cm)	-	48	86	81	80	62	64
pH	6-9	5,05	7,19	9,33	7,89	8,47	7,93
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>5,0	11,35	9,2	9,0	9,0	12,54	10,56
Potencial Redox (mV)	-	305	-	210	240	291	243
Secchi (m)	-	0,9	-	0,7	1,0	1,0	0,9

*VP = Valores permitidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005

De acordo com os parâmetros estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005 para corpos hídricos classe 2, a estação amostral RB1, durante a segunda campanha, apresentou níveis de turbidez acima do permitido (117UNT). Os maiores valores de condutividade elétrica foram observados na represa de Rio Bonito (RB1, RB2 e RB3, apresentaram 86, 81 e 80 µS/cm, respectivamente). A estação amostral DB, da represa de Duas Bocas, apresentou pH = 5,05, valor abaixo do permitido pela Resolução CONAMA 357/2005 (pH entre 6-9) para águas de classe 2, enquanto a estação RB2 da represa de Rio Bonito apresentou pH = 9,33, valor acima do permitido pela mesma resolução. O gráfico de distribuição do perfil vertical foi realizado onde a profundidade permitiu fazer a perfilagem (estações RB2, RB3 e SU1, da segunda campanha). Os gráficos revelam uma diferença brusca de temperatura (termoclina) nas estações RB2 (Figura 7) e RB3 (Figura 8) e uma anoxia no fundo da estação amostral RB2, em contraste com o aumento da condutividade na mesma estação.

6.2 Quantificação dos elementos-traço

Foram quantificados os elementos-traço chumbo (Pb), cádmio (Cd), cobalto (Co), cobre (Cu), níquel (Ni), arsênio (As), ferro (Fe), manganês (Mn), alumínio (Al), zinco (Zn). A quantificação dos elementos-traços nas amostras de água (Tabela 2) e sedimento (Tabela 3), apontam que a maioria delas se encontra dentro dos limites permitidos pela Resolução CONAMA 357/2005. Entretanto, para as amostras de água

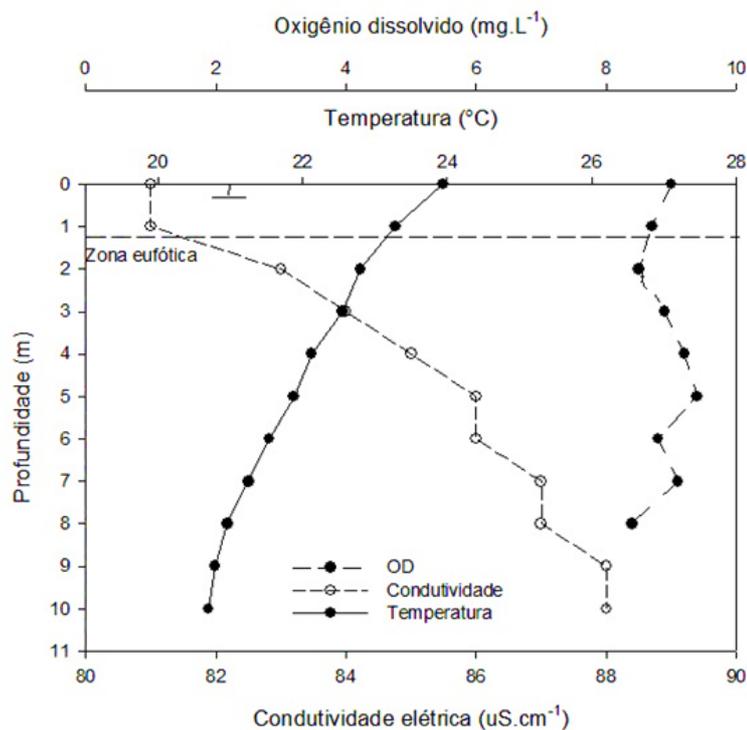


Figura 7: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral RB2, na represa de Rio Bonito/ES.

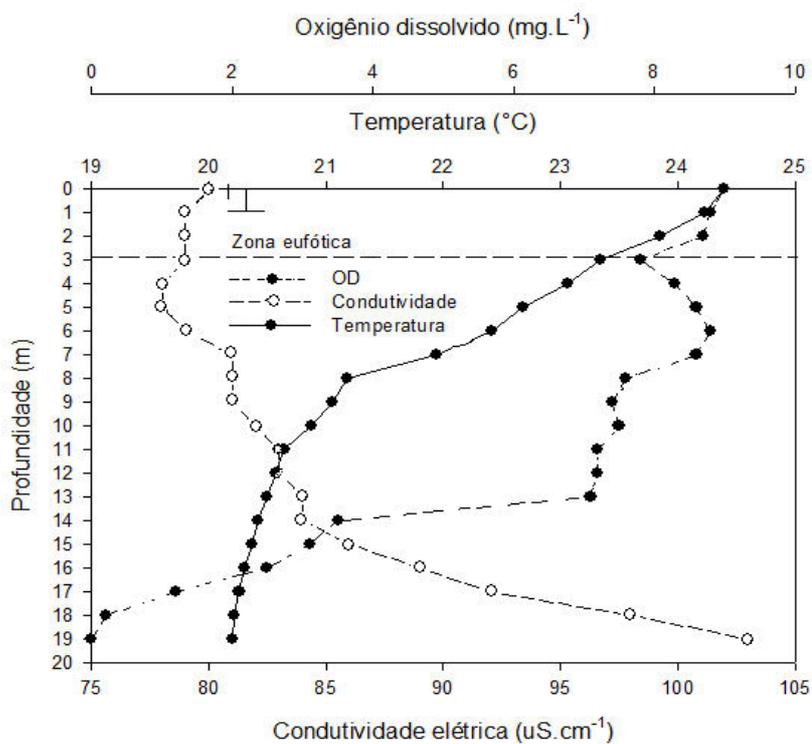


Figura 8: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral RB3, na represa de Rio Bonito/ES.

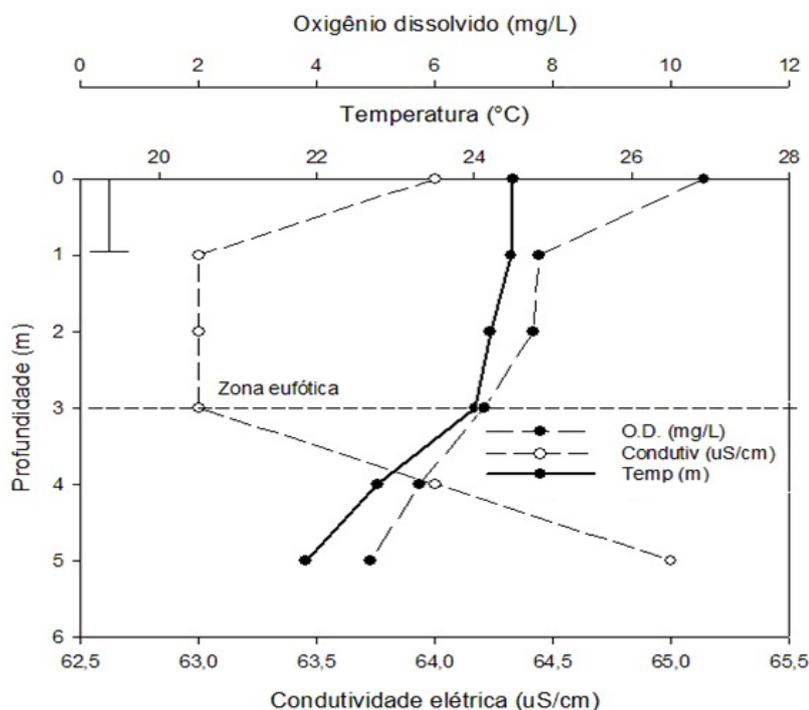


Figura 9: Distribuição vertical dos valores de temperatura, oxigênio dissolvido (O.D.) e condutividade durante a segunda campanha (nov/2016) na estação amostral SU2, da represa Suíça/ES.

(Tabela 2), as concentrações de Fe (Tabela 2) nas estações amostrais RB1, SU1 e SU2 da primeira campanha e RB1 na segunda campanha, bem como a concentração de As (Tabela 2) na estação RB1 na segunda campanha, estão acima do permitido pela resolução.

Para as amostras de sedimento (Tabela 3), classificadas de acordo com a resolução CONAMA nº 454/2012, a concentração de Ni (Tabela 3) da estação amostral SU2 e a concentração de Zn (Tabela 3) nas estações DB, RB1, SU1 e SU2 durante a primeira campanha, também se encontram com valores acima do permitido pela resolução. Dentre as estações, RB1 foi a que apresentou maiores concentrações (Tabela 3) nas amostras de água das duas campanhas, em contraste com DB, que apresentou menores concentrações. As concentrações dos elementos nas amostras (Tabela 3) da primeira campanha, tanto para água quanto para sedimento, foram maiores que as amostras da segunda campanha.

Tabela 2: Concentração dos elementos-traço em $\mu\text{g/L}^{-1}$ e suas respectivas incertezas nas amostras de água, da primeira (mar/16) e segunda (nov/16) campanha, coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

Amostras	*Fe	*Mn	⁶³ Cu	¹¹² Cd	⁶⁰ Ni	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As	⁵⁹ Co	*Al	*Zn	
VP*($\mu\text{g/L}^{-1}$)	300,00	100,00	9,00	1,00	25,00	10,00	0,14	50,00	100,00	180,00	
1ª Campanha	DB	120 ± 1	0,111 ± 0,001	4,33 ± 0,03	<0,000002	0,211 ± 0,003	0,067 ± 0,0017	0,040 ± 0,0002	<0,000002	3,74 ± 0,24	2,65 ± 0,0
	RB1	947 ± 9	0,300 ± 0,001	1,39 ± 0,01	0,016 ± 0,0001	0,450 ± 0,003	0,339 ± 0,007	0,120 ± 0,001	0,124 ± 0,001	74,8 ± 0,25	4,04 ± 0,0
	RB2	28 ± 1	0,163 ± 0,002	0,279 ± 0,004	0,002 ± 0,00001	0,216 ± 0,009	0,051 ± 0,0011	0,125 ± 0,001	0,041 ± 0,002	5,1 ± 0,83	3,13 ± 0,0
	RB3	27 ± 1	0,170 ± 0,002	0,510 ± 0,01	0,002 ± 0,00001	0,222 ± 0,007	0,088 ± 0,0028	0,138 ± 0,001	0,043 ± 0,007	8,4 ± 0,72	1,96 ± 0,0
	SU1	354 ± 2	0,302 ± 0,002	1,42 ± 0,01	0,003 ± 0,00001	0,743 ± 0,014	0,206 ± 0,001	0,118 ± 0,001	0,069 ± 0,003	51,9 ± 0,76	3,31 ± 0,0
	SU2	344 ± 2	0,314 ± 0,001	1,52 ± 0,01	0,004 ± 0,00001	0,382 ± 0,001	0,230 ± 0,001	0,106 ± 0,001	0,052 ± 0,001	41,3 ± 0,17	4,03 ± 0,0
2ª Campanha	DB	293 ± 1	11,4 ± 0,1	0,323 ± 0,002	0,004 ± 0,00001	0,028 ± 0,0001	0,059 ± 0,0003	0,069 ± 0,0001	0,052 ± 0,0003	7,14 ± 0,70	3,49 ± 0,0
	RB1	715 ± 9	11,2 ± 0,1	2,58 ± 0,18	0,004 ± 0,00001	0,493 ± 0,004	0,247 ± 0,001	0,146 ± 0,001	0,109 ± 0,001	48,1 ± 1,2	3,94 ± 0,0
	RB2	98 ± 1	2,27 ± 0,04	0,665 ± 0,040	0,003 ± 0,00001	0,195 ± 0,001	0,014 ± 0,0001	0,131 ± 0,001	0,028 ± 0,0001	8,8 ± 0,92	1,22 ± 0,8
	RB3	73 ± 2	2,84 ± 0,04	0,569 ± 0,019	< 0,000002	0,075 ± 0,0004	0,005 ± 0,0001	0,133 ± 0,001	0,021 ± 0,0001	7,3 ± 0,39	1,87 ± 0,7
	SU1	232 ± 1	10,2 ± 0,1	0,604 ± 0,005	0,002 ± 0,00001	0,042 ± 0,0001	0,113 ± 0,001	0,069 ± 0,0001	0,058 ± 0,0001	9,3 ± 0,01	3,87 ± 0,1
	SU2	219 ± 1	7,64 ± 0,04	0,561 ± 0,006	< 0,000002	0,022 ± 0,0001	0,111 ± 0,001	0,053 ± 0,0001	0,037 ± 0,0001	11,0 ± 0,2	3,25 ± 0,0

* Ld = Limite de detecção; *Feito no ICP OES. VP = Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA nº 357/2005

Tabela 3: Concentração dos elementos-traço (mg/Kg^{-1} de massa seca) e suas respectivas incertezas nas amostras de sedimento, da primeira (mar/16) e segunda (nov/16) campanha, coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

Amostras	*Fe	*Mn	⁶³ Cu	¹¹² Cd	⁶⁰ Ni	²⁰⁸ Pb	⁷⁵ As	⁵⁹ Co	*Al	*Zn	
VP*(mg/Kg^{-1})	-	-	35,7	0,6	18,0	35,0	5,9	-	-	123,0	
1ª Campanha	DB	37837 ± 410	130 ± 4	14,0 ± 0,4	0,007 ± 0,007	12,5 ± 0,9	28,4 ± 0,8	1,73 ± 0,03	6,16 ± 0,10	75196 ± 2003	184 ± 3
	RB1	72401 ± 1610	237 ± 6	12,8 ± 0,8	0,055 ± 0,007	12,2 ± 0,6	22,9 ± 1,1	2,39 ± 0,19	4,93 ± 0,30	96449 ± 3168	145 ± 1
	RB2	83698 ± 2340	369 ± 9	12,0 ± 0,4	0,006 ± 0,001	13,2 ± 0,8	26,4 ± 0,8	2,67 ± 0,09	5,23 ± 0,21	107640 ± 3886	74 ± 1
	RB3	96872 ± 2730	144 ± 3	10,3 ± 0,4	0,006 ± 0,001	9,80 ± 0,51	15,1 ± 0,7	3,28 ± 0,14	2,90 ± 0,23	122420 ± 4679	94 ± 2
	SU1	78076 ± 1030	818 ± 4	14,8 ± 0,4	0,046 ± 0,001	13,7 ± 0,5	23,0 ± 0,8	1,84 ± 0,07	7,97 ± 0,32	90799 ± 2436	138 ± 6
	SU2	61795 ± 1750	378 ± 10	15,7 ± 0,4	<0,0021	20,2 ± 0,7	20,8 ± 0,4	1,89 ± 0,06	8,26 ± 0,02	88880 ± 3917	148 ± 1
2ª Campanha	DB	35062 ± 831	186 ± 3	16,0 ± 0,3	0,093 ± 0,0013	8,08 ± 0,18	20,9 ± 0,3	2,02 ± 0,01	7,28 ± 0,07	82610 ± 3718	71 ± 2
	RB1	54036 ± 291	402 ± 3	16,3 ± 0,5	0,104 ± 0,001	6,13 ± 0,21	14,9 ± 0,2	2,18 ± 0,05	5,51 ± 0,13	74898 ± 1915	52 ± 1
	RB2	63796 ± 1005	252 ± 3	13,7 ± 0,3	0,073 ± 0,001	7,00 ± 0,36	16,5 ± 0,4	2,99 ± 0,06	4,79 ± 0,10	80565 ± 1729	38 ± 1
	RB3	63819 ± 6092	283 ± 21	11,6 ± 0,5	0,046 ± 0,001	4,95 ± 0,12	16,3 ± 0,4	3,26 ± 0,05	4,13 ± 0,09	75954 ± 5698	29 ± 1
	SU1	57503 ± 1648	585 ± 14	18,5 ± 0,5	0,118 ± 0,004	9,53 ± 0,62	15,8 ± 0,1	1,98 ± 0,02	9,15 ± 0,10	81681 ± 3577	62 ± 2
	SU2	58253 ± 575	643 ± 5	18,2 ± 0,2	0,111 ± 0,006	9,81 ± 0,32	16,2 ± 0,2	1,95 ± 0,01	8,77 ± 0,03	87340 ± 2574	65 ± 4

* VP = Valor máximo permitido pela Resolução CONAMA nº 357/2005

6.2 Análise do índice de germinação (GI) e índice de crescimento radicular (CR)

Para a análise do Índice de Germinação em *A. cepa*, os resultados (Tabela 4) revelaram que apenas as amostras de água da estação RB2 (0,84) e as amostras de sedimento de SU2 (0,38) coletadas na primeira campanha, apresentaram valores significativos inferiores ao controle negativo (0,92).

A análise de crescimento radicular (CR) permitiu constatar que apenas as radículas tratadas com as amostras de sedimento da primeira campanha da estação SU2 apresentaram comprimentos significativamente inferiores (0,69 cm), quando comparada ao comprimento das radículas do controle negativo (2,08 cm). As radículas tratadas com as amostras de água de todas as estações amostrais não apresentaram diferenças significativas quanto ao seu comprimento (Tabela 4).

6.3 Avaliação citogenética em *Allium cepa* L.

Ao avaliar as células meristemáticas que estão em processo de divisão celular, foi possível analisar o índice mitótico (MI) (Tabela 4). Os resultados apontam que células tratadas com as amostras de água da primeira campanha apresentaram uma menor porcentagem no número de células em divisão em SU1 (6,4) e SU2 (6,4), quando comparadas ao controle negativo (8,46). Para as amostras de sedimento da mesma campanha, as estações amostrais RB1 (6,34), RB3 (6,88), SU1 (6,68) e SU2 (0,00) apresentaram uma redução significativa quando comparadas com o controle negativo (8,46). Durante a segunda campanha, foi observado uma redução no MI das amostras de água das estações DB (6,4), RB1 (6,92), RB2 (7,46) e SU1 (6,86) quando comparado ao controle negativo (9,34). Para as amostras de sedimento da segunda campanha, DB (8,78), RB1 (6,98), RB2 (7,88), RB3 (7,27), SU1 (6,64) e SU2 (6,02) foram as que apresentaram diminuição significativa ao controle negativo (9,3).

Com relação ao índice de aberrações cromossômicas (CA), foram observadas as seguintes alterações (Figura 10) (Tabela 5 e 6): aderência cromossômica, C-metáfase, perda cromossômica, quebra cromossômica, anáfase multipolar e atraso. O resultado das análises de CA (Tabela 4) demonstrou que todas as amostras de

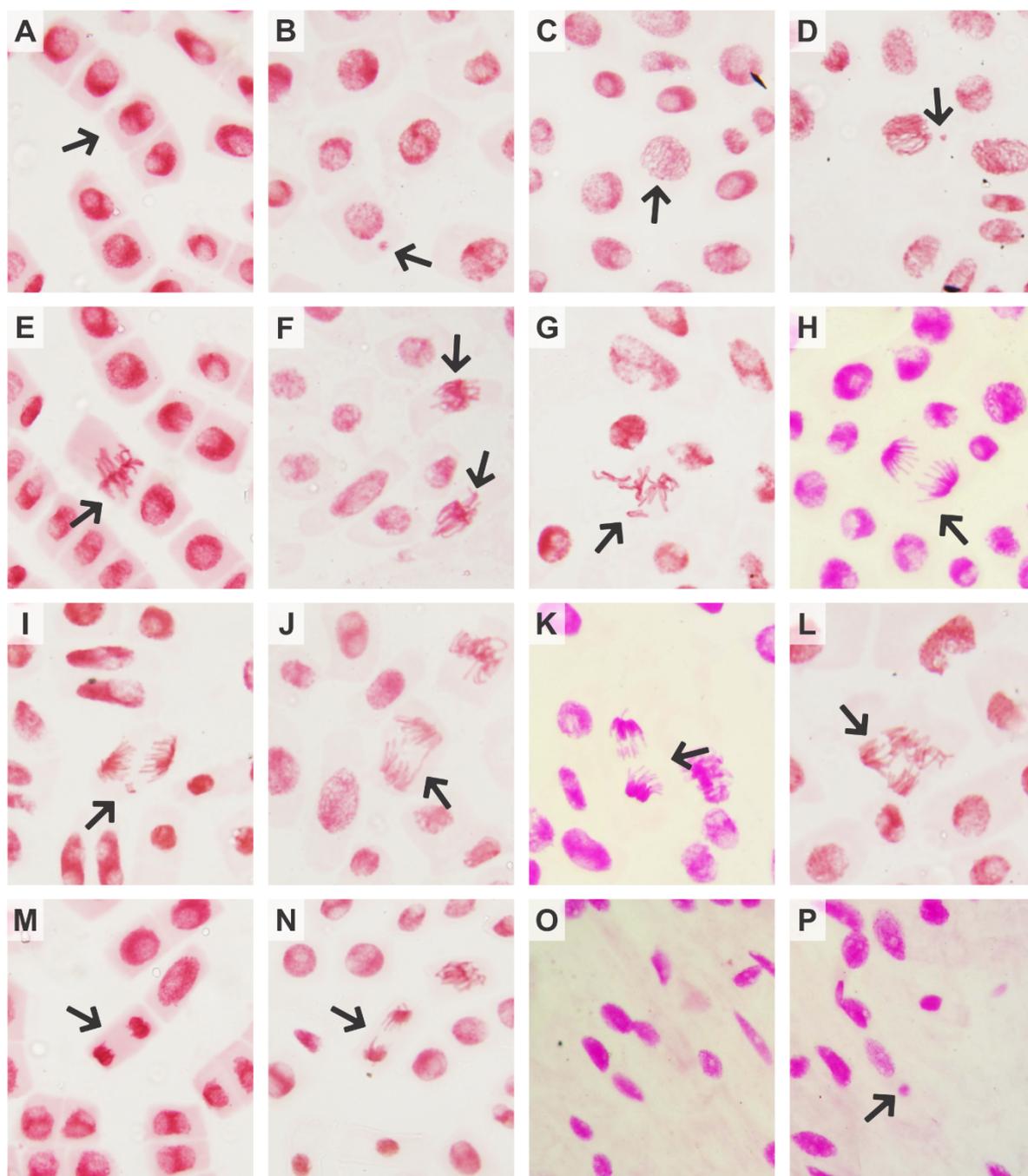


Figura 10: Células de *A. cepa* tratadas com amostras de água e sedimento coletadas nas represas de Duas Bocas, Rio Bonito e Suíça, na bacia do Rio Santa Maria da Vitória/ES – **A** - intérfase normal; **B** - intérfase com MN; **C** - prófase normal; **D** - prófase com MN; **E** - metáfase normal; **F** - metáfase com aderência cromossômica; **G** - C-metáfase; **H** - anáfase normal; **I** - anáfase com perda; **J** - anáfase com ponte; **K** - anáfase com quebra; **L** - anáfase multipolar; **M** - telófase normal; **N** - telófase com atraso; **O** - células F_1 ; **P** - células F_1 com MN

Tabela 4: Avaliação citogenética das amostras de água e sedimento da primeira e segunda campanha das estações amostrais de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

	Água						Sedimento						
	MI	CA	IMUT	MN-F ₁	GI	CR	MI	CA	IMUT	MN-F ₁	GI	CR	
1ª Campanha	CN	8,46 ± 1,3b	0,38 ± 0,3a	0,02 ± 0a	0,04 ± 0,1a	0,92 ± 0,03a	2,08 ± 0,25a	8,46 ± 1,3c	0,38 ± 0,3a	0,02 ± 0a	0,04 ± 0,1a	0,92 ± 0,03b	2,08 ± 0,25b
	CP	5,7 ± 1,2a	1,14 ± 0,3b	0,64 ± 0,1c	0,76 ± 0,3b	0,88 ± 0,03b	2,06 ± 0,21a	5,7 ± 1,2b	1,14 ± 0,3b	0,64 ± 0,1c	0,76 ± 0,3c	0,88 ± 0,03b	2,06 ± 0,21b
	DB	5 ± 0,5a	0,82 ± 0,2a	0,02 ± 0a	0,28 ± 0,2a	0,92 ± 0,03a	1,77 ± 0,13a	9,8 ± 1,2c	1,3 ± 0,6b	0,04 ± 0,1a	0,12 ± 0,1a	0,89 ± 0,03b	1,87 ± 0,38b
	RB1	8,68 ± 0,6b	1,94 ± 0,6b	0,2 ± 0,2a	0,28 ± 0,2a	0,93 ± 0,05a	2,26 ± 0,2a	6,34 ± 0,7b	2,2 ± 0,4c	0,1 ± 0,1b	0 ± 0a	0,91 ± 0,04b	2,23 ± 0,48b
	RB2	7,48 ± 0,4b	1,2 ± 0,3b	0,06 ± 0,1a	0,2 ± 0,1a	0,84 ± 0,03b	2,01 ± 0,14a	8,48 ± 0,8c	2,4 ± 0,6c	0,18 ± 0,1b	0,36 ± 0,3b	0,94 ± 0,02b	2,01 ± 0,38b
	RB3	7,9 ± 1,1b	1,56 ± 0,6b	0,44 ± 0,1b	0,32 ± 0,2a	0,94 ± 0,02a	2,12 ± 0,14a	6,88 ± 0,8b	2,12 ± 0,9c	0,18 ± 0,1b	0 ± 0a	0,95 ± 0,04b	1,97 ± 0,45b
	SU1	6,42 ± 1,3a	1,52 ± 0,8b	0,08 ± 0,1a	0,24 ± 0,3a	0,92 ± 0,02a	1,94 ± 0,28a	6,68 ± 0,6b	2,22 ± 0,4c	0,16 ± 0,1b	0,32 ± 0,2b	0,91 ± 0,03b	1,79 ± 0,57b
	SU2	6,4 ± 1,2a	1,54 ± 0,5b	0,02 ± 0a	0,24 ± 0,2a	0,92 ± 0,02a	2,09 ± 0,23a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,38 ± 0,17a	0,69 ± 0,22a
2ª Campanha	CN	9,34 ± 1,4c	0,34 ± 0,3a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,87 ± 0,08a	1,15 ± 0,19a	9,34 ± 1,4c	0,34 ± 0,3a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,87 ± 0,08a	1,15 ± 0,18a
	CP	5,24 ± 1a	1,28 ± 0,3a	0,66 ± 0,2d	0,82 ± 0,2d	0,79 ± 0,04a	2,64 ± 0,34a	5,24 ± 1a	1,21 ± 0,3b	0,66 ± 0,2d	0,79 ± 0,2c	0,78 ± 0,04a	2,64 ± 0,34b
	DB	6,4 ± 0,6b	0,78 ± 0,4a	0 ± 0a	0,28 ± 0,2b	0,78 ± 0,08a	1,59 ± 0,25a	8,78 ± 0,9c	0,93 ± 0,3b	0,01 ± 0a	0,16 ± 0,1a	0,79 ± 0,09a	1,43 ± 0,09a
	RB1	6,92 ± 0,8b	1,96 ± 0,5b	0,3 ± 0,1b	0,52 ± 0,1c	0,79 ± 0,02a	1,71 ± 0,27a	6,98 ± 0,7b	2,03 ± 0,2c	0,25 ± 0,1b	0,44 ± 0,1b	0,86 ± 0,08a	1,8 ± 0,34a
	RB2	7,46 ± 0,8b	1,76 ± 0,5b	0,16 ± 0,1b	0,08 ± 0,1a	0,82 ± 0,07a	2,3 ± 0,84a	7,88 ± 0,6c	2,42 ± 0,4c	0,11 ± 0a	0,4 ± 0,2b	0,67 ± 0,02a	1,44 ± 0,26a
	RB3	9,02 ± 0,6c	1,76 ± 0,4b	0,5 ± 0,1c	0,52 ± 0,1c	0,8 ± 0,01a	2,1 ± 0,61a	7,27 ± 0,7b	1,85 ± 0,2c	0,47 ± 0,1c	0,44 ± 0,1b	0,76 ± 0,08a	1,65 ± 0,45a
	SU1	6,86 ± 0,3b	1,82 ± 0,6b	0,4 ± 0,1c	0,42 ± 0,1c	0,6 ± 0,04a	1,68 ± 0,63a	6,64 ± 0,8b	2,18 ± 0,4c	0,28 ± 0,1b	0,52 ± 0,2b	0,73 ± 0,1a	1,63 ± 0,35a
	SU2	9,84 ± 0,9c	2,24 ± 0,7b	0,28 ± 0,1b	0,12 ± 0,1a	0,79 ± 0,02a	2,25 ± 0,61a	6,02 ± 1a	1,89 ± 0,4c	0,15 ± 0,1b	0,32 ± 0,1b	0,71 ± 0,08a	1,99 ± 0,32a

*Médias com letras iguais na mesma coluna/campanha, não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). CN = Controle Negativo. CP = Controle Positivo. MI = índice mitótico. CA = índice de aberrações cromossômicas. IMUT = índice de mutagenicidade. MN-F₁ = índice de mutagenicidade em F₁. GI = índice de germinação. CR = crescimento radicular.

Tabela 5: Avaliação da frequência de aberrações cromossômicas avaliadas pelo ensaio com *Allium cepa* após exposição às amostras de água e sedimento da primeira e segunda campanha das estações amostrais de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

	1ª Campanha							2ª Campanha							
	Ponte	Quebra	C-Met.	A. multip.	Atraso	Aderência	Perda	Ponte	Quebra	C-Met.	A. multip.	Atraso	Aderência	Perda	
Água	CN	0,04 ± 0,01b	0 ± 0a	0,12 ± 0,02b	0 ± 0a	0 ± 0a	0,22 ± 0,02b	0 ± 0a	0,04 ± 0,01b	0 ± 0b	0 ± 0b	0 ± 0b	0,06 ± 0,01b	0,22 ± 0,01c	0 ± 0b
	CP	0,08 ± 0,01b	0 ± 0a	0,02 ± 0b	0,04 ± 0,01a	0,2 ± 0,02a	0,76 ± 0,02a	0,04 ± 0a	0,14 ± 0,01b	0,1 ± 01a	0,2 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a	0,12 ± 0,01b	0,44 ± 0,02c	0,04 ± 0,01b
	DB	0,02 ± 0b	0 ± 0a	0,04 ± 0,01b	0,02 ± 0a	0,12 ± 0,01a	0,56 ± 0,03b	0,06 ± 0a	1,28 ± 0,04b	0,04 ± 0b	0 ± 0a	0,14 ± 0,02b	0 ± 0b	0,14 ± 0,01c	0,46 ± 0,02b
	RB1	0,28 ± 0,03a	0 ± 0a	0,28 ± 0,01a	0,06 ± 0,01a	0,28 ± 0,02a	1,02 ± 0,03a	0,02 ± 0a	0,24 ± 0,01a	0 ± 0b	0,3 ± 0,02a	0 ± 0b	0,54 ± 0,03a	0,82 ± 0,01b	0,06 ± 0,01b
	RB2	0,16 ± 0,02a	0 ± 0a	0,14 ± 0,01b	0,02 ± 0a	0,06 ± 0,01a	0,82 ± 0,02a	0 ± 0a	0,16 ± 0,01b	0 ± 0b	0,22 ± 0,01a	0,04 ± 0,01b	0,26 ± 0,01b	0,94 ± 0,04b	0,14 ± 0,01a
	RB3	0,18 ± 0,02a	0,02 ± 0a	0,12 ± 0,01b	0 ± 0a	0,5 ± 0,03a	0,84 ± 0,02a	0 ± 0a	0,28 ± 0,01a	0 ± 0b	0,28 ± 0,02a	0,02 ± 0b	0,32 ± 0,01a	0,84 ± 0,04b	0,02 ± 0b
	SU1	0 ± 0b	0 ± 0a	0,14 ± 0,01b	0,04 ± 0,01a	0,14 ± 0,03a	1,18 ± 0,04a	0,02 ± 0a	0,12 ± 0,01b	0,02 ± 0b	0,18 ± 0,01a	0,02 ± 0b	0,42 ± 0,01a	1,16 ± 0,03a	0,18 ± 0,01a
	SU2	0,14 ± 0,01a	0 ± 0a	0,1 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,18 ± 0,02a	1,08 ± 0,04a	0 ± 0a	0,36 ± 0,02a	0,06 ± 0a	0,26 ± 0,01a	0 ± 0b	0,18 ± 0,02b	1,38 ± 0,06a	0 ± 0b
Sedimento	CN	0,04 ± 0,01a	0 ± 0a	0,12 ± 0,02a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,22 ± 0,02a	0 ± 0a	0,04 ± 0,01a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,06 ± 0,01a	0,22 ± 0,01a	0 ± 0a
	CP	0,08 ± 0,01a	0 ± 0a	0,02 ± 0a	0,04 ± 0,01a	0,2 ± 0,02b	0,76 ± 0,02b	0,04 ± 0a	0,14 ± 0,01a	0,1 ± 0b	0,2 ± 0,01b	0,12 ± 0,01b	0,12 ± 0,01a	0,44 ± 0,02b	0,04 ± 0,01b
	DB	0,12 ± 0,01a	0 ± 0a	0,1 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,24 ± 0,02b	0,8 ± 0,04a	0 ± 0a	0,14 ± 0,01a	0 ± 0a	0,02 ± 0a	0 ± 0a	0,12 ± 0,01a	0,66 ± 0,02b	0 ± 0a
	RB1	0,34 ± 0,03b	0 ± 0a	0,475 ± 0,02b	0,16 ± 0,02b	0,2 ± 0,01b	1,1 ± 0,02b	0,02 ± 0a	0,44 ± 0,01b	0,02 ± 0a	0,16 ± 0,01b	0,2 ± 0,01b	0,2 ± 0,02a	0,96 ± 0,02c	0,06 ± 0,01b
	RB2	0,28 ± 0,02b	0,02 ± 0a	0,18 ± 0,01a	0,04 ± 0,01a	0,32 ± 0,01c	1,56 ± 0,05c	0 ± 0a	0,48 ± 0,02b	0 ± 0a	0,26 ± 0,01b	0,12 ± 0b	0,4 ± 0,01b	1,16 ± 0,02c	0 ± 0a
	RB3	0,4 ± 0,03b	0,04 ± 0,01a	0,275 ± 0,02b	0 ± 0a	0,52 ± 0,03c	0,92 ± 0,04b	0,02 ± 0a	0,56 ± 0,01b	0 ± 0a	0,24 ± 0,01b	0,06 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a	0,88 ± 0,01c	0 ± 0a
	SU1	0,16 ± 0,01a	0 ± 0a	0,3 ± 0,03b	0,04 ± 0,01a	0,38 ± 0,01c	1,32 ± 0,03c	0,02 ± 0a	0,2 ± 0,01a	0 ± 0a	0,3 ± 0,01b	0,06 ± 0,01a	0,46 ± 0,01b	1,12 ± 0,03c	0,1 ± 0b
	SU2	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0 ± 0a	0,26 ± 0,01a	0,02 ± 0a	0,26 ± 0,01b	0,12 ± 0,01b	0,22 ± 0,01a	1 ± 0,02c	0,02 ± 0a

*CN = Controle Negativo. CP = Controle Positivo. C-Met. = C-metáfase. A. multip. = Anáfase Multipolar.

água e sedimento apresentaram índices significativos superiores ao controle negativo (0,38 – primeira campanha; 0,34 - segunda campanha), exceto durante a primeira campanha nas amostras de água da estação DB (0,82) e na segunda campanha nas amostras de água de DB (0,78).

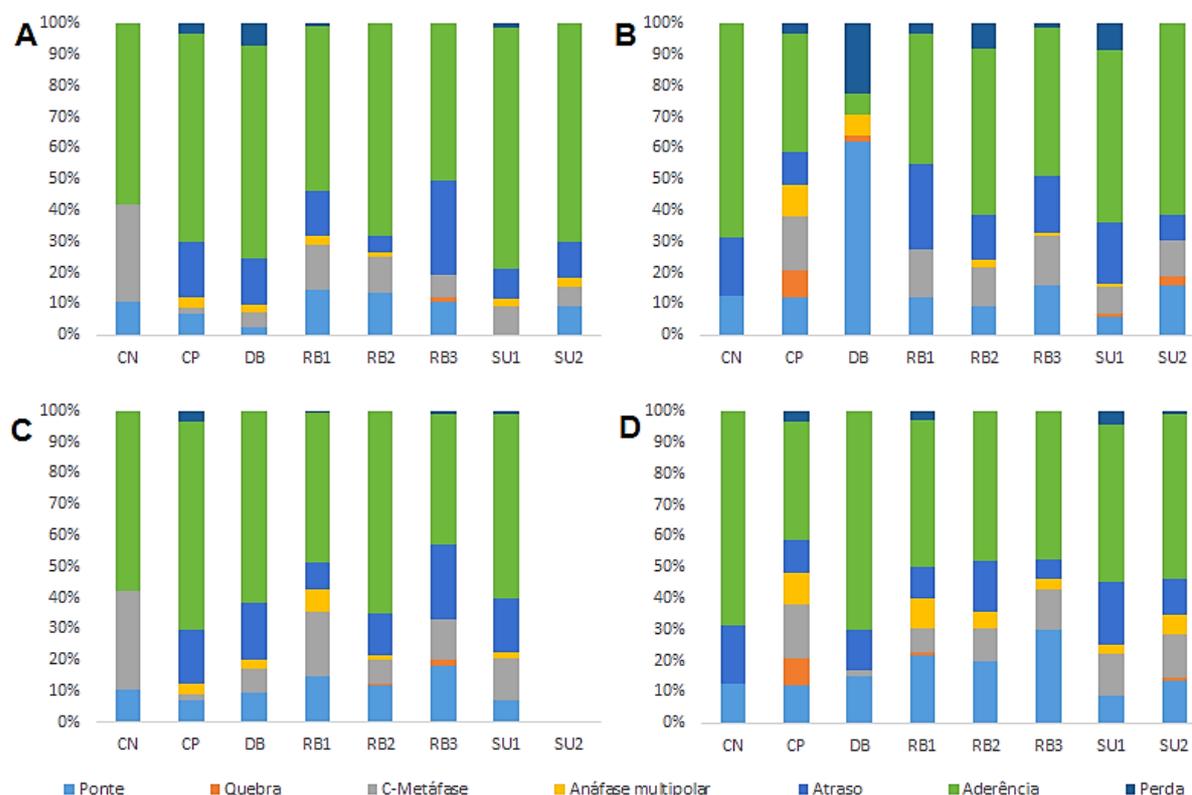


Figura 11: Frequência das alterações cromossômicas (AC) em células de raízes de *A. cepa* expostas às amostras de água das estações de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suiça (SU) e aos controles negativo (CN) e positivo (CP). **A e B**: amostras de água da primeira e segunda campanha, respectivamente. **C e D**: amostras de água sedimento, da primeira e segunda campanha, respectivamente.

A análise do Índice de Mutagenicidade (IMUT) (Tabela 4), onde foram observadas as frequências de quebras cromossômicas (Figura 10-K) e micronúcleo (Figura 10-B), indicou que nas amostras de água da primeira campanha apenas RB3 (0,44) foi significativamente superior ao controle negativo. Nas amostras de sedimento da mesma campanha, somente a estação DB (0,0) não apresentou índice significativo em relação ao controle negativo (0,0). Na segunda campanha, para as amostras de água, somente a estação DB (0,0) não foi significativa quando comparada ao controle negativo (0,00). Já as amostras de sedimento, o IMUT das estações DB (0,00) e RB2 (0,11) não diferiram significativamente do controle negativo (0,00).

Quando observada a frequência de micronúcleos em células F_1 (MN- F_1) (Tabela 4) (Figura 10-P), durante a primeira campanha, apenas as amostras de sedimento das estações RB2 (0,36) e SU1 (0,32) foram significativamente superiores ao controle negativo (0,00). Enquanto que na segunda campanha, somente RB2 (0,08) e SU2 (0,12) para as amostras de água e DB (0,16) para as amostras de sedimento não apresentaram índices que diferissem do controle negativo (0,00).

6.4 Análise dos biomarcadores bioquímicos

A Análise dos Componentes Principais (PCA) realizada entre os elementos-traço e biomarcadores bioquímicos (Figura 12) aponta que as variáveis analisadas explicam 79,4% da variação observada entre as amostras de água da primeira campanha e 75,9% na segunda campanha. E para as amostras de sedimento (Figura 13), a PCA explica 70,4% na primeira campanha e 75,4% na segunda campanha.

Para a estação amostral de DB, nas amostras de água foi observada alta atividade da CAT, e maiores níveis de LPO e GSH durante a primeira campanha e SOD durante a segunda (Tabela 6). Por meio da análise dos componentes principais (PCA), a quantificação da LPO e GSH pode estar relacionada ao Zn e ao Cu (Figura 12). Nas amostras de sedimento, durante a primeira campanha observou-se a atividade elevada da CAT e GST, provavelmente associada à concentração de Cd e Pb das amostras (Tabela 6) (Figura 13).

Para a represa de Rio Bonito, na estação RB1 durante a primeira campanha, para as amostras de água, foi observada alta atividade da GST, relacionada à concentração de Pb, Fe, Mn, Co, Cd, Al (Tabela 6) (Figura 12). Durante a segunda campanha, alta atividade da GST e GSH, provavelmente relacionada à atividade de As e ao Ni, Cu e Al, respectivamente (Tabela 6) (Figura 12). Para as amostras de sedimento, durante a segunda campanha constatou-se elevada atividade da GST, que pode ter sido influenciada pelas concentrações de As e Fe (Tabela 6) (Figura 13)

Na estação RB2, durante a primeira campanha, para as amostras de água, foi observada alta atividade da GST, relacionada à concentração de Co, Al, Pb, Cd, Fe e Mn e a alta atividade da CAT pelo Cu (Tabela 6) (Figura 12). Durante a segunda campanha, alta atividade da GST e níveis de LPO, provavelmente relacionada à atividade de As e Ni, e os elevados níveis de GSH, pelo Al, Co, Cu, Fe e Pb (Tabela

6) (Figura 12). Para as amostras de sedimento, constatou-se elevada atividade da SOD e GST, na primeira e segunda campanha, respectivamente (Tabela 6) (Figura 13).

Para a estação RB3, durante a primeira campanha, foi observada alta atividade de CAT e níveis de LPO nas amostras de água, possivelmente relacionadas à concentração de Cu e ao Cu e As, respectivamente (Tabela 6) (Figura 12). Durante a segunda campanha, alta atividade da GST, provavelmente relacionada à atividade de As e Ni (Tabela 6) (Figura 12). Para as amostras de sedimento, durante a primeira campanha, foi relatada alta atividade de CAT e LPO, que podem estar relacionadas à concentração de Cd e Pb e ao Al e As, respectivamente. Na segunda campanha constatou-se elevada atividade da GST, provavelmente relacionada à concentração de Cd (Tabela 6) (Figura 13).

Na represa Suíça, na estação amostral SU1 durante a primeira campanha, para as amostras de água, foi observada alta atividade da CAT, GST e níveis de LPO, relacionada à concentração de Cu, ao Co, Al, Pb, Cd e Fe e aos elementos Cu, Zn e Fe, respectivamente (Tabela 6) (Figura 12). Durante a segunda campanha, alta atividade da GSH, provavelmente relacionada à atividade de Co, Fe, Pb, Al e Cu (Tabela 6) (Figura 12).

A estação SU2 apresentou durante a primeira campanha nas amostras de água, alta atividade de GST, possivelmente relacionada aos elementos Co, Al, Pb, Cd e Fe e elevados níveis de LPO, que podem estar relacionados ao Cu, Zn e Fe. Na segunda campanha, observou-se níveis elevados de GSH

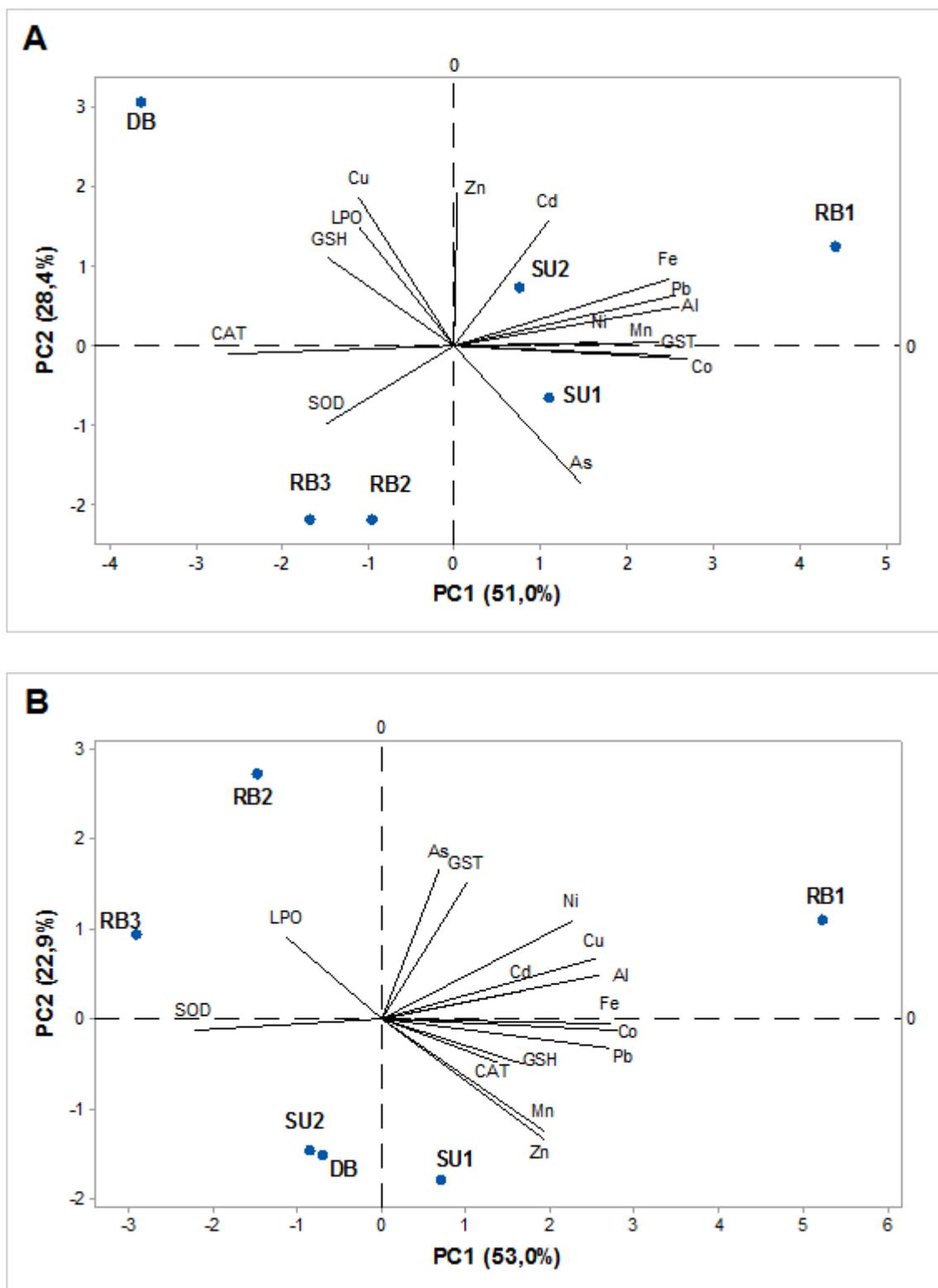


Figura 12: Análise de PCA integrando dados de elementos-traço e bioquímicos às amostras de água coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suiça (SU)/ES **A** – primeira campanha; **B** – segunda campanha. Atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona s-transferase (GST), taxa de peroxidação lipídica (LPO) e glutatona reduzida (GSH) em raízes de *Allium cepa* após exposição

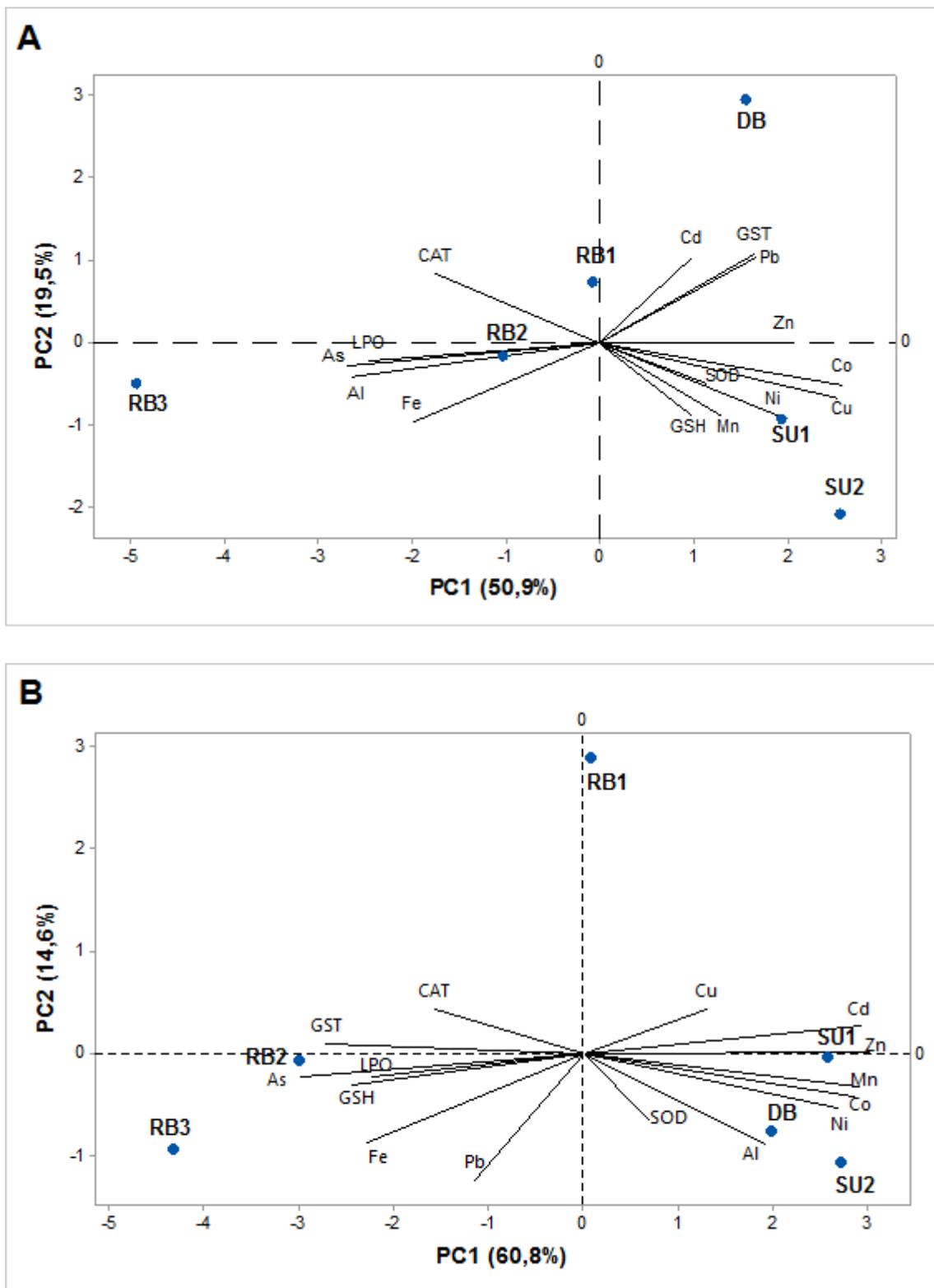


Figura 13: Análise de PCA integrando dados de elementos-traço e bioquímicos às amostras de sedimento coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES **A** – primeira campanha; **B** – segunda campanha. Atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona s-transferase (GST), taxa de peroxidação lipídica (LPO) e glutatona reduzida (GSH) em raízes de *Allium cepa* após exposição

Tabela 6: Atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona s-transferase (GST), peroxidação lipídica (LPO) e glutatona reduzida (GSH) em raízes de *Allium cepa* após exposição às amostras de água e sedimento coletadas nos diferentes pontos das represas de Duas Bocas (DB), Rio Bonito (RB) e Suíça (SU)/ES.

		Água					Sedimento				
		CAT (nM/mg)	SOD (U/mg)	GST (nM/mg)	LPO (nM/mg)	GSH (µmol/mg)	CAT (nM/mg)	SOD (U/mg)	GST (nM/mg)	LPO (nM/mg)	GSH (µmol/mg)
1ª Campanha	DB	188,07 ± 28,91a	38,3 ± 10,99a	260,92 ± 4,09b	7,5 ± 2,05a	3,09 ± 0,66a	375,02 ± 66,86a	35,18 ± 11b	758,58 ± 59,7a	2,24 ± 0,87b	2,69 ± 1,27a
	RB1	91,23 ± 2,23b	26,93 ± 2,63a	443,12 ± 7,94a	0,86 ± 0,19b	2,17 ± 0,11b	199,47 ± 29,16b	38,04 ± 1,29b	272,83 ± 66,61c	0,9 ± 0,16b	2,27 ± 0,49a
	RB2	169,54 ± 22,71a	37,57 ± 9,03a	371,7 ± 88,32a	0,29 ± 0,08b	1,64 ± 0,4b	156,2 ± 27,95b	55,5 ± 8,07a	401,85 ± 77,75b	3,24 ± 3,13b	1,95 ± 0,07a
	RB3	152,5 ± 38,57a	44,59 ± 7,35a	271,15 ± 30,31b	1,22 ± 0,22b	2,8 ± 0,31a	450,73 ± 27,18a	24,61 ± 11,21b	218,04 ± 13,8c	16,95 ± 0,67a	2,94 ± 0,41a
	SU1	148 ± 2,9a	46,64 ± 0,92a	357,29 ± 83,58a	4,24 ± 0,21a	2,05 ± 0,07b	120,41 ± 5,92b	31,06 ± 6,46b	441,37 ± 81,75b	2,49 ± 1,26b	3,31 ± 0,24a
	SU2	131,65 ± 6,03b	31,1 ± 10,31a	339,01 ± 28,43a	6,04 ± 0,19a	2,43 ± 0,19b	157,86 ± 1,74b	53,79 ± 0,6a	402,86 ± 4,46b	1,48 ± 0,12b	3,56 ± 0,04a
2ª Campanha	DB	134,53 ± 20,18a	52,2 ± 3,76a	211,34 ± 164,51b	1,08 ± 1,37b	2,9 ± 0,39b	154,46 ± 10,66a	40,61 ± 3,8a	215,82 ± 5,02b	1,94 ± 0,19a	3,89 ± 0,31a
	RB1	147,53 ± 20,87a	30,21 ± 3,68b	371,2 ± 59,43a	0,72 ± 0,03b	3,88 ± 0,22a	181,7 ± 16,63a	36,86 ± 1,63a	319,47 ± 49,74a	1,17 ± 0,12a	3,9 ± 2,39a
	RB2	144,64 ± 54,07a	41,42 ± 5,41b	439,55 ± 17,26a	6,42 ± 0,36a	3,46 ± 0,34a	240,62 ± 77,05a	33,13 ± 1,71a	340,8 ± 7,35a	2,71 ± 1,16a	4,14 ± 1,41a
	RB3	126,28 ± 46,84a	52,97 ± 16,79a	257,95 ± 62,92b	1,52 ± 1,45b	2,04 ± 0,73b	156,21 ± 20,75a	42,34 ± 9,59a	412,24 ± 22,69a	2,89 ± 2,32a	5,29 ± 3,55a
	SU1	166,55 ± 79,82a	37,14 ± 0,98b	209,2 ± 40,9b	2,43 ± 0,85b	4,67 ± 1,38a	155,13 ± 25,09a	40,4 ± 4,11a	244,38 ± 49,02b	1,93 ± 0,62a	2,81 ± 1,17a
	SU2	141,28 ± 68,56b	37,9 ± 10,88a	179,98 ± 35,74b	2,99 ± 1,48b	3,5 ± 0,38a	150,21 ± 64,42a	39,6 ± 16,02a	283,9 ± 88,11b	0,06 ± 0,01a	3,86 ± 0,8a

*médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (p > 0,05)

7. DISCUSSÃO

7.1 Represa de Duas Bocas

As variáveis limnológicas são importantes para a caracterização da água e amplamente utilizadas na avaliação de impactos ambientais. Dentre as variáveis analisadas nesse estudo, a estação amostral de Duas Bocas (DB) apresentou valor de pH abaixo do estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005, que estabelece o valor entre 6-9 para águas de classe II. Valores de pH ácido em ambientes aquáticos, como o das amostras de água da estação amostral DB, normalmente estão relacionados à presença de ácidos orgânicos na água, como ácidos húmicos e fúlvicos, encontrados em águas escuras, ricas em substâncias húmicas (ESTEVES, 2011). A estação DB fica localizada na foz do rio Pau-amarelo e recebe o aporte de muita matéria orgânica proveniente do rio e da floresta no entorno. Essa matéria orgânica se decompõe, consumindo oxigênio e liberando gás carbônico, que em contato com a água, forma ácido carbônico e reduz o pH da água, podendo afetar o metabolismo de diversas espécies aquáticas e influenciando o efeito de substâncias tóxicas para esses organismos (COLE, 1994; FUNASA, 2007; ESTEVES, 2011).

De forma integrada às análises limnológicas, as características bióticas são necessárias para uma melhor avaliação do ambiente e permitem averiguar os efeitos de estressores sobre os ecossistemas. Assim, os resultados das análises do *Allium cepa* após exposição às amostras coletadas de DB, revelam que as amostras de água nas duas campanhas apresentaram índice mitótico (MI) significativamente inferior ao controle negativo e a amostra de água da segunda campanha apresentou índice de mutagenicidade em células F_1 . O índice mitótico refere-se ao potencial citotóxico das amostras avaliadas e o índice de mutagenicidade em células F_1 indica a fixação de um dano mutagênico à molécula de DNA não reparado pelo sistema de reparo das células meristemáticas e fixado nas células F_1 (MA et al., 1995).

Segundo Hoshina e Marin-Morales (2009), as alterações no índice mitótico são um alerta para os níveis de contaminantes de um ambiente, pois revela a existência de poluentes possivelmente citotóxicos. Estudos limnológicos indicam que a represa de DB é mesoeutrófica-eutrófica com máximos metalimnéticos de clorofila e

dominância da comunidade fitoplanctônica por cianobactérias alternada com clorófitas (DELAZARI-BARROSO et al., 2009), sendo que dentre as cianobactérias há espécies potencialmente produtoras de cianotoxinas (DELAZARI-BARROSO et al., 2007; SANT'ANNA et al., 2008). Alguns estudos relatam a toxicidade de cianobactérias em raízes de *A. cepa*, causando apoptose das células e consequente redução do índice mitótico, como observado por Sousa et al. (2010) e Laughinghouse (2012), o que pode estar relacionado aos efeitos citotóxicos apresentados nessas amostras.

Embora o índice de aberrações cromossômicas (CA) não tenha sido significativo nas amostras de água da segunda campanha, a presença de células com alto número de pontes e perdas cromossômicas durante a segunda campanha das amostras de água pode estar relacionado ao dano mutagênico observado em células F_1 . Pontes cromossômicas podem ocasionar perdas ou quebras das cromátides ligadas, que, se não reparadas, podem originar MN na próxima etapa de divisão celular e posterior fixação do dano em células F_1 (FENECH et al., 1997; FENECH, 2000; RIBEIRO et al., 2003; SOUZA et al., 2013b). Uma das formas de indução na formação de pontes cromossômicas é a contaminação por elementos-traço (MATSUMOTO et al., 2006; BIANCHI et al., 2011).

As amostras de sedimento das duas campanhas apresentaram alteração apenas no CA, que avalia a genotoxicidade pela análise de alterações cromossômicas durante a divisão celular e que são passíveis de reparo, podendo ocorrer de forma espontânea ou pela exposição aos agentes físicos e químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2008; FERNANDES et al., 2009). Essa alteração também pode estar relacionada à limnologia da represa conforme DELAZARI-BARROSO et al., (2009). Estudos de Laughinghouse (2012) também observaram alterações no CA de células meristemáticas de *A. cepa* tratadas com extratos de cianobactérias. Ainda, durante a primeira campanha, o nível de Ferro no sedimento de DB apresentou-se acima da resolução CONAMA 454/2012. Segundo Chandran et al. (2005), mesmo alguns elementos essenciais aos organismos, quando combinados com outros elementos como cromo, níquel e ferro, podem potencializar seu efeito, causando danos genotóxicos e mutagênicos em células de *A. cepa*.

Com base nos resultados da análise de marcadores bioquímicos, onde é avaliada a atividade de enzimas do estresse oxidativo, como CAT (catalase), GST

(glutathione-S-transferase), SOD (superóxido dismutase) e níveis de GSH (glutathione reduzida) e LPO (lipoperoxidação), demonstrou que as amostras de água da primeira campanha na estação DB, apresentaram maior atividade da enzima CAT e dos níveis de LPO e GSH e, durante a segunda campanha, alta atividade da SOD. Pela análise dos componentes principais (PCA) (Figura 12), os níveis de LPO e GSH podem estar relacionados à presença dos elementos-traço Zn e Cu nessas amostras. Para as análises de sedimento, onde somente a primeira campanha apresentou níveis altos de CAT e GST, a atividade dessas enzimas pode estar relacionada com a presença dos elementos-traço Cd e Pb pela análise de PCA (Figura 13).

Essas enzimas fazem parte da resposta bioquímica de organismos perante a estresses abióticos que podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), representadas pelo radical ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, que, se não neutralizado pelas defesas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e glutathione reduzida (GSH), podem promover danos oxidativos às membranas celulares (peroxidação lipídica - LPO) e ao material genético (LUSHCHAK et al., 2011). Metais como o cobre possuem potencial redox ativo, participando das reações de Fenton e Haber-Wiess e gerando EROs, principalmente radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), altamente tóxico às membranas lipídicas e à molécula de DNA. O efeito tóxico de metais como o Cd, Pb e Zn – que nessa estação amostral encontra-se acima dos valores permitidos pela legislação –, os danos se manifestam na alteração dos componentes de rotas metabólicas importantes, como fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, afetando o crescimento e desenvolvimento das plantas (FLOWERS et al. 2007; VERMA; DUBEY, 2003; SRIVASTAVA et al., 2006). Assim, observa-se que mesmo com as defesas antioxidantes ativadas pela CAT e níveis altos de GSH, o mecanismo de reparo antioxidante parece não ser suficiente para conter os danos oxidativo à membrana lipídica, evidenciado pelo pelos níveis de LPO apresentados. Ainda, pelo efeito da LPO no desenvolvimento, também pode estar relacionado com baixo índice mitótico apresentado nas amostras de água da primeira campanha.

7.2 Represa de Rio Bonito

O elevado índice de turbidez apresentado pela estação RB1 durante a segunda campanha (Tabela 1), está relacionado às características da zona de rio de um

reservatório e que de acordo com Thorton et al. (1990), a zona de rio é uma região que apresenta transporte de significativas quantidades de material fino particulado, como silte e argila. Além disso, coincide com o período de chuva na bacia de drenagem da represa de Rio Bonito (Figura 2). Segundo Esteves (2011), a precipitação influencia diretamente no ambiente aquático, elevando os níveis de água e aumentando a concentração de matéria orgânica dissolvida e, conseqüentemente, ocorre o aumento de partículas provenientes da ressuspensão do sedimento das águas tributárias e superficiais.

Com relação aos valores de condutividade elétrica (Tabela 1), as estações amostrais da represa de Rio Bonito apresentaram maiores valores. De acordo com Manzano et al. (2015), essa variável indica a quantidade de sais presentes na coluna d'água, sendo parâmetro indireto para a concentração de poluentes, pois aumenta à medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados. Porém, segundo a CETESB (2009), apenas ambientes com níveis superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ são considerados impactados. O pH alcalino observado em RB2, acima do limite estabelecido pelo CONAMA 357/2005, pode estar relacionado ao tipo de solo onde a água percorre (FRASCARELI et al., 2016) e também pode estar associado à presença de despejos industriais (RODRIGUES et al. 2015).

Quando analisamos os gráficos de distribuição da perfilagem, observamos a queda acentuada da temperatura, evidenciando uma estratificação térmica principalmente na estação RB3 durante a segunda campanha (Figura 4). Segundo Esteves (2011), a estratificação térmica impede a circulação da água entre a superfície e, na maioria das vezes, condiciona a estratificação química. Ainda segundo o autor, as maiores taxas de liberação de nutrientes do sedimento para a coluna d'água ocorre quando o fundo apresenta concentrações reduzidas de oxigênio ou situações anóxicas, como observado na estação RB3 (Figura 4), tornando o meio propício à solubilização de alguns íons e afetando diretamente o potencial redox do meio.

A análise citogenética pelo teste do *A. cepa* pode estar relacionado à alta concentração de Fe e As nas amostras de água durante a segunda campanha e Zn nas amostras de sedimento da primeira campanha em RB1. Além disso, a represa de Rio Bonito recebe aporte de poluentes provenientes de atividades granjeiras e de horticultura da sua bacia, que também podem estar associados aos resultados

observados. As aberrações cromossômicas mais frequentes nessa estação – aderências, atrasos e C-metáfases – provavelmente estão relacionadas a substâncias que apresentam afinidade de interação com o fuso mitótico, como elementos-traço, observado por diversos autores sobre sua ação na desorganização ou inativação do fuso mitótico em plantas superiores (LIU et al., 1992; FUSCONI et al., 2006). Um dos primeiros trabalhos que correlacionaram íons metálicos com as aberrações cromossômicas foi realizado por Fiskesjö (1988), onde o autor relata aderências e C-metáfase como as principais alterações observadas como resultado dessa exposição. Alterações no MI, CA e IMUT foram relatadas Plavak (2013) em estudos com células meristemáticas de *A. cepa* expostas a diferentes concentrações de As e Cd. O mesmo resultado foi observado por Yi et al. (2007) em estudos de concentrações diferentes também com raízes de *A. cepa* expostas ao As. O Zn pode apresentar toxidez quando em altas concentrações, afetando o crescimento e metabolismo de espécies vegetais, como apresentado por Ramos et al. (2009). Leme e Marin Morales (2007) propuseram que quando a frequência de aberrações cromossômicas que causam morte celular é muito alta, acaba diminuindo o número total de células F_1 e aumenta proporcionalmente o número dessas células com MN, como pode ter ocorrido em RB1 e RB3.

Foram observados maiores danos durante a segunda campanha tanto para água quanto para sedimento. Principalmente pela presença significativa de MN em células F_1 , onde foi observado afixação do dano causado durante o ciclo celular pelos poluentes presentes nas amostras. Segundo MA et al. (1995), os danos causados à molécula de DNA durante o ciclo celular, quando não reparado, são observados na forma de MN nas células F_1 . Durante a segunda campanha (novembro/2016), o nível da água da represa de Rio Bonito estava muito abaixo do encontrado na primeira campanha (Março/2016). Segundo Esteves (2011), pode ocorrer a concentração dos poluentes na coluna d'água nos períodos de estiagem e, conseqüentemente, uma maximização dos seus efeitos. Em contrapartida, estudos de Christofolletti (2008) e Duarte et al. (2017), encontraram maiores frequências de danos citogenéticos durante o período de chuva.

Amostras de água da estação RB1, durante a primeira campanha apresentaram alta atividade da GST (Tabela 6). Pela análise de PCA (Figura 12), a atividade da enzima GST está possivelmente correlacionada a quase todos os

elementos-traço quantificados, exceto Mn. Neste parâmetro avaliado, foi observada grande quantidade de Fe (acima do exigido pela Resolução CONAMA 357/2005) (Tabela 2). A GST desempenha papel detoxificador de potenciais agentes gerados intracelularmente ou encontrados na forma de xenobióticos (TORRES et al., 2004), por meio de reações de conjugação de grupo sulfidrílico da glutatona com grupos eletrofílicos de compostos xenobióticos (catalisada pela GST) tornando produtos da reação menos tóxicos e mais solúveis em água (LAM et al., 1994, TORRES et al., 2004).

A segunda campanha apresentou níveis altos de GSH e atividade da GST (Tabela 6), e níveis de Fe e As acima da resolução CONAMA nº 357/2005) (Tabela 2) inferindo este resultado possivelmente à presença destes dois elementos-traço. Quanto ao sedimento, apenas na segunda campanha, foi relatada alta atividade da GST (Tabela 6), que pela análise de PCA, pode estar relacionada também às concentrações de Fe e As. Bustingorri e Lavado (2014) relataram que plantas expostas a elevadas concentrações de As, apresentaram um aumento na atividade da GSH. O Fe livre participa da reação de Fenton, podendo formar radicais hidroxilas ($\bullet\text{OH}$), que reagindo com moléculas celulares como a GSH, pode resultar em dano tecidual oxidativo (SHANDER et al., 2009; GATTERMANN et al., 2011)

Na estação RB2, amostras de água da primeira campanha, apresentaram-se com alta atividade de CAT e GST (Tabela 6), que pela análise de PCA, podem estar relacionadas à atividade do Fe, Pb, Cd e Co e Al. Como observado em DB, esses elementos podem causar danos no crescimento e desenvolvimento das plantas e a ativação dessas enzimas pode ser uma tentativa de eliminação desses poluentes ou de EROs formadas, a fim de evitar a propagação do dano oxidativo e consequente dano nas membranas lipídicas. Segundo Rae et al. (1999), a maior parte da produção do radical $\bullet\text{OH}$ via reação de Fenton se deve à disponibilidade dos seguintes metais de transição: ferro, cobre, cromo e cobalto. Nas amostras da segunda campanha (Tabela 6) observou-se alta atividade das GST, LPO e GSH. A análise de PCA indica relação da atividade dessas enzimas a diversos metais, como Ni, Cu, Al e principalmente o As, que durante a segunda campanha está acima do permitido pela legislação nessa estação.

Segundo Bustingorri e Lavado (2014), plantas expostas a elevadas concentrações de As, apresentaram um aumento na atividade da SOD, CAT, GPX e GSH. A ativação das GST e GSH podem estar relacionadas ao processo de

conjugação com algum xenobiótico presente nas amostras, pois, a enzima GST catalisa a conjugação da GSH com compostos poluentes, deixando-os menos tóxicos e mais solúveis na água para facilitar a excreção ou degradação (CARLETTI et al. 2008; HUBER et al., 2008).

Os altos níveis de LPO, novamente, indicam que o processo de reparo do sistema antioxidante (ativado pelas enzimas CAT, GST, níveis de GSH) foi ineficiente, provocando danos à membrana lipídica das células. As amostras de água da segunda campanha apresentaram peroxidação lipídica e também dano ao material genético, demonstrado pelo índice de mutagenicidade, além de alterações no índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas. Assim, como observado por Stohs e Bagchi (1995), a formação de EROs pode resultar em peroxidação lipídica e, conseqüentemente, danos à molécula de DNA.

Análises bioquímicas da estação amostral RB3 (Tabela 6) apontaram atividades para CAT e LPO, em amostras de água da primeira campanha, possivelmente ativadas pelo Cu e ao Cu e As, respectivamente, pela análise de PCA (Figura 12). A segunda campanha apresentou alta atividade da GST, que pode ter sido ativada pela concentração de As e Ni nas amostras. Ao avaliar o sedimento da mesma estação, na primeira campanha observa-se LPO e CAT com alta atividade, e pela análise da PCA (Figura 13), podem estar relacionadas ao As e Al e ao Cd e Pb, respectivamente e alta atividade da GST relacionada ao As na segunda campanha.

O aumento da atividade dessas enzimas provavelmente ocorreu na tentativa de eliminação dos elementos-traço presentes e de evitar a propagação dos subprodutos do metabolismo oxidativo (KIM; KANG, 2015). Como observado, a peroxidação lipídica (LPO) é um subproduto da ação das EROs por meio da danificação da membrana lipídica das células (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). É uma reação em cadeia que gera muitas outras moléculas bioativas (EROs, peróxidos e isoprostanos) e aldeídos como produtos finais da oxidação, extremamente danosos e ocorre quando o sistema antioxidante foi ineficaz (JOMOVA; VALKO, 2011). Segundo Blakely et al. (1990), o peróxido de hidrogênio, em condições fisiológicas, não reage com a molécula de DNA, mas na presença de íons metálicos de transição, por meio da reação de Fenton, o peróxido de hidrogênio reage com esses metais, podendo produzir altas concentrações de hidroxil, que são diretamente responsáveis por alterações no DNA. Isso pode estar relacionado com os resultados encontrados

no bioensaio citogenético com *A. cepa*, onde observamos alterações nos valores de MI, CA e IMUT quando comparados ao controle negativo.

7.3 Represa Suíça

Na avaliação da toxicidade das amostras de água e sedimento realizada pelo sistema *A. cepa*, foram observados valores inferiores de germinação e crescimento radicular em amostras de sedimento da estação SU2. A concentração de Níquel (Ni) e Zinco (Zn) superior ao permitido pela Resolução CONAMA nº 454/2012 nas amostras de sedimento da primeira campanha podem estar relacionadas com esse resultado observado. Segundo Mishra e Kar (1974), quando o Ni é absorvido em excesso pela planta, o elemento causa redução no crescimento das raízes e clorose na parte aérea. Akbaş et al. (2009) também observaram efeitos fitotóxicos em plantas expostas a elevadas concentrações de Ni, corroborando os resultados encontrados nas amostras de água de SU2. Em ambientes aquáticos, o Ni pode ser depositado no sedimento por precipitação, complexação, adsorção em partículas de argila ou pode ser incorporado na biota, como o fitoplâncton e macrófitas aquáticas (CEMPEL; NIKEL, 2006). Esse resultado citotóxico encontrado nas amostras de sedimento em SU2 durante a primeira campanha influenciou a análise do MI e CA nessa amostra, uma vez que esse efeito reduz substancialmente a frequência do ciclo de divisão celular. A citotoxicidade indicada pela redução do MI em ambientes impactados também foi observada por Cabral (2007) em estudos com o teste do *A. cepa* em amostras de água superficial da represa Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves, Assu/RN.

Foram observados danos citogenéticos em ambas as amostras, sobretudo durante a segunda campanha e nas amostras de sedimento, onde foi observado dano genotóxico (aberrações cromossômicas) em células meristemáticas e mutagênico (formação de micronúcleos) em células meristemáticas e células F₁, podendo estar relacionado aos elementos-traço quantificados, como Ni e Zn. As aberrações mais encontradas nas amostras da represa SU foram aderência, C-metáfase e atrasos, assim como observado nos resultados para a represa de RB. O efeito mutagênico pode ser observado por danos à molécula DNA decorrentes da exposição a agentes mutagênicos, resultando em uma fragmentação cromossômica acêntrica (origem clastogênica) ou perda de cromossomos inteiros (aneugênica). Dessa forma, segundo

Leme e Marin Morales (2009), o micronúcleo é considerado um dos biomarcadores mais eficazes e simples de serem analisados para detectar efeito mutagênico promovido por químicos poluentes. Segundo Chakravarty e Srivastava (1992), a toxicidade do Ni é mais grave que a induzida por outros íons metálicos, como Cu e Zn.

Com relação à análise dos biomarcadores bioquímicos, elevada atividade da CAT, GST e níveis de LPO, foi verificada na estação amostral SU1 em amostras de água da primeira campanha (Tabela 6) (Figura 12), provavelmente relacionadas aos diversos elementos-traço: Cu, aos Co, Al, Pb, Cd Fe, ao Cu, Zn e Fe, respectivamente. Além disso, a quantificação de Fe está acima do permitido pela legislação. O aumento na atividade da GST frente a tantos poluentes, provavelmente se deu na tentativa de evitar que os danos causados pelas EROs fossem propagados, afirmando desta forma, como um bom marcador bioquímico, sendo muito utilizada em programas de monitoramento de compostos químicos poluentes, principalmente metais (COGO et al., 2009). Na segunda campanha, a GSH apresentou elevada atividade em amostras de água (Tabela 6) e pode ter relação aos elementos traço Co, Fe, Pb, Al e Cu, como observado pela análise de PCA (Figura 12). A GST é uma enzima que auxilia na eliminação de hidroperóxidos lipídicos pela conjugação com a GSH, facilitando sua eliminação (ŠETLÍKOVÁ; WIEGAND, 2009), ainda assim, a ativação desse sistema antioxidante não foi suficiente para impedir que ocorresse dano à membrana lipídica. Possivelmente devido à alta concentração de Fe nessa estação. O Fe livre é o principal elemento na reação de Fenton e conseqüente formação de radicais hidroxila no organismo, gerando danos às membranas quando não neutralizados (JOMOVA; VALKO, 2011).

Na estação SU2, nas amostras de água durante a primeira campanha, foram relatadas elevadas atividades de GST e LPO (Tabela 6), possivelmente influenciadas pelas concentrações de Co, Al, Pb, Fe e Mn e ao Cu, Zn e Fe, respectivamente, como indicado pela análise de PCA (Figura 12). Como observado na estação SU1, a GST tem um importante papel na conjugação da GSH com hidroperóxidos lipídicos ou com xenobióticos presentes nas amostras, facilitando sua eliminação a fim de evitar danos às membranas lipídicas das células. Porém, quando essa defesa antioxidante não é totalmente eficaz, ocorre o estresse oxidativo e, conseqüentemente, dano à membrana lipídica, como ocorreu durante a primeira campanha. Já durante a segunda

campanha, os elevados níveis de GSH observados (Tabela 6) (Figura 12) provavelmente foram suficientes para eliminar essas EROs e impedir o estresse oxidativo nas raízes de *A. cepa*. Alguns vegetais, quando em exposição a determinados metais de transição como Cu, Zn e Fe sofrem a redução do *pool* de GSH total, provocando um desequilíbrio nos níveis de GSSH/GSH e consequentemente, uma alteração no equilíbrio oxidativo desses organismos.

Com relação às amostras de sedimento, foi observado alta atividade apenas na primeira campanha da enzima SOD (Tabela 6), possivelmente ativada pelo Co, Cu, Ni, Zn e Pb segundo a PCA (Figura 13). Nessa estação, a quantificação de Ni e Zn estavam acima do permitido pela legislação. Como observado por outros autores (CHAOUÏ et al., 1997; CEMPEL; NIKEL, 2006; CAREGNATO, 2009), o Ni e o Zn possuem ação fitotóxica em plantas, afetando o crescimento principalmente das raízes. Esse resultado foi observado nos bioensaios de toxicidade deste trabalho, evidenciado pelo baixo índice de germinação, crescimento, índice mitótico e índice de aberrações cromossômicas. A atividade da SOD aumenta como resultado da formação de EROs, como radical superóxido pela exposição a metais pesados. O aumento de superóxido desencadeia o sinal para ativação de enzimas antioxidantes como a SOD (ALVAREZ; LAMB, 1997), atuando assim como uma das primeiras defesas do organismo à produção de EROs.

8. CONCLUSÃO

As análises dos parâmetros limnológicos apontaram para sinais de eutrofização da represa de Rio Bonito, principalmente na estação amostral RB3, durante a segunda campanha.

A quantificação dos elementos-traços nas amostras de água e sedimento, indicam que a maioria das concentrações se encontra dentro dos limites permitidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005 e CONAMA nº 454/2012. Entretanto, para as amostras de água, Fe e As apresentaram concentrações acima do permitido e nas amostras de sedimento, Zn e Ni. As concentrações dos elementos-traços na primeira campanha foram superiores à segunda campanha e maior nas amostras de sedimento.

A exposição de sementes de *A. cepa* às amostras coletadas para germinação foi capaz de induzir alterações no status oxidativo dos organismos, inferindo a presença de poluentes, como elementos-traço, ao estresse oxidativo observado em raízes de *A. cepa*.

A partir do ensaio com *A. cepa*, as represas Rio Bonito e Suíça apresentaram maiores níveis de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente SU2 e RB1. Para a estação RB1, a alta indução de danos nas células, provavelmente se deu pela presença de Fe, Zn e As. O baixo crescimento radicular, germinação e índice mitótico encontrados nas amostras de sedimento de SU2 na primeira campanha, podem estar relacionados ao Ni e Zn presentes nessa estação.

A relação entre os danos citogenéticos e a atividade bioquímica mostrou-se próxima, principalmente nas amostras de água. Podemos sugerir que os danos citogenéticos observados são possivelmente evidenciados pelos níveis de LPO observados nas mesmas estações amostrais.

Observa-se uma maior atenção a estudos de preservação, biomonitoramento e controle de qualidade da água da estação amostral de Duas Bocas, por se tratar de um reservatório para fins de abastecimento público.

A partir do resultado das análises químicas, toxicogenéticas e bioquímicas, podemos evidenciar a importância em integrar esses dados para uma análise mais completa e detalhada de estudo do biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.

9. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA Estadual de Recursos Hídricos – AGERH. **Relatório do Comitê da Bacia do Rio Santa Maria da Vitória e Rio Jucu. Processo e Definição dos Enquadramentos**. Disponível em: < <https://agerh.es.gov.br/cbh-smv>>. Acesso em: 16 de dezembro de 2016.

AKBAŞ, H.; DANE, F.; MERİÇ, Ç. Effect of nickel on root growth and the kinetics of metal ions transport in onion (*Allium cepa*) root. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, n. 4, p. 332-6, 2009.

ALAVAREZ, M.E.; LAMB, C. Oxidative burst mediated defense responses in plant disease resistance. In: **Oxidative stress and the Molecular Biology of antioxidant defenses**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. p. 815–39.

ANTHONY, R. G.; HUSSEY, P. J. Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton. **Trends Plant Science**, v. 4, p. 112–116, 1999.

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

ASHRAF, M. Biotechnological **Annual Review in Plant Biology** approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 84-93, 2009.

AZIZ, A.; LARHER, F. Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of *Brassica napus* L. **Journal of Plant Physiology**, v. 153, n. 5-6, p. 754-762, 1998.

BABICH, H.; SEGALL, M. A.; FOX, K. D. The *Allium* Test--A Simple, Eukaryote Genotoxicity Assay. **American Biology Teacher**, v. 59, n. 9, p. 580-83, 1997.

BARŠIENĖ, J.; DEDONYTĖ, V.; RYBAKOVAS, A.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; ANDERSEN, O. K. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in

peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 99-104, 2006.

BAPTISTA, M; CARDOSO, A. Rios e Cidades: uma longa e sinuosa história. **Revista UFMG**, v. 20, n. 2, p. 124-153, 2013.

BARRA, C.M.; SANTELLI, R, E.; ABRÃO, J.J.; GUARDIA, M.L. Especificação de arsênio – Um Revisão. **Química Nova**, v. 23, n.1, 2000

BERNARDES, P.M. Prospecção de toxicidade de fungicidas por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares em *Allium cepa*. **Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2014

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. Grune & Stratton, p. 8-18, 1975.

BIANCHI, J; ESPINDOLA, E.L.G.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 826-833, 2011.

BLAKELY, W.F; FUCIARELLI, A. F.; WEGHER, B. J.; DIZDAROGLU, M. Hydrogen peroxide-induced base damage in deoxyribonucleic acid. **Radiation research**, v. 121, n. 3, p. 338-343, 1990.

BOGITSH, B. J.; MIDDLETON, O. L.; RIBEIRO-RODRIGUES, R. Effects of the antitubulin drug trifluralin on the proliferation and metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 85, p. 475–480, 1999.

BONOMO, M.M. Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em *Carica papaya* L..**Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2014. 85p.

BORBA, R.P. Arsênio em ambiente superficial: processos geoquímicos naturais e antropogênicos em uma área de mineração aurífera, Campinas-SP, 250p. **Tese de Doutorado em Geociências**, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

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.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 357**. Diário Oficial da União de 18/03/2005. Brasília. 2005

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº 454**. Diário Oficial da União de 08/11/2012. Brasília. 2012.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Potencial de florações de cianobactérias em um reservatório de abastecimento doméstico no estado do espírito santo (reservatório duas bocas – Cariacica – ES)**. Brasília: Funasa, 2007. 82p

BRIAT, J; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie**, v. 322, n. 1, p. 43-54, 1999.

BUSTINGORRI, C; LAVADO, R.S. Soybean as affected by high concentrations of arsenic and fluoride in irrigation water in controlled conditions. **Agricultural Water Management**, v. 144, p. 134-139, 2014.

BUSS, D.F; BAPTISTA, D.F; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 465-473, 2003.

BUSS, D.F; OLIVEIRA, R.B.; BAPTISTA, D.F. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 1, 2008.

BUZELLI, G.M.; CUNHA-SANTINO, M.B. Diagnosis and analysis of water quality and trophic state of Barra Bonita reservoir, SP. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, n. 1, p. 186-205, 2013.

CABRAL, T.M. Avaliação da genotoxicidade das águas superficiais da Barragem Engenheiro Armando Ribeiro Gonçalves, Assu/RN. **Dissertação de Mestrado em Genética e Biologia Molecular** - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

CAJARAVILLE, M.P.; BEBIANNO, M. J.; BLASCO, J.; Porte, C.; SARASQUETE, C.; VIANEGRO, 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, p. 295-311, 2000.

CAMPOS, C.R. Monitoramento da microbiana e dos parâmetros físico-químico do vinhoto. **Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola** - Universidade Federal de Lavras, 2009.

CARDOSO-SILVA, S. NISHIMURA, P.Y.; PADIAL, P.R.; MARIANI, C.F.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPÊO, M.L.M. Compartimentalização e qualidade da água: o caso da Represa Billings. **Bioikos**, Campinas, v. 28, p.31-43, 2014.

CARITÁ, R. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular)**, Universidade Estadual Paulista – UNESP-Rio Claro, 2010.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; DEL BOCCIO, P.; FEDERICI, L.; DILLIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: identification, cloning and functional characterization. **Aquatic toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48-57, 2008.

CASTILLO, G. 2004. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, Resultados y Aplicaciones**. México: IMTA, 188p. 2004.

CELICO, A. S. Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças. **Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias**, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2015

CEMPEL, M.; NIKEL, G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 3, p. 375-382, 2006.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Variáveis de qualidade de água**. São Paulo, 2009. Disponível em: < <http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/wp-content/uploads/sites/32/2013/11/variaveis.pdf> >. Acesso em: 19 Jan. 2017.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 3, p. 422-426, 2005.

CHAKRAVARTY, B; SRIVASTAVA, S. Toxicity of some heavy metals in vivo and in vitro in *Helianthus annuus*. **Mutation Research Letters**, v. 283, n. 4, p. 287-294, 1992.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M. H.; ELFERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Plant Science**, v. 127, p. 139-147, 1997.

CHRISTOFOLETTI, C. A. Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. **Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas (Biologia celular e molecular)**. Universidade Estadual Paulista – Rio Claro, 2008.

COGO, A.J.D; SIQUEIRA, A.F.; RAMOS, A.C., CRUZ, Z. M.; Silva, A.G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v. 7, n. 1, p. 37-42, 2009.

COLE, G. **Textbook of Limnology**. Sainte Louis: The C. V. Mosby, 1994

COMITÊ da Bacia Hidrográfica do Rio Santa Maria da Vitória. **CBHs Jucu e Santa Maria - RT2 Diagnóstico das Bacias Vol-I-II-III**. Disponível em: < <https://agerh.es.gov.br/cbh-smv> >. Acesso em: 28 de dezembro de 2016.

COREGNATO, F. F., Análise dos parâmetros de estresse oxidativo em espécies vegetais expostas a poluentes ambientais. **Dissertação de Mestrado em Ciências**

Biológicas: bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2009. 61p

CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI JR, I.; OKAWA, M. H. The fate of *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth. detritus within a tropical reservoir. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 22, n. 2, 2010.

CUYPERS A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. Biphasic effect of copper on the ascorbateglutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p. 512-517, 2000.

DELAZARI-BARROSO, A., SANT'ANNA, C.L. & SENNA, P.A.C. (2007). Phytoplankton from Duas Bocas reservoir, Espírito Santo State, Brazil (except diatoms). **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p.211-229, 2007.

DELAZARI-BARROSO, A.; BARROSO, G. F.; HUSZAR, V.L.M.; AZEVEDO, S.M.F.O. Physical regimes and nutrient limitation affecting phytoplankton growth in a meso-eutrophic water supply reservoir (Southeastern Brazil). **Lakes & Reservoirs: Research & Management**, v. 14, n.4, p.269-278, 2009.

DIXON, D.P.; SELLARS, J.D.; KENWRIGHT, A.M; STEEL, P.G. The maize benzoxazinone DIMBOA reacts with glutathione and other thiols to form spirocyclic adducts. **Phytochemistry**, v. 77, p. 171-178, 2012.

DUARTE, I.D; DIAS, M.C., DAVID, J.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, 2012.

DUARTE, I. D.; ROCHA, L. D; BONOMO, M. M.; MOROZESK, M.; COELHO, E. J. R.; DIAS, M. C. D.; 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.

DUTKA, B. Short-term root elongation toxicity bioassay. **Methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments (B. Dukta, Ed.) National Water Research Institute (NWRI). Environment Canada, Canadá**, p. 120-122, 1989.

ESTEVEES, F.A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. **Science of the Total Environment**, v. 346, n. 1, p. 256-273, 2005.

FENECH, M; PEREPETSKAYA, G.; MIKHALEVICH, L. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations—experiences from the Chernobyl catastrophe. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, n. 2, p. 112-118, 1997.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

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 *Nyctiocorax nyctiocorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista da Gestão Costeira Integrada**, v. 10, n. 2, p. 229-241, 2010.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

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.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test—an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FISKESJO, G.; LEVAN, Albert. **Evaluation of the first ten MEIC chemicals in the Allium test**. Alternatives to laboratory animals: ATLA, 1993.

FLOWERS, M. D.; FISCUS, E. L.; BURKEY, K. O.; BOOKER, F. DUBOUIS, J. B. Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and yield of snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes differing in sensitivity to ozone. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 190-198, 2007.

FRASCARELI, D.; BEGHELLI, BEGHELLI, F. G. DE S.; DA SILVA, S.C.; MOSCHINI-CARLOS, V. Heterogeneidade espacial e temporal de variáveis limnológicas no reservatório de Itupararanga associadas com o uso do solo na Bacia do Alto Sorocaba-SP. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, p. 771-781, 2015.

FRASCARELI, D.; SILVA, S.C.; CHAVES, A.P.; CARLOS, V.M. Qualidade da água do Rio Sorocaba (Sorocaba/SP) e sensibilizações educacionais nas escolas públicas municipais. **AMBIENTE & EDUCAÇÃO-Revista de Educação Ambiental**, v. 21, n. 1, p. 195-213, 2016.

FRIBERG, L.; NORDBERG, G.F.; VOUK, V.B. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Amsterdam: 2nd, 1985.

FUSCONI, A.; REPETTO, O.; BONA, E.; MASSA, N.; GALLO, C.; DUMAS-GAUDOT, E.; BERTA, G. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 253–260, 2006.

GALLAGHER, E.P.; CANADÁ, A.T., DIGIULIO, R.T. The protective role of glutathione in chlorothanil- induced toxicity to channel catfish. **Aquatic Toxicology**, v. 23, p. 155-168, 1992.

GALTER, I. N. Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos – Alegre, Brasil. **Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento** – Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, 2016. 88p.

GATTERMANN, N.; RACHMILLEWITZ, E. A. Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis and complications. **Annals of Hematology**, v. 90, p. 1-10, 2011. Doi: 10.1007/s00277-010-1091-1.

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.

GOMES, J.V.; TEIXEIRA, J.T.D.S.; LIMA, V.M.D.; 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.

GOPALAN, H. N. B. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 99-102, 1999.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the US Environmental Protection Agency gene-tox program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 99, n. 3, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GREGER, M. Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. **Heavy Metal Stress in Plants**. India: Springer. p. 1-12, 2004

GROVER, I. S.; KAUR, Satwinderjeet. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 183-188, 1999.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. [51] Assays for differentiation of glutathione S-Transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398-405, 1981.

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.

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.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, Â. Glutathione and related enzymes: biological roles and importance in pathological processes. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. **Lewis Publishers**, p. 155-195, 1992.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2010. **Características da população e dos domicílios: resultados do universo**. Rio de Janeiro: IBGE. 2011.

JARDIM, W.F. Medição e interpretação de valores do potencial redox (E_H) em matrizes ambientais. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1233-1235, 2014.

JIANG, Z-Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxides measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v.26, p.853-856, 1991.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JOMOVA, K; VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**, v. 283, n. 2, p. 65-87, 2011.

KIM, J; KANG, J. The arsenic accumulation and its effect on oxidative stress responses in juvenile rockfish, *Sebastes schlegelii*, exposed to waterborne arsenic (As 3+). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 668-676, 2015.

LAM, B.K.; PENROSE, J.F.; FREEMAN, G.J.; AUSTEN, K. F. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7663-7667, 1994.

LAUGHINGHOUSE, H. D.; PRÁ, D.; SILVA-STENICO, M. E.; RIEGER, A.; FRESCURA, V. D. S.; FIORE, M. F.; TEDESCO, S. B. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v. 432, p. 180-188, 2012.

LEE, Y.S.; KANG, Y.S.; LEE, S.H.; KIM, J.A. Role of NAD (P) H oxidase in the tamoxifen-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in HepG2 human hepatoblastoma cells. **Cell death and differentiation**, v. 7, n. 10, p. 925, 2000.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—a case study. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 1, p. 80-86, 2008.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

LEWIS, M. A. Algae and vascular plant tests.in: Rand, G. (Ed), **Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment**, Taylor; Francis Publishers, USA, p. 135-169, 1995.

LINDELL, M.J; RAI, H. Photochemical oxygen consumption in humic Waters, **Archiv für Hydrobiologie**. v. 43, p. 145-155, 1994.

LIU, DONGHUA; JIANG, WUSHENG; LI, MAOXIE. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. **Hereditas**, v. 117, n. 1, p. 23-29, 1992.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011

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/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MAJER, B.J.; TSCHERKO, D.; PASCHKE, A.; WENNRICH, R.; KUNDI, M., KANDLER, E.; KNASMÜLLER, S Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental**, v. 515, n. 1-2, p. 111-124, 2002

MALUF, S.W.; RIEGEL, M. **Citogenética humana**. Porto Alegre. Artmed Editora, 2009.

MALLICK, N; MOHN, F.H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MANAN, T.S.A.; MALAKAHMAD, A.; SIVAPALAN, S. Toxicological studies of Perak River water using biological assay. In: **Engineering Challenges for Sustainable Future: Proceedings of the 3rd International Conference on Civil, Offshore and Environmental Engineering (ICCOEE 2016, Malaysia, 15-17 Aug 2016)**. CRC Press, 2016. p. 299.

MANZANO, B. C.; ROBERTO, M. M.; HOSHINA, M. M., MENEGARIO, A. A.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the

comet assay in HTC cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 2, p. 1399-1407, 2015.

MARCANO, L.; DEL CAMPO, A. Estudio ultraestructural del nucléolo en poblaciones meristemáticas de cebolla *Allium cepa* (L) tratadas con inhibidores metabólicos. **Ciencia**, v. 3, n. 2, p. 73-82, 1995.

MARCANO, L.; MONTIEL, X.; CARRUYO, I.; BRACHO, M. D. P.; ATENCIO, L. Efecto mitotóxico y genotóxico del cadmio en células meristemáticas de cebolla (*Allium cepa* L.). **Ciencia**, v. 6, n. 2, P. 93-99, 1998.

MARCANO, L.; CARRUYO, I.; DEL CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environmental Research**, v. 94, n. 2, p. 221-226, 2004.

MARRS, K. A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annual review of plant biology**, v. 47, n. 1, p. 127-158, 1996.

MATSUMOTO, S.T. Estudos sobre a influência de efluentes potencialmente genotóxicos, derivados de curtume, na contaminação de recursos hídricos da região de Franca/SP. **Tese de Doutorado em Genética**, Universidade Estadual Paulista – UNESP, 2004. 216p

MATSUMOTO, S.T.I; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 1, p. 148-158, 2006.

MAZIVIERO, G.T. Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual Paulista, 2011

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MINISSI, S; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 393, n. 1, p. 17-21, 1997.

MISHRA, D.; KAR, M. Nickel in plant growth and metabolism. **The Botanical Review**, v. 40, n. 4, p. 395-452, 1974.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S. V.; PRASAD, M. N. V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, p. 25-37, 2006.

MITTLER, Ron. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.

MONTAVON, P; KUKIC, K. R; BORTLIK, K. A simple method to measure effective catalase activities: optimization, validation, and application in green coffee. **Analytical biochemistry**, v. 360, n. 2, p. 207-215, 2007.

MOROZESK, M. Efeitos dos ácidos húmicos provenientes de aterro sanitário em plantas. **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2014. 85p.

NOVELLI, F.Z. A Reserva Biológica de Duas Bocas e seus vínculos com a história da conservação no Espírito Santo. **Natureza on line**, v. 8, n. 2, p. 57-59, 2010.

OCHI, T.; SUZUKI, T.; ISONO, H.; SCHLAGENHAUFEN, C.; GIESSLER, W.; TSUTSUI, T. Induction of structural and numerical changes of chromosome, centrosome abnormality, multipolar spindles and multipolar division in cultured Chinese hamster V79 cells by exposure to a trivalent dimethylarsenic compound. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 530, n. 1, p. 59-71, 2003.

OLIVEIRA, R.M.L. A Criação dos Comitês de Bacias Hidrográficas dos Rios Jucu e Santa Maria da Vitória: Perspectivas e Desafios da Gestão Hídrica Capixaba. **Dissertação de Mestrado em Geografia**, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, 2011.

PEDRAZZI, F.J.M.; DE SOUZA SARIDINHA, D.; MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPEO, M. Spatial and temporal quality of water in the Itupararanga Reservoir, Alto Sorocaba Basin (SP), Brazil. **Journal of Water Resource and Protection**, v. 5, n. 01, p. 64, 2013

PALMIERI, M.J. Análise comparativa do efeito citotóxico do Spent Pot Liner (SPL) e seus principais componentes fracionais em células vegetais e humanas. **Dissertação de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas**, Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2012.

PASCALICCHIO, A.E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo: Annablume, 2002.

PATNAIK, A.R.; ACHARY, V. M.M.; PANDA, B.B. Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. **Plant Growth Regulation**, v. 71, n. 2, p. 157-170, 2013.

PLAVAK, T. Efeitos genotóxicos e citotóxicos do estresse causado por arsênio e cádmio em *Allium cepa* L.. **Dissertação de Mestrado em Biologia Evolutiva**, Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2013. 51p.

PRABHU, K.S.; REDDY, P.V; JONES, E.C; LIKEN, A.D.; REDDY, C.C. Characterization of a class alpha glutathione-S-transferase with glutathione peroxidase activity in human liver microsomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 424, n. 1, p. 72-80, 2004.

QUEIROZ, C.G.S.; ALONSO, A.; MARES-GUIA, M.; MAGALHAES, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. **Biologia Plantarum**, v. 41, n. 3, p. 403-413, 1998.

RAE, T. D.; SCHMIDT, P. J; PUFAHL, R. A.; CULOTTA, V. C.; O'HALLORAN, T. V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. **Science**, v. 284, p. 805-808, 1999

RAMOS, S. J.; CASTRO, E. M.; PINTO, S, I, C.; FAQUIN, V.; OLIVEIRA, C.; PEREIRA, G. C. Uso do silício na redução da toxidez de zinco em mudas de eucalipto. **Interciencia**, v. 34, n. 3, p. 189-194, 2009.

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas**, p. 173-178, 2003.

RUBIM, K. T. Comunidade fitoplanctônica e variáveis limnológicas no reservatório de Rio Bonito: Rio Santa Maria da Vitória (Santa Maria de Jetibá – ES). **Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal**, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006. 126 f.

RODRIGUES, L.A.; TORRES, N.H.; TORNISIELO, V.L.; FERREIRA, L.F.R., MARANHO, L.A. Determination of toxicity assays, trophic state index, and physicochemical parameters on Piracicaba River and Itapeva Stream. **Revista Ambiente & Água**, v. 10, n. 2, p. 310-317, 2015.

SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; PEREIRA, C.D.S.; CARVALHO, C.S.; SADUSKAS-HENRIQUE, H.; FERNANDES, M.N. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 41-51, 2013.

SANT'ANNA, C.L.A.; AZEVEDO, M.T. de P.; WERNER, V.M.; DOGO, C.R.; CARVALHO, L.R. de. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. **Algological Studies**, v.126, p.251-265, 2008.

SANTOS-FILHO, F. M. A política nacional de recursos hídricos (Lei 9.433/97) e sua implementação no Distrito Federal. In: **Revista da Fundação Escola Superior do Ministério Público do Distrito Federal e Territórios**, v. 17, p. 144-179, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 101, n. 1, p. 7, 1993.

SCANDALIOS, J.G.; ACEVEDO, A.; RUZSA, S. Catalase gene expression in response to chronic high temperature stress in maize. **Plant Science**, v.156, p. 103-110, 2000.

SEGURA, F.R; NUNES, E.A.; PANIZ, F.P.; PAULELLI, A.C.C.; RODRIGUES, G.B.; BRAGA, G.U.L.B.; FILHO, W.R.P.; BARBOSA, F.; CERCHIARO, G.; SILVA, F.B.; BATISTA, B.L. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, v. 218, p. 813-825, 2016.

ŠETLÍKOVÁ, I.; WIEGAND, C. Hepatic and branchial glutathione S-transferases of two fish species: Substrate specificity and biotransformation of microcystin-LR. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 4, p. 515-523, 2009.

SEYLER, P. T.; BOAVENTURA, G. R. Distribution and partition of trace metals in the Amazon basin. **Hydrological Processes**, v. 17, p. 1345-1361, 2003

SHANDER, A.; CAPPELLINI, M. D.; GOODNOUGH, L. T. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusion. **VoxSanguinis**, v. 91, p. 185-197, 2009.

SOUZA, B.S. Avaliação do processo H₂O₂/UV como pós-tratamento e remoção da atrazina de um efluente secundário de ETE para fins de reuso. **Tese de Doutorado em Engenharia Química** - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011

SOUZA, I. C.; DUARTE, I. D.; PIMENTEL, N. Q.; ROCHA, L. D.; MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; MATSUMOTO, S. T. Matching metal pollution with bioavailability, bioaccumulation and biomarkers response in fish (*Centropomus parallelus*) resident in neotropical estuaries. **Environmental pollution**, 180, 136-144, 2013a.

SOUZA, T.S; HENCKLEIN, F.A; DE ANGELIS, D.D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of landfarming soil treated with sugar cane vinasse. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1627-1636, 2013b.

SOUZA, L. L. Avaliação in vivo e in vitro do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e do sedimento do rio Corumbá – São Paulo, Brasil. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Estadual Paulista, 2014.

SRIVASTAVA, S.; MISHRA, S; TRIPATHI, R. D.; DWIVEDE, S.; GUPTA, D. K. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Aquatic Toxicology**, v. 80, p. 405-15, 2006.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 321-336, 1995.

TEIXEIRA, E.C.; FORMOSO, M.L.L.; BINOTTO, R.B.; SANCHEZ, J.D. Estudo do potencial de oxi-redução em águas subterrâneas que sofrem influência dos depósitos

de rejeitos de carvão e cinzas – municípios do Rio Grande do Sul. **Geochimica Brasiliensis**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 1999.

THORNTON, K.W.; KIMMEL, B.L.; PAYNE, F.E. **Reservoir Limnology: ecological perspectives**. John Wiley & Sons, 1990.

TORRES, M.C.L.; SOARES, N.F.F; MAIA, J.F. Parâmetros cinéticos da Glutathione S-Transferase e sua ativação por extratos de vegetais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 243-248, 2004.

TUCCI, C. E. M.; HESPANHOL, I.; CORDEIRO NETO, O. M. **Gestão da Água no Brasil**. Brasília: UNESCO, 2001

TUNDISI, J.G. Represas artificiais: perspectivas para o controle e manejo da qualidade da água para usos múltiplos. In (Ed) **Anais do 4 Simpósio Brasileiro de Hidrologia e Recursos Hídricos**. São Paulo: Associação Brasileira de Recursos Hídricos, 1985. p. 36-59.

VALERIO, M.E.; GARCÍA, J.F.; PEINADO, F.M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**, v. 378, n. 1, p. 63-66, 2007.

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, p. 645-655, 2003

WHITE, C. C.; VIERNES, H.; KREJSA, C. M.; BOTTA, D.; KAVABAGG, D. T. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate-cysteine ligase activity. **Analytical Biochemistry**, v. 318, p. 175-180, 2003

YI, H.; WU, L.; JIANG, L. Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium*-root micronucleus assay. **Science of the Total Environment**, v. 383, p. 232–236, 2007

YOUNG, B.J.; RIERA, N.I.; BEILY, M.E.; BRES, P.A.; CRESCO, D.C.; RONCO, A.E. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.