

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

IAN DRUMOND DUARTE

**QUALIDADE DA ÁGUA DA LAGOA JUARA (SERRA/ES): AVALIAÇÕES
FÍSICAS, QUÍMICAS E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
CITOGENÉTICAS EM PLANTAS**

VITÓRIA
2014

IAN DRUMOND DUARTE

**QUALIDADE DA ÁGUA DA LAGOA JUARA (SERRA/ES): AVALIAÇÕES
FÍSICAS, QUÍMICAS E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
CITOGENÉTICAS EM PLANTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciência Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Vegetal.

Orientador (a): Profa. Dra. Silvia Tamie Matsumoto

Co-orientador: Prof. Dr. Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.

VITÓRIA

2014

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

D812q Duarte, Ian Drumond, 1988-
Qualidade da água da lagoa Juara (Serra/ES) : avaliações físicas, químicas e respostas fisiológicas e citogenéticas em plantas / Ian Drumond Duarte. – 2014.
104 f. : il.

Orientador: Silvia Tamie Matsumoto.

Coorientador: Geraldo Rogério Faustini Cuzzuol.

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

1. Cebola. 2. Toxicidade - Testes de toxicidade. 3. Testes de mutagenicidade. 4. Pigmentos cloroplastídicos. 5. Tradescantia pallida. I. Matsumoto, Silvia Tamie. II. Cuzzuol, Geraldo Rogério Faustini. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Humanas e Naturais. IV. Título.

CDU: 57

IAN DRUMOND DUARTE

“QUALIDADE DA AGUA DA LAGOA JUARA (SERRA/ES): AVALIAÇÕES FÍSICAS, QUÍMICAS E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E CITOGENÉTICAS EM PLANTAS”

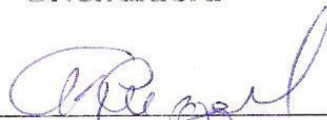
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA




Profª Drª Silvia Tamie Matsumoto
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Orientadora



Profº Drº Geraldo Rogério F. Cuzzuol
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES
Co-orientador



Profª Drª Maria do Carmo Pimentel Batitucci
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal - UFES
Examinador Interno



Profº Drº Leonardo Dobbs
Universidade De Vila Velha – UVV-ES
Examinador Externo

O segredo do sucesso é a constância do propósito.

Benjamin Disraeli.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo, pelo ensino e infraestrutura.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

A todos os docentes, discentes e profissionais do Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, pelo conhecimento transmitido e contribuições.

A Prof^ª. Dra. Silvia Tamie Matsumoto, pela amizade, pela parceria, por ter aceitado orientar este trabalho e por toda a orientação durante minha formação.

Agradeço aos membros da banca, que aceitaram corrigir este trabalho e por todas as contribuições.

Aos velhos amigos do GEMUT (Mariana, Marina, Lívia e Iara), e aos novos amigos (Edvar, Monique e Ian) por dividirem cada detalhe deste trabalho, pelas contribuições, respeito e carinho que recebo todos esses anos.

Aos colegas do PPGBV, pela presença e pelos momentos vividos nesses dois curtos anos.

A Prof^ª. Dr^ª Diolina Moura pela ajuda de grande valia com as soluções nutritivas.

Ao LATEAC, em especial a Prof^ª. Dr^ª Valeria Fernandes, Sandra, Nayara, Fred e cia pelo parceria desenvolvida durante esse projeto.

A Associação de Pescadores da Lagoa Juara, pela excelente recepção e apoio.

Ao Prof.^º Mauro e aos profissionais Labpetro, pela ajuda concedida na realização de análises imprescindíveis para este trabalho.

A UVV, em especial aos professores Leonardo Dobbss e Romildo Rocha pela disponibilização das estacas de *Tradescantia pallida* e auxílio no cultivo.

A Liliane, pelo carinho, amor, presença nesses momentos da minha vida.

Aos meus amigos que escutaram tanta “conversa biológica”, mas sempre se fizeram presentes.

A minha família, pela confiança, suporte, amor, carinho e orações.

A Deus, por mediar e proteger todo esse caminho.

RESUMO

A gestão dos recursos hídricos necessita da integração entre os critérios físicos e químicos, e os aspectos bióticos, os quais possibilitam identificar os efeitos combinados de substâncias e avaliar suas influências. Os sistemas testes *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*, são utilizados para o estudo da poluição aquática a partir de aspectos citogenéticos. Além destes biomarcadores, os teores de clorofila também são utilizados em estudos de estresse devido ao reflexo a múltiplos fatores. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade da água da lagoa Juara (Município de Serra/ES) pela análise integrada de aspectos físicos, químicos e ecotoxicológicos a partir de estudos citogenéticos em *A. cepa* e *T. pallida*, e fotossintéticos nesta última espécie. Foram definidas três estações amostrais ao longo da lagoa e a partir de amostras de água foram analisados parâmetros tais como condutividade, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes e metais. A determinação dos metais ocorreu por análises de espectrometria de massa. O teste do *A. cepa* foi realizado a partir sementes germinadas em amostras de água da lagoa. Com plantas de *T. pallida*, foi realizado o ensaio da mitose em ponta de raiz de *T. pallida* e dosado os teores de pigmentos cloroplastídicos em folhas totalmente expandidas. Para tanto, foi realizado ensaio utilizando-se a água da lagoa como solvente para solução de Hoagland onde estacas previamente enraizadas de *T. pallida* foram expostas durante 24 horas e 40 dias para as avaliações citogenéticas e fotossintéticas, respectivamente. Foi realizado novo teste do *A. cepa* nas águas da lagoa após os 40 dias de ensaio para aferir a manutenção das propriedades químicas das amostras. A avaliação citogenética nas duas espécies envolveu a análise dos índice mitótico (IM), índice de aberrações cromossômicas (AC) e frequência de micronúcleos (MN). Para a análise estatística foi utilizada a análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0.05$) para a comparação dos tratamentos durante a mesma campanha, e teste de Bonferroni ($p < 0,05$) para a comparação entre as campanhas. Os resultados físicos e químicos mensurados demonstram que a lagoa Juara apresenta indícios de eutroficação artificial. Duas estações amostrais, em pelo menos uma campanha amostral, apresentaram potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico. Todavia, esses potenciais não demonstram relação com os teores de Fe e Mn quantificados, levando a crer que tais pontos apresentam outros potenciais

poluentes. Os danos citogenéticos observados apresentaram efeitos maximizados durante a segunda campanha, demonstrando o efeito do período de chuva na intensificação da poluição nesse ambiente. O estudo do metabolismo fotossintético em *T. pallida*, demonstrou os teores de pigmentos cloroplastídicos relacionados ao elevado aporte de nutrientes presentes nas estações J2 e J3. Sendo o excesso destes, o provável responsável pelo teor inferior de pigmentos em J3. Observa-se que os ensaios com *A. cepa* e *T. pallida* responderam de maneira fidedigna ao risco potencial do ambiente, complementando as análises físicas e químicas usualmente utilizadas na avaliação da qualidade da água de ambientes lacustres.

Palavras-chave: *Allium cepa*; *Tradescantia pallida*; citotoxicidade; genotoxicidade; mutagênicidade; pigmentos cloroplastídicos.

ABSTRACT

The management of water resources requires the integration of the physical and chemical parameters, and biotic features, which make it possible, identify the combined effects of substances and their influences. The *Allium cepa* and *Tradescatia pallida* test systems are used for the study of water pollution from cytogenetic aspects. In addition to these biomarkers, the contents of chlorophyll also are use in studies of stress due to reflection to the single or combined factors. The objective of this study was to evaluate the water quality of the Juara pond (Municipality of Serra / ES) by the integrated analysis of physical, chemical and ecotoxicological aspects through cytogenetic studies in *A. cepa* and *T. pallida*, and photosynthetic metabolism in this last specie. Three sampling stations were established along the lagoon. And from water samples, parameters such as conductivity, dissolved oxygen, concentration of nutrients and metals were analyzed. The determination of the metal has occurred by mass spectrometry analysis. The *A. cepa* test was conducted from seeds germinated in water samples from the pond. With plants of *T. pallida*, was conducted the test of mitosis in root tip of *T. pallida* and dosed the pigment contents in fully expanded leaves. For that, assay was performed using the pond water as a solvent for Hoagland solution where previously rooted cuttings of *T. pallida* were exposed for 24 hours and 40 days for cytogenetic and photosynthetic evaluation, respectively. New test of *A. cepa* was conducted in the waters of the pond, after 40 days of testing, to assess the maintenance of the chemical properties of the samples. Cytogenetic evaluation in the both species involved the analysis of mitotic index (MI), index of chromosomal aberrations (CA) and frequency of micronuclei (MN). For statistical analysis, analysis of variance followed by Tukey ($p < 0.05$) for the comparison of treatments during the same campaign, and Bonferroni test ($p < 0.05$) for comparison between the campaigns, were used. The measured physical and chemical results show that Juara pond presents evidence of artificial eutrophication. The cytogenetic assays show that two sampling stations, in at least one sampling campaign, showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials. However, these potentials do not relate to the contents of Fe and Mn quantified, leading to the idea that these points have other potential pollutants. Cytogenetic damage had maximized effects observed during the second campaign, demonstrating the effect of period of rain on the intensification of

pollution in that environment. The study of photosynthetic metabolism in *T. pallida* showed that the chloroplastidic pigment contents are related to the high input of nutrients on J2 and J3 stations. Being the excess of these, the probable responsible for the less content of pigments in J3. It is observed that the *A. cepa* and *T. pallida* tests responded faithfully to the potential environmental risk, complementing the physical and chemical analyzes commonly used in assessing the quality of the lake water environments.

Keywords: *Allium cepa*; *Tradescantia pallida*; cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity; chloroplastidic pigments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 (Artigo I) – Estações amostrais na lagoa Juara, sendo 1: J1 (referência); 2: J2 (piscicultura) e 3: J3 (próximo a foz do Córrego Laranjeiras).	67
Figura 2 (Artigo I) – Precipitação durante março de 2012 (mar/12) a março de 2013 (mar/13) - Estação meteorológica localizada no município de Vitória-ES, Coordenadas: S 20,300° / W 40,317°, 36 m.	67
Figura 3 (Artigo I) – Danos citogenéticos em <i>Allium cepa</i> . A: aderência; B: brotamento; C: C-metáfase; D: micronúcleo. As setas indicam os danos citogenéticos.	68
Figura 1 (Artigo II) – Estações amostrais na lagoa Juara, sendo 1: J1 (referência); 2: J2 (piscicultura) e 3: J3 (próximo a foz do Córrego Laranjeiras).	94
Figura 2 (Artigo II) – Precipitação durante março de 2012 (mar/12) a março de 2013 (mar/13) - Estação meteorológica localizada no município de Vitória-ES, Coordenadas: S 20,300° / W 40,317°, 36 m.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Artigo I) – Parâmetros físicos e químicos das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3.	69
Tabela 2 (Artigo I) – Quantificação de metais ($\mu\text{g}/\text{mL}$) das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013. 1ª Campanha: período de baixa precipitação, 2ª Campanha: período de alta precipitação.	70
Tabela 3 (Artigo I) – Resultados de IM, AC e MN no ensaio <i>Allium cepa</i> após exposição às amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).	71
Tabela 4 (Artigo I) – Resultados das aberrações cromossômicas do ensaio do <i>Allium cepa</i> após exposição às amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).	72
Tabela 1 (Artigo II) – Resultados de IM, AC e MN no ensaio <i>Tradescantia pallida</i> após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3.	95

Tabela 2 (Artigo II) – Resultados das aberrações cromossômicas do ensaio da Tradescantia pallida após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).
.....96

Tabela 3 (Artigo II) – Resultados de IM, AC e MN no ensaio Allium cepa após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).
.....97

Tabela 4 (Artigo II) – Resultados de IM, AC e MN no ensaio Allium cepa após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).
.....98

Tabela 5 (Artigo II) – Quantificação de metais ($\mu\text{g}/\text{mL}$) das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013. 1ª Campanha: período de baixa precipitação, 2ª Campanha: período de alta precipitação.
.....99

Tabela 6a (Artigo II) – Resultados de Chl a, Chl b, Chl total ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) em Tradescantia pallida após exposição crônica em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referente às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).100

Tabela 6b (Artigo II) – Resultados de Razão Chl a/b, Carotenóides (mg.g-1MS) e Razão Chl/Carot em *Tradescantia pallida* após exposição crônica em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referente às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL E BIOMARCADORES.....	17
2.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM <i>Allium cepa</i> <i>Tradescantia pallida</i>	18
2.3 ASPECTOS FOTOSSINTÉTICOS.....	22
2.4 LAGOA JUARA.	24
3 OBJETIVOS.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 ÁREA DE ESTUDO E ESTAÇÕES AMOSTRAIS.....	27
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	27
4.3 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	29
4.4 TESTE DO <i>ALLIUM CEPA</i> E ENSAIO DA MITOSE EM PONTA DE RAIZ DE <i>TRADESCANTIA PALLIDA</i>	30
4.5 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM <i>TRADESCANTIA PALLIDA</i>	31
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
5 REFERÊNCIAS.....	34
6 RESULTADOS.....	46
6.1 ARTIGO I:.....	47
6.2 ARTIGO II:.....	73
7 CONCLUSÕES GERAIS	102

1 INTRODUÇÃO

A gestão e proteção dos recursos hídricos não devem ser baseadas apenas nos critérios físicos e químicos, pois estes, realizados longe da fonte poluidora podem ser insensíveis a perturbações do ecossistema. Por outro lado, os organismos respondem e integram as condições ambientais durante toda sua vida, e por isso também devem ser levados em consideração (BÉKAERT, 2002; BUSS et al., 2003; BUSS et al., 2008). Os critérios bióticos refletem diretamente a condição de risco do recurso, detectam problemas que outros métodos podem subestimar ou não diagnosticar, porém não substituem abordagens químicas e físicas, e sim as complementam (KARR, 1981; BARSIENTE et al., 2006).

Os parâmetros físicos e químicos possibilitam a avaliação pontual, necessitando-se de numerosas análises para se realizar eficientemente o monitoramento temporal dos cursos d'água (METCALFE, 1989; BUSS et al., 2008). Entretanto, ressalta-se que essas análises refletem diversas influências como a litologia do local, influência atmosférica e das condições climáticas e antrópicas. Logo, identificar e quantificar estas, por meio de análises físicas e químicas, torna-se importante para o gerenciamento dos recursos hídricos (MARKICH e BROWN, 1998). Assim, é necessário integrar ao método tradicional, os aspectos bióticos (BUSS et al., 2008).

As plantas fornecem ótimos sistemas de ensaios genéticos e são bastante sensíveis aos poluentes ambientais (KURAS, 2006), sendo usualmente utilizadas na avaliação da qualidade da água e no monitoramento de rios, lagos e efluentes industriais e domésticos (GRISOLIA et al., 2005; EGITO et al., 2007; LEME e MARIN-MORALES, 2008; CERETTI et al., 2010; GRIPPA et al., 2012).

Os espécimes de *Allium cepa* L., família Liliaceae, são utilizados como sistema-teste para a investigação de danos nos cromossômicos e no aparato mitótico a partir das células meristemáticas de suas raízes, o que possibilita a determinação de potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (FERNANDES et al., 2007; CARITÁ e MARIN-

MORALES, 2008; ROBERTO, 2009; GRIPPA et al., 2012). Diante disso, o sistema-teste *A. cepa* é indicado para a análise da poluição de recursos hídricos devido sua alta sensibilidade a substâncias químicas (RADIC et al., 2010).

As plantas do gênero *Tradescantia* L., família Commelinaceae, como relatado por Carvalho (2005), também tem sido bastante utilizadas em estudos de toxicologia genética, destacando-se o ensaio da formação de micronúcleos em células mãe de grãos de pólen e o ensaio da mitose em ponta de raiz, possibilitando a investigação da genotoxicidade e mutagenicidade. Além disso, essa espécie tem como vantagem na avaliação da poluição aquática, a capacidade de detectar baixos níveis de toxicidade genética em amostras não concentradas (RODRIGUES, 2011).

Além dos testes de genética toxicológica, as avaliações fisiológicas também são de grande importância, onde se destacam os estudos envolvendo os pigmentos fotossintetizantes de plantas expostas a poluentes ambientais, sobretudo metais, já que o sistema fotossintético é extremamente sensível aos mesmos (PONGRAC et al., 2009). O decréscimo de clorofila já foi relatado em estudos envolvendo a contaminação de espécies de plantas por elementos traço (ONCEI et al., 2000; MOBIN E KHAN 2007). Por outro lado, o excesso de adubação orgânica também pode provocar alterações no sistema fotossintético das plantas. Corrêa et al. (2009) observaram que diminuição nos teores de clorofila em *Origanum vulgare* L. expostos a elevadas concentração de adubos orgânicos.

A lagoa Juara é um dos mais importantes corpos hídricos da região metropolitana de Vitória e localiza-se no Município de Serra, Espírito Santo, Brasil. Apresenta 2,9 Km² de superfície e microbacia que se estende da zona rural ao litoral. A lagoa apresenta importante função ecológica e socioeconômica, sendo utilizada para lazer, recreação e pesca. Desde o ano de 2000, a Associação de Pescadores da lagoa Juara pratica a piscicultura intensiva na lagoa, cultivando tilápias (*Oreochromis* sp.) em tanques rede (OLIVEIRA, 2011). Com isso, o aumento da pressão antrópica sobre esse corpo d'água

tem aumentado, como por exemplo, o assoreamento e degradação de margens devido a agricultura e pastagens, e a detecção de efluentes domésticos.

Diante da importância desse ambiente, a realização do biomonitoramento de maneira integrada, contemplando aspectos ecotoxicológicos, citogenéticos e fisiológicos, torna-se imprescindível devido sua alta sensibilidade e integração de fatores presentes no meio, que atrelado a análise de parâmetros físicos e químicos usualmente realizadas, pode promover avaliação integrada da qualidade da água da lagoa Juara, abrangendo tanto aspectos abióticos quanto bióticos desse ecossistema lacustre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMONITORAMENTO AMBIENTAL E BIOMARCADORES

Gerenciar os recursos hídricos, intervir na saúde pública e realizar as medidas necessárias para mitigar o impacto ambiental devido ao desordenado crescimento populacional, exige estudos interdisciplinares que abranjam todos os aspectos dos ecossistemas. Tais atividades têm sido auxiliadas pelo emprego do biomonitoramento (MUGNAI e GATTI, 2008). O monitoramento bem como a avaliação do risco dos ambientes impactados não podem ser baseados apenas em análises químicas, pois essas são ineficientes para a indicação e predição de efeitos deletérios causados por contaminantes na biota (CAJARAVILLE et al., 2000; BARSINE et al., 2006). Assim, para aumentar a eficiência dos sistemas de detecção dos impactos ambientais é de suma importância a integração de abordagens físicas e químicas com características bióticas dos ecossistemas (ROSENBERG e RESH, 1993; BUSS et al., 2003; BUSS et al., 2008).

Segundo Buss et al. (2008), a necessidade de integração entre os métodos físicos e químicos tradicionais com a análise biótica é importante, pois o monitoramento por meio de métodos físicos e químicos aborda o tipo e a intensidade de fatores, inferindo indiretamente sobre os efeitos nos organismos. Por outro lado, o biomonitoramento fornece informações sobre os efeitos de estressores no sistema biológico, eventualmente possibilitando inferências a respeito da qualidade e quantidade do distúrbio. Logo, com a integração dessas ferramentas, há o aumento do potencial da identificação das causas e avaliação dos efeitos de estressores sobre os ecossistemas aquáticos.

Sendo assim, o monitoramento ambiental define-se como uma série temporal de medições de variáveis físicas, químicas e bióticas utilizadas para responder às mudanças dos ecossistemas (LOVETT et al., 2007). Mais especificamente, o

biomonitoramento mensura os atributos de organismos vivos como consequência das alterações ocorridas no ambiente (MATTHEWS et al., 1982). Neste contexto, os marcadores biológicos ou biomarcadores são úteis na determinação do grau de impacto sobre a biota, além de permitirem a identificação de estressores ou poluentes responsáveis por tais efeitos (FUENTES-RIOS et al., 2005).

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas em células, fluidos corpóreos, tecidos e órgãos de organismo, sendo indicativos da exposição ou efeito a xenobióticos (LAM e GRAY, 2003). Dentre os biomarcadores, aqueles baseados na resposta ao nível molecular e celular refletem respostas sobre os primeiros sinais de perturbação ambiental (NIGRO et al., 2006).

De acordo com Cajaraville et al. (2000), a utilização de biomarcadores ao nível celular ou molecular tem sido proposta como ferramenta sensível de alerta para efeitos biológicos medidos em avaliações de qualidade ambiental. Assim, estes podem ser utilizados em estudos de campo que buscam caracterizar áreas impactadas onde uma complexa mistura de poluentes está normalmente presente (MONSERRAT et al., 2007).

Dentre os biomarcadores, a nível celular e molecular para a avaliação dos potenciais genotóxicos e mutagênicos, destacam-se as anormalidades nucleares e os micronúcleos (MN) respectivamente. Estes últimos são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (PANTALEÃO et al., 2006), deixando de ser incorporados ao núcleo das células filhas. Esses fragmentos de cromatina, separados do núcleo principal, permanecem durante toda a vida da célula e indicam quebra cromossômica ou disfunções do fuso mitótico, que podem ser ocasionadas por compostos tóxicos (BOLOGNESI et al., 2006).

2.2 ESTUDOS CITOGENÉTICOS EM *Allium cepa* E *Tradescantia pallida*

De acordo com BARBÉRIO (2013), as preocupações referentes aos riscos que os agentes químicos introduzidos no ambiente podem levar a alterações genéticas nos organismos foi uma das razões fundamentais para o desenvolvimento de métodos para avaliar a genotoxicidade de produtos químicos. Assim, estudos colaborativos acerca do uso de bioensaios com plantas para biomonitoramento da genotoxicidade de poluentes ambientais foram iniciados e organizados, como o “International Program Chemical Safety (IPCS), o “United Nations Environmental Program (UNEP)” e o “World Health Organization (WHO)”.

Com relação aos ensaios citogenéticos, as plantas superiores mesmo apresentando baixas concentrações de enzimas oxidase e limitações quanto à especificação de substrato em relação a outros grupos de organismos, podem ser utilizadas como modelos uma vez que o alvo é o DNA, comuns a todos os organismos (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Além disso, por sua capacidade de bioacumulação, as plantas podem ainda indicar a presença de substâncias tóxicas no meio ambiente mesmo em concentrações muito baixas. As raízes, em particular, por terem contato direto com os metais, usualmente atuam como uma barreira contra a sua translocação, justificando o maior nível de danos no DNA em suas células (SANTOS e RODRIGUEZ, 2011).

Os agentes genotóxicos podem provocar lesões primárias no DNA, como a formação de aductos de DNA, oxidação de bases, dimerização de bases ou ligações cruzadas, as quais podem ser reparadas ou não, levando a alterações irreversíveis ou causar morte celular. Além disso, as mutações podem ocorrer em nível de genes (mutações do gene) ou a nível cromossômico (aberrações estruturais e numéricas) (MAJER et al., 2005). Sendo assim, os testes de toxicidade e genotoxicidade são necessários para a avaliação das reações dos organismos vivos à poluição ambiental bem como para a identificação de possíveis efeitos sinérgicos de vários poluentes sobre os mesmos (GRANT e OWENS, 2006).

Dentre as plantas superiores utilizadas para detecção de substâncias genotóxicas no ambiente, destacam-se a *Allium cepa*, *Tradescantia sp.*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum*

vulgare, *Pisum sativum*, *Crepis capillaris*, *Vicia faba* e *Zea mays*. Tais sistemas-testes, além de correlacionarem-se a outros sistemas bióticos, são altamente sensíveis a muitos poluentes ambientais e úteis para o monitoramento dos potenciais efeitos sinérgicos da mistura de poluentes (BARBÉRIO, 2013).

O Ensaio de aberrações cromossômicas em raiz de *Allium cepa* é considerado eficiente, sendo utilizado na avaliação do potencial genotóxico de compostos químicos no meio ambiente, devido sua sensibilidade e boa correlação com sistemas de teste de animais e vegetais (GRANT, 1982; CHAUHAN et al., 1999; MA et al., 2005; LEMOS et al., 2007; BOLOGNESI et al., 2011; BOLOGNESI e HAYASHI, 2011).

Os estudos de aberrações cromossômicas em ponta da raiz de *Allium* foi adotado pelo International Program on Plant Bioassay (IPPB), para monitorar ou testar poluentes ambientais (MA, 1999). De acordo com Firbas e Amon (2013), o *Allium cepa* L. é muito apropriado para os estudos genotóxicos tendo em vista suas diversas características. A sua dinâmica de crescimento radicular é muito rápida e sensível aos poluentes, sua divisão celular é facilmente observadas, possui cariótipo e número de cromossomos estável ($2n = 16$), apresenta diversidade na morfologia dos cromossomos, apresenta resposta clara e rápida para as substâncias químicas, e danos espontâneos no DNA ocorrem raramente.

O teste *A. cepa* permite também a avaliação de diferentes *endpoints* como as aberrações cromossômicas utilizadas na detecção da genotoxicidade, o índice mitótico na detecção da citotoxicidade e a frequência de micronúcleos para a verificação da mutagenicidade (LEME e MARIN-MORALES, 2009; GRIPPA et al., 2012). O sistema teste *Allium cepa* é um método padronizado e sensível, sendo amplamente utilizado para testar a qualidade da água (RANK, 2003). Tal método tem sido útil na pesquisa da contaminação dos cursos d'água como rios (MAJER et al., 2005, BARBÉRIO et al., 2009), solo (WATANABE e HIRAYAMA, 2001; POHREN et al., 2013), na resposta à pesticidas e herbicidas (BOLLE et al., 2004; FERNANDES et al., 2009; VENTURA-

CAMARGO et al., 2011), e nos efeitos de efluentes farmacêuticos e de hospitais (ABU e MBA, 2011; BAGATINI et al., 2011).

Com a finalidade de avaliação do recurso hídrico pelo teste do *Allium cepa*, Hoshina e Marin-Morales (2009) identificaram aberrações cromossômicas e micronúcleos, sugerindo a interferência de efluentes de refinarias de petróleo sobre a qualidade da água do Rio Atibaia. Já Barbosa et al. (2010), avaliaram o potencial genotóxico de amostras de água da Lagoa de Extremoz e observaram mudanças significativas na frequência de aberrações cromossômicas e no índice mitótico no teste do *A. cepa*. Neste caso, tais alterações foram relacionadas à contaminação da lagoa por metais como cádmio, cromo e cobre.

As plantas do gênero *Tradescantia* são herbáceas que possuem ampla adaptação em regiões tropicais ou subtropicais. Devido ao seu tamanho pequeno e por possuírem seis pares de cromossomos ($2n = 12$) relativamente grandes em suas células somáticas, essas plantas são favoráveis para a utilização em estudos citogenéticos (MA, 1981). Dentre os ensaios realizados com as plantas desse gênero, o Trad-MCN utiliza os danos cromossômicos em tétrades florais como indicador de propriedades carcinogênicas de substâncias nas formas gasosa, líquida e sólida. Os resultados do teste podem ser obtidos no período de 24-48 h após a exposição *in situ* ou em laboratório (MA, 2001).

Já o ensaio da mitose em ponta de raiz de *Tradescantia* torna-se interessante, pois apresenta características também encontradas em meristemas radiculares de *Allium cepa* (MA, 1982). Segundo Ma et al. 1995, as células meristemáticas das raízes de *Tradescantia* são apropriadas e eficientes para a detecção da clastogenicidade de poluentes ambientais, especialmente no monitoramento aquático. Os estudos com *Tradecantia pallida* especificamente, tem sido realizados na avaliação radiação ionizante (CARVALHO, 2005) e resíduos sólidos (MIELLI et al., 2009) e de corpos hídricos (GARCIA et al., 2011; MERLO et al., 2011), e efluentes como o estudo de Thewes et al. (2011) o qual avaliou efluentes de estações de tratamento, enquanto

Elezaj et al. (2011) investigaram os possíveis efeitos genotóxicos e mutagênicos de efluentes de termoeletrica sobre o ecossistema aquático, fomentando os ensaios com meristemas de raízes de *T. pallida* como método para a avaliação de águas.

2.3 ASPECTOS FOTOSSINTÉTICOS

Durante o seu ciclo de vida, as plantas estão sujeitas a vários estressores ambientais. Para tanto, elas desenvolvem mecanismos que as possibilitam aumentar a sua tolerância. Esses mecanismos podem se remeter a adaptações físicas, alterações moleculares e celulares que ocorrem após o início do stress (KNIGHT e KNIGHT, 2001).

Com relação a poluentes como os metais, as plantas apresentam singularidades quanto a sua capacidade de retirar, acumular e tolerar tais metais, podendo ocorrer diferenças marcantes entre espécies, variedades ou tecidos de um mesmo espécime (SANTOS et al., 2006). Plantas tolerantes aos elementos traços apresentam mecanismos para restrição do excesso de metais nos compartimentos celulares (PONGRAC et al., 2009). Estes envolvem a exclusão do metal, a quelação por ácidos orgânicos e aminoácidos e a compartimentalização do metal em estruturas subcelulares (CLEMENS et al., 2001). Tais processos são importantes para a manutenção do metabolismo da planta tendo em vista que esse é extremamente sensível (KUPPER et al., 1999; PONGRAC et al., 2009).

Os metais, exemplo do cobre, manganês, níquel e zinco, são microelementos essenciais para as plantas. E alguns, como cádmio, são encontrados em sítios ativos de algumas enzimas (LANE e MOREL, 2000). No entanto, em elevadas concentrações os metais induzem a inibição de vários processos metabólicos das plantas (JOSHI e MOHANTY, 2004; KUPPER e KRONECK, 2005). As reações fotossintéticas, como relatado por KUPPER et al. (2007), é um dos mecanismos metabólicos mais importantes com relação a inibição de atividade pelos metais sob concentrações relevantes, sendo o fotossistema II identificado como o principal alvo. Vestígios de

metais podem substituir o íon magnésio da molécula de clorofila, impossibilitando sua atividade, e ocasionando a diminuição da atividade fotossintética (FERRAT et al., 2003).

Dentre os metais, o cobre em concentrações tóxicas promove danos oxidativos, devido a sua propriedade redox e interfere nos processos celulares como a fotossíntese, síntese de pigmentos e a permeabilidade da membrana plasmática (KUPPER et al., 2003; PILON et al., 2006; BURKHEAD et al., 2009). O alumínio, afeta o crescimento das plantas como consequência secundária, ou seja, a redução do crescimento pode ser resultado das alterações bioquímicas desencadeadas pelo alumínio em concentrações tóxicas nas plantas. Dentre essas, destacam-se as alterações nos processos fotossintéticos e estomáticos (PEIXOTO et al., 2002; KONRAD et al., 2005). Em estudos realizados com espécimes de café, a presença de alumínio resultou em degradação das membranas dos tilacóides, prejudicando os processos de captação e fixação de CO₂ durante a fotossíntese (KONRAD et al., 2005).

O cádmio, quando acumulado nos cloroplastos, inibe a atividade enzimática da biossíntese de clorofila e afeta a fixação de CO₂ (KRUPA E BASZYNSKI, 1995; SIEDLECKA et al., 1997) ou ainda inibe a agregação dos complexos proteicos dos pigmentos ao aparato molecular do fotossistema (HORVATH et al., 1996). Nesse aspecto, Mobin e Khan (2007) demonstraram diminuição dose-dependente de clorofila a, clorofila b e clorofila total em *Brassica juncea* após exposição ao cádmio. Assim, como o cádmio, o cromo também inibe a biossíntese de clorofila, levando ao crescimento reduzido, clorose, prejuízos na fotossíntese, nanismo e até a morte da planta (SHARMA et al., 1995). Em estudos com *Ocimum tenuiflorum*, esse metal reduziu os teores foliares de clorofila total, clorofila a e clorofila b (RAI et al., 2004).

O decréscimo de clorofila é relatado em estudos envolvendo a contaminação de espécies de plantas por metais (ONCEL et al., 2000; MOBIN E KHAN., 2007). Por outro lado, o excesso de adubação orgânica também pode provocar alterações no sistema fotossintético das plantas. Corrêa et al. (2009) observaram que os maiores valores

clorofila foram obtidos em função de doses crescentes de adubação orgânica em experimento com *Origanum vulgare* L.. Isso pode ser explicado pela maior disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e magnésio, os quais fazem parte da molécula de clorofila. Todavia, o decréscimo no teor de clorofila, a partir do ponto de máxima da curva, pode ser atribuído ao excesso de nutrientes no substrato, causando redução do pigmento.

Variações no metabolismo fotossintético também relacionam-se a presença de substâncias químicas tais como herbicidas e inseticidas. Giroto et al. (2010) observaram diferenças entre as respostas de cana-de-açúcar expostas aos herbicidas S-metolachor e atrazine. O estudo dos efeitos de herbicida sobre *Ananas comosus* demonstrou redução nos teores de pigmentos fotossintéticos após exposição ao herbicida amicarbazone, enquanto o diuron + paraquat apresentou-se letal para esta espécie, tendo em vista a grande redução dos teores de clorofila a e b e carotenoides (CATUNGA et al., 2005). Assim, os teores de clorofila podem ser utilizados como biomarcadores em estudos de estresse devido a fatores ambientais únicos ou combinados sobre as plantas (FERRAT et al., 2003).

2.4 LAGOA JUARA

A lagoa Juara é um ambiente lacustre localizado na região metropolitana de Vitória, no município de Serra, Espírito Santo, Brasil. Sua área superficial apresenta em torno de 2,9 Km². Sua microbacia de drenagem se estende da zona rural ao litoral. É um ambiente de importância tanto ecológica quanto socioeconômica, sendo local de lazer, recreação, pesca e cultivo intensivo de tilápias pela Associação de Pescadores da lagoa Juara. Para essa finalidade, conta com 150 tanques rede, com aproximadamente 400 peixes em cada tanque para comercialização e fornecimento para os restaurantes locais e atraindo o turismo (OLIVEIRA, 2011).

Juntamente com a sub-bacia da lagoa Jacuném (32,06 Km²), a sub-bacia da lagoa Juara (193,34 Km²) constitui, juntamente com os córregos que saem das respectivas lagoas

(7, 54 Km²) a bacia hidrográfica do rio Jacaraípe, ocupando uma área aproximada de 200,6 Km². Apesar de sua área, esses ambientes sofrem tendo em vista o acelerado crescimento industrial da região Metropolitana da Grande Vitória nas décadas de 1970 e 1980, que aliados a falta de planejamento urbano, resultou na degradação dos recursos naturais (Léllis, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade da água da lagoa Juara a partir da análise integrada de aspectos físicos, químicos e ecotoxicológicos, a partir de estudos citogenéticos em ensaios com *Allium cepa*, e citogenéticos e fotossintéticos em ensaios com espécimes de *Tradescantia pallida*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Analisar os parâmetros físicos e químicos das águas da lagoa Juara;
- b. Avaliar os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das águas da lagoa Juara a partir de testes citogenéticos em ensaios com espécimes de *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*;
- c. Avaliar alterações no metabolismo fotossintético de *Tradescantia pallida* expostas às águas da lagoa Juara;
- d. Analisar as alterações citogenéticas e fisiológicas entre as estações amostrais e campanhas realizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO E ESTAÇÕES AMOSTRAIS

A lagoa Juara localiza-se no município de Serra, Espírito Santo, Brasil. Apresenta 2,9 Km² de superfície e microbacia que se estende da zona rural ao litoral. Para caracterizar as condições da lagoa Juara foram definidas três estações amostrais ao longo da lagoa por meio de aparelho de GPS (Garmin Etrex): J1 - considerado ponto referência de qualidade da água da lagoa, localizado a montante das outras estações amostrais (S 20º 06. 415'/ H 40º 15. 041'); J2 - local de instalação dos tanques redes pela Associação de Pescadores da lagoa Juara (S 20º 06. 381'/ HO 40º 13. 949') e J3 - localizado próximo ao centro de vivência da comunidade, nas proximidades da foz do Córrego Laranjeiras, e localizado a jusante das estações J2 e J1. (S 20º 07. 660'/ H 40º 12. 748').

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

As coletas consistiram de amostragem de água subsuperficial, realizadas em duas campanhas amostrais, setembro de 2012 e março de 2013, buscando compreender estações de baixa precipitação e chuva, respectivamente. Durante as campanhas amostrais, foram aferidos parâmetros físicos e químicos em campo e laboratório, e coletadas amostras de água para os ensaios *in vivo* com *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*.

As amostras de água coletadas, nas estações amostrais de ambas as campanhas para a realização do Teste do *Allium cepa*, foram armazenadas em frascos de polietileno e posteriormente armazenadas em refrigeração até a realização dos ensaios. Sementes de *A. cepa* da variedade Baía periforme de mesmo lote (TOPSEED - Lote 026111, Germinação 85%, Pureza 99%) foram utilizadas tendo em vista a homogeneidade genética e fisiológica, além de estarem disponíveis durante todo o ano, garantindo a

confiabilidade do ensaio (LEME e MARIN-MORALES, 2008). Sementes foram germinadas diretamente nas águas correspondentes às estações amostrais J1, J2 e J3. O controle negativo (CON) foi realizado com sementes germinadas em água destilada e o controle positivo (CON+) em solução de Metil Metano Sulfonato (MMS) na concentração final de 4×10^{-4} mM

Para a realização dos ensaios citogenéticos e fisiológicos em *Tradescantia pallida*, inicialmente foi realizado o enraizamento de estacas em solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ força ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - 4 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{KNO}_3 - 4 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 3 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{NaNO}_3 - 2 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹; Micronutrientes: $\text{H}_3\text{BO}_3 - 61,83 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 1,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} - 0,3 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} - 1,8 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 0,6 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹; Fe-EDTA: $\text{Na}_2\text{EDTA} - 3,8 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 3,8 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹).

Para tanto, para cada campanha realizada, 75 estacas apresentando 30 ± 5 cm de comprimento com três a cinco nós foliares e três a cinco nós expostos à solução de Hoagland foram dispostas em tanques de hidroponia de polietileno (10 litros), com aeração constante e pH mantido entre a faixa 6,0-6,5 por meio da adição de NaOH – 0.1N ou HCl – 0.1N. Ao final de 23 dias de enraizamento os comprimentos radiculares apresentavam 2 a 5 cm de comprimento.

O experimento com as estacas de *T. pallida* foi inteiramente casualizado. Após o enraizamento, 25 estacas divididas em cinco grupos foram aleatoriamente coletadas para o início da exposição aguda de 24 horas (Ma, 1982). Essas estacas foram dispostas em novos tanques de hidroponia (7,5 litros) contendo amostras de água correspondentes às estações amostrais enriquecida com os nutrientes da solução de Hoagland $\frac{1}{2}$ força para o início da exposição. Para o controle negativo (CON) as estacas foram expostas em nova solução nutritiva de Hoagland $\frac{1}{2}$ força e o controle positivo (CON+) em solução nutritiva de Hoagland acrescida do herbicida Trifluralina (0,84 mg/L) (FERNANDES et al., 2009).

Com o término da exposição aguda, novamente, 25 estacas foram aleatoriamente coletadas e divididas em cinco grupos para o início da exposição crônica de 40 dias. Tanto a exposição aguda quanto a crônica, a aeração foi mantida constante, o volume de solução foi mantido em 7,5 litros e o pH regulado para a faixa de 6,0 a 6,5.

Com as plantas expostas nos diferentes grupos experimentais (J1, J2, J3, CON e CON+) durante 24 horas, foi realizado o Ensaio em ponta de raiz de *T. pallida* de acordo com Ma (1982), com modificações. Enquanto as plantas expostas durante 40 dias foram utilizadas na investigação de possíveis alterações sobre o metabolismo fotossintético.

Amostras das soluções utilizadas durante o ensaio de 40 dias com os espécimes de *T. pallida* foram coletadas e armazenadas em frascos de polietileno em refrigeração para a realização do Teste do *Allium cepa* para constatar a manutenção das propriedades das amostras de água e os efeitos sobre as plantas ao longo do experimento. As sementes foram germinadas diretamente nas soluções utilizadas durante a exposição de 40 dias em *T. pallida*, correspondentes às estações amostrais J1, J2, J3, ao controle negativo (CON) e ao controle positivo (CON+) com Trifluralina.

4.3 PARÂMENTROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Durante as amostragens foram aferidos a temperatura da água (°C) bem como os teores de oxigênio dissolvido (% saturação), a condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e a salinidade (ppt), sendo determinados em cada estação amostral a partir do medidor multiparâmetro YSI 85 em subsuperfície. O pH foi determinado por meio do pHmetro Micronal.

A turbidez foi determinada por meio de turbidímetro digital Plus ALFAKIT. A determinação dos sólidos totais em suspensão (STS) ocorreu conforme Apha (1992). Filtros Millipore de fibra de vidro GF1 foram secos em estufas à 60°C durante 24 horas

antes da coleta e pesados em da filtragem para evitar absorção de umidade. As amostras coletadas foram armazenadas refrigeradas e posteriormente filtradas a vácuo. Após filtragem, os filtros foram acondicionados em estufa a 60°C por 48 horas e posteriormente pesados para o cálculo dos resultados conforme a fórmula STS (mg/L) = $(P_f - P_i) / V$, onde: STS: sólidos totais suspensos (mg/L); P_f = peso final do filtro em miligramas; P_i = peso inicial do filtro em miligramas e V = volume da amostra em L.

Para a análise da concentração de nutrientes as amostras foram logo refrigeradas, sendo uma parcela congelada para a quantificação de fósforo total e outra filtrada em filtros Millipore de fibra de vidro GF1, a vácuo, e congeladas para determinação de nitrito, silicatos, nitrogênio amoniacal, ortofosfato e, conforme os métodos de Valderrama (1981), Golterman et al. (1978), Koroleff (1976) e Strickland e Parsons (1960).

Para a quantificação dos elementos Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn e Pb, foram utilizados frascos de polietileno previamente lavados com sabão neutro, detergente EXTRAN (2%) e solução de Ácido nítrico (HNO₃ 10%) respectivamente. As amostras foram acidificada em campo com Ácido nítrico concentrado (2,5 ml de HNO₃ para 500 ml de amostra) e posteriormente armazenadas refrigeradas em caixas térmicas (RIETZLER et al., 2001). A quantificação foi baseada no método descrito por U.S. EPA 200.8 a partir de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em aparelho Varian - Modelo AA 240 FS.

4.4 TESTE DO *Allium cepa* E ENSAIO DA MITOSE EM PONTA DE RAIZ DE *Tradescantia pallida*

O Teste do *A. cepa*, utilizando células meristemáticas de raiz foi realizado de acordo com Grant (1982), com modificações. Sendo, as raízes das sementes submetidas aos tratamentos coletadas após atingirem aproximadamente 2 cm de comprimento. O Ensaio da mitose em ponta de raiz de *T. pallida* foi realizado conforme Ma (1982), com modificações. Sendo utilizadas raízes apresentando de 2 cm a 5 cm de comprimento.

Para a confecção das lâminas, tanto as raízes de *A. cepa* quanto *T. pallida*, foram fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma de ácido acético) por 24 horas. Os meristemas foram submetidos à hidrólise ácida em HCl 1N (60°C) por 8 minutos, seguidos por lavagem em água destilada. A coloração foi realizada pelo método tradicional de Feulgen e as lâminas foram confeccionadas pelo método comum de esmagamento suave com uma gota de carmim acético (2%) e recobertas com lamínulas, sendo posteriormente destacadas em nitrogênio líquido e por fim montadas com bálsamo do Canadá para análise.

Foram analisadas cinco lâminas por tratamento (J1, J2, J3, CON+ e CON) em ambos os ensaios citogenéticos, sendo avaliadas aproximadamente 5000 células em cada tratamento em microscópio de luz. As fases celulares, bem como as alterações cromossômicas, foram listadas e as frequências utilizadas para se calcular o índice mitótico (IM), o índice de aberrações cromossômicas (AC) e a frequência de micronúcleos (MN).

A análise de citotoxicidade, aferida pelo índice mitótico, foi obtida a partir da razão do número total de células em divisão com o número total de células analisadas. Para a análise da genotoxicidade por meio do índice de aberrações cromossômicas, diferentes tipos de alterações foram considerados nos diferentes estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como ponte, quebra, c-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência, perda, núcleo lobulado, núcleo fragmentado, brotamento e célula bi-nucleada.

A avaliação da mutagenicidade por meio da frequência de micronúcleos foram consideradas as células portadoras de micronúcleos em relação ao número total de células observadas (LEME e MARIN-MORALES, 2008). IM, AC e MN foram calculados de acordo com a fórmula: frequência = $(A/B) \times 100$, onde A equivale ao total de células do parâmetro analisado, e B ao total de células analisadas.

4.5 PIGMENTOS CLOROPLASTÍDICOS EM *Tradescantia pallida*

A realização de dosagens dos pigmentos cloroplastídicos em folhas jovens totalmente expandidas ocorreu conforme protocolo de Hiscox e Israeltam (1979). Para isso pesou-se 100 mg de massa fresca dos discos foliares com o auxílio do perfurador de 1cm². Os discos foram imediatamente colocados em tubos de ensaio contendo 7 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) e incubados no escuro em banho-maria a ±65°C. Após 24 horas (para a extração completa dos pigmentos) o volume de DMSO foi completado para 10 ml e foram feitas as leituras das absorvâncias nos comprimentos de onda de 470, 645, 663 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer, e calculados as concentrações dos pigmentos segundo Lichtenthaler e Wellburn (1983) pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Chl } a = [(12,7.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.MS)$$

$$\text{Chl } b = [(22,9.A_{645}) - (4,68.A_{663})].V/(1000.MS)$$

$$\text{Chl }_{\text{total}} = [(20,2.A_{663}) - (2,69.A_{645})].V/(1000.MS)$$

$$\text{Carot} = [(1000.A_{470}) - (1,82.\text{Chl } a - 85,02.\text{Chl } b)].V/(198.1000.MS)$$

Onde: Chl e Carot significam clorofila e carotenóides respectivamente. A663, A645 e A470 representam os valores das absorvâncias; V é o volume da amostra (em mL) utilizado e MS é a massa seca dos discos. Também foi calculada a razão clorofila a / clorofila b e razão clorofila total / carotenoides. Para a obtenção da massa seca, os discos foram secos em estufa a 70°C até obtenção de massa constante.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dispondo do número de cada alteração celular, dos índices citogenéticos (IM, AC e MN), das concentrações de pigmentos cloroplastídicos foram realizadas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey ($p < 0.05$), a fim de se comparar as estações amostrais e controles em cada campanha. Para a comparação das estações entre as campanhas amostrais foi realizada a análise de

variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni ($p < 0.05$).

5 REFERÊNCIAS

ABU, N.E.; MBA, K.C. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**, v. 3, p. 44-51, 2011.

APHA – American Publication Health Association, **Standars methods for the examination of water and wastewater**. GREENBERG, A. E.; CLESCERI, L. S.; EATON, A. D. (Eds.). 18.ed. USA: Washington D. C., 1992.

BAGATINI M.D.; VASCONCELOS, T.G.; LAUGHINGHOUSE, H.D. 4TH; MARTINS, A.F.; TEDESCO, S.B. Biomonitoring hospital effluents by the *Allium cepa* L. test. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.82, p. 590-592, 2009.

BARBÉRIO, A. Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality, **Water Treatment, Dr. Walid Elshorbagy (Ed.)**, 2013. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/water-treatment/bioassays-with-plants-in-the-monitoring-of-water-quality>

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

BARBOSA, J.S.; CABRAL, T.M.; FERREIRA, D.N.; AGNEZ-LIMA, L.F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 320–325, 2010.

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

BÉKAERT, C.; FERRIER, F.; MARTY, J.; PFOHL-LESZKOWICZ, A.; BISPO, A.; JOURDAIN, M.J.; JAUZEN, M.; LAMBOLEZ-MICHEL, L.; BILLARD, H. Evaluations of and genotoxic potencial of stabilized industrial waste and contaminated soils, **Waste management**, v. 22, p. 241 – 247, 2002.

BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; TUCCI, P.; EVANDRI, M.G. Clastogenicity of atrazine assessed with the *Allium cepa* test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, p. 137-141, 2004.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, p. 205-213, 2011.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p.93-98, 2006.

BURKHEAD, J. L.; REYNOLDS, K. A.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C.M.; PILON, M. Copper homeostasis. **New Phytologist**. v.182, n.4, p. 799–816, 2009.

BUSS, D.F.; BATISTA, D.F.; NESSIMIAN, J.L. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n.4, 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. 339-345, 2008.

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

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, n.5, p.722-725, 2008.

CARVALHO, A.C. A Tradescantia como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. **Radiologia Brasileira**, v. 38, n.6, p. 459-462, 2005.

CATUNGA, M.G.; FREITAS, S.P.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, C.M.M. EFEITOS DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA E NO CRESCIMENTO DE ABACAXI (*Ananas comossus*). **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 115-121, 2005

CERETTI, E.; ZANI, C.; ZERBINI, I.; GUZELLA, L.; SCAGLIA, M.; BERNA, V.; DONATO, F.; MANARCA, S.; FERETTI, D. Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles. **Water research**, v. 44, p. 1462–1470, 2010.

CHAUHAN, L.K.S.; SAXENA, P.N.; GUPTA, S.K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, p. 181-189, 1999.

CLEMENS, S.; SCHROEDER, J.I.; DEGENKOLB, T. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 3640-3643, 2001.

CORRÊA, R.M.; PINTO, J.E.B.; REIS, E.S.; OLIVEIRA, C.; EVARISTO, M.C.; BRANT, R.S. Características anatômicas foliares de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. 2009. **Maringá**, v. 31, n. 3, p. 439-444, 2009.

DOS SANTOS, F.S.; SOBRINHO, N.M.B.A.; MAZUR, N.; GARBISU, C.; BARRUTIA, O.; BECERRIL, J.M. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p.16-20, 2011.

EGITO, L.C.M.; MEDEIROS, M.G.; MEDEIROS, S.R.B.; AGNEZ-LIMA, L.F. Cytotoxic and genotoxic potential os surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.2, p.435-441, 2007.

ELEZAJ, I.R.; MILLAKU, L.B.; IMERI-MILLAKU, R.H.; SELIMI, Q.I.; LETAJ, K. R. Acute Genotoxic Effects of Effluent Water of Thermo-Power Plant “Kosova” In *Tradescantia pallida*. **Journal of Chemical Health Risks**, v.1, n.1, p.23-28, 2011.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.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, p. 1680–1686, 2009.

FERRAT, L.; PERGENT-MARTINI, C.; ROME ´O. M. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. **Aquatic Toxicology**, v. 65, p. 187-204, 2003.

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

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

GARCIA, A.C.F.S.; MARCON, A.E.; FERREIRA, D.M.; DOS SANTOS, E.A.B.; DO AMARAL, V.S.; DE MEDEIROS, S.R. Micronucleus study of the quality and mutagenicity of surface water from a semi-arid region. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 12, p.3329-3335, 2011.

GIROTTI, M.; ARALDI, R.; VELINI, E.D.; JASPER, S.P.; GOMES, G.L.G.C.; CARBONARI, C.A. Eficiência fotossintética da cana-de-açúcar após a aplicação dos herbicidas S-metolachlor e atrazine em pós-emergência. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.9, n.3, p.109-116, 2010.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh waters**. IBP Handbook, n. 8, 1978.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, v.99, p 273-291, 1982.

GRANT, W.F.; OWENS, E.T. Zea mays assays of chemical/radiation genotoxicity for the study of environmental mutagens. **Mutation Research**. v.613, p. 17-64, 2006.

GRIPPA, G. A.; NATI, N.; MATSUMOTO, S.T. Evaluation of Water Samples from a River by Cytologic Analysis in *Allium cepa*. **Cytologia**, v.77, p. 3-10, 2012.

GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, A.B.B.; BONFIM, H.; KLAUTAU-GUIMARÃES, M.N. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.2, p.334-338, 2005.

HISCOX, J. D. E; ISRAELTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v. 57, p. 1332-1334, 1979.

HORVATH, G.; DROPPA, M.; ORAVEEZ, A.; RASKIN, V.; MARDER, J.B. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium poisoned barley leaves. **Planta**, v. 199, p.238 –243, 1996.

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, p.2090 –2095, 2009.

JOSHI, M.K.; MOHANTY, P. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In: PAPAGEORGIU, G.C.; GOVINDJE, E. eds. **Chlorophyll a**

fluorescence: a signature of photosynthesis . Dordrecht, The Netherlands: Springer, p. 637 – 661, 2004.

KARR, J. R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, p. 21-27, 1981.

KNIGHT, H.; KNIGHT, M.R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. **TRENDS in Plant Science**, v.6, n.6, 2001.

KONRAD, M.L.F.; SILVA, J. A. B.; FURLANI, P. R.; MACHADO, E. C. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, v. 64, n. 3, p. 30-37, 2005.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In. GRASSHOFF, R. ed **Methods of sea water analysis**. Verlag. Chemie Weinheim. p.117-181, 1976.

KRUPA, Z.; BASZYNSKI, T. Some aspects of heavy metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v.17, p. 177–190, 1995.

KÜPPER, H.; KRONECK, P. M. H.. Heavy metal uptake by plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K.O. eds. **Metal ions in biological systems** . New York, NY, USA: Marcel Dekker Inc, p. 97 – 142, 2005

KÜPPER, H.; PARAMESWARAN, A.; LEITENMAIER, B.; TRTÍLEK, M.; SETLÍK, I.. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, v.175, p. 655–674, 2007

KÜPPER, H.; ZHAO, F.; MCGRATH, S. P. Cellular Compartmentation of Zinc in Leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*, **Plant Physiology**, v. 119, n. 1, p. 305-312, 1999.

KUPPER, H.; SETLÍK, I.; SETLIKOVA´, E.; FERIMAZOVA, N.; SPILLER, M.; KÜPPER, F. C. Copper-induced inhibition of photosynthesis: Limiting steps of in vivo copper

chlorophyll formation in *Scenedesmus quadricauda*, **Functional Plant Biology**, v.30, n.12, p. 1187–1196, 2003.

KURAS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 211–221, 2006.

LAM, P.K.S.; GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n.2, p. 182-186, 2003.

LANE, T.W.; MOREL, F.M.M. A biological function for cadmium in marine diatoms. **Proceedings of National Academy of Sciences, USA**, v. 97, n. 9, p. 4627 – 4631, 2000.

LÉLLIS, F. S. 2006. **Análise Ambiental de uma Bacia Hidrográfica como Subsídios ao Planejamento Costeiro. Bacia da Lagoa Jacuném (Serra, ES)**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso – Oceanografia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2006.

LEME, D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation Research**, v.650, p.80-86, 2008.

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

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

LICHTENTHALER, H.K.; WELBURN, A. R. Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. **Biochemical Society Transactions**, v.11, p.591-592, 1983.

LOVETT, G. M.; BURNS, D. A.; DRISCOLI, C. T.; JENKINS, J. C.; MITCHELL, M. J.; RUSTAD, L.; SHANLEY, J. B.; LIKENS, G. E.; HAEUBER, R. 2007. Who needs environmental monitoring? **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.5, n.5, p.253-260.

MA, T. H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G. A.; ZANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, n.2, p. 185-195, 1995.

MA, T. H.; CABRERA, G. L.; OWENS, E. Genotoxic agents detected by plant bioassays. **Reviews on Environmental Health**, v. 20, p.1-13, 2005.

MA, T. H. Tradescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p. 85-90, 1981.

MA, T. H. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother – cell meiosis). **Mutation Research**, v.99, p.293-302, 1982.

MA, T. H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research**, v.426, p. 103-106, 1999.

MA, T. H. *Tradescantia* micronucleo bioassay for detection of carcinogens. **Folia Histochemica et Cytobiologica**, v.39, n. 2, p. 54-55, 2001.

MAJER, B.J.; GRUMMT, T.; ULH, M.; KNASMULLER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica**, v. 33, p. 45-55, 2005.

MARKICH, S. J.; BROWN, P. L. Relative importance of natural and anthropogenic influences on the fresh surface-water chemistry of the Hawkesbury-Hepean river, south-eastern Australia **The Science of the total environment**, v.217, n.3, p.201-203, 1998.

MATTHEWS, R. A.; BUIKEMA, A. L.; CAIRNS Jr., J. Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. **Water Research**, v. 16, p. 129-139, 1982.

MERLO, C.; ABRIL, A.; AMÉ, M. V.; ARGÜELLO, G. A.; CARRERAS, H. A.; CHIAPPERO, M. S.; HUED, A. C.; WANNAZ, E.; GALANTI, L. N.; MONFERRÁN, M. V.; GONZÁLEZ, C. M.; SOLÍS, V.M. Integral assessment of pollution in the Suquía River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. **Science of the Total Environment**, v. 409, n.23, p. 5034-5045, 2011.

METCALFE, J. L. Biological water quality assessment of running waters based on macroinvertebrates communities: History and present status in Europe. **Environmental Pollution**, v. 60, p. 101-139, 1989.

MIELLI, A. C.; MATTA, M. E.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P. H.; UMBUZEIRO, G. A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. **Mutation Research**, v. 672, n. 1, p. 51-54, 2009

MOBIN, M.; KHAN, N.A. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassicajuncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, v.164, p. 601 — 610, 2007.

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

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

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

OLIVEIRA, L. B. **Variação espaço-temporal das respostas ecofisiológicas da comunidade fitoplanctônica em uma lagoa costeira tropical com múltiplos usos: lagoa Juara Serra, ES**. Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2011.

ONCEL, I.; KELES, Y.; USTUN, A. S.; Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. **Environmental Pollution**, v. 107, n. 3, p. 315–320, 2000.

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

PEIXOTO, P. H .P.; DA MATTA, F .M.; CAMBRAIA, J. Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 821-832, 2002.

PILON, M.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; GOGOLIN, K. A.; YE,H. Copper cofactor delivery in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology**., v. 9, n.3, p. 256–263, 2006.

POHREN, R. S; DA COSTA, T. C.; VARGAS, V. M. F. Investigation of Sensitivity of the *Allium cepa* Test as an Alert System to Evaluate the Genotoxic Potential of Soil Contaminated by Heavy Metals. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 224, p. 1460, 2013.

PONGRAC, P.; ZHAO, F. J.; RAZINGER, J.; ZRIMEC, A.; REGVAR, M. Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. **Environmental and Experimental Botany**. v. 66, n. 3, p. 479–486, 2009.

RADIC, S.; STIPANICEV, D.; VUJCIC, V.; RAJCIC, M. M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment**, v.408, p.1228-1233, 2010.

RAI, V.; VAJPAYEE, P.; SINGH, S. N.; MEHROTRA, S. Effect of chromium accumulation on photosynthetic pigments, oxidative stress defense system, nitrate reduction, proline level and eugenol content of *Ocimum tenuiflorum* L. **Plant Science**, v. 167, p. 1159–1169, 2004.

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

RIETZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy Metals in Tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. **Brasilian Journal Biology**. v.61, n.3, p.363-370, 2001.

ROBERTO, M.M. **Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de Baccharis dracunculifolia (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium cepa* e células de mamíferos (HTC)**. 129p. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, G.S. Bioensaios de toxicidade genética com Tradescantia. **Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**, 2011. Disponível em: <http://apostilas.cena.usp.br/Regina/Outras/Plantas%20Bioindicadoras/Mutagenicidade%20com%20plantas%20Geraldo%20S.%20Rodrigues.pdf> .

ROSENBERG, D. M.; RESH V. H. Introduction to freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. Pp 1–9. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H., (eds.), **Freshwater Biology and Benthic Macroinvertebrates**. Chapman & Hall, New York, 1993.

SANTOS, S.; RODRIGUEZ, E. Review on some emerging endpoints of Chromium (VI) and Lead phytotoxicity, In Botany, Ed. Mworia J., In Tech, Disponível em :

www.intechopen. com/books/botany/review-on-emerging-endpoints-of-chromium-vi-and-leadphytotoxicity, 2011.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: **Nutrição Mineral de Plantas**; FERNANDES, M. S., ed.; SBCS: Viçosa, 2006, cap. 16.

SHARMA, D. C.; CHATTERJEE, C.; SHARMA, C. P. Chromium accumulation and its effect on Wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Dh 2204) metabolism, **Plant Science**, v. 111, p. 145–151, 1995.

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

STRICKLAND, J.D.; PARSONS, T.R. A manual of sea water analysis. **Bulletin Fisheries Research Board of Canada**, 1960.

THEWES, M. R.; DELIO, E. J.; DROSTE, A. Genotoxicity biomonitoring of sewage in two municipal wastewater treatment plants using the *Tradescantia pallida* var. purpurea bioassay. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, n.4, p. 689-693, 2011.

VALDERRAMA, J.C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural water. **Marine chemistry**, v. 10, p. 109 – 122, 1981.

VENTURA-CAMARAGO, B. C.; MALTEMPI, P. P. P.; MARIN-MORALES, M. A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium cepa* Meristematic Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v.1, n.3, p.1-12, 2011.

WATANABE, T.; HIRAYAMA, T. Genotoxicity of soil. **Journal of Health Science**, v.47, p. 433-438, 2001.

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram utilizados na produção de dois artigos científicos, conforme apresentados a seguir.

6.1 ARTIGO 1

Ian Drumond Duarte^a, Edvar Junior Roncetti^a, Livia Dorsh Rocha^a, Mariana Morozesk^a, Marina Marques Bonomo^a, Iara Souza Costa^a, Nayara Heloisa Vieira Fraga Silva^a, Eustaquio Vinicius Ribeiro de Castro^b, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima^b, Silvia Tamie Matsumoto^{a*}.

Avaliação da qualidade da água de um ambiente lacustre por meio de análises físicas, químicas e citogenéticas

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Brasil.

*siltamie@gmail.com

O manuscrito será submetido ao periódico Water, Air and Soil Pollution (ISSN 1573-2932), após tradução para a língua inglesa.

Resumo

A gestão dos recursos hídricos necessita da integração entre os critérios físicos e químicos, e os aspectos bióticos, os quais possibilitam identificar os efeitos combinados de substâncias e avaliar suas influências. Os objetivos deste estudo foram avaliar a qualidade da água da lagoa Juara (Município de Serra/ES) por meio dos parâmetros físicos, químicos e as respostas citogenéticas em espécimes de *Allium cepa* após serem submetidas a tratamento com amostras de água coletadas em períodos de chuva e baixa precipitação. Para tanto, foram definidas três estações amostrais ao longo da lagoa. A partir de amostras de água foram analisados parâmetros tais como condutividade, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes e metais. A partir do teste do *Allium cepa*, foram analisados os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos. Os resultados físicos e químicos mensurados demonstraram que a lagoa Juara apresenta indícios de eutrofização artificial. Duas estações amostrais, em pelo menos uma campanha amostral, apresentaram potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico. Os danos citogenéticos observados apresentaram efeitos maximizados durante a segunda campanha, demonstrando o efeito do período de chuva na intensificação da poluição nesse ambiente. Observa-se que o sistema teste *A. cepa* respondeu de maneira fidedigna ao risco potencial do ambiente, e complementa as análises físicas e químicas, ressaltando a necessidade da integração de métodos bióticos, físicos e químicos.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade, eutrofização.

Abstract

The management of water resources requires the integration of the physical and chemical parameters, and biotic features, which make it possible to identify the combined effects of substances and their influences. The objectives of this study were to evaluate the quality water from Juara pond (Municipality of Serra / ES) through the physical, chemical parameters and cytogenetic responses in specimens of *Allium cepa* after be submitted to treatment with samples of water from the Juara pond collected in periods of rainy and drought. To this end, three sampling stations were established along the pond. From water samples, parameters such as conductivity, dissolved oxygen, concentration of nutrients and metals were analyzed. From the test of *Allium cepa*, the cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials were analyzed. The physical and chemical parameters measured showed that the Juara pond show evidence of artificial eutrophication. Two sampling stations, in at least one sampling campaign, showed cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials. The cytogenetic damage showed maximized effects observed during the second campaign, demonstrating the effect of rainfall on the intensification of pollution in this environment. It is observed that the *Allium cepa* test responded reliably to the potential of the environment, and complements the physical and chemical analyzes, highlighting the need for integration of the biotic, physical and chemical methods.

Keywords: *Allium cepa*, cytotoxicity, genotoxicity, mutagenicity, eutrophication.

1 Introdução

As alterações nos ecossistemas aquáticos, decorrentes da expansão das fronteiras agrícolas e do aumento desordenado das demais atividades humanas, têm gerado grande preocupação em relação à disponibilidade e qualidade dos recursos hídricos (Callisto et al. 2001). Nesse aspecto, é necessária a implementação de critérios adequados e rigorosos para o monitoramento da qualidade da água (Buss et al. 2008). Estes critérios devem aliar o tradicional método físico e químico ao monitoramento biótico, o qual possibilita adquirir dados das condições bióticas dos ambientes (Cairns e Pratt 1993).

O monitoramento ambiental pode ser definido como uma série temporal de medições de variáveis físicas, químicas e biológicas para responder questões sobre mudanças no ecossistema (Lovett et al. 2007). Biomonitoramento é a medição do comportamento de atributos de organismos vivos a fim de avaliar as alterações ocorridas no ambiente (Matthews et al. 1982). Nesse aspecto, os biomarcadores moleculares e celulares são importantes, tendo em vista seu potencial de avaliação antecipada de mudanças nos altos níveis de organização biológica, isto é, população, comunidade ou ecossistema. Logo, os organismos podem responder ao stress por meio de alterações moleculares e celulares antes de serem acometido por doenças ou morte. Os biomarcadores podem ser ferramentas em estudos de campo cujas áreas impactadas apresentam mistura complexa de poluentes (Monserrat et al. 2003).

Nesse cenário, as plantas compõem ótimos sistemas de ensaios genéticos por serem sensíveis a poluentes ambientais e têm sido utilizadas no monitoramento de ambientes aquáticos e efluentes industriais ou domésticos (Grippa et al. 2012; Gupta e Ahmad 2012; Firbas e Amon 2013; Mesi e Kopliku 2013). Dentre as plantas, o *Allium cepa* L., da família Liliaceae, é amplamente utilizada como sistema-teste para a avaliação de danos cromossômicos e no aparato

mitótico, devido à facilidade de análise bem como a alta sensibilidade na detecção de químicos e compostos tóxicos (Leme e Marin-Morales 2008), sendo eficaz na análise da poluição de recursos hídricos pela avaliação da qualidade da água (Radic et al. 2010).

Gerenciar os recursos hídricos e realizar as medidas necessárias para mitigar o impacto ambiental devido ao desordenado crescimento populacional, exige estudos interdisciplinares que abranjam todos os aspectos dos ecossistemas (Mugnai e Gatti 2008). A lagoa Juara é um dos corpos hídricos mais importantes da região metropolitana de Vitória. Localizada no município de Serra, Espírito Santo, Brasil. Tal corpo d'água apresenta importante função ecológica e socioeconômica, sendo utilizada para lazer, recreação, pesca e local para prática de piscicultura intensiva pela Associação de Pescadores da lagoa Juara (Oliveira 2011). Todavia esse ambiente lacustre tem sido submetido a diversos impactos antrópicos, como assoreamento, degradação de suas margens devido a agricultura e pastagens, bem como o aporte de efluentes domésticos.

Tendo em vista à degradação desse ambiente e a sua importância ecológica e socioeconômica, faz-se necessário o seu monitoramento tanto por meio dos métodos físicos e químicos tradicionais quanto por testes bióticos que sejam rápidos e sensíveis. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade da água da lagoa Juara por meio dos parâmetros físicos, químicos e as respostas citogenéticas em *Allium cepa* após tratamento com amostras de água da lagoa Juara coletadas em períodos de chuva e baixa precipitação.

2 Material e Métodos

2.1 Área de estudo e estações amostrais

A lagoa Juara localiza-se no município de Serra, Espírito Santo, Brasil. Apresenta 2,9 Km² de superfície e microbacia que se estende da zona rural ao litoral. Para caracterizar suas condições foram definidas três estações amostrais (Figura 1) por meio de aparelho de GPS

(Garmin Etrex): J1 – estabelecido como ponto referência de qualidade da água da lagoa, situado a montante das outras estações amostrais (S 20° 06. 415' / H 40° 15. 041'); J2 - local de instalação dos tanques redes pela Associação de Pescadores da lagoa Juara (S 20° 06. 381' / HO 40° 13. 949') e J3 - localizado nas proximidades da foz do Córrego Laranjeiras, a jusante de J2 e J1 (S 20° 07. 660' / H 40° 12. 748'). As coletas consistiram de amostragem de água subsuperficial, realizadas durante duas campanhas amostrais em setembro de 2012 e março de 2013.

2.2 Análises físicas e químicas

Durante as amostragens, foram aferidos a temperatura da água (°C), os teores de oxigênio dissolvido (% saturação), a condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) e a salinidade (ppt) a partir do medidor multiparâmetro YSI 85. O pH foi determinado por meio do pHmetro Micronal e a turbidez foi determinada pelo turbidímetro digital Plus ALFAKIT.

Amostras foram coletadas e armazenadas em caixa térmica refrigeradas, sendo posteriormente filtradas em Millipore de fibra de vidro GF1 a vácuo para a determinação de sólidos totais em suspensão (STS), conforme Apha (1992). A análise da concentração de nutrientes nas estações amostrais consistiu de coleta de água em frascos, refrigerados posteriormente, sendo parte congelada para a quantificação de fósforo total enquanto a outra parcela foi filtrada em filtros Millipore de fibra de vidro GF1, a vácuo, sendo posteriormente congeladas para determinação de nitrito, silicato, nitrogênio amoniacal, ortofosfato e silicatos, conforme os métodos de Valderrama (1981), Golterman et al. (1978), Koroleff (1976) e Strickland e Parsons (1960).

Para a quantificação dos elementos Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn e Pb, amostras de água superficial de cada estação amostral, em ambas as campanhas, foram coletadas e armazenadas em frascos de polietileno previamente lavados com sabão neutro,

detergente EXTRAN (2%) e solução de Ácido nítrico (HNO_3 10%) respectivamente. Cada amostra de água foi acidificada em campo com Ácido nítrico concentrado (2,5 ml de HNO_3 para 500 ml de amostra) e posteriormente armazenadas em caixa térmica refrigerada (Rietzler et al. 2001). A quantificação foi baseada no método descrito por U.S. EPA 200.8 a partir de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em aparelho Varian - Modelo AA 240 FS.

2.3 Teste do *Allium cepa*

As amostras de água coletadas para a realização do Teste do *Allium cepa* foram armazenadas em frascos de polietileno e posteriormente conservadas em refrigeração até a realização dos ensaios. Sementes de *A. cepa*, variedade Baia periforme (TOPSEED - Lote 026111, Germinação 85%, Pureza 99%.) foram utilizadas tendo em vista a homogeneidade genética e fisiológica, além de estarem disponíveis durante todo o ano, garantindo a confiabilidade do ensaio (Leme e Marin-Morales 2008). O Teste do *A. cepa*, utilizando células meristemáticas de raiz foi realizado de acordo com Grant (1982), com modificações. Sementes foram germinadas diretamente nas águas correspondentes às estações amostrais J1, J2 e J3. O controle negativo (CON) foi realizado com sementes germinadas em água destilada e o controle positivo (CON+) em solução de Metil Metano Sulfonato (4×10^{-4} mM).

As raízes das sementes foram coletadas após atingirem aproximadamente 2 cm de comprimento, e fixadas em Carnoy (3 etanol:1 ácido acético) por 24 horas. Os meristemas foram submetidos à hidrólise ácida em HCl 1N (60°C). A coloração foi realizada pelo método tradicional de Feulgen e as lâminas foram confeccionadas por esmagamento com carmim acético (2%).

Foram analisadas cinco lâminas por tratamento (J1, J2, J3, CON+ e CON), sendo avaliadas aproximadamente 5000 células em cada tratamento em microscópio de luz. As fases celulares, bem como as alterações cromossômicas, foram listadas e as frequências utilizadas para se calcular o índice mitótico (IM), o índice de aberrações cromossômicas (AC) e a frequência de micronúcleos (MN).

A análise de citotoxicidade, aferida por IM, foi obtida a partir da razão do número total de células em divisão com o número total de células analisadas. Para a análise da genotoxicidade por meio de AC, alterações foram consideradas nos estágios da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase e telófase), como ponte, quebra, c-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência, perda, núcleo lobulado, núcleo fragmentado, brotamento e célula bi-nucleada (Figura 3). Já para a avaliação da mutagenicidade por meio de MN foram consideradas as células portadoras de micronúcleos em relação ao número total de células observadas (Figura 3) (Leme e Marin-Morales 2008).

Os índices IM, AC e MN foram calculados de acordo com a fórmula: frequência = $(A/B) \times 100$, onde A equivale ao total de células do parâmetro analisado, e B ao total de células analisadas. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey ($p < 0.05$) a fim de se comparar as estações amostrais e controles em cada campanha. Para a comparação das estações entre as campanhas amostrais foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni ($p < 0.05$).

3 Resultados e Discussão

Os dados pluviométricos apontam que a primeira campanha amostral caracterizou-se como período de baixa precipitação, apresentando índice de 36,4 mm de precipitação (Figura 2). Já a segunda campanha, apesar de apresentar o mês antecedente marcado por baixa precipitação,

foi caracterizada como período de alta precipitação no mês de ocorrência, apresentando índice de 448,8 mm.

Dentre as análises físicas e químicas (Tabela 1), destacam-se os valores de condutividade elétrica, nitrogênio amoniacal, e fósforo total. Os valores de condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$) apresentaram-se superiores em J2 e J3, sobretudo durante a segunda campanha com máximas de 133,60 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) em J2 e 198,40 ($\mu\text{S}/\text{cm}$) em J3. Essa variável indica a quantidade de íons dissolvidos presentes na coluna d'água, representando uma medida indireta da concentração de poluentes, possibilitando a detecção de fontes poluidoras e o fornecimento de dados sobre o ecossistema aquático e sua bacia de drenagem (Esteves 1998). De acordo com Cetesb (2011), valores superiores a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ são indicativos de ambientes impactados.

Com relação ao nitrogênio amoniacal, foi observado o aumento relativo dos níveis durante o período de alta precipitação, sobretudo em J2 (6,81 $\mu\text{g}/\text{L}$) e J3 (33,05 $\mu\text{g}/\text{L}$), sendo este último o de maior nível (Tabela 1). Na estação J2 os níveis elevados podem estar relacionados ao aporte de ração e excretas oriundos da piscicultura intensiva de tilápias. Em J3 os níveis podem se remeter ao córrego Laranjeiras que é um tributário da lagoa rico em efluentes domésticos não tratados. Os níveis de íons de amônia referem-se ao alto grau de poluição orgânica em ambientes aquáticos, como posto por Wetzel (2001) e observado por Oliveira (2011) em estudo pretérito na lagoa Juara.

Os índices de fósforo total, principal fator determinante para o estado trófico da lagoa, foi elevado em J3 durante ambas campanhas, apresentando o maior valor (69,3 $\mu\text{g}/\text{L}$) durante o período de alta precipitação (Tabela 1). As altas concentrações de fósforo estão associadas com a eutrofização, pois o fósforo é considerado nutriente limitante para a produção primária em lagos

tropicais (Huzsar 2006). Grandes quantidades de fósforo são oriundas, provavelmente, de descargas de esgotos sanitários, efluentes industriais e drenagem agrícola (Cetesb 2011).

Dentre os metais quantificados (Tabela 2), os metais Ca, Fe, Mg e Mn foram detectados. Com relação aos mesmos, o Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil, em sua resolução nº 357 estabelece para as águas doces os valores máximos tolerados para os manganês (0,1 µg/mL) e ferro (0,3 µg/mL). Na lagoa Juara, com relação ao manganês, não foi observado valores acima do estabelecido pela resolução, tendo os níveis variando entre 0,040 a 0,056 µg/mL nas estações avaliadas, em ambas as campanhas. Por outro lado, as concentrações de ferro ultrapassaram o estabelecido por tal resolução, com níveis variando de 1,237 a 2,614 µg/mL.

Essa quantificação de Fe sugere uma relação da concentração deste elemento com a composição orgânica das estações amostrais, de modo que J3, em ambas as campanhas, apresentou os menores níveis de ferro e em contrapartida os maiores níveis de nitrogênio amoniacal e fósforo total. Neste aspecto, segundo Costa et al. (2008), há processos capazes de reduzir a concentração dos íons metálicos livres como, por exemplo, as reações de complexação. No ambiente aquático, metais podem se complexar com a matéria orgânica dissolvida, como por exemplo, as substâncias húmicas que podem representar 80% da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais e influenciar numerosos processos biogeoquímicos (Corami et al. 2007; Lamelas e Slaveykova. 2007).

As análises físicas e químicas quando integradas aos estudos de biomonitoramento detectam a presença de agentes químicos potencialmente nocivos ao ambiente aquático e à saúde humana. De acordo com Markich e Brown (1998), a análise da água superficial a partir parâmetros físicos e químicos reflete influências da litologia do local da amostragem, da

atmosfera e das condições climáticas e antrópicas. Identificar e quantificar estas são uma forma importante de gerenciamento dos recursos hídricos.

Todavia, a caracterização de possíveis consequências da exposição da biota aos agentes tóxicos apenas com base em procedimentos químicos é ineficiente, apresentando limitações no método em prever os efeitos sinérgicos e antagônicos de contaminantes em misturas ambientais complexas (Helma et al. 1998). Por outro lado, os ensaios bióticos são capazes de caracterizar os efeitos de contaminantes ambientais em exposições crônica e aguda (Ohe 2004). Logo, é necessário avaliar o impacto potencial causado pela exposição desses agentes em diferentes organismos (Van der Oost et al. 2003).

Os resultados das análises pelo teste do *A. cepa* após exposição às amostras de água das diferentes estações amostrais revelaram que durante a primeira campanha a estação amostral J3 apresentou valores de IM menores, e AC e MN significativamente maiores do que o controle negativo e outras estações amostrais (Tabela 3). O valor inferior de IM em J3 ($0,061 \pm 0,005$) remete-se ao potencial citotóxico das amostras avaliadas, o qual reduz substancialmente a frequência do ciclo de divisão celular. Já o valor superior de AC ($0,029 \pm 0,002$) refere-se ao potencial genotóxico das amostras e decorre da frequência de aberrações cromossômicas, sobretudo aderência e brotamento que foram as aberrações de frequência significativamente superiores em relação ao controle negativo (Figura 3 e Tabela 4). A frequência de micronúcleo em J3 ($0,003 \pm 0,001$) também foi significativamente superior ao controle negativo, porém sem diferença significativa em relação ao controle positivo (Tabela 3).

Os resultados do teste de *A. cepa* referentes às amostras de água do período de alta precipitação demonstraram que além da estação amostral J3, a estação J2 também apresentou valores de IM, AC e MN significativamente diferentes em relação ao observado no controle

negativo. Sendo que nos índices AC e MN, J2 e J3 não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 3). Em relação ao IM, os valores observados em J2 ($0,094 \pm 0,004$) e J3 ($0,059 \pm 0,001$) foram inferiores ao controle negativo e a estação referência J1, por outro lado, os índices AC e MN apresentaram-se significativamente superiores (Tabela 3). As análises das aberrações cromossômicas revelaram que os elevados índices em J2 ($0,020 \pm 0,002$) e J3 ($0,021 \pm 0,002$) decorreram dos elevados números de c-metáfases, aderência e brotamentos (Figura 3 e Tabela 4). A frequência de micronúcleo apresentou-se significativamente superior a CN, em J2 e J3 (Tabela 3).

As análises de comparação de IM, AC e MN entre as mesmas estações amostrais em diferentes campanhas, revelaram que o índice mitótico mostrou-se significativamente superior em J1 durante o período de alta precipitação. Já o índice de aberrações cromossômicas apresentou valor superior em J2 e inferiores em J3 durante a segunda campanha, enquanto que a frequência de micronúcleos apresentaram valores mais acentuados nessas estações durante a segunda campanha (Tabela 3). Isso demonstra que durante o período de alta precipitação na lagoa Juara ocorre os maiores níveis de danos não reversíveis ao DNA levando à formação de micronúcleos. A presença de compostos tóxicos podem levar à formação dos micronúcleos que são formados por fragmentos de cromossomos acêntricos (efeito clastogênico) ou por cromossomos inteiros que não completaram a migração anafásica da divisão celular (efeito aneugênico) (Bolognesi et al. 2006; Pantaleão et al. 2006).

A interferência da precipitação sobre ambientes lacustres e sua consequência nas frequências de danos observado nos resultados citogenéticos na lagoa Juara, também foi observada nos estudos de Christofolletti (2008) e Duarte et al. (2011), onde foi observada intensificação dos danos citogenéticos durante o período de chuva. Nesse aspecto, Ergene et al.

(2007) relatam que as concentrações dos poluentes nas águas geralmente dependem do fenômeno de enriquecimento ou diluição causado, por exemplo, pela chuva. Nesses casos, a alta precipitação pode promover a diluição dos poluentes ou ainda agravar os efeitos pela maior lixiviação dos poluentes provenientes do solo e redes de esgoto. Ainda segundo Esteves (1998), em lagos muito rasos é possível que ocorra maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água durante períodos de chuva. A lagoa Juara, apresentou profundidade média de 2,55 m em J1, 2,40 m em J2 e 1,60 m em J3.

Diversos estudos relacionam a presença de alterações reversíveis e não reversíveis ao DNA devido à presença de metais tais como o cromo (Kopliku e Mesi 2013), chumbo (Carruyo et al. 2008), cádmio (Seth et al. 2008) e alumínio (Achary et al. 2007). Todavia, na lagoa Juara, apesar da presença de alguns metais tais como Fe e Mg, os elevados níveis de AC e MN em J2 e sobretudo em J3, não parece estar relacionada a esses contaminantes. A toxicidade dos metais depende da forma química que assumem nos ambientes aquáticos, todavia há processos como a complexação em matéria orgânica que podem alterar a concentração dos íons metálicos livres e diminuir significativamente sua toxicidade (Costa et al. 2008).

A lagoa Juara, apresenta bacia hidrográfica ocupada por áreas residenciais e rurais. Tal ocupação aliada aos processos de lixiviação e despejo de efluentes pode resultar numa mistura complexa de poluentes, seja de origem inorgânica ou orgânica. Nesse aspecto, destacam-se os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de substâncias como fertilizantes (Bhatta e Sakya 2008), herbicidas (Jabee et al. 2008; Fernandes et al. 2009; Ventura-Camargo et al. 2011), hidrocarbonetos de petróleo (Leme et al. 2008; Mazzeo et al. 2010), conservantes alimentícios (Palani-Kumar e Panneerselvam 2007; Turkoglu 2007), fungicidas (Celik et al. 2005) e

inseticidas (Soliman et al. 2001), ou até mesmo de misturas complexas como efluentes de indústrias (Matsumoto et al. 2006; Sik et al.2009) e domésticos (Grover e Kaur 1999).

4 Conclusão

Os parâmetros físicos e químicos mensurados demonstram indícios de processos de eutroficação na lagoa Juara, principalmente em J3, tendo em vista o lançamento de efluentes nesta estação amostral. Durante o período de baixa precipitação, a estação que apresentou níveis significativos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi J3. Enquanto que durante o período de alta precipitação, J2 e J3 apresentaram valores significativos de tais potencias. Dentre as aberrações citogenéticas, foram observadas com maior frequência, as alterações c-metafase, brotamento e aderência. Apesar dos danos citogenéticos observados em *Allium cepa*, estes não parecem relacionar-se à presença de Fe e Mn. Todavia, observou-se que o sistema teste *A. cepa* respondeu de maneira a ao risco potencial deste ambiente aquático, complementando as análises físicas e químicas usualmente realizadas para o monitoramento da qualidade da água.

5 Referências

Achary, V.M.M., Jena S., Panda K.K. & Panda B.B. (2007) Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70,300-310.

APHA – American Publication Health Association, Standars methods for the examination of water and wastewater (1992). Greenberg, A. E., Clesceri, L. S. & Eaton, A. D. (Eds.). 18.ed. USA: Washington D. C.

Bhatta, P. & Sakya, S.R. (2008) Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem of *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. *Ecoprint*, 15, 83-88.

Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M. & Sciutto, A. (2006) Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 93-98.

Buss, D.F.; Oliveira, R.B. & Baptista, D.F. (2008) Monitoramento Biológico De Ecossistemas Aquáticos Continentais. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), 339-345.

Cairns, J. & Pratt, J.R. (1993) A history of biological monitoring using benthic Macroinvertebrates. p. 10-17. In: Rosenberg, D.M. & Resh, V.H., (eds.), *Freshwater Biology and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York

Callisto, M.; Moretti, M. & Goulart, M.D.C. 2001. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, 6(1), 71-82.

Carruyo, I., Fernandez, Y., Marcano, L., Montiel, X. & Torrealba, Z. (2008) Correlation of toxicity with lead content in root tip cells (*Allium cepa* L.). *Biological Trace Element Research*, 125, 276-285.

Celik, M., Yuzbasioglu, D., Unal, F., Arslan, O., Kasap, R. (2005) Effects of dinocap on the mitosis of *Allium cepa* L. *Cytologia*; 70,13-22.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (2011) Variáveis de qualidade das águas. <http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/125-variaveis-de-qualidade-das-aguas-e-dos-sedimentos> Acessado em 20 Dezembro 2013.

Christofolletti, C.A.(2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 129 f. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências - Rio Claro, São Paulo. 2008.

Corami, F., Capodaglio, G., Turetta, C., Bragadin, M., Calace, N. & Petronio, B.M. (2007) Complexation of cadmium and copper by fluvial humic matter and effects on their toxicity. *Annali di Chimica*, 97(1-2), 25-37.

Costa, C.R., Olive, P., Botta, C.C.R. & Espindola, E.G. (2008) Toxicidade em Ambientes Aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. *Quimica Nova*, 31(7), 1820-1830.

Duarte, I.D., Dias, M.C., David, J.A.O. & Matsumoto, S.T. (2012) 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*, 10(2), 211-219.

Ergene, S., Çavas, T., Çelik, A., Koleli, N., Kaya, F. & Karahan, A. (2007) Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16, 385-391.

Esteves, F.A. (1998) *Fundamentos de Limnologia*. (602 p.), Rio de Janeiro, 2ª edição, Editora Interciência.

Fernandes, T.C., Mazzeo, D.E. & Marin-Morales, M.A. (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1680-1686.

Firbas, P. & Amon, T. (2013) Allium Chromosome Aberration Test for Evaluation Effect of Cleaning Municipal Water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 4(4), 189.

Golterman, H. L., Clymo, R. S. & Ohnstad, M. A. M. (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh waters*. IBP Handbook n. 08.

Grant, W.F. (1982) Chromosome aberration assays in *Allium cepa*. *Mutation Research*, 99, 273–291.

Grippa, G.A., Nati, N. & Matsumoto, S.T. (2012) Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. *Cytologia*, 71(1), 1-7.

Grover I.S. & Kaur S. (1999) Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the Allium root anaphase aberration and micronucleus assays. *Mutation Research*, 426, 183-188.

Gupta, A.K. & Ahmad, M. (2012) Assessment of cytotoxic and genotoxic potential of refinery waste effluent using plant, animal and bacterial systems. *Journal of Hazardous Materials*, 201–202, 92–99.

Helma, C., Eckl, P., Gottmann, E., Kassie, F., Rodinger, W., Steinkellner, H., Windpassinger, C., Schulte-Hermann, R. & Knasmueller, S. (1998) Genotoxic and ecotoxic effects of groundwaters and their relation to routinely measured chemical parameters. *Environmental Science and Technology*, 32(12), 1799 – 1805

Huzsar, V.L.M. (2006) Nutrient – chlorophyll relationships in tropical – subtropical lakes: do temperate models fit? *Biogeochemistry*, 79, 239-250.

Jabee, F., Ansari, M.Y.K. & Shahab, D. (2008) Studies on the effect of maleic hydrazide on root tip cells and pollen fertility in *Trigonella foenum-graecum* L. *Turkish Journal of Botany*, 32, 337-344.

Kopliku, D. & Mesi, A. (2013). Assessment Of Cytotoxic And Genotoxic Potency Of Cr(VI)-Doped River Water Of Nen-Shkodra Lowland, Albania, On *Allium cepa* L. *Journal of environmental Research and Development*, 7(4), 1322-1332.

Koroleff, F. (1976) Determination of nutrients. In. Grasshoff, R. ed *Methods of sea water analysis*. Verlag. Chemie Weinheim. 117-181.

Lamelas, C. & Slaveykova, V.I. (2007) Comparison of Cd(II), Cu(II), and Pb(II) biouptake by green algae in the presence of humic acid. *Environmental Science & Technology*, 41(11), 4172-4178.

Leme, D.M. & Marin-Morales, M.A. (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water- A case study. *Mutation Research*, 650, 80-86.

Leme, D.M., De Angelis, D.de F. & Marin-Morales, M.A. (2008) Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquatic Toxicology*, 88, 214–219.

Lovett, G.M., Burns, D.A., Driscoli, C.T., Jenkins, J.C., Mitchell, M.J., Rustad, L., Shanley, J.B., Likens, G.E. & Haeuber, R. (2007) Who needs environmental monitoring? *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(5), 253-260.

Markich, S. J. & Brown, P. L.(1998) Relative importance of natural and anthropogenic influences on the fresh surface-water chemistry of the Hawkesbury-Hepean river, south-eastern Australia *The Science of the total environment*, 217(3), 201-203.

Matthews, R. A., Buikema, A. L. & Cairns Jr., J. (1982) Biological monitoring part IIA: Receiving system functional methods relationships, and indices. *Water Research*, 16, 129-139.

Mazzeo, D.E.C., Levy, C.E., Angelis, D.F. & Marin-Morales, M.A. (2010) BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. *Science of the Total Environment*, 408, 4334–4340.

Matsumoto, S. T., Mantovani, M. S., Malagutti, M. I., Dias, A. L., Fonseca, I. C. & Marin-Morales, M. A. (2006) Assessment of the Genotoxic and Mutagenic Effect of Chromium residues Present in Tannery Effluents Using the Micronucleus and Comet Assay in *Oreochromis niloticus* and Chromosomes Aberrations in *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 148-158.

Mesi, A. & Koplíku, D. (2013) Toxicity Bio-Monitoring of Shkodra Lake Surface Water Using a Higher Plant Assay. *Academic Journal of Interdisciplinary Studies*, 2(8),133.

Monserrat, J.M., Geracitano, L.A. & Bianchini, A. (2003) Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology*, 9, 255-269.

Mugnai, R. & Gatti, M.G. (2008) Infra-estrutura básica de suporte para o estudo de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), 506-519.

Ohe, T., Watanabe, T. & Wakabayashi, K. (2004) Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research*, 567(2– 3), 109 – 149

Oliveira, L. B. Variação espaço-temporal das respostas ecofisiológicas da comunidade fitoplanctônica em uma lagoa costeira tropical com múltiplos usos: lagoa Juara Serra, ES).

Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, 2011

Palani-Kumar, L. & Panneerselvam, N. (2007) Cytogenetic Studies Of Food Preservative In *Allium cepa* Root Meristem Cells. *Medicine and Biology*, 14(2), 60 – 63.

Pantaleão, S. D. E. M., Alcântara, A.V., Alves J. D. O. P. & Spanó, M. A. (2006) The piscine micronucleus test to assess the impact of pollution on the Japaratuba river in Brazil. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(3), 219-224.

Radić, S., Stipaničev, D., Vujčić, V., Rajčić, M.M., Širac, S. & Pevalek-Kozlina, B. (2010) The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment*, 408, 1228-1233.

Rietzler, A. C., Fonseca, A. L. & Lopes, G. P. (2001). Heavy Metals in Tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. *Brasilian Journal Biology*, 61(3), 363-370.

Seth C.S., Misra V., Chauhan L.K.S. & Singh, R.R. (2008) Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 71, 711-716.

Sik, L., Acar, O. & Aki, C. (2009) Genotoxic effects of industrial wastewater on *Allium cepa* L. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1919-1923.

Soliman, M.I. (2001) Genotoxicity testing of neem plant (*Azadirachta indica* A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome aberrations assay. *Journal of Biological Sciences*, 1(11), 1021-1027.

Strickland, J.D. & Parsons, T.R. (1960) A manual of sea water analysis. *Bulletin. Fisheries Research Board of Canada*.

Turkoglu, S. (2007) Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, 626, 4-14.

Valderrama, J.C. (1981) The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural water. *Marine chemistry*, 10, 109 – 122.

Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.

Ventura-Camargo, B.C., Maltempi, P.P.P. & Marin-Morales, M.A. (2011) The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium cepa* Meristematic Cells. *J Environment Analytic Toxicol*, 1(3), 1-12.

Wetzel, R. G. (2001) *Limnology*, 3rd edn. San Diego: Academic Press.

Figuras

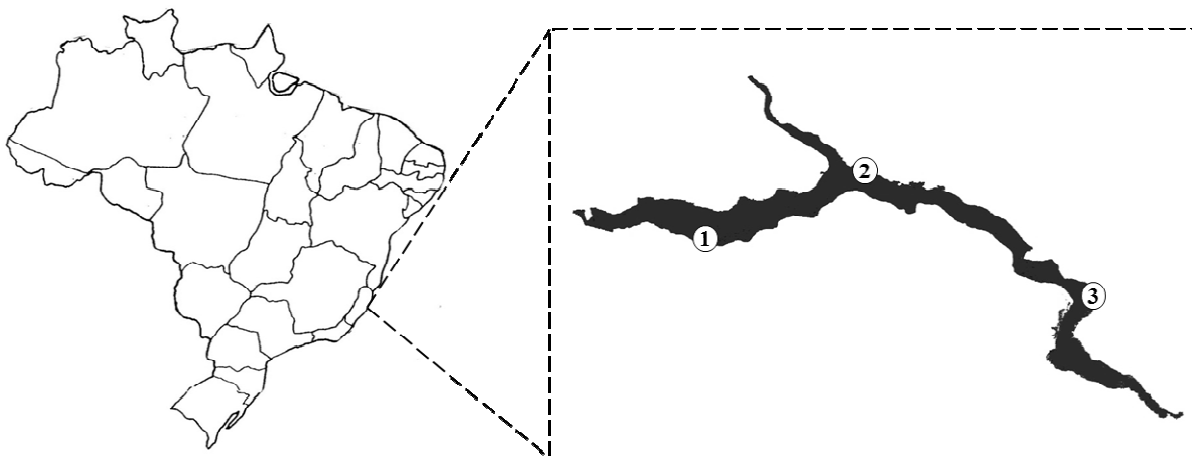


Figura 1. Estações amostrais na lagoa Juara, sendo 1: J1 (referência); 2: J2 (piscicultura) e 3: J3 (próximo a foz do Córrego Laranjeiras).

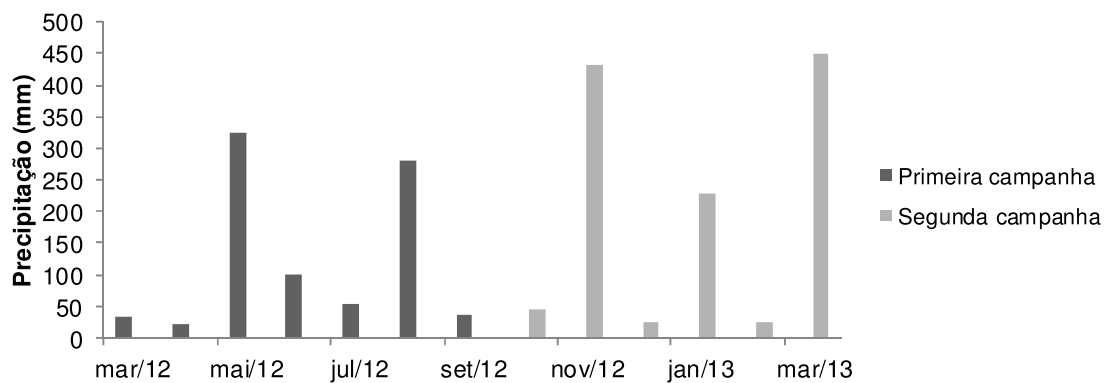


Figura 2. Precipitação durante março de 2012 (mar/12) a março de 2013 (mar/13) - Estação meteorológica localizada no município de Vitória-ES, Coordenadas: S 20,300° / W 40,317°, 36 m.

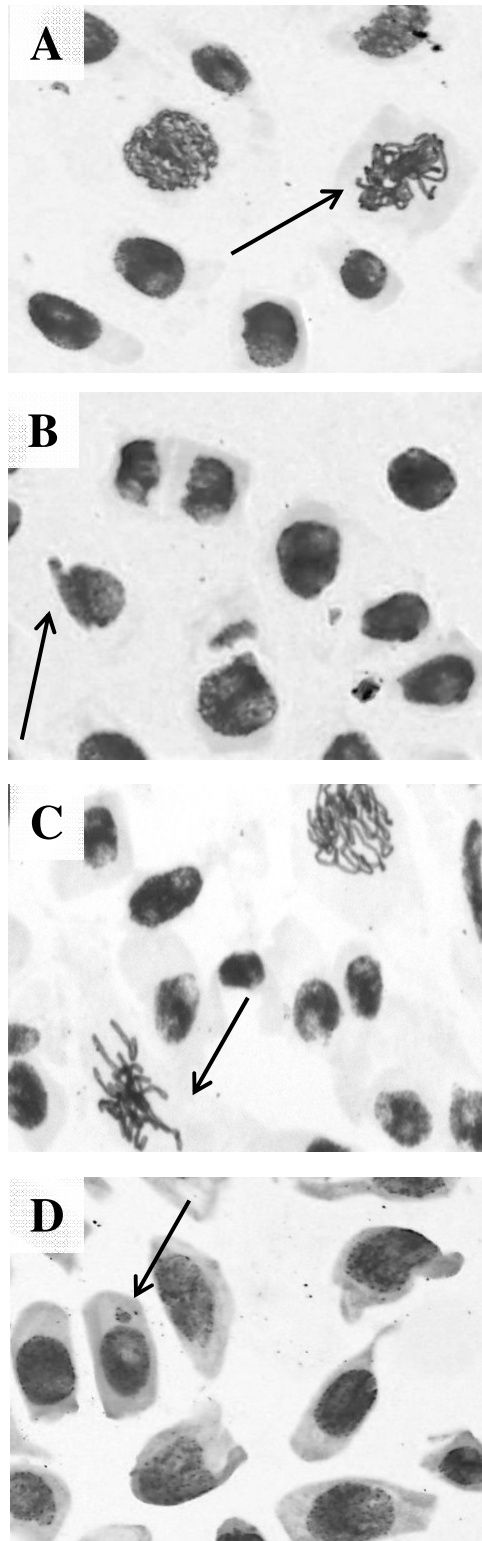


Figura 3. Danos citogenéticos em *Allium cepa*. A: aderência; B: brotamento; C: C-metáfase; D: micronúcleo. As setas indicam os danos citogenéticos.

Tabela

Tabela 1: Parâmetros físicos e químicos das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3.

Parâmetros físicos e químicos	1ª Campanha			2ª Campanha		
	J1	J2	J3	J1	J2	J3
Condutividade (µS/cm)	101,00	104,80	143,00	103,80	133,60	198,40
N(NH3)(µg/L)	2,59	4,34	19,51	3,22	6,81	33,05
N(NO2)(µg/L)	5,82	8,11	4,75	5,57	4,04	4,41
OD (% saturação)	54,20	60,60	74,80	99,40	73,10	196,00
Ortofosfato (µg/L)	18,48	39,70	37,76	40,45	36,88	31,71
P total (µg/L)	23,45	30,47	63,04	48,24	38,99	69,03
pH	6,72	6,80	6,84	7,020	6,82	8,96
Salinidade (ppt)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Silicato (mg/L)	97,44	119,76	188,10	95,72	102,25	181,24
STS (mg/L)	0,40	2,20	0,90	11,80	10,60	5,30
Temp. água(°C)	26,00	26,10	25,50	30,90	30,60	31,10
Temp. ar (°C)	26,00	27,00	27,50	31,00	33,00	31,00
Turbidez (UNT)	8,27	9,23	9,74	6,74	6,98	37,08

Tabela 2: Quantificação de metais ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013. 1ª Campanha: período de baixa precipitação, 2ª Campanha: período de alta precipitação.

Metais $\mu\text{g/mL}$	1ª Campanha			2ª Campanha		
	J1	J2	J3	J1	J2	J3
Al	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ca	4,183	3,941	5,684	4,665	4,781	6,151
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Co	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fe	2,614	2,042	1,515	2,177	2,116	1,237
Li	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mg	2,022	2,127	2,836	2,600	2,707	3,174
Mn	0,052	0,040	0,042	ND	0,040	0,056
Ni	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Limites de detecção: 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para Li, Co, Cu, Ni, Cr, Ca e Mn; 0,08 $\mu\text{g/mL}$ para Pb e Fe; 0,80 $\mu\text{g/mL}$ para Al; 0,01 $\mu\text{g/mL}$ para Zn; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ para Cd e Mg. ND= não detectado pelo método.

Tabela 3: Resultados de IM, AC e MN no ensaio *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

Índices	Campanha	Controles/Estações	Média±EPM	Diferença entre as campanhas
IM	1ª Campanha	CON	0,084 ± 0,006 ^A	nc
		CON+	0,049 ± 0,004 ^{Ba}	nc
		J1	0,093 ± 0,006 ^{Ab}	***
		J2	0,099 ± 0,004 ^{Ab}	-
		J3	0,061 ± 0,005 ^{Ba}	-
	2ª Campanha	CON	0,111 ± 0,004 ^A	nc
		CON+	0,060 ± 0,003 ^{Ba}	nc
		J1	0,140 ± 0,004 ^B	***
		J2	0,094 ± 0,004 ^B	-
		J3	0,059 ± 0,001 ^{Ba}	-
AC	1ª Campanha	CON	0,003 ± 0,001 ^A	nc
		CON+	0,026 ± 0,002 ^{Ba}	nc
		J1	0,002 ± 0,000 ^{Ab}	-
		J2	0,005 ± 0,001 ^{Ab}	***
		J3	0,029 ± 0,002 ^{Ba}	**
	2ª Campanha	CON	0,002 ± 0,001 ^A	nc
		CON+	0,026 ± 0,002 ^{Ba}	nc
		J1	0,004 ± 0,000 ^A	-
		J2	0,020 ± 0,002 ^{Ba}	***
		J3	0,021 ± 0,002 ^{Ba}	**
MN	1ª Campanha	CON	0,000 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,004 ± 0,001 ^{Ba}	nc
		J1	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	-
		J2	0,001 ± 0,000 ^{Ab}	***
		J3	0,003 ± 0,001 ^{Ba}	***
	2ª Campanha	CON	0,002 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,006 ± 0,001 ^B	nc
		J1	0,001 ± 0,000 ^A	-
		J2	0,011 ± 0,001 ^{Ba}	***
		J3	0,013 ± 0,001 ^{Ba}	***

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * Diferença significante entre estações amostrais nas diferentes campanhas ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni's. nc: Não comparado. EPM: Erro padrão da média.

as aberrações cromossômicas do ensaio do *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles vivo (CON+).

	1ª Campanha					2ª Campanha				
	CON	CON+	J1	J2	J3	CON	CON+	J1	J2	J3
	0,000 ± 0,000 ^A	1,400 ± 0,400 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^A	0,400 ± 0,400 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	1,200 ± 0,583 ^{Aa}
	0,400 ± 0,245 ^A	1,400 ± 0,245 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	1,000 ± 0,316 ^{Ba}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	1,000 ± 0,316 ^{Ba}
	2,200 ± 0,490 ^A	3,600 ± 0,748 ^{Aab}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	1,000 ± 0,548 ^{Aab}	2,000 ± 0,894 ^{Aab}	0,000 ± 0,000 ^A	1,200 ± 0,490 ^{Aab}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	1,200 ± 0,374 ^{Aab}	1,400 ± 0,400 ^{Bb}
	0,200 ± 0,200 ^A	1,000 ± 0,316 ^{Aa}	1,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	0,800 ± 0,374 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}
	0,000 ± 0,000 ^A	1,400 ± 0,400 ^{Ba}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,800 ± 0,583 ^{Aab}	0,000 ± 0,000 ^A	3,200 ± 0,800 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}
	0,000 ± 0,000 ^A	12,200 ± 0,800 ^{Ba}	0,800 ± 0,374 ^{Ab}	2,600 ± 0,510 ^{Ab}	13,000 ± 1,225 ^{Ba}	1,600 ± 0,980 ^A	13,400 ± 0,927 ^{Ba}	3,400 ± 0,510 ^A	13,200 ± 0,860 ^{Ba}	10,600 ± 0,678 ^{Ba}
	0,200 ± 0,200 ^A	1,800 ± 0,490 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	1,600 ± 0,510 ^{Ba}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	1,000 ± 0,447 ^{Aab}
	0,000 ± 0,000 ^A	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,000 ± 0,000 ^A	1,800 ± 0,800 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	1,000 ± 0,447 ^{Aa}	10,600 ± 0,927 ^B	0,400 ± 0,245 ^A	4,400 ± 0,510 ^{Ba}	0,600 ± 0,400 ^{Ab}	4,000 ± 0,707 ^{Bab}	6,000 ± 1,581 ^{Ba}
	0,000 ± 0,000 ^A	1,000 ± 0,548 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,800 ± 0,374 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,800 ± 0,374 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}

Diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem

6.2 ARTIGO 2

Ian Drumond Duarte^a, Edvar Junior Roncetti^a, Livia Dorsh Rocha^a, Mariana Morozesk^a, Marina Marques Bonomo^a, Iara Souza Costa^a, Liliane Baldan Zani^a, Eustaquio Vinicius Ribeiro de Castro^c, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima^c, Silvia Tamie Matsumoto^a.

Respostas citogenéticas e fotossintéticas de plantas após exposição à águas de um ambiente lacustre

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, 29075-910, Vitória, Brasil.

*siltamie@gmail.com

O manuscrito será submetido ao periódico Environmental Monitoring and Assessment ISSN 1573-2959), após tradução para a língua inglesa.

Resumo

As plantas são sensíveis aos poluentes ambientais, sendo ótimos organismos para ensaios genéticos e fisiológicos. Os sistemas testes *Allium cepa* e *Tradescantia pallida*, são utilizados para o estudo da poluição aquática, aérea e terrestre. Dentre os biomarcadores, danos citogenéticos e teores de clorofila são utilizados em estudos de estresse devido às suas respostas a fatores únicos ou combinados. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos avaliar as respostas citogenéticas e fotossintéticas em *T. pallida*, e citogenéticas em *A. cepa* expostas às águas de três estações amostrais da lagoa Juara (Município de Serra/ES), coletadas em duas campanhas amostrais. A partir de amostras de água superficial, foram analisadas as concentrações de metais e realizados os ensaios com os espécimes vegetais. Os potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foram analisados pelo teste do *Allium cepa* e ensaio da mitose em ponta de raiz de *T. pallida*. Enquanto que os teores de pigmentos cloroplastídicos foram dosados em folhas de *T. pallida* após exposição crônica às águas da lagoa. Os ensaios citogenéticos demonstram que duas estações amostrais, em pelo menos uma campanha amostral, apresentaram danos citogenéticos. Isso sugere a presença de potenciais poluentes os quais apresentaram seus efeitos maximizados durante o período de chuva. O estudo do metabolismo fotossintético em *T. pallida*, demonstrou que os teores de pigmentos cloroplastídicos estão relacionados ao elevado aporte de nutrientes presentes nas estações. Sendo o excesso destes, o provável responsável pelo teor inferior pigmentos em uma delas.

Palavras-chaves: *Allium cepa*, *Tradescantia pallida*, citotoxicidade, genotoxicidade, mutaênicidade, pigmentos cloroplastídicos.

Abstract

Plants are sensitive to environmental pollutants, so they are great organisms for genetic and fisiologic testing. The *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* test systems, are used for the study of water, air and land pollution. Among the biomarkers, cytogenetic damage and chlorophyll levels are used in studies of stress due to their responses to single or combined factors. Thus, this study aimed to evaluate the cytogenetic and photosynthetic responses in *T. pallida*, and cytogenetic in *A. cepa* exposed to waters from three sampling stations of Juara pond (Municipality of Serra / ES), collected in two sampling campaigns. From surface water samples were analyzed metal concentrations and tests with plant specimens were performed. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic potentials were analyzed by the *A. cepa* test and mitosis in root tip *T. pallida* test. While the chloroplastidic pigment contents were measured in leaves of *T. pallida* after chronically exposed at the waters of the pond.

The cytogenetic assays show that two sampling stations, in at least one sampling campaign, showed cytogenetic damage. This suggests the presence of potential pollutants which have their effects maximized during period of rain. The study of photosynthetic metabolism in *T. pallida* showed that the chloroplastidic pigment contents are related to the high presence of nutrients stations. Being the excess of these, the probable responsible for the less content of pigments in one station.

Keywords: *Allium cepa*, *Tradescantia pallida*, cytotoxicity, genotoxicity, mutaênicidade, chloroplastidic pigments.

Introdução

A utilização de substâncias químicas com fins sociais e econômicos, aliado à ausência da devida gestão, faz com que dejetos humanos e industriais de complexa mistura sejam lançados nos ambientes aquáticos, comprometendo a qualidade da água. Inúmeras substâncias químicas potencialmente mutagênicas podem ser encontradas em pesticidas e efluentes industriais ou domésticos (Barbério 2013).

A lagoa Juara é um dos corpos hídricos mais importantes da região metropolitana de Vitória e está localizada no município de Serra, Espírito Santo, Brasil. A lagoa apresenta importante função ecológica bem como socioeconômica, sendo utilizada para lazer, recreação, pesca e local para prática de piscicultura intensiva pela Associação de Pescadores da lagoa Juara (Oliveira 2011). Todavia, esse ambiente lacustre tem sido submetido a diversos impactos antrópicos, como assoreamento, degradação de suas margens devido à agricultura e pastagens, bem como o aporte de efluentes domésticos.

As plantas são consideradas ótimos sistemas de ensaios genéticos e são bastante sensíveis aos poluentes ambientais (Kuras 2006; Leme e Marin-Morales 2008). Dentre elas destacam-se as plantas do gênero *Tradescantia* L., família Commelinacea, usualmente utilizadas na avaliação da qualidade do ar, da água e de compostos químicos (Alves et al 2008; De Souza Lima et al. 2009; Elezaj et al. 2011; Merlo et al. 2011; Thewes et al. 2011). De acordo com Carvalho (2005), *Tradescantia sp.* têm sido utilizadas em estudos de toxicologia genética, destacando-se o ensaio da formação de micronúcleos em células mãe de grãos de pólen e o ensaio da mitose em ponta de raiz (Ma 1982). O que permite a investigação da genotoxicidade e mutagenicidade, sendo vantajoso na avaliação da poluição aquática por detectar baixos níveis de toxicidade genética em amostras não concentradas (Rodrigues 2011).

Os espécimes de *Allium cepa* L., família Liliaceae, são utilizados como sistema-teste para a investigação de danos nos cromossomos e no aparato mitótico a partir das células meristemáticas de suas raízes, o que possibilita a determinação de potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (Fernandes et al. 2007; Caritá e Marin-Morales 2008; Roberto 2009; Grippa et al. 2012).

Além dos ensaios em genética toxicológica, as avaliações fisiológicas são de grande importância, e nesse âmbito se destacam os estudos envolvendo os pigmentos fotossintéticos de plantas expostas a poluentes ambientais, sobretudo metais, já que o sistema fotossintético é extremamente sensível aos mesmos (Pongrac et al. 2009). Dos Santos et al. (2011) observaram danos ao sistema fotossintético em espécimes de *Brachiaria decumbens* Stapf após contaminação por Cd e Zn, principalmente pela redução dos níveis de clorofila e β -caroteno. Por outro lado, o excesso de adubação orgânica também pode provocar alterações no sistema fotossintético das plantas. Corrêa et al. (2009).

Devido à importância da lagoa Juara/ES para a comunidade que faz seu uso, é necessário seu monitoramento por testes sensíveis e de respostas rápidas. Diante disso, este trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade da água da lagoa Juara por meio das respostas citogenéticas e fotossintéticas em espécimes de *Tradescantia pallida*, e citogenéticas em espécimes de *Allium cepa* expostos a amostras de água da lagoa Juara coletadas em períodos de chuva e baixa precipitação.

Material e Métodos

Estações amostrais

Foram coletadas amostras de água em três estações amostrais ao longo da lagoa Juara, Município de Serra/ES (Figura 1), onde: J1 - ponto referência da lagoa (S 20 ° 06. 415' / H 40° 15.

041'); J2 – piscicultura (S 20° 06. 381'/ HO 40° 13. 949') e J3 – região da foz do Córrego Laranjeiras (S 20° 07. 660'/ H 40° 12. 748'). As coletas consistiram de amostragem de água subsuperficial, realizadas durante duas campanhas, setembro de 2012 que compreende o período de baixa precipitação e março de 2013, o período de chuva.

Desenho experimental

Para a realização dos ensaios citogenéticos e fisiológicos em *Tradescantia pallida*, inicialmente foi realizado o enraizamento de estacas em solução nutritiva de Hoagland ½ força ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - 4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{KNO}_3 - 4 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{MgCl}_2.6\text{H}_2\text{O} - 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O} - 3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O} - 3 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{CaSO}_4.2\text{H}_2\text{O} - 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{NaNO}_3 - 2 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; $\text{NH}_4\text{NO}_3 - 1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$; Micronutrientes: $\text{H}_3\text{BO}_3 - 61,83 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O} - 1,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O} - 0,3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O} - 1,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O} - 0,6 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; Fe-EDTA: $\text{Na}_2\text{EDTA} - 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, $\text{FeCl}_3.6\text{H}_2\text{O} - 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$).

Para tanto, para cada campanha realizada, 75 estacas apresentando 30 ± 5 cm de comprimento com três a cinco nós foliares e três a cinco nós expostos à solução de Hoagland foram dispostas em tanques de hidroponia de polietileno (10 litros), com aeração constante e pH mantido entre a faixa 6,0-6,5 por meio da adição de NaOH – 0.1N ou HCl – 0.1N. Após 23 dias de enraizamento os comprimentos radiculares apresentavam 2 a 5 cm.

O experimento com as estacas de *T. pallida* foi inteiramente casualizado. Após o enraizamento, 25 estacas divididas em cinco grupos foram aleatoriamente coletadas para o início da exposição aguda de 24 horas (Ma 1982). Essas estacas foram dispostas em novos tanques de hidroponia (7,5 litros) contendo amostras de água correspondentes às estações amostrais enriquecida com os nutrientes da solução de Hoagland ½ força para o início da exposição. Para o

controle negativo (CON) as estacas foram expostas em nova solução nutritiva de Hoagland ½ força e o controle positivo (CON+) em solução nutritiva de Hoagland acrescida do herbicida Trifluralina (0,84 mg/L) (Fernandes et al. 2009).

Com o término da exposição aguda, novamente, 25 estacas foram aleatoriamente coletadas e divididas em cinco grupos para o início da exposição crônica de 40 dias. Tanto a exposição aguda quanto a crônica, a aeração foi mantida constante, o volume de solução foi mantido em 7,5 litros e o ph regulado para a faixa de 6,0 a 6,5.

Com as plantas expostas nos diferentes grupos experimentais (J1, J2, J3, CON e CON+) durante 24 horas, foi realizado o Ensaio em ponta de raiz de *T. pallida* de acordo com Ma (1982), com modificações. Enquanto as plantas expostas durante 40 dias foram utilizadas na investigação de possíveis alterações sobre o metabolismo fotossintético.

Amostras das soluções utilizadas durante o ensaio de 40 dias com *T. pallida* foram coletadas e armazenadas em frascos de polietileno em refrigeração para a realização do Teste do *Allium cepa* para constatar a manutenção das propriedades das amostras de água e os efeitos sobre as plantas ao longo do experimento. As sementes foram germinadas diretamente nas soluções utilizadas durante a exposição de 40 dias em *T. pallida*, correspondentes às estações amostrais J1, J2, J3, ao controle negativo (CON) e ao controle positivo (CON+) com Trifluralina.

Ensaio citogenéticos em *Tradescantia pallida* e *Allium cepa*

O Teste do *A. cepa*, utilizando células meristemáticas de raiz foi realizado de acordo com Grant (1982), com modificações. Sendo, as raízes das sementes submetidas aos tratamentos coletadas após atingirem aproximadamente 2 cm de comprimento. O Ensaio da mitose em ponta de raiz de *T. pallida* foi realizado conforme Ma (1982), com modificações. Sendo utilizadas raízes apresentando de 2 cm a 5 cm de comprimento.

Para a confecção das lâminas, tanto as raízes de *A. cepa* quanto *T. pallida*, foram fixadas em Carnoy 3:1 (três partes de etanol para uma de ácido acético) por 24 horas. Os meristemas foram submetidos à hidrólise ácida em HCl 1N (60°C) por 8 minutos, seguidos por lavagem em água destilada. A coloração foi realizada pelo método tradicional de Feulgen e as lâminas foram confeccionadas pelo método comum de esmagamento suave com uma gota de carmin acético (2%) e recobertas com lamínulas, sendo posteriormente destacadas em nitrogênio líquido e por fim montadas com bálsamo do Canadá para análise.

Foram analisadas cinco lâminas por tratamento (J1, J2, J3, CON+ e CON) em ambos os ensaios citogenéticos, sendo avaliadas aproximadamente 5000 células em cada tratamento em microscópio de luz. As fases celulares, bem como as alterações cromossômicas, foram listadas e as frequências utilizadas para se calcular o índice mitótico (IM), o índice de aberrações cromossômicas (AC) e a frequência de micronúcleos (MN).

Para a análise do índice mitótico (IM), foram consideradas a frequência de células de cada fase da divisão celular, como segue:

$$IM = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Para a avaliação do potencial genotóxico pelo índice de aberrações cromossômicas (AC), foram consideradas as seguintes aberrações cromossômicas: ponte, quebra, c-metáfase, anáfase multipolar, atraso, aderência, perda, núcleo lobulado, núcleo fragmentado, brotamento e célula bi-nucleada. De modo que:

$$AC = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com aberrações cromossômicas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

E para a análise do potencial mutagênico foi considerado a frequência células com micronúcleos (MN), onde:

$$MN = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com micronúcleo}}{\text{n}^\circ \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Pigmentos cloroplastídicos em *T. pallida*

A avaliação do metabolismo fotossintético foi realizada com os espécimes de *T. pallida* expostos durante 40 dias por meio de dosagens dos pigmentos cloroplastídicos em folhas jovens totalmente expandidas segundo protocolo de extração de Hiscox e Israeltam (1979). Foram feitas leituras das absorvâncias nos comprimentos de onda de 470, 645, 663 nm em espectrofotômetro Thermo Scientific GENESYS 10S UV-Vis Spectrophotometer, e calculados as concentrações dos pigmentos segundo Lichtenthaler e Wellburn (1983) pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Chl } a = [(12,7 \cdot A_{663}) - (2,69 \cdot A_{645})] \cdot V / (1000 \cdot MS)$$

$$\text{Chl } b = [(22,9 \cdot A_{645}) - (4,68 \cdot A_{663})] \cdot V / (1000 \cdot MS)$$

$$\text{Chl}_{\text{total}} = [(20,2 \cdot A_{663}) - (2,69 \cdot A_{645})] \cdot V / (1000 \cdot MS)$$

$$\text{Carot} = [(1000 \cdot A_{470}) - (1,82 \cdot \text{Chl } a - 85,02 \cdot \text{Chl } b)] \cdot V / (198 \cdot 1000 \cdot MS)$$

Onde: Chl e Carot significam clorofila e carotenoides, respectivamente. A663, A645 e A470 representam os valores das absorvâncias; V é o volume da amostra (em mL) utilizado e MS é a massa seca dos discos (g). Também foi calculada a razão clorofila a / clorofila b e razão clorofila total / carotenoides.

Análises estatísticas

Foram realizadas a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey ($p < 0.05$), a fim de se comparar as estações amostrais e controles em cada

campanha, e para a comparação das estações entre as campanhas amostrais foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni ($p < 0.05$).

Metais

Para a quantificação dos metais (Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn e Pb), as amostras de água superficial foram coletadas em J1, J2 e J3, durante os períodos de chuva e baixa precipitação em frascos de polietileno e acidificada em Ácido nítrico concentrado (2,5 ml de HNO₃ para 500 ml de amostra) (Rietzler et al. 2001). A quantificação foi baseada no método descrito por U.S. EPA 200.8 a partir de espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) em aparelho Varian - Modelo AA 240 FS.

Resultados e Discussão

Os resultados das análises pelo ensaio em ponta de raiz de *T. pallida* após exposição aguda, às amostras de água na forma de solução nutritiva, revelam que durante a primeira campanha, período de baixa precipitação (Figura 2), a estação amostral J3 apresentou IM inferior ($0,062 \pm 0,004$) em relação ao controle negativo ($0,129 \pm 0,005$) e às outras estações amostrais (Tabela 1), o que caracteriza, conforme Leme e Marin-Morales (2008), o seu potencial de citotoxicidade elevado. Nessa mesma estação amostral, foi observado que AC ($0,016 \pm 0,001$) e MN ($0,005 \pm 0,000$) foram superiores ao controle negativo. As aberrações cromossômicas observadas com maior frequência foram aderência, núcleo lobulado e brotamento (Tabela 2).

Durante o período de chuva (Figura 2), as análises citogenéticas em *T. pallida* demonstraram que o IM de J2 ($0,081 \pm 0,004$) e J3 ($0,093 \pm 0,003$) foram significativamente inferiores ao encontrado no CON. Quanto ao potencial genotóxico, J2 e J3 apresentam índices de AC superiores ao controle negativo, sendo J2 apresentando índice de $0,012 \pm 0,001$ e J3 de $0,020 \pm 0,002$. As análises das aberrações cromossômicas revelaram que os elevados índices de AC

nessas estações amostrais decorreram dos elevados números de c-metáfases, aderência e brotamentos (Tabela 2). Quanto ao índice MN, apesar de J2 ($0,002 \pm 0,001$) não ter diferido do CON, como J3 ($0,004 \pm 0,001$), J2 também não apresentou diferença significativa em relação a J3, o que demonstra tendência a acentuadas frequências de micronúcleo (Tabela 2).

A análise comparativa entre as campanhas revelou que o IM das estações J2 foi significativamente inferior e o de J3, superior durante a segunda campanha (período de chuva) (Tabela 2). Já o índice de aberrações cromossômicas apresentou valor superior em J2 e J3 durante a segunda campanha, enquanto as frequências de micronúcleos não apresentaram diferenças significativas entre as campanhas amostrais (Tabela 2). Assim, foi observado que no período de alta precipitação, a lagoa Juara apresenta os maiores potenciais genotóxicos. Segundo Ergene et al. (2007), a alta concentração dos poluentes nas águas relaciona-se com o fenômeno de concentração ou diluição promovido pela chuva. Christofolletti (2008) e Duarte et al. (2011), relatam a interferência da sazonalidade em ambientes lacustres, com intensificação dos danos no material genético durante o período de chuva

Os resultados das análises pelo teste do *A. cepa* expostos às amostras de água das diferentes estações amostrais na forma de solução nutritiva, após exposição crônica de 40 dias em *T. pallida*, revelaram que na primeira campanha a estação amostral J3, assim como em *T. pallida*, apresentou os índices IM, AC e MN significativamente diferentes dos índices referentes ao CON e às outras estações amostrais (Tabela 3). Sendo AC ($0,037 \pm 0,004$) determinado principalmente pelas aberrações de quebra, c-metáfases, atraso, aderência (Tabela 4). Na segunda campanha, os índices AC e MN, tanto em J2 quanto em J3 apresentaram valores superiores em comparação ao CON de forma que AC de J2 ($0,023 \pm 0,001$) e J3 ($0,019 \pm 0,002$) foi determinado, sobretudo, por quebra, aderência, perda e brotamento. Quanto à frequência de micronúcleos, J2 e J3

apresentaram valores superiores ao CON, com índices $0,009 \pm 0,001$ e $0,015 \pm 0,002$, respectivamente.

As análises de comparação de IM, AC e MN entre as mesmas estações amostrais nas diferentes campanhas revelaram que ao contrário de *T. pallida*, as respostas com relação ao IM no teste do *Allium cepa* mostraram-se inferiores em J3 durante o período de alta precipitação (Tabela 3), indicando maior sensibilidade deste quanto a danos citotóxicos. Com relação a AC, as observações de intensificação de danos com a chuva mantiveram-se para J2 enquanto que para J3 foram inferiores na segunda campanha. E quanto ao MN, J2 e J3 apresentaram expressivo aumento da frequência de micronúcleo durante a segunda campanha, sobretudo J3, sugerindo o grande aumento dos danos não reversíveis (MN).

Apesar de algumas distinções observa-se que as repostas de *A. cepa* e *T. pallida* corresponderam-se, sugerindo similaridades quanto à sensibilidade e a manutenção dos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das amostras de água durante as exposições aguda e crônica em *Tradescantia pallida*. Os estudos citogenéticos relacionam a ocorrência de alterações citogenéticas devido à presença de metais tais como o chumbo (El-Shahaby et al. 2003), arsênio (Yi et al. 2007), cádmio (Seth et al. 2008) e boro (Konuk et al. 2007).

Nas amostras de água da lagoa Juara foram detectados os metais Ca, Fe, Mg e Mn (Tabela 5), onde a concentração de Fe (1,237 a 2,614 $\mu\text{g/mL}$) foi superior ao estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Brasil, em sua resolução nº 357 (0,3 mg/l ou 0,3 $\mu\text{g/mL}$). Apesar da presença desse metal, os elevados níveis de AC e MN em J2 e J3 demonstram não estar relacionados ao mesmo. A partir da análise dos estudos realizados por Silva (2013), desenvolvido com amostras coletadas nas mesmas estações amostrais durante as mesmas campanhas, observa-se que os níveis de Fe nas estações J1, J2 e J3 em ambas as campanhas parece apresentar relação entre a

sua concentração e a composição orgânica das estações. A estação amostral J3, por exemplo, apresentou os menores níveis de ferro e em contrapartida os maiores níveis de nitrogênio amoniacal e fósforo total durante os períodos de baixa precipitação e chuva.

Com relação à fisiologia do metabolismo fotossintético de *T. pallida*, a quantificação dos pigmentos cloroplastídicos demonstrou que a estação amostral J2, durante o período de baixa precipitação, apresentou os e teores ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$, MS = massa seca) de clorofila a ($30,141 \pm 1,601$), clorofila b ($8,290 \pm 0,438$), clorofila total ($49,347 \pm 2,619$) e carotenóides ($30,382 \pm 1,943$) significativamente superiores ao CON. Com relação à Clorofila b, não houve diferença significativa entre J2 e J3, apesar de J3 não ter apresentado valor significativamente superior em comparação ao CON (Tabelas 6a e 6b).

Durante a segunda campanha, J2 novamente apresentou os maiores níveis ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{MS}$) de clorofila a ($44,179 \pm 1,182$), clorofila b ($11,785 \pm 0,350$), clorofila total ($72,304 \pm 1,932$) e carotenóides ($62,487 \pm 1,898$) em relação controle negativo. A razão clorofila a/b não apresentou diferenças entre as estações amostrais e o controle em ambas as campanhas, assim como a razão clorofila total / carotenóides (Tabelas 6a e 6b). Já a comparação das mesmas estações amostrais entre os períodos de baixa precipitação e chuva revelaram que em J2 os níveis de clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides foram significativamente superiores durante a segunda campanha, enquanto a razão clorofila total / carotenoide apresentou-se inferior (Tabelas 6a e 6b).

Estudos relatam a relação entre os metais e a deturpação do metabolismo fotossintético (Oncel et al. 2000; Mobin e Khan 2007), destacando-se metais como Cu (Pilon et al. 2006; Burkhead et al 2009), Al (Peixoto et al. 2002) e Cd (Mobin e Khan 2007). Todavia, assim como observado nas análises citogenéticas, os resultados da avaliação fotossintética não demonstram apresentar influência da presença dos metais Fe, Ca, Mn e Mg quantificados nas águas da lagoa

Juara. Por outro lado, Silva (2013) relata que as concentrações de nitrogênio amoniacal e fósforo total durante o período de chuva foram elevados nas estações amostrais J2 e J3 em ambas as campanhas, sendo os níveis em J3 mais acentuados. Nesse panorama, os estudos de Backes et al. (2008) com bulbos de alho demonstraram que a aplicação de doses crescentes de nitrogênio elevou os níveis de clorofila e conseqüentemente o desenvolvimento das plantas. Ferreira et al. (2006) com estudos em tomateiros e Kitajima e Hogan (2003) em espécies da família Bignoniacea, também observaram aumento da concentração de clorofila com a adubação nitrogenada.

Estudos realizados por Silva (2013) em estações correspondentes a J1, J2 e J3 da lagoa Juara, revelaram que a estação correspondente a J2, piscicultura, e J3 apresentaram as maiores concentrações de nutrientes, sendo esta última apresentando os maiores valores. Com relação J3, as concentrações dos pigmentos cloroplastídicos em *T. pallida* não apresentaram níveis significantes tal como observado em J2, o que diverge com a relação de que maiores níveis de pigmentos refletem a maior concentração de nutrientes no meio.

Corrêa et al. (2009), ao submeter espécimes de *Oruganum vulgare L.* a diferentes níveis de adubação orgânica, observaram que as maiores concentrações de clorofila foram obtidos com doses crescentes de adubo orgânico até o ponto máximo da curva. A partir deste, os maiores níveis de adubação resultaram em decréscimo da concentração de clorofila, sendo tal efeito atribuído ao excesso de nutrientes.

Logo os teores de nutrientes presentes na estação amostral J3, em ambos os períodos avaliados pode ter influenciado nos níveis de pigmentos cloroplastídicos apresentados por *T. pallida* expostos às águas desta estação. Além disso, possivelmente há relação com a presença de potenciais poluentes tendo em vista o lançamento de efluentes pelo córrego Laranjeiras na

estação amostral J3, o que refletiu nos elevados índices de danos no DNA observados tanto nos ensaios com *T. pallida* após exposição aguda, quanto em *A. cepa* exposto às amostras da exposição crônica.

Conclusão

Os ensaios citogenéticos em *T. pallida* e *A. cepa* apontam potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico nas estações amostrais J2 e J3 em pelo menos uma capmnh amostral, sugerindo a presença de poluentes cujos efeitos são maximizados no período de chuva. Quanto aos potenciais citotóxicos, genotóxicos e mutagênico, foram observadas similaridades entre as respostas de *A. cepa* e *T. pallida*.

A investigação fotossintética em *T. pallida*, por meio dos teores de pigmentos cloroplastídicos, demonstra relação ao elevado aporte de nutrientes presentes nas estações J2 e J3, sendo nesta última, o excesso de nutrientes, o provável responsável pelo valor inferior do teor mensurado. A presença de Fe e Mn não parece relacionar-se às respostas observadas citogenéticas e fisiológicas observadas. O excesso de nutrientes parece ter toxicidade sobre o metabolismo fotossintético, enquanto que os danos citogenéticos podem ter sido provocados por outros poluentes tais como herbicidas.

Referências

Alves, E. S., de Souza, S. R., Pedroso, A. N. V. & Domingos, M. (2008). Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'Purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 717–721.

Backes, C. B., Lima, C. P., Godoy, L. J. G., Villas Bôas, R. L. & Imaizumi, I. (2008) Coloração verde nas folhas da cultura do alho vernalizado em resposta à adubação nitrogenada. *Bragantia*, 67(2), 23-29.

Barbério, A. (2013) Bioassays with Plants in the Monitoring of Water Quality, *Water Treatment*, Dr. Walid Elshorbagy (Ed.). <http://www.intechopen.com/books/water-treatment/bioassays-with-plants-in-the-monitoring-of-water-quality> Acessado em 20 Novembro 2013.

Burkhead, J. L., Reynolds, K. A., Abdel-Ghany, S. E, Cohu, C.M & Pilon, M. (2009) Copper homeostasis. *New Phytologist*. 182(4), 799–816.

Caritá, R. & Marin-Morales, M.A. (2008) Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere*, 72(5), 722-725.

Carvalho, A.C. (2005) A *Tradescantia* como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. *Radiologia Brasileira*, 38(6), 459-462.

Christofoletti, C.A.(2008) Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus*. 129 f. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências - Rio Claro, São Paulo. 2008.

Corrêa, R.M., Pinto, J.E.B., Reis, E.S., Oliveira, C., Evaristo, M.C. & Brant, R.S. (2009) Características anatômicas foliares de orégano (*Origanum vulgare* L.) submetidas a diferentes fontes e níveis de adubação orgânica. *Maringá*, 31(3), 439-444.

De Souza Lima, E., de Souza, S. R. & Domingos, M. (2009) Sensitivity of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. 'Purpurea' Boom to genotoxicity induced by ozone. *Mutation Research*, 675, 41–45.

Dos Santos, F.S., Sobrinho, N.M.B.A, Mazur, N., Garbisu, C., Barrutia, O. & Becerril, J.M. 2011. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição De Pigmentos Fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Química Nova*, 34(1),16-20.

Duarte, I.D., Dias, M.C., David, J.A.O. & Matsumoto, S.T. (2012) 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*,10(2), 211-219.

Elezaj, I.R., Millaku, L.B., Imeri-Millaku, R.H., Selimi, Q.I. & Letaj, K. R. (2011) Acute Genotoxic Effects of Effluent Water of Thermo-Power Plant “Kosova” In *Tradescantia pallida*. *Journal of Chemical Health Risks*, 1(1), 23-28.

El-Shahaby, O.A., Abdel-Migid, H.M., Soliman, M.I. & Mashaly, I.A. (2003). Genotoxicity screening of industrial wastewater using the *Allium cepa* chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6,23-28.

Ergene, S., Çavas, T., Çelik, A., Koleli, N., Kaya, F. & Karahan, A. (2007) Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16, 385-391.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C. & Marin-Morales, M.A. (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3), 252-259.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C & Marin-Morales, M.A. (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent —Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1680–1686.

Ferreira, M. M. M., Ferreira, G. B., Fontes, P. C. R. & Dantas, J. P. (2006) Índice SPAD e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo. *Ceres*, 53(305), 83-92.

Grant, W.F. (1982) Chromosome aberration assays in *Allium cepa* . *Mutation Research*, 99, 273–291.

Grippa, G.A., Nati, N. & Matsumoto, S.T. (2012) Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. *Cytologia*, 71(1), 1-7.

Hiscox, J. D. & Israeltam, G. F. (1979) A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Canadian Journal of Botany*, 57, 1332-1334.

Kitajima, K. & Hogan, K. P. (2003) Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. *Plant, Cell and Environment*, 26, 857-865.

Konuk, M., Liman, R. & Cigerci, I.H. (2007) Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells, *Pakistan Journal of Botany*, 39, 73–79.

Kuras, M., Nowakowska, J. & Sliwinska, E. (2006) Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium Test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 211–221.

Leme, D.M. & Marin-Morales, M.A. (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water- A case study. *Mutation Research*, 650, 80-86.

Lichtenthaler, H.K. & Welburn, A. R. (1983) Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592.

Ma, T. H. (1982) *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother – cell meiosis). *Mutation Research*, 99, 293-302.

Merlo, C., Abril, A., Amé, M. V., Argüello, G. A., Carreras, H. A., Chiappero, M. S., Hued, A. C., Wannaz, E., Galanti, L. N., Monferrán, M. V., González, C. M. & Solís, V.M. (2011) Integral assessment of pollution in the Suquía River (Córdoba, Argentina) as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Science of the Total Environment*, 409, 23, 5034-5045.

Mobin, M. & Khan, N.A. 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassicajuncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 164, 601 - 610.

Oliveira, L. B. (2011) Variação espaço-temporal das respostas ecofisiológicas da comunidade fitoplanctônica em uma lagoa costeira tropical com múltiplos usos: lagoa Juara Serra, ES). *Dissertação de Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo.*

Oncel, I., Keles, Y. & Ustun, A. S. (2000) Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environmental Pollution*, 107(3), 315–320.

Peixoto, P. H .P., Da Matta, F .M. & Cambraia, J. (2002) Responses of the photosynthetic apparatus to aluminum stress in two sorghum cultivars. *Journal of Plant Nutrition*, 25(4), 821-832.

Pilon, M, Abdel-Ghany, S. E., Cohu, C. M., Gogolin, K. A. & Ye,H. (2006) Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology.*, 9, (3), 256– 263.

Pongrac, P., Zhao, F.J., Razinger, J., Zrimec, A. & Regvar, M. (2009) Physiological responses to Cd and Zn in two Cd/Zn hyperaccumulating *Thlaspi* species. *Environmental and Experimental Botany*. 66(3), 479–486.

Rietzler, A. C., Fonseca, A. L. & Lopes, G. P. (2001). Heavy Metals in Tributaries of Pampulha Reservoir, Minas Gerais. *Brasilian Journal Biology*, 61(3), 363-370.

Roberto, M.M. (2009) Avaliação do potencial antimutagênico de extrato etanólico de própolis verde e de *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), por meio de sistema-teste de *Allium cepa* e células de mamíferos (HTC). 129p. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2009.

Rodrigues, G.S. (2011) Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia*. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EMBRAPA, <http://apostilas.cena.usp.br/Regina/Outras/Plantas%20Bioindicadoras/Mutagenicidad%20com%20plantas%20Geraldo%20S.%20Rodrigues.pdf> . Acessado em: Outubro de 2011.

Seth C.S., Misra V., Chauhan L.K.S. & Singh, R.R. (2008) Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 71, 711-716.

Silva, N.H.V.F. (2013) Comunidade Fitoplanctônica em uma Lagoa Costeira: Lagoa Juara/Serra. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. Vitória, ES.

Thewes, M. R., Delio, E. J. & Droste, A. (2011) Genotoxicity biomonitoring of sewage in two municipal wastewater treatment plants using the *Tradescantia pallida* var. *purpurea* bioassay. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4), 689-693, 2011.

Yi, H., Wu, L. & Jiang, L. (2007) Genotoxicity of arsenic evaluated by *Allium* -root micro-nucleus assay, *Science of the Total Environment*, 308(1-3), 232–236.

Figuras

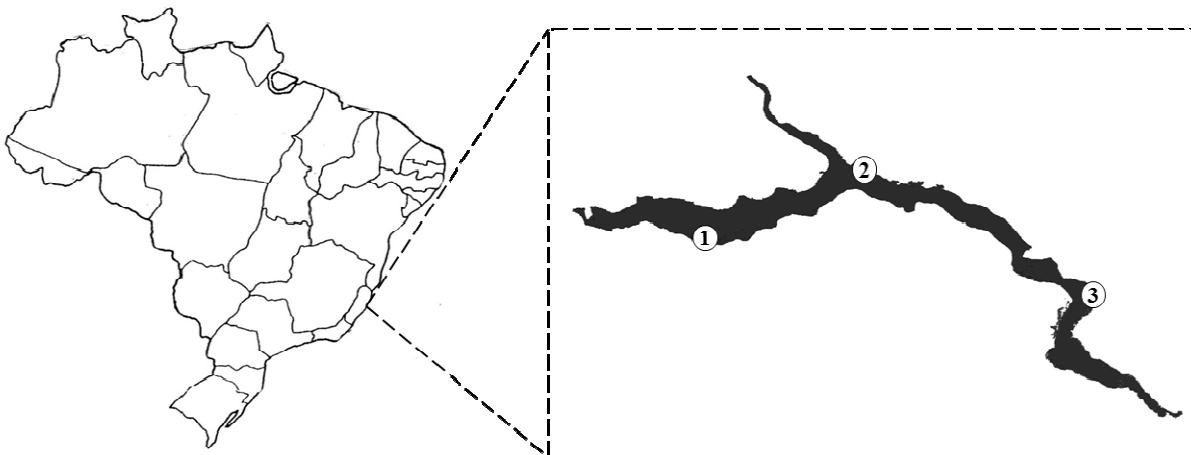


Figura 1. Estações amostrais na lagoa Juara, sendo 1: J1 (referência); 2: J2 (piscicultura) e 3: J3 (próximo a foz do Córrego Laranjeiras).

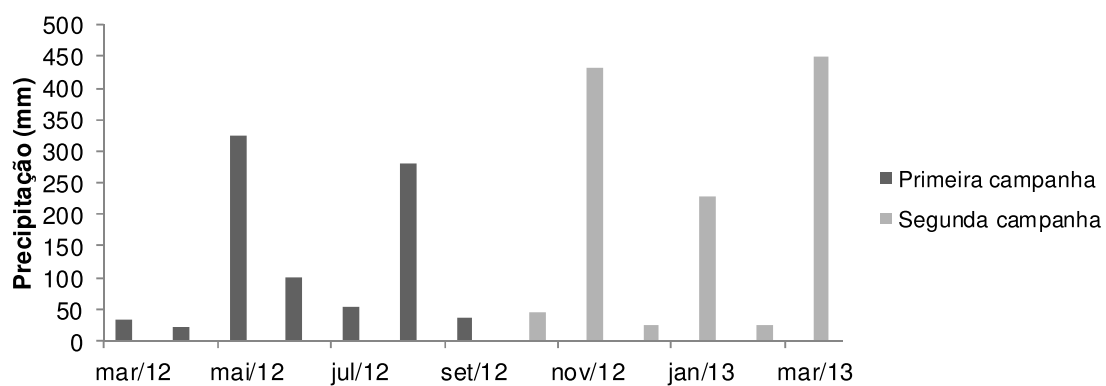


Figura 2. Precipitação durante março de 2012 (mar/12) a março de 2013 (mar/13) - Estação meteorológica localizada no município de Vitória-ES, Coordenadas: S 20,300° / W 40,317°, 36 m.

Tabelas

Tabela 1: Resultados de IM, AC e MN no ensaio *Tradescantia pallida* após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3.

Índices	Campanha	Controles/Estações	Média±EPM	Diferença entre as campanhas
IM	1ª Campanha	CON	0,129 ± 0,005 ^A	nc
		CON+	0,029 ± 0,002 ^B	nc
		J1	0,124 ± 0,004 ^{Aa}	-
		J2	0,129 ± 0,003 ^{Aa}	***
		J3	0,062 ± 0,004 ^B	***
	2ª Campanha	CON	0,121 ± 0,001 ^A	nc
		CON+	0,015 ± 0,002 ^B	nc
		J1	0,113 ± 0,003 ^A	-
		J2	0,081 ± 0,004 ^B	***
		J3	0,093 ± 0,003 ^B	***
AC	1ª Campanha	CON	0,006 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,026 ± 0,002 ^B	nc
		J1	0,002 ± 0,001 ^{Aa}	-
		J2	0,003 ± 0,001 ^{Aa}	***
		J3	0,016 ± 0,001 ^B	*
	2ª Campanha	CON	0,002 ± 0,001 ^A	nc
		CONT	0,016 ± 0,002 ^{Bab}	nc
		J1	0,003 ± 0,001 ^A	-
		J2	0,012 ± 0,001 ^{Ba}	***
		J3	0,020 ± 0,002 ^{Bb}	*
MN	1ª Campanha	CON	0,001 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,006 ± 0,001 ^{Ba}	nc
		J1	0,001 ± 0,000 ^{Ab}	-
		J2	0,002 ± 0,000 ^{Ab}	-
		J3	0,005 ± 0,000 ^{Ba}	-
	2ª Campanha	CON	0,001 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,005 ± 0,001 ^{Ba}	nc
		J1	0,001 ± 0,000 ^{Ab}	-
		J2	0,002 ± 0,001 ^{Aab}	-
		J3	0,004 ± 0,001 ^{Ba}	-

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * Diferença significante entre estações amostrais nas diferentes campanhas ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni's. nc: Não comparado. EPM: Erro padrão da média.

Tabela 2: Resultados das aberrações cromossômicas do ensaio da *Tradescantia pallida* após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

Aberrações cromossômicas	1ª Campanha					2ª Campanha				
	CON	CON+	J1	J2	J3	CON	CON+	J1	J2	J3
Ponte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Quebra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C-Metáfase	0,400 ± 0,245 ^A	13,800 ± 1,068 ^B	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^A	7,600 ± 1,077 ^B	0,400 ± 0,245 ^A	3,000 ± 0,548 ^{Ba}	4,000 ± 0,316 ^{Ba}
Anáfase multipolar	0,000 ± 0,000 ^A	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	-	-	-	-	-
Atraso	-	-	-	-	-	0,000 ± 0,000 ^A	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}
Aderência	5,000 ± 0,316 ^A	11,000 ± 0,707 ^B	2,000 ± 0,316 ^{Ba}	2,400 ± 0,510 ^{Ba}	8,200 ± 0,860 ^B	1,000 ± 0,316 ^A	4,200 ± 0,860 ^{Ba}	1,400 ± 0,245 ^A	6,000 ± 0,316 ^{Ba}	10,600 ± 0,510 ^B
Perda	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	-	-	-	-	-
Núcleo lobulado	0,000 ± 0,000 ^A	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	2,200 ± 0,374 ^B	0,000 ± 0,000 ^A	2,600 ± 0,510 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	1,000 ± 0,548 ^{Aa}
Núcleo fragmentado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	0,400 ± 0,245 ^A	0,600 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	4,800 ± 0,663 ^B	0,400 ± 0,245 ^A	1,200 ± 0,490 ^{Aab}	0,600 ± 0,245 ^{Aa}	3,000 ± 0,548 ^{Bbc}	4,200 ± 0,860 ^{Bc}
Célula bi-nucleada	0,000 ± 0,000 ^A	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^A	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Médias ± Erro padrão da média.

Tabela 3: Resultados de IM, AC e MN no ensaio *Allium cepa* após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

Índices	Campanha	Controles/Estações	Média±EPM	Diferença entre as campanhas
IM	1ª Campanha	CON	0,100 ± 0,002 ^A	nc
		CON+	0,080 ± 0,003 ^{Ba}	nc
		J1	0,095 ± 0,003 ^{Ab}	-
		J2	0,102 ± 0,003 ^{Ab}	-
		J3	0,081 ± 0,004 ^{Ba}	**
	2ª Campanha	CON	0,097 ± 0,004 ^A	nc
		CON+	0,059 ± 0,002 ^{Ba}	nc
		J1	0,099 ± 0,006 ^{Ab}	-
		J2	0,103 ± 0,003 ^{Ab}	-
		J3	0,060 ± 0,001 ^{Ba}	**
AC	1ª Campanha	CON	0,005 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,051 ± 0,004 ^B	nc
		J1	0,006 ± 0,000 ^{Aa}	-
		J2	0,005 ± 0,001 ^{Aa}	***
		J3	0,037 ± 0,004 ^B	***
	2ª Campanha	CON	0,005 ± 0,000 ^A	nc
		CONT	0,055 ± 0,004 ^B	nc
		J1	0,006 ± 0,001 ^A	-
		J2	0,023 ± 0,001 ^{Ba}	***
		J3	0,019 ± 0,002 ^{Ba}	***
MN	1ª Campanha	CON	0,001 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,009 ± 0,001 ^B	nc
		J1	0,001 ± 0,000 ^{Aa}	-
		J2	0,001 ± 0,000 ^{Aa}	***
		J3	0,003 ± 0,000 ^B	***
	2ª Campanha	CON	0,001 ± 0,000 ^A	nc
		CON+	0,015 ± 0,002 ^{Ba}	nc
		J1	0,002 ± 0,000 ^A	-
		J2	0,009 ± 0,001 ^B	***
		J3	0,015 ± 0,002 ^{Ba}	***

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * Diferença significante entre estações amostrais nas diferentes campanhas ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni's. nc: Não comparado. EPM: Erro padrão da média.

Tabela 4: Resultados de IM, AC e MN no ensaio *Allium cepa* após exposição em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referentes às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

Aberrações cromossômicas	1ª Campanha					2ª Campanha				
	CON	CON+	J1	J2	J3	CON	CON+	J1	J2	J3
Ponte	0,000 ± 0,000 ^A	1,400 ± 0,510 ^B	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,600 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	0,510 ^B	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,600 ± 0,400 ^{Aa}	1,200 ± 0,374 ^{Aa}
Quebra	0,000 ± 0,000 ^A	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,600 ± 0,245 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	1,000 ± 0,000 ^{Bb}	0,800 ± 0,374 ^{Bb}
C-Metáfase	0,800 ± 0,200 ^A	12,400 ± 1,208 ^B	1,000 ± 0,316 ^{Aa}	1,200 ± 0,374 ^{Aa}	7,600 ± 0,927 ^B	1,400 ± 0,245 ^A	1,000 ^B	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,600 ± 0,400 ^{Aa}	0,800 ± 0,374 ^{Aa}
Anáfase multipolar	0,400 ± 0,245 ^A	2,200 ± 0,583 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,200 ± 0,200 ^A	1,000 ± 0,316 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,000 ± 0,000 ^{Ab}	0,200 ± 0,200 ^{Ab}
Atraso	0,000 ± 0,000 ^A	3,000 ± 0,447 ^{Ba}	0,600 ± 0,245 ^{Ab}	0,400 ± 0,245 ^{Ab}	3,000 ± 0,548 ^{Ba}	0,000 ± 0,000 ^A	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	2,000 ± 0,316 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}
Aderência	2,000 ± 0,316 ^A	9,800 ± 0,583 ^{Ba}	3,400 ± 0,245 ^{Ab}	2,000 ± 0,584 ^{Ab}	21,800 ± 2,634 ^{Ba}	2,600 ± 0,245 ^A	9,400 ± 0,510 ^{Bab}	4,000 ± 0,707 ^A	11,600 ± 0,748 ^{Ba}	8,800 ± 0,860 ^{Bb}
Perda	0,400 ± 0,245 ^A	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	1,000 ± 0,316 ^{Ac}	0,200 ± 0,200 ^{Aa}	1,400 ± 0,245 ^{Bbc}	1,800 ± 0,374 ^{Bbc}
Núcleo lobulado	0,000 ± 0,000 ^A	7,400 ± 0,927 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	11,200 ± 1,393 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}
Núcleo fragmentado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brotamento	1,200 ± 0,200 ^A	13,600 ± 1,720 ^B	1,000 ± 0,447 ^{Aa}	1,400 ± 0,510 ^{Aa}	3,000 ± 0,837 ^{Aa}	0,600 ± 0,245 ^A	13,000 ± 1,225 ^B	0,600 ± 0,245 ^A	5,400 ± 0,245 ^{Ba}	5,200 ± 1,530 ^{Ba}
Célula bi-nucleada	0,000 ± 0,000 ^A	1,400 ± 0,510 ^B	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^{Aa}	0,000 ± 0,000 ^A	4,800 ± 0,583 ^B	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,400 ± 0,245 ^{Aa}	0,600 ± 0,245 ^{Aa}

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Médias ± Erro padrão da média.

Tabela 5: Quantificação de metais ($\mu\text{g/mL}$) das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013. 1ª Campanha: período de baixa precipitação, 2ª Campanha: período de alta precipitação.

Metais $\mu\text{g/mL}$	1ª Campanha			2ª Campanha		
	J1	J2	J3	J1	J2	J3
Al	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ca	4,183	3,941	5,684	4,665	4,781	6,151
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Co	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cu	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fe	2,614	2,042	1,515	2,177	2,116	1,237
Li	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mg	2,022	2,127	2,836	2,600	2,707	3,174
Mn	0,052	0,040	0,042	ND	0,040	0,056
Ni	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Limites de detecção: 0,04 $\mu\text{g/mL}$ para Li, Co, Cu, Ni, Cr, Ca e Mn; 0,08 $\mu\text{g/mL}$ para Pb e Fe; 0,80 $\mu\text{g/mL}$ para Al; 0,01 $\mu\text{g/mL}$ para Zn; 0,02 $\mu\text{g/mL}$ para Cd e Mg. ND= não detectado pelo método.

Tabela 6a: Resultados de Chl *a*, Chl *b*, Chl_{total} (mg.g⁻¹MS) em *Tradescantia pallida* após exposição crônica em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referente às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

	Campanha	Controles/Estações	Média±EPM	Diferença entre as campanhas
Chl <i>a</i>	1ª Campanha	CON	22,381 ± 1,132 ^A	nc
		J1	21,722 ± 1,136 ^{Aa}	-
		J2	30,141 ± 1,601 ^B	***
	2ª Campanha	J3	25,016 ± 0,934 ^A	-
		CON	22,087 ± 2,739 ^A	nc
		J1	22,748 ± 3,126 ^{Aa}	-
	2ª Campanha	J2	44,179 ± 1,182 ^B	***
		J3	26,512 ± 3,918 ^{Aa}	-
		CON	6,610 ± 0,391 ^A	nc
Chl <i>b</i>	1ª Campanha	J1	6,015 ± 0,313 ^{Aa}	-
		J2	8,290 ± 0,438 ^{Bb}	***
		J3	7,178 ± 0,188 ^{Aab}	-
	2ª Campanha	CON	5,861 ± 0,823 ^A	nc
		J1	6,187 ± 0,868 ^{Aa}	-
		J2	11,785 ± 0,350 ^B	***
	2ª Campanha	J3	7,341 ± 1,236 ^{Aa}	-
		CON	36,675 ± 1,854 ^A	nc
		1ª Campanha	J1	35,566 ± 1,859 ^{Aa}
J2	49,347 ± 2,619 ^B		***	
J3	40,979 ± 1,524 ^{Aa}		-	
Chl _{total}	2ª Campanha	CON	36,146 ± 4,489 ^A	nc
		J1	37,237 ± 5,118 ^{Aa}	-
		J2	72,304 ± 1,932 ^B	***
	2ª Campanha	J3	43,410 ± 6,426 ^{Aa}	-

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * Diferença significativa entre estações amostrais nas diferentes campanhas ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni's. nc: Não comparado. EPM: Erro padrão da média.

Tabela 6b: Resultados de Razão Chl *a/b*, Carotenóides (mg.g⁻¹MS) e Razão Chl/Carot em *Tradescantia pallida* após exposição crônica em Solução de Hoagland derivadas das amostras de água coletadas da Lagoa Juara no ano de 2012 e 2013 referente às 1ª Campanha (período de baixa precipitação) e 2ª Campanha (período de alta precipitação) nas estações amostrais J1, J2 e J3, e controles negativo (CON) e positivo (CON+).

	Campanha	Controles/Estações	Média±EPM	Diferença entre as campanhas
Razão Chl <i>a/b</i>	1ª Campanha	CON	3,402 ± 0,125 ^A	nc
		J1	3,612 ± 0,041 ^{Aa}	-
		J2	3,639 ± 0,068 ^{Aa}	-
		J3	3,481 ± 0,042 ^{Aa}	-
	2ª Campanha	CON	3,803 ± 0,094 ^A	nc
		J1	3,686 ± 0,066 ^{Aa}	-
		J2	3,752 ± 0,068 ^{Aa}	-
		J3	3,657 ± 0,094 ^{Aa}	-
Carot	1ª Campanha	CON	20,571± 1,566 ^A	nc
		J1	20,326 ± 2,058 ^{Aa}	-
		J2	30,382 ± 1,943 ^B	***
		J3	22,796 ± 1,419 ^{Aa}	-
	2ª Campanha	CON	23,019± 6,061 ^A	nc
		J1	26,797 ± 6,685 ^{Aa}	-
		J2	62,487 ± 1,898 ^B	***
		J3	32,179 ± 8,790 ^{Aa}	-
Razão Chl / Carot	1ª Campanha	CON	1,806 ± 0,108 ^A	nc
		J1	1,784 ± 0,089 ^{Aa}	-
		J2	1,636 ± 0,077 ^{Aa}	*
		J3	1,818 ± 0,102 ^{Aa}	-
	2ª Campanha	CON	1,728 ± 0,150 ^A	nc
		J1	1,559 ± 0,173 ^{Aa}	-
		J2	1,158 ± 0,019 ^{Aa}	*
		J3	1,542 ± 0,178 ^{Aa}	-

Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem significativamente de CON, enquanto médias seguidas pela mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * Diferença significante entre estações amostrais nas diferentes campanhas ($p < 0.05$), de acordo com ANOVA seguido pelo Teste de Bonferroni's. nc: Não comparado. EPM: Erro padrão da média.

7 CONCLUSÕES GERAIS

As análises dos parâmetros físicos e químicos apontam para sinais de eutroficação artificial na lagoa Juara, sobretudo na estação amostral J3;

Apesar da presença de metais, tais como Fe e Mn, estes não parecem resultarem em danos citogenéticos ou fotossintéticos. Sugere-se a presença de outros potenciais poluentes tais como herbicidas e compostos orgânicos como fatores promotores dos danos citogenéticos.

A partir dos ensaios citogenéticos realizados em *Allium cepa* e *Tradecantia pallida*, foi possível observar que a estação amostral J3 apresentou os maiores níveis de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

Foi observada a maximização dos danos citogenéticos durante o período de chuva.

Foi constatado que as respostas citogenéticas em *A. cepa* e *T. pallida* corresponderam-se, sugerindo similaridades quanto à sensibilidade após exposição às águas da lagoa Juara.

A avaliação do metabolismo fotossintético em *T. pallida*, demonstra que os teores de pigmentos cloroplastídicos estão relacionados ao elevado aporte de nutrientes.

A relação entre os danos citogenéticos e os teores pigmentos cloroplastídicos mostrou-se próxima em J3, apesar dos distintos potenciais estressores e respostas dos biomarcadores.