



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento



IASMINI NICOLI GALTER

**Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos**

**ALEGRE - ES  
2016**

IASMINI NICOLI GALTER

**Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, linha de pesquisa Biologia evolutiva e citogenética e área de concentração Mutagênese.

Orientadora: Silvia Tamie Matsumoto  
Coorientador: José Augusto de Oliveira David

**ALEGRE - ES  
2016**

**IASMINI NICOLI GALTER**

**Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogénicos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento, linha de pesquisa Biologia evolutiva e citogenética e área de concentração Mutagênese.

Aprovada em        de        de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Silvia Tamie Matsumoto  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Orientadora

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Tatiana da Silva Sousa  
Universidade Federal do Espírito Santo  
Examinador Interno

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Marcela Ferreira Paes  
Instituto Federal do Espírito Santo  
Examinador Externo

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Galter, Iasmini Nicoli, 1991-

G179a Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos / Iasmini Nicoli Galter. – 2016.

93 f. : il.

Orientadora: Silvia Tamie Matsumoto.

Coorientador: José Augusto de Oliveira David.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Cromossomos – Aberrações. 2. Ensaio Cometa. 3. Cultura de células.  
4. Água – Análise. I. Matsumoto, Silvia Tamie. II. David, José Augusto de Oliveira. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 575:631

---

Em especial,  
a minha mãe Iana Maria Nicoli Galter  
meu pai Aldecir Boneres Galter  
minha irmã Isadora Nicoli Galter  
e aos meus avós Darci, Maria, Benilda e Attila (*in  
memória*),  
pelo amor, dedicação, apoio e confiança.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Espírito Santo e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pela oportunidade de realizar minha pesquisa e adquirir tantos conhecimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, Iana Maria Nicoli e Aldecir Galter, por me apoiarem em todos os momentos, por me incentivarem a seguir em frente, por colocar o meu sonho em primeiro lugar e principalmente pelo amor. Vocês são meus exemplos!

A minha irmã Isadora Galter, pelo companheirismo, amizade, confiança e gargalhadas. Tenho muito orgulho da nossa relação.

A todos os meus familiares (Nicoli e Galter) por terem me proporcionado ótimos momentos de descontração, por me apoiarem durante esses anos de estudos e sempre que possível contribuírem com algum suporte. Estar com vocês é renovador.

A Sílvia Tamie Matsumoto, por confiar no meu trabalho, pelos conhecimentos transmitido, pelos conselhos, pelas oportunidades e mesmo as críticas que me ajudaram a crescer profissionalmente. Meu obrigado, também, a sua amizade e por durante esses anos ter se tornado uma verdadeira mãe-científica, sempre preocupada, disposta a ajudar e cuidando da gente.

Ao professor José Augusto de Oliveira David, pelos conselhos, ensinamentos, trocas de ideias, ajuda nas coletas e pelas risadas.

As professoras Tatiana Souza e Marcela Paes por aceitarem serem membros da banca examinadora e, assim, contribuírem no meu processo formativo.

Ao GEMUT (Grupo de Pesquisa em Mutagênese e Toxicologia), por me acolherem, pelos momentos de descontração nos dias cansativos, pela amizade, carinho e ajuda nos experimentos. Vocês fizeram meus dias mais felizes! Ian Duarte, Francielen Aragão, Maressa Malini, Ian Martins, Edvar Roncetti, Lívia Dorsch, Stefanie Lievore, Marina Braga, Lucas Vescovi, Michell Pedruzzi e Enzo Zini. E a nossa membro mirim Tamise.

Não posso deixar de agradecer em especial ao Ian Duarte, por todo ensinamento, paciência, caronas, ajuda e principalmente amizade. Obrigada por tudo!

Aos agregados do GEMUT, Dayana, Vinicius e Leonardo, por tornar as horas do café da tarde uma verdadeira festa e a Bete por contagiar a todos com a sua felicidade.

Aos colegas do Laboratório de Anatomia e Histologia Animal que me ajudaram sem medir esforços nos experimentos com peixe. Meu muito obrigada Luara Louzada, Diego Lacerda e Vivian Mainardi.

A Sabrina Furtado, secretária do Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento, pelas informações, disponibilidade e atenção.

As minhas amigas-irmãs Renata Carvalho e Jaqueline Pêgo, por me apoiarem, por tentarem amenizar minha ansiedade e por estarem sempre ao meu lado. A verdadeira amizade não é ser inseparáveis, mas sim estar separados sem que nada mude!

As minhas eternas amigas Luara Louzada, Márcia Paulúcio, Mayla Gava, Lorena Brunoro, Márcia Fadini, Liliana Ribeiro e Mila Marques pelos momentos de descontração, torcida e amizade.

A Aline de Menezes e Rodrigo Zocoloto, meus pais do Alegre, pela torcida, conselhos e contribuição com a minha pesquisa.

Aos Amigos de Vix, João Antônio, Gabriela Miglio e Raysa Nascimento, não sei traduzir em palavras o quanto vocês foram importantes para a minha “adaptação” aqui em Vitória, tenham a certeza que vocês fizeram toda a diferença nesse percurso.

A Ândrea Plothegeer, por ter me acolhido, pela amizade, por aturar a minha ansiedade, pelas ajudas e por fazer todos os dias serem diferenciados. Você foi um presente que Deus recolocou na minha vida para mostrar que existem amizades que podem ficar anos sem contatos, mas que quando se encontra ela ainda está lá.

Por fim e, sobretudo, a Deus por iluminar o meu caminho e permitir que alcançasse mais um sonho.

## RESUMO

O rio Itapemirim é considerado um dos mais importantes recursos hídricos do Espírito Santo. Tendo em vista a importância ecológica e socioeconômica deste recurso hídrico a preocupação com a qualidade da água é crucial, fazendo-se necessário a avaliação da água por abordagens que integrem os aspectos abióticos aos ensaios toxicogenéticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade da água do rio Itapemirim/ES, por meio de análise dos aspectos abióticos e toxicogenéticos, utilizando como organismo teste *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de célula de mamífero. Para tal, foram definidas 4 estações amostrais ao longo do percurso do rio Itapemirim/ES, nas quais foram realizadas amostragens de água em períodos de alta precipitação e estiagem. A partir das amostras foram avaliados a condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ), temperatura da água ( $^{\circ}\text{C}$ ), oxigênio dissolvido ( $\text{mg/L}$ ) e pH, bem como quantificado a concentração de metais. Para o teste do *A. cepa* foram realizados o teste de crescimento radicular e análise citogenética. O ensaio com espécimes de *O. niloticus* envolveram teste do micronúcleo e ensaio do cometa. Já os bioensaios com células CHO-K1 foram os testes do MTT e ensaio do cometa. A maioria das variáveis abióticas avaliadas demonstraram que as águas das duas campanhas, estão de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, assim como a maioria dos metais. Todavia, os índices de Al e Cu na água estavam acima do permitido pela legislação. Pelos resultados obtidos, pode-se observar que os compostos presentes nas águas destes rios apresentam potencial fitotóxico, genotóxico e mutagênico para os dois organismos-teste *in vivo* e para o teste *in vitro*. Os resultados mais expressivos foram os obtidos da estação RI 03, provavelmente isto está relacionado ao fato dessa estação estar nas proximidades da região urbana do município de Cachoeiro de Itapemirim/ES. Notou-se também, que as duas campanhas realizadas apresentaram efeito negativo sobre os bioensaios realizados. Os dados encontrados neste estudo indicam que a qualidade da água do rio Itapemirim/ES encontra-se comprometida e alertam para os riscos que os despejos de efluentes domésticos e industriais apresentam sobre os corpos hídricos, principalmente pela complexa constituição química que apresentaram.

Palavras – chaves: Metais. Aberrações cromossômicas. Micronúcleo. Ensaio do cometa. MTT. *A. cepa*. *O. niloticus*. Cultura de células.

## ABSTRACT

Itapemirim river is considered one of the most important water resources of the Espírito Santo. Considering the ecological and socio-economic importance of this water resource, the concern about water quality is crucial, which makes necessary water assessment with approaches that integrate abiotic aspects to toxicogenetics assays. This study aimed to evaluate the water quality of Itapemirim river, through analysis of abiotic and toxicogenetics aspects, using as a test organism *A. cepa*, *O. niloticus*, and mammalian cell culture. Therefore, we defined four sampling stations along the Itapemirim river, to collect water samples during two periods: high precipitation and dry spell. From the samples were evaluated conductivity (S / cm) water temperature (° C), dissolved oxygen (mg / L) and pH, as well as quantified metals concentration. For *Allium cepa* assay were performed root growth test and cytogenetic analysis. Micronucleus test and comet assay were made with *O. niloticus* specimens. MTT test and comet assay were performed with CHO-K1 cells. Most abiotic variables evaluated showed waters from two campaigns are according to CONAMA Resolution No. 357/2005, as well as most metals. However, Al and Cu levels were above in the water regarding the legislation. Based on the results, it was verified that the compounds present in the waters of these river have the phytotoxic, genotoxic and mutagenic potential for the two in vivo and in vitro test organisms. The most significant results were obtained from the RI 03 sample, probably because it is related to the fact that the station is near to urban area of Cachoeiro Itapemirim / ES. It was also noted that the two campaigns conducted showed negative effect on bioassays performed. The data in this study indicate that water quality of Itapemirim river is committed and alert to the risk that domestic and industrial wastewater discharges have on water bodies, especially because of the complex chemical constitution presented.

Keywords: Metals. Chromosomal Aberrations. Micronucleus. Comet assay. MTT. *A. cepa*. *O. niloticus*. Cell Culture.

## LISTA DE ABREVIações

Ag – Prata

AGERH – Agência Estadual de Recursos Hídricos

Al – Alumínio

AM – Alterações Mitóticas

AN – Anormalidades Nucleares

As – Arsênio

B – Boro

Ba – Bário

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CCA – Centro de Ciências Agrárias

Cd – Cádmio

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

CHO – Célula de Ovário de Hamster Chinês

Co - Cobalto

CP – Controle Positivo

Cr – Cromo

CR – Crescimento Radicular

Cu – Cobre

CN – Controle Negativo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Desvio Padrão

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

EP – Erro Padrão da Média

F – Fluoreto

F1 – Células da Primeira Geração da Divisão Celular

Fe – Ferro

Hg – Mercúrio

HCl – Ácido Clorídrico

HNO<sub>3</sub> – Ácido Nítrico

IAN – Índice de Anormalidades Nucleares

ID – Índice de Danos

IEM – Índice de Efeito Mutagênico

IFES – Instituto Federal do Espírito Santo

IM –Índice Mitótico

MMS –Metilmetano sulfonado

Mn – Manganês

MN –Micronúcleo

MTT – Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)

N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

Ni – Níquel

OD – Oxigênio Dissolvido

Pb – Chumbo

PBS – Tampão Fosfato Salino

pH – Potencial Hidrogeniônico

RI – Rio Itapemirim

S – Sulfeto

Se – Selênio

SEAMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

Zn – Zinco

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padrões de lançamento de efluentes do CONAMA nº 397, de 3 de abril de 2008 .....26

Tabela 2- Resumo dos resultados encontrados nos testes com *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de CHO-K1 .....92

### Artigo 1

Tabela 1 - Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas ao longo do rio Itapemirim-ES no ano de 2015.....80

Tabela 2- Quantificação dos metais das amostras de água do rio Itapemirim/ES nas duas campanhas realizadas.....80

Tabela 3- Crescimento médio das raízes (mm) de *Allium cepa* após exposição a amostras de água do rio Itapemirim/ES na primeira e na segunda campanha. ....81

Tabela 4- Frequência de divisão mitótica e IM (índice mitótico) de células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas do rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM). ....82

Tabela 5- Frequência de aberrações cromossômicas avaliados pelo ensaio com *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas no rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM).....84

Tabela 6- Frequência de micronúcleos (MN) em células meristemáticas e F1, avaliados pelo ensaio com *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas no rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM). 85

Tabela 7- Avaliação alterações nucleares e mutagênica de amostras de água de quatro estações ao longo do rio Itapemirim/ES em eritrócitos de *O. nilóticos* com base no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa, nas duas campanhas realizadas.....86

Tabela 8- Valores médios e desvio padrão das classes de dano no DNA e do escore, obtidos por meio do ensaio cometa em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) expostas as águas do rio Itapemirim-ES, em época de alta precipitação (1º campanha) e estiagem (2º campanha). ....89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bacia Hidrográfica do Rio Itapemirim/ES .....	19
Figura 2 - Balanço de oxigênio dissolvido nos sistemas aquáticos; os processos acelerados ou aumentados pela descarga de materiais orgânicos são indicados por setas verdes .....	23
Figura 3 - AC observadas em células meristemáticas de <i>A. cepa</i> expostas à mistura do inseticida imidaclopride com o herbicida sulfentrazone. A) prófase poliplóide (seta); B) Cmetáfase; C) metáfase com aderência cromossômica; D) metáfase com perda cromossômica; E) metáfase com quebra cromossômica (seta); F) metáfase poliplóide (seta); G) anáfase com aderência cromossômica; H) anáfase com perda cromossômica (seta); I) anáfase multipolar; J) anáfase poliplóide; K) anáfase com ponte cromossômica (seta); L) anáfase com quebra cromossômica (seta); M) telófase com ponte cromossômica (seta); N) telófase com atraso cromossômico (seta); O) telófase com perda cromossômica (seta); P) broto nuclear (seta); Q) célula binucleada (seta), R e S) células micronucleadas; T) célula em processo de morte celular. Fonte: Ambrósio 2012.....	29
Figura 4 – Regiões meristemática e F1 das raízes de <i>Allium cepa</i> com células portadoras de micronúcleos (setas). A) Região meristemática; B) Região F1. Aumento: 400X. Fonte: Bianchi 2008.....	31
Figura 5- Redução enzimática do anel tetrazólico do MTT .....	32
Figura 6 - Ensaio do cometa realizada com eritrócitos <i>Oreochromis niloticus</i> . A- Classe 0 ( sem dano celular) ; B -Classe 1 (pequeno dano); C- Classe 2 ( dano médio ) e D- classe 3 (grande dano) . Fonte: Matsumoto et al. 2006.....	34
Figura 7- Estações amostrais ao longo do percurso do rio Itapemirim/ES.....	37
Figura 8- Estações de coleta ao longo rio Itapemirim/ES. a) RI 01, b) RI 02, c) RI 03 e d) RI 04.....	37

### Artigo 1

<b>Fig. 1-</b> Bacia Hidrográfica do rio Itapemirim/ES e regiões de coleta ao longo rio (1) RI 01, (2) RI 02, (3) RI 03 e (4) RI 04.....	79
--	----

<b>Fig. 2-</b> Média da precipitação acumulada trimestral (mm) na região da estação meteorológica Cachoeiro de Itapemirim/ES. Ano 2015. Primeira campanha enquadra-se dentro do período de JAN/FEV/MAR, uma vez que essa foi realizada no final de março e a segunda campanha enquadra-se no período de JUL/AGO/SET, uma vez que foi realizada no início de outubro .....	79
---	----

**Fig. 3-** Comparação do crescimento radicular de raízes de *A. cepa* submetidas as amostras de água do rio Itapemirim, nas duas campanhas realizadas. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos .....81

**Fig. 4-** Comparação do Índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas as amostras de água do rio Itapemirim, nas duas campanhas realizadas. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos .....83

**Fig. 5-** Comparação entre as campanhas para o índice de alterações genotóxicas (a), mutagênicas(b) e o índice de danos no DNA (c) em eritrócitos de *O. niloticus* expostos as amostras de água do rio Itapemirim/ES. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos .....87

**Fig. 6-** Viabilidade celular de células de ovário de hamster chinês expostas a amostras de água do rio Itapemirim/ES, em duas campanhas. Médias  $\pm$  SD de acordo com Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Colunas com as mesmas letras nas estações não diferem estatisticamente.....88

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1 – Panorama dos Recursos Hídricos.....	17
2.2 – Histórico da Bacia do rio Itapemirim/ES.....	19
2.3 – Estudo de biomonitoramento e da qualidade das águas .....	21
2.4 - Avaliação abiótica dos ecossistemas aquáticos .....	22
2.5 - Ensaio Toxicogénéticos .....	26
2.5.1 - <i>Allium cepa</i> , <i>Oreochromis niloticus</i> e cultura celular.....	26
2.5.2 – Crescimento Radicular.....	27
2.5.3 – Análises Citogenéticas.....	27
2.5.4 – Ensaio Citotóxico do MTT .....	31
2.5.5 - Ensaio do cometa .....	32
<b>3 – OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 – Objetivo Geral .....	35
3.2 – Objetivos Específicos.....	35
<b>4 – METODOLOGIA</b> .....	36
4.1 - Material biológico .....	36
4.2 - Estações amostrais.....	36
4.3 - Parâmetros físicos e químicos.....	38
4.4 - Bioensaios com <i>Allium cepa</i> .....	38
4.4.1 - Crescimento radicular e análise citogenética .....	39
4.5 - Bioensaios com <i>Oreochromis niloticus</i> .....	40
4.5.1 Teste do micronúcleo.....	40
4.6 -Cultura celular.....	41
4.6.1 - Linhagem celular e condições de cultivo de células CHO-K1.....	41

4.6.2 - Ensaio citotóxico do MTT .....	41
4.7- Ensaio do cometa .....	42
4.7.1 – Suspensão celular – <i>Oreochromis niloticus</i> .....	42
4.7.2– Suspensão celular e teste de viabilidade - Cultura de células CHO-K1...	42
4.7.3 – A Técnica .....	43
4.8 - Análise Estatística.....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>6 – RESULTADOS</b> .....	<b>57</b>
Artigo 1.....	57
<b>7- CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>90</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são considerados renováveis, porém sua disponibilidade e potencialidade encontra-se ameaçada devido a sua contaminação, que pode ser resultado de mudanças físicas, químicas, físico-química e/ou biológica da água causadas por processos naturais e/ou, principalmente, pela ação do homem (BAPTISTA e CARDOSO, 2013). A concentração populacional, a perda da mata nativa, o pastoreio, o esgoto doméstico e os resíduos sólidos da produção agrícola e industrial quando lançados em locais inapropriados são os principais fatores de degradação dos corpos de água (SANTANA et al., 2012).

O estado do Espírito Santo possui 12 bacias hidrográficas, destacando-se a do rio Itapemirim por constituir o principal sustentáculo do desenvolvimento do sul do estado (PASTRO, 2012). O rio Itapemirim tem sua nascente na Serra do Caparaó-ES, situado entre os meridianos 40°48' e 41°52' de longitude Oeste e os paralelos 20°10' e 21°15' de latitude Sul, possuindo, aproximadamente, 5.919,5 km<sup>2</sup> de extensão (IEMA, acesso nov. de 2015). Sua bacia abrange um número considerável de municípios, sendo 16 no Espírito Santo e parte do município de Lajinha em Minas Gerais. Conferindo, assim, grande heterogeneidade entre as regiões (PASTRO, 2012).

Algumas agências que realizam o monitoramento da qualidade da água no Brasil utilizam análises abióticas que possibilitam verificar as influências atmosféricas, as condições climáticas, antrópicas e a litologia do local (DUARTE et al., 2012). Entretanto, estas não levam em consideração os testes de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (GROVER e KAUR, 1999). Nesse sentido, os níveis de tolerância estabelecidos por meio de parâmetros abióticos preocupam, uma vez que alguns estudos de genética toxicológica revelam resultados significativos mesmo quando os valores da contaminação são inferiores aos permitidos pela legislação (MATSUMOTO et al., 2006; PIRES e CHAPARRO, 2010; OLIVIERA, 2013).

O uso de biomarcadores como indicador de contaminação ambiental tem sido utilizado, principalmente ao nível celular e molecular, pois agem como receptores biológicos diretos dos agentes presentes no ambiente (FERNANDES et al., 2009).

Dentre os bioindicadores, destacam-se as plantas superiores, os peixes e a cultura de células de mamíferos.

O uso de plantas superiores como bioindicadores vem sendo utilizado desde a década de 70 (GRANT, 1999). A partir de então, a espécie *Allium cepa* L. tornou-se um modelo padrão pelo tamanho grande e número reduzido de seus cromossomos ( $2n=16$ ) e a alta sensibilidade em detectar agentes químicos no ambiente (FISKESJÖ, 1985; LEME e MARIN-MORALES, 2008; CARITÁ, 2010; SOUSA et al., 2013). Os peixes se evidenciaram como bioindicadores, devido a capacidade de acumular substâncias tóxicas no organismo (MATSUMOTO et al., 2006) e por possuírem metabolismo similar aos vertebrados superiores, já que são evolutivamente próximos a estes (AL-SABTI e METCALFE, 1995; LEMOS et al., 2007; BRITO, 2015). Já a cultura celular possui vantagens pela facilidade de padronização das condições experimentais, uniformidade metabólica e comportamental do material, e pela organização dos cromossomos e de seu DNA assemelhar-se às células *in vivo* (CARDOZO et al., 2006, MATSUMOTO et al., 2006; HARA, 2012; MALAQUIAS, 2015).

Tendo em vista a importância ecológica e socioeconômica da bacia do rio Itapemirim/ES faz-se necessário a sua avaliação por abordagens que integrem os aspectos abióticos aos ensaios toxicogenéticos envolvendo biomarcadores, tais como *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura celular.

## 2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Panorama dos Recursos Hídricos

A água é classificada como recurso natural essencial para a sobrevivência dos seres vivos da Terra. É um recurso que está envolvido em todos os aspectos da civilização, desde o desenvolvimento agrícola e industrial até os valores culturais da sociedade (SILVA, 2008), o que a torna um produto finito, vulnerável e passível de uma crise em um futuro próximo (SILVA, 2007; ALVES, 2010).

A demanda de água pelos seres vivos tem correlação direta com o aumento populacional. À medida que a população aumenta, instantaneamente é observado um aumento da demanda de água (SILVA, 2008). Ao longo dos últimos anos, o rápido crescimento populacional foi desconsiderado, resultando em uma degradação do meio ambiente (ALVES, 2010), e o fato desta não estar distribuída igualmente em todas as regiões do mundo, levou a água a ser citada como uma das questões bélicas do mundo moderno. Com isso, normas de direito internacional foram apontadas como uma forma de reduzir as tensões entre os países (CAMDESSUS et al., 2005; ALVES, 2010).

O Brasil tem uma situação privilegiada em relação à disponibilidade de água, possuindo aproximadamente 15% da água doce do mundo. O território brasileiro tem 17 trilhões de metros cúbicos disponíveis de água dos 113 trilhões disponíveis para a vida terrestre (SANTILLI, 2001).

Mesmo com essa disponibilidade, os problemas de conflitos para o uso da água e a preocupação com a sua qualidade levaram os técnicos profissionais e os meios acadêmicos a discutir, nos anos 70, sobre como minimizar esses problemas (TUCCI et al., 2001). Em 1988, com a nova Constituição, iniciou-se o processo de gestão dos recursos hídricos no Brasil. A constituição estabeleceu que: *“são bens da União os lagos, rios e quaisquer correntes em terrenos de seu domínio, ou que banhem mais de um Estado da federação, sirvam de limite com outros Países, ou se estendam a território estrangeiro ou dele provenham, bem como os terrenos marginais e as praias fluviais”*, assim como *“bens dos Estados, as águas superficiais ou subterrâneas, fluentes, emergentes ou em depósito, ressalvadas, neste caso, na forma da lei, as decorrentes de obras da União”* (TUCCI et al., 2001; BRASIL, 1988).

Em 8 de janeiro de 1997 foi definido a Política Nacional de Recursos Hídricos e implementado o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos por meio da Lei nº 9.433/97 (conhecida como Lei das Águas), sua finalidade é preservar a qualidade da água das variadas formas de poluição e de seu mau uso, levando em consideração a sua inter-relação com os outros recursos naturais (SANTILLI, 2001; TUCCI et al., 2001).

Já o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu os padrões de potabilidade da água (água destinada ao abastecimento humano), diferenciando-os dos padrões de balneabilidade (água para fins de recreação de contato primário) e dos padrões para água de irrigação, ou uso industrial, enquadrando o uso dos mananciais em classes para facilitar a definição dos critérios e/ou de suas condições (OSHIRO, 2011).

A resolução do CONAMA definiu para cada classe, além dos usos a que se destinam, os requisitos a serem observados, estabeleceu limites individuais para cada substância e também os padrões de qualidade da água e as condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos hídricos (CONAMA, 2005; OSHIRO, 2011).

De maneira geral, cada estado organiza seus sistemas de recursos hídricos, tendo como base as políticas nacionais. O governo do Espírito Santo em 16 de dezembro de 2013, por meio da Lei nº10.143, criou a Agência Estadual de Recursos Hídricos – AGERH, que está vinculada diretamente à Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEAMA. A AGERH tem por finalidade “*executar a Política Estadual de Recursos Hídricos, regular o uso dos recursos hídricos estaduais, promover a implementação, gestão das obras de infraestrutura hídrica de usos múltiplos e realizar o monitoramento hidrológico no estado do Espírito Santo*” (AGÊNCIA, acesso em: 16 jan. 2016).

Uma das principais bacias hidrográficas do Espírito Santo é a do rio Itapemirim. Em 19 de julho de 2006, por meio do decreto 1.703-R, foi criado o Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Itapemirim que contém uma composição diversificada e democrática. Suas principais competências são: aprovar o Plano de Recursos Hídricos da Bacia; arbitrar conflitos pelo uso da água, em primeira instância administrativa; estabelecer mecanismos, sugerir os valores da cobrança pelo uso da água; entre outros (CÔMITES, acesso em: 16 de jan. 2016).



com que vilas, estradas e fazendas fossem construídas em suas margens (FERRAZ, 1986; BRAVO, 1998). A região de Cachoeiro de Itapemirim tornou-se um importante polo econômico, primeiramente, com a produção de cana-de-açúcar, seguido pela implementação da cultura cafeeira (PREFEITURA, acesso: 17 jan. 2016). Além disso, foi uma das primeiras regiões a ter ligação com o Rio de Janeiro pela linha férrea, atraindo, assim, os investimentos industriais como as fábricas de tecido, fábricas de cimento, fábricas de papel, serraria industrial e a exploração de Mármore e Granito, que funcionam, atualmente, juntamente com outras modalidades como as indústrias de aguardente, frigoríficas e cooperativas de derivados do leite (PASTRO, 2012). Essas indústrias, na sua maioria, foram instaladas sem um plano de sustentabilidade ambiental.

Atualmente, no setor industrial, destacam-se as empresas de rochas ornamentais, prática iniciada pelos portugueses em 1920. O Espírito Santo é a região com maior índice de exploração nesse setor, chegando a produzir em torno de 4000 toneladas por mês de lama abrasiva, resíduo gerado na produção do mármore e granito (SOUZA, 2007; ROCHA e SOUZA, 2010).

Além do desenvolvimento econômico, a bacia do rio Itapemirim apresenta um contingente populacional no Espírito Santo de aproximadamente 506 mil habitantes (IBGE 2010, PASTRO, 2012). O aumento populacional, historicamente observado, provoca degradação constante da Bacia, pois leva a um aumento na captação dos mananciais, gerando mais resíduos sólidos e, com isso, aumenta os aterros sanitários e a poluição difusa. Além disso, o problema se agrava com o aumento de liberação de esgoto, principalmente, quando este é liberado sem tratamento (NAME et al, 2011). Esse lançamento de efluentes sem tratamento tem comprometido a qualidade da água captada para abastecimento doméstico em muitos mananciais (AGÊNCIA, 2005).

As principais causas da degradação dessa bacia são: lançamento de esgoto urbano sem tratamento em seus cursos d'água, despejo de subprodutos da indústria de álcool, de beneficiamento de produtos de animais e lançamento de detritos sólidos e metais pesados pelas indústrias de mármore e granito. Em sua grande maioria, esses resíduos são eliminados de forma incorreta, diretamente em rios, córregos ou lagos, causando problemas ambientais e danos à saúde. A Lama abrasiva, quando eliminada em corpos de água, pode alterar as características tanto superficiais quanto sub-superficiais da água, seja por meio da sua

solubilização, ou do seu arraste por suspensão (ESPÍRITO SANTO, acesso: 26 abril 2016).

### **2.3 – Estudo de biomonitoramento e da qualidade das águas**

O biomonitoramento pode ser definido como o acompanhamento sistemático da situação dos recursos ambientais dos meios físico e biótico, fornecendo informação sobre os fatores que influenciam o estado de conservação, preservação, degradação e recuperação ambiental da região avaliada (BRASIL, 2009).

A qualidade ambiental é influenciada pelas variáveis ambientais, sejam elas em função das ações antrópicas e/ou transformações naturais. Um dos principais ambientes que sofrem variações ambientais são os aquáticos, pois a sua contaminação muitas vezes ocorre por meio de fontes difusa. Esta pode ocorrer por meio do escoamento rural e urbano ao longo das bacias hidrográficas e não permitem identificar de onde os contaminantes estão sendo lançados, podendo estes serem de origem orgânica ou inorgânica (SOUZA, 2014). Além da poluição difusa, outras fontes de contaminação direta são observadas ao longo dos recursos hídricos, como o lançamento de forma incorreta de esgoto doméstico e resíduos industriais.

Diferentes métodos são aplicados para avaliar a qualidade da água e fornecer um espectro de informações para um monitoramento efetivo. Os métodos mais usuais nessa avaliação são as mensurações dos parâmetros físicos e químicos. Os parâmetros físicos são representados pela condutividade elétrica, sólidos totais, sólidos dissolvidos, sólidos suspensos, cor, turbidez, alcalinidade e dureza. Já os parâmetros químicos são pH, oxigênio dissolvido, DBO (demanda bioquímica de oxigênio), DQO (demanda química de oxigênio), nitrogênio total, nitrogênio amoniacal, nitrato, fósforo, cloretos, ferro, potássio, sódio, magnésio, manganês, zinco e cobre (CAMPOS, 2009).

Outra ferramenta do monitoramento ambiental é a ecotoxicologia que busca avaliar o ambiente baseando-se em respostas de organismos submetidos a estresse. Podemos definir a ecotoxicologia como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres

vivos que habitam a biosfera. No Brasil, testes ecotoxicológicos para monitorar a qualidade da água têm se tornado bastante comuns (MAGALHÃES e FILHO, 2008; MAFFAZZIOLI, 2011).

Substâncias químicas presentes no ambiente podem apresentar afinidade com o material genético dos seres vivos e causar lesões na molécula de DNA. Essa afinidade pode causar alterações do tipo cromossômicas e/ou nucleares. As alterações cromossômicas ocorrem nos cromossomos, podendo modificar sua estrutura e/ou seu número (RUSSEL, 2002). Já as anormalidades nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico, podendo ser uma consequência das aberrações cromossômicas (LEME e MARIN-MORALES, 2009; PALMIERI, 2012; PIZZAIA, 2013).

Essas alterações podem ser utilizadas para prospectar o potencial tóxico de diferentes compostos químicos (ANDRADE et al., 2010) e definir seus mecanismos de ação, citotóxico, genotóxicos e/ou mutagênicos (BOER e HOEIJMAKERS, 2000; DOURADO, 2014). A citotoxicidade de um agente significa o efeito destrutivo que este agente provoca às células, sendo averiguado por meio da identificação de alterações cromossômicas, nucleares e pelo índice mitótico, que é a quantidade de célula em divisão durante o ciclo celular dividido pelo número total de células observadas. O termo genotoxicidade é empregado para caracterizar diversos efeitos de um agente sobre o DNA que podem resultar em aberrações cromossômicas, como a formação de aductos de DNA, lesões na fita de DNA, síntese de DNA não programada e trocas entre cromátides irmãs, sendo estes passíveis de reparo. Já a mutagenicidade é caracterizada pela indução de mutação no nível gênico ou cromossômico, resultando em alterações nucleares que são permanentes no conteúdo ou na estrutura do material genético de um organismo (CARITÁ, 2010).

#### **2.4 - Avaliação abiótica dos ecossistemas aquáticos**

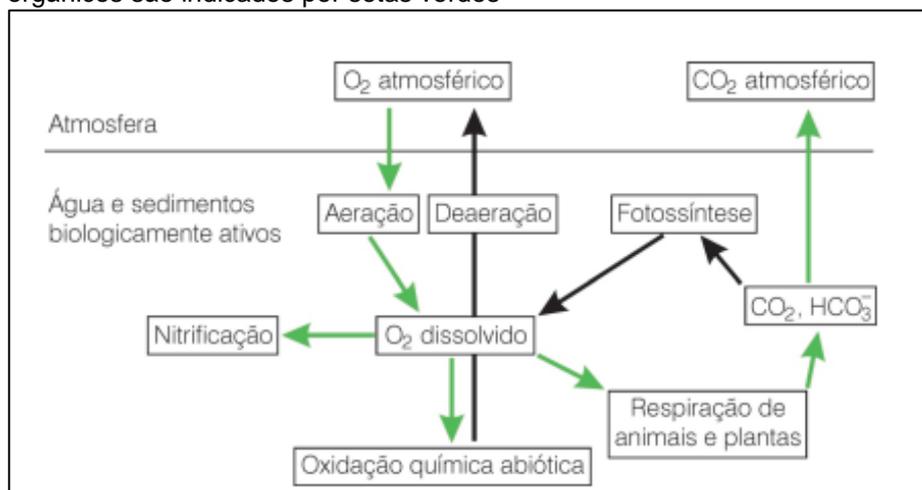
A água é de extrema importância para a vida, portanto é necessário que atenda alguns parâmetros físicos e químicos (SILVA, 2012). A caracterização físico-químico tem como objetivo quantificar os elementos iônicos presentes na água e associar os efeitos de suas propriedades às questões ambientais. Os teores das amostras são sempre comparados aos valores padrões especificados pelas

portarias e resoluções legais que dão subsídio aos laboratórios na expedição de seus laudos (PARRON et al., 2011). Alguns parâmetros principais têm sido usados nos estudos da qualidade da água, destacando-se a mensuração da temperatura, do oxigênio dissolvido (OD), da condutividade elétrica, do pH e a quantificação dos metais.

A temperatura é um fator que influencia praticamente todos os processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem na água. A temperatura é influenciada tanto pela temperatura do ar, quanto pela insolação direta (BORGES et al., 2003). Além disso, este parâmetro exerce influência marcante na velocidade das reações químicas, nas atividades metabólicas dos organismos e na solubilidade de substâncias (BRASIL, 2006; ROSA, 2015).

O oxigênio dissolvido é empregado como padrão de classificação para águas naturais (BUGIN et al., 2011), sendo um dos principais elementos que permitem que os seres heterotróficos se estabeleçam no meio aquático. Nesse ambiente, o oxigênio pode ser adquirido ou ser perdido, conforme a figura 2 (SILVA, 2012).

Figura 2 - Balanço de oxigênio dissolvido nos sistemas aquáticos; os processos acelerados ou aumentados pela descarga de materiais orgânicos são indicados por setas verdes



Fonte: FIORRUCI e BENEDETTI-FILHO, 2005.

Quando amostras de água contém grandes quantidades de substâncias orgânicas biodegradáveis, o oxigênio dissolvido reduz, ou desaparece, isso ocorre em virtude dos resíduos orgânicos despejados nos corpos d'água sofrerem decomposição por microrganismos que utilizam oxigênio para a respiração,

resultando na ausência de outros tipos de seres vivos aeróbicos (CAMPOS, 2009; SANTOS, 2015).

A condutividade elétrica expressa a capacidade que a água tem em conduzir corrente elétrica. Esta capacidade depende, basicamente, da concentração total, da mobilidade, da valência e da concentração relativa de íons, além da temperatura da água (PARRON et al., 2011; SILVA, 2015). A condutividade elétrica oportuniza realizar uma interpretação inicial das condições ambientais, uma vez que pode expressar a quantidade de materiais dissolvidos na água (JUSTUS, 2012; SILVA, 2012).

A Resolução Conama 357/05 não estabelece limites de concentração para condutividade elétrica, todavia a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 2011) estabelece que a condutividade elétrica pode representar medida indireta da concentração de poluentes, sendo considerado crítico os níveis superiores a 100  $\mu\text{S}/\text{cm}$ .

O termo pH (potencial hidrogeniônico) representa a concentração de íons hidrogênio,  $\text{H}^+$ , em escala antilogarítmica, onde sua grandeza varia de 0 a 14, indicando as condições de acidez ( $<7,0$ ), neutralidade ( $=7,0$ ) e basicidade ( $>7,0$ ) da água. Na natureza, normalmente quando a concentração de sais é alta e cujos cátions ionizam, como o ácido sulfúrico, o pH tende a diminuir. Já em regiões com balanço hídrico negativo, ou que sofrem influência do mar é mais frequente encontrar pH altos, devido à presença de carbonatos e bicarbonatos (ESTEVES, 1998; SILVA, 2012; BRASIL, 2014).

O pH exerce efeito sobre a fisiologia de diversas espécies presentes nos ecossistemas aquáticos, podendo agir diretamente nos processos de permeabilidade das membranas e, portanto, interferindo no transporte iônico entre as células e o meio. Além disso, o pH baixo pode interferir na vida dos seres vivos, causando a redução da taxa de crescimento populacional, a má formação do esqueleto e alterações na reprodução (ESTEVES, 1998; SILVA, 2012;).

Os metais pesados são um grupo de elementos que possuem como principal característica a sua densidade específica e nível de toxicidade particulares (RIBEIRO et al., 2012). Cerca de 80 dos 110 elementos da tabela periódica são classificados como metais (BACCAN, 2004), sendo os mais característicos o arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), níquel (Ni), manganês (Mn), mercúrio (Hg) e zinco (Zn) (LIMA, 2013).

Alguns desses metais são necessários para a realização de funções vitais no organismo dos seres vivos como: cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio, e zinco. Entretanto, esses elementos em níveis excessivos podem ser extremamente tóxicos. Já o mercúrio, o chumbo e o cádmio, por exemplo, são metais que não possuem nenhuma função dentro dos organismos e a acumulação dos mesmos pode provocar doenças, principalmente nos mamíferos (FERREIRA et al., 2010; CÉLICO, 2015).

Os metais se acumulam nos componentes do ambiente, manifestando sua toxicidade por serem absolutamente não degradáveis. Fator este que os diferencia dos compostos orgânicos tóxicos (BAIRD, 2002; VOIGT et al., 2016). Os organismos aquáticos são os que mais sofrem com o acúmulo de metais, podendo absorver os metais, diretamente, por meio da superfície do corpo, de estruturas respiratórias e pela ingestão da água, ou, indiretamente, por meio da cadeia alimentar. Esse acúmulo influencia na produtividade de plantas e animais e, ainda, podem causar doenças nos seres humanos, podendo levar à morte (FERREIRA et al., 2010; FARIAS, 2014).

Dependendo do organismo, a absorção, a toxicidade e a bioacumulação dos metais variam, podendo ser alterados pelo efeito da temperatura, do pH, da turbidez, do oxigênio dissolvido e da concentração de outros metais (MORTIMER, 2000; BRANDÃO, 2013).

No ecossistema aquático, os metais podem ser introduzidos de forma natural ou artificial. Naturalmente, a inserção pode ocorrer por meio do aporte atmosférico e chuvas, pela liberação e transporte a partir da rocha matriz ou outros compartimentos do solo (PAULA, 2006; SEYLER e BOAVENTURA, 2008; LIMA, 2013; SANTOS-FILHO, 2015). De modo antropogênico, os metais chegam aos ambientes aquáticos, principalmente, devido às atividades de mineração (carvão e jazidas minerais), indústrias, agricultura e geração de efluentes municipais (CASTRO, 2006; GOMES e SATO, 2011; LIMA, 2013; SANTOS-FILHO, 2015).

Devido ao seu efeito tóxico, resoluções para controlar as taxas de metais apropriados no ambiente têm sido criadas. No Brasil, a resolução que estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes é a Resolução CONAMA nº 397, de 3 de abril de 2008 (CONAMA, 2008), descritos na tabela 1.

Tabela 1- Padrões de lançamento de efluentes do CONAMA nº 397, de 3 de abril de 2008

<b>METAIS</b>	<b>VALOR PERMITIDO</b>
Arsênio total	0,5 mg/L As
Bário total	5,0 mg/L Ba
Boro total	5,0 mg/L B
Cádmio total	0,2 mg/L Cd
Chumbo total	0,5 mg/L Pb
Cianeto total	1,0 mg/L CN
Cobre dissolvido	1,0 mg/L Cu
Cromo hexavalente	0,1 mg/L Cr6+
Cromo trivalente	1,0 mg/L
Ferro dissolvido	15,0 mg/L Fe
Fluoreto total	10,0 mg/L F
Manganês dissolvido	1,0 mg/L Mn
Mercurio total	0,01 mg/L Hg
Níquel total	2,0 mg/L Ni
Nitrogênio amoniacal total	20,0 mg/L N
Prata total	0,1 mg/L Ag
Selênio total	0,30 mg/L Se
Sulfeto	1,0 mg/L S
Zinco total	5,0 mg/L Zn

## 2.5 - Ensaio Toxicogenéticos

### 2.5.1 - *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e cultura celular

Bioensaio com plantas superiores são utilizados para a análise citogenética e recomendados desde a década de 70 (GRANT, 1999), sendo as plantas excelentes modelos para detectar mutágenos ambientais (BRAGA e LOPES, 2015). Entre as espécies vegetais a que se destaca é o *Allium cepa*, que se caracteriza como um ótimo material para análises de poluição de recursos hídricos (MACHADO, 2013; MACEDA et al., 2015), pela sua alta sensibilidade na avaliação da qualidade da água, permitindo resultados satisfatório dos danos cromossômicos e dos distúrbios causados no ciclo mitótico (RADIC et al., 2010).

As características dos peixes que os evidenciam como bioindicador são a capacidade de acumular substâncias tóxicas no organismo, por responderem mesmo as baixas concentrações de compostos mutagênicos (MATSUMOTO et al., 2006) e por possuírem metabolismo similar aos vertebrados superiores, já que são evolutivamente próximos a estes (AL-SABTI e METCALFE, 1995; LEMOS et al., 2007). Além disso, esses animais sobrevivem em ambientes poluídos, com pouco fluxo de água e um dos animais de topo da cadeia alimentar, sendo ainda, os resultados encontrados em peixe diretamente relacionado aos resultados

encontrados em água (CARRETEIRO, 2012). A espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia) é considerada um excelente modelo entre os peixes, principalmente por permitir a captura de indivíduos sem prejudicar a conservação de sua espécie (VIJAYAN et al., 1996, ÇAVAS; ERGENE-GÖZÜKARA, 2003).

A cultura celular é uma eficiente ferramenta para a avaliação ambiental, possuindo vantagens como a facilidade de padronização das condições experimentais (temperatura, pH, composição do meio de cultura, densidade populacional), a uniformidade metabólica e comportamental do material, possibilidade dos tratamentos das células serem realizados em várias fases do ciclo celular, pela rapidez, ser financeiramente acessíveis, ter boa reprodutividade e pela organização dos cromossomos e de seu DNA assemelhar-se às células in vivo (CARDOZO et al., 2006, MATSUMOTO et al., 2006).

### **2.5.2 – Crescimento Radicular**

Os testes de crescimento radicular são caracterizados como rápidos, fáceis, baratos, confiáveis e não consisti de tecnologias avançadas (GOPALAN, 1999; VALERIO et al., 2007; BERNADES, 2014), sendo um dos métodos utilizados para avaliar o potencial ecotoxicológico de substâncias. Este método consiste em mensurar a elongação radicular durante exposição a algum agente potencialmente tóxico (PALMIEIRI, 2012). A análise do efeito dos compostos nas células de sementes das plantas vasculares podem ser realizadas desde a fase inicial de desenvolvimento (DUTKA, 1989; LEWIS, 1995). Dessa forma, o teste de crescimento possui ótima aplicação e quando empregado juntamente com outras técnicas, como os testes citogenéticos, facilitam a identificação do potencial fitotóxico da água e proporciona ampla exploração dos dados obtidos (ANDRADE et al., 2010, YOUNG et al., 2012; BERNADES, 2014). Essa combinação de testes permite explorar mais os dados, tanto de maneira teórica como nas análises laboratoriais (PALMIEIRI, 2012).

### **2.5.3 – Análises Citogenéticas**

A citogenética analisa a estrutura, o número, os movimentos e a função dos cromossomos, bem como as variações dessas propriedades, relacionando todos

estes fatores com a transmissão, recombinação e expressão dos genes (BRAMMER et al., 2007). Assim, pode ser utilizada em estudos para determinar a toxicidade de compostos, bem como avaliar os efeitos sinérgicos de potenciais contaminantes dos ecossistemas aquáticos sobre a biota do mesmo (MAZZEO, 2009; KERN, 2012). Uma das ferramentas que auxilia nessa determinação é a avaliação do ciclo celular, que permite compreender sobre as estruturas organizacionais dos cromossomos e como eles procedem durante a divisão (GRANT, 1994).

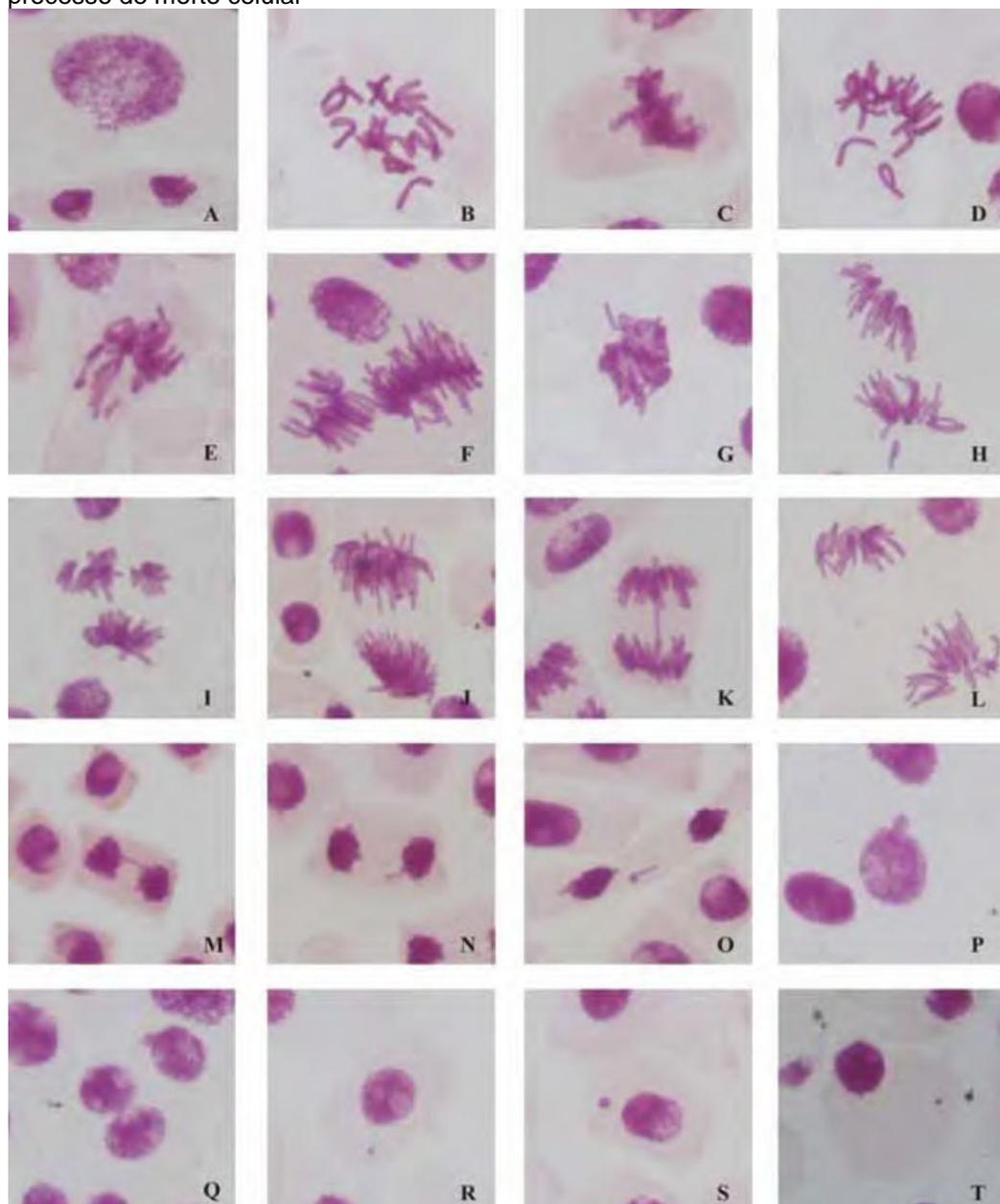
A avaliação do ciclo celular pode ser feita por meio do índice de divisão celular (IM), que é calculado pela quantidade de célula em divisão durante o ciclo celular dividido pelo total de células observadas. A anormalidade pode estar relacionada tanto pelo aumento como pela diminuição desse índice. A diminuição pode estar relacionada à exposição a um composto tóxico durante o crescimento, enquanto o aumento pode levar a formação de tumores (HOSHINA, 2002; LEME e MARIN-MORALES, 2009; MACHADO, 2013).

Outra forma de avaliação é pela presença de aberrações mitóticas no ciclo celular, considerado um dos métodos mais antigos para averiguar os efeitos tóxicos de uma substância (FERNANDES et al., 2007). Essas aberrações ocorrem nos cromossomos modificando sua estrutura e/ou sua quantidade, sendo que este último pode envolver um conjunto cromossômico (euploidias) ou apenas alguns (aneuploidias) (RUSSEL, 2002; BERNADES, 2014) e são reconhecidas como importantes consequências da ação genotóxica de agentes químicos no DNA ou nas células (NATARAJAN, 2002; MACEDO et al., 2014).

Como exemplos de alterações mitóticas (Figura 3) podemos citar a formação de cromossomos pegajosos – uma alteração na estrutura do cromossomo que forma uma aglomeração por causa da perda das características normais de condensação (BABICH et al., 1997); a c-metáfase – caracterizada pelo distúrbio no fuso, fazendo com que o ciclo celular seja interrompida na fase de metáfase, podendo assim ser observado o cromossomo espalhado pela célula muito condensado e com o centrômero bem definido e a formação de pontes – que podem ser identificadas com mais facilidade na fase de anáfase/telófase e surge com a quebra terminal no cromossomo de ambas as cromátides e a associação delas logo após a quebra. Erros na formação das fibras do fuso, da placa equatorial, da divisão do centrômero podem, ainda, bloquear ou levar a falha à

movimentação das cromátides-irmãs, levando ao aparecimento de anáfases desorganizadas, multipolares e a perda de cromossomos (ANDRADE et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; PIZZAIA, 2013; COSTA et al., 2015).

Figura 3 – Alterações cromossômicas observadas em células meristemáticas de *A. cepa*. A) prófase poliplóide (seta); B) Cmetáfase; C) metáfase com aderência cromossômica; D) metáfase com perda cromossômica; E) metáfase com quebra cromossômica (seta); F) metáfase poliplóide (seta); G) anáfase com aderência cromossômica; H) anáfase com perda cromossômica (seta); I) anáfase multipolar; J) anáfase poliplóide; K) anáfase com ponte cromossômica (seta); L) anáfase com quebra cromossômica (seta); M) telófase com ponte cromossômica (seta); N) telófase com atraso cromossômico (seta); O) telófase com perda cromossômica (seta); P) broto nuclear (seta); Q) célula binucleada (seta), R e S) células micronucleadas; T) célula em processo de morte celular



Fonte: Ambrósio 2012.

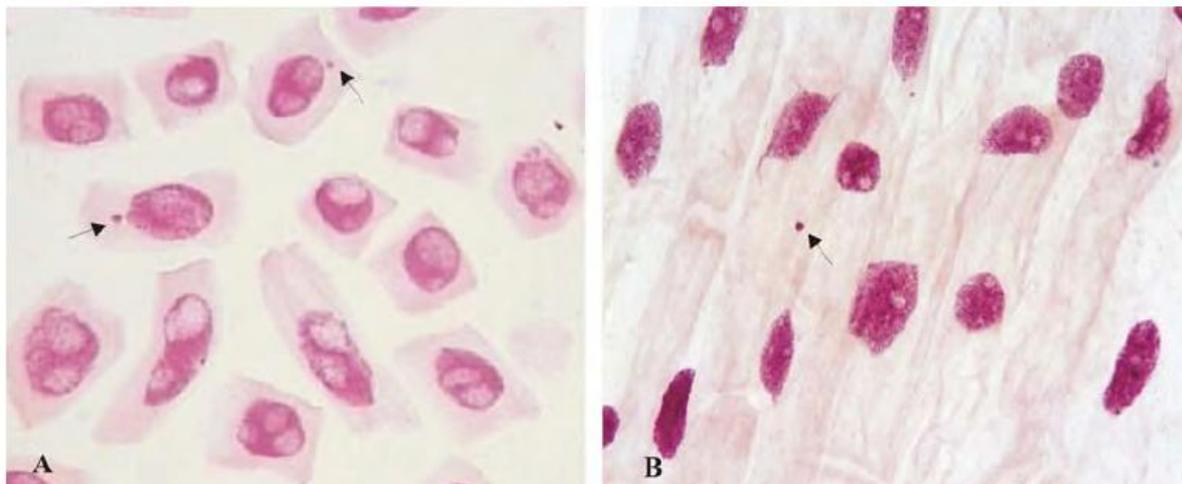
Estudos que indicam a presença de aberrações cromossômicas contribuem, para estabelecer o mecanismo de ação da amostra, podendo este ser aneugênico ou clastogênico (LEME et al., 2008; LÚCIO NETO, 2011; SILVA et al., 2015). As substâncias clastogênicas provocam quebras cromossômicas, sendo possível observar na célula a presença de fragmentos e pontes em anáfase e telófase. Já as substâncias aneugênicas inativam a estrutura celular e causam alterações como perda de cromossomo, c-metáfase, anáfases multipolares e cromossomo pegajoso (FENECH, 2000; LEME e MARIN-MORALES, 2009; ALMEIDA, 2014).

As anormalidades nucleares são caracterizadas por alterações morfológicas no núcleo interfásico, podendo ser uma consequência das aberrações mitóticas (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Uma das formas citológicas de anormalidade nuclear é a formação do micronúcleo, que consiste num núcleo pequeno que se assemelha ao núcleo principal e que parecem nas células filhas em decorrência de danos não reparados ou reparados erroneamente, induzidos nas células parentais. Os agentes químicos, físicos ou biológicos podem ser responsáveis por esses danos, interferindo no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso ou que introduzindo a perda de material genético (cromossomos inteiros ou fragmentos) (SOUZA, 2005; SILVA et al., 2003; RIBEIRO, 2003).

Schimidt, em 1975, foi o primeiro a descrever sobre o teste do micronúcleo, que vem sendo utilizado até hoje, devido a sua técnica ser considerada fácil de visualizar quando comparada com ensaios de análise de aberrações cromossômicas. Assim, o método requer menos treinamento e perícia (FLORES e YAMAGUCHI, 2008). Além disso, o teste de micronúcleo permite inferir sobre o efeito mutagênico de compostos e amostras.

Outra vantagem do teste do micronúcleo é que não depende do cariótipo da espécie envolvida, podendo ser aplicado em qualquer população de células. A análise de MN em células meristemáticas e em células F1 de *A. cepa* (Figura 4), tem sido considerada um método eficiente para indicar a ação direta de poluentes ambientais sobre o DNA (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Estudos mostram maior eficiência quando estes fragmentos acêntricos são analisados na região de F1 do que em relação à região meristemática (MACÊDO et al, 2008).

Figura 4 – Regiões meristemática e F1 das raízes de *Allium cepa* com células portadoras de micronúcleos (setas). A) Região meristemática; B) Região F1. Aumento: 400X. Fonte: Bianchi 2008



Além da utilização em plantas, a avaliação do micronúcleo em peixes é amplamente utilizada, tendo em vista que esses organismos sofrem bioacumulação assim como os mamíferos. Isso permite que, mesmo em baixas concentrações, os organismos respondam aos agentes mutagênicos (MANSOURI et al., 2012). Em peixe, existem diversos outros tipos de alterações na morfologia dos eritrócitos que já foram descritas por Carrasco et al. (1990), mas que ainda não apresentam sua origem completamente compreendida. Essas lesões foram basicamente classificadas em: *blebbed* cujos núcleos apresentam pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina ou heterocromatina; *lobed* cujos núcleos apresentam evaginações mais largas e sua estrutura não é tão definida como as descritas para os *blebbed*, podendo alguns núcleos apresentar várias destas estruturas; e *notched* onde os núcleos apresentam um corte bem definido em sua forma, sendo estes geralmente com uma profundidade significativa, aparentando não possuir material nuclear no local e ser delimitados pela membrana nuclear (RAMSDORF, 2007; SOUZA, 2005).

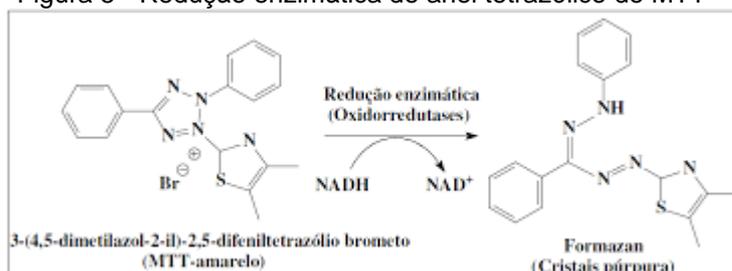
#### 2.5.4 – Ensaio Citotóxico do MTT

Uma das ferramentas para análise citotóxica é o teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), que é um método colorimétrico rápido, amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas

(MOSMAN, 1983), permitindo determinar a citotoxicidade de um composto, seja ele orgânico ou inorgânico.

O método baseia-se na capacidade de as células viáveis reduzirem metabolicamente o sal de MTT. Quando incubado com células vivas, por endocitose, o MTT tem seu anel tetrazólico reduzido no interior da mitocôndria, por meio da atividade da enzima succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, resultando na formação de cristais de formazan, convertendo assim, o composto de cor amarela para um composto azul escuro (Figura 5). Os cristais de formazan se acumulam na célula em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose (PERES et al., 2008).

Figura 5- Redução enzimática do anel tetrazólico do MTT



Fonte: Ribeiro et al., 2013.

Os cristais solubilizados com solução de DMSO (dimetilsufóxido) formam uma solução cuja absorvância pode ser mensurada. Dessa maneira, a intensidade da cor mensurada por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (BELLAN, 2013).

Desde a descrição original do teste do MTT por Mosmann, o mesmo tem sido utilizado em diversos experimentos com cultura de células para avaliar a qualidade das águas de rios e lagos. Trintinaglia et al. (2013) e Bianchi et al. (2015) demonstraram a eficiência do ensaio de MTT em avaliar a citotoxicidade da água em quatro estações ao longo da Bacia Hidrográfica do Rio dos Sinos, no sul do Brasil.

### 2.5.5 - Ensaio do cometa

Uma das técnicas visuais para detectar rupturas no DNA e assim avaliar o potencial genotóxico de uma amostra é o ensaio do cometa, também conhecido

como SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay). Essa técnica é considerada uma técnica molecular e começou a ser desenvolvida com o aperfeiçoamento das metodologias de eletroforese do DNA em micro-gel, realizadas por Ostling e Johanson em 1984. Posteriormente, foram otimizadas por Singh et al. (1988) que atribuíram maior sensibilidade a técnica por meio do uso de solução alcalina, sendo essa versão a mais utilizada atualmente.

O Ensaio do cometa avalia danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar as quebras de fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e/ou oxidantes (TICE et al., 2000). Além disso, apresenta vantagens como a detecção de pequenos danos no DNA, requerimento de pequeno número de células, flexibilidade e precisão metodológica, fácil aplicação, reprodutibilidade e curto período de tempo para a realização do experimento (KOSZ-VNENCHAK e ROKOSK, 1997; MITCHELMORE e CHIPMAN, 1998; TICE et al., 2000, BÜCKER et al., 2006; PAVÃO et al., 2007; SCHERER e STROHSCHOEN, 2013).

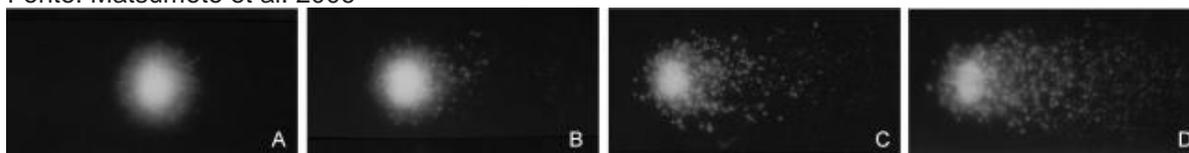
A aplicação do teste do cometa abrange uma ampla diversidade de áreas, incluindo a genética médica, a genética toxicológica e a ecotoxicológica, possibilitando, principalmente, a realização dos monitoramentos ambientais. A avaliação genotóxica, por meio do ensaio do cometa, é uma das principais metodologias para o monitoramento dos ambientes aquáticos, sendo empregado em diversos trabalhos sobre a qualidade de ecossistemas aquáticos brasileiros (CARITÁ, 2010; DUARTE, et al., 2012; YILDIZ et al., 2009; ARYA e MUKHERJEE, 2014; JOVTCHEV et al., 2001; NIKOLOVA et al., 2013).

No núcleo, o DNA enovela-se com proteínas histonas, formando alças de 5-200 Kpb que ficam aderidas a uma rede proteica, ou matriz nuclear, mantendo-se fortemente compactado (RIBEIRO et al., 2003). Uma das etapas dos processos do ensaio do cometa consiste em lisar as membranas das células e extrair essas proteínas nucleares, incluindo as histonas. Desta forma, o DNA, que é maior e mais pesado que o restante dos componentes celulares, passará a ocupar o espaço que antes era preenchido pela célula e formará uma estrutura residual semelhante a um núcleo, chamado de nucleóide.

Após essa etapa, a técnica consiste em submeter as lâminas a eletroforese, onde elas sofrem a passagem de corrente elétrica. Nessa fase, caso exista quebra na molécula de DNA, as alças se desenovelam e migram em sentido ao ânodo.

Quando mais intensa for a indução de quebras, menores serão os fragmentos e maior a extensão de migração, permitindo quantificar os danos causados nas células individuais e avaliar o potencial genotóxico de amostras (Figura 6).

Figura 6 - Ensaio do cometa realizada com eritrócitos *Oreochromis niloticus*. A- Classe 0 ( sem dano celular) ; B -Classe 1 (pequeno dano); C- Classe 2 ( dano médio ) e D- classe 3 (grande dano) .  
Fonte: Matsumoto et al. 2006



Outra peculiaridade do ensaio do cometa é que ele permite a detecção de danos no DNA entre diferentes células, em virtualmente qualquer população de célula eucarionte, possibilitando que diversos modelos sejam utilizados. Arya e Mukherjee (2014) relatam o sucesso de utilizar *Allium cepa* e *Vicia faba* para a realização do teste do cometa, assim como Souza e Fontanetti (2007) e Matsumoto et al. (2006) confirmaram a eficiência do ensaio em eritrócitos de peixe e em cultura de célula de mamífero *in vitro*.

Os testes supracitado são realizados há muito tempo. Em 1995 Monteith e Vanstone compararam os resultados obtidos por outras técnicas *in vivo* e *in vitro* para determinar o potencial genotóxicos de amostras ambientais e compostos isolados e inferiram que o teste do cometa é tão eficiente quanto os demais na detecção de danos no DNA (CARITA, 2010).

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – Objetivo Geral

Tendo em vista a problemática ambiental no entorno da bacia do rio Itapemirim-ES, como o lançamento inadequado de esgoto, de detritos sólidos e metais pesados no curso d' água, esse estudo teve como objetivo avaliar a qualidade de amostras de água em dois períodos, por meio de análises de parâmetros abióticos, fitotóxicos, citotóxicos, citogenéticos e moleculares, utilizando como bioensaios espécimes de *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e linhagens de células selvagens de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

#### 3.2 – Objetivos Específicos

- 1) Avaliar parâmetros físicos e químicos de amostras de águas coletadas em quatro estações ao longo do rio Itapemirim/ES, em dois períodos;
- 2) Verificar o efeito fitotóxico das amostras de água do rio Itapemirim/ES sobre as raízes de *A. cepa*;
- 3) Averiguar o potencial citotóxico de amostras de água por meio do índice mitóticos e viabilidade celular;
- 4) Detectar e identificar os diferentes tipos de aberrações mitóticas e anormalidades nucleares encontradas em células meristemáticas de *A. cepa* e eritrócitos de *O. niloticus*;
- 5) Investigar o potencial mutagênico de amostras de águas do rio Itapemirim/ES, por meio da presença de micronúcleo em células meristemáticas e células F1 de *Allium cepa* e em eritrócitos de *Oreochromis niloticus*;
- 6) Investigar o potencial genotóxico de amostras de águas do rio Itapemirim/ES por meio do ensaio do cometa em *O. niloticus* e células de ovário de hamster chinês (CHO-K1);
- 7) Estabelecer entre as campanhas a que apresenta os maiores níveis de contaminação.

## 4 – METODOLOGIA

### 4.1 - Material biológico

Os materiais biológicos utilizados como sistemas–teste constituíram-se de bulbos de *Allium cepa* (cebola), espécimes de *Oreochromis niloticus* (tilápia), sendo estes machos e com características homogêneas, adquiridos de estação de piscicultura livre de contaminação no Instituto Federal do Espírito Santo – Alegre (IFES) e linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

Para a realização do bioensaio com *O. niloticus* o projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Espírito Santo, sobre o protocolo número 16/2015.

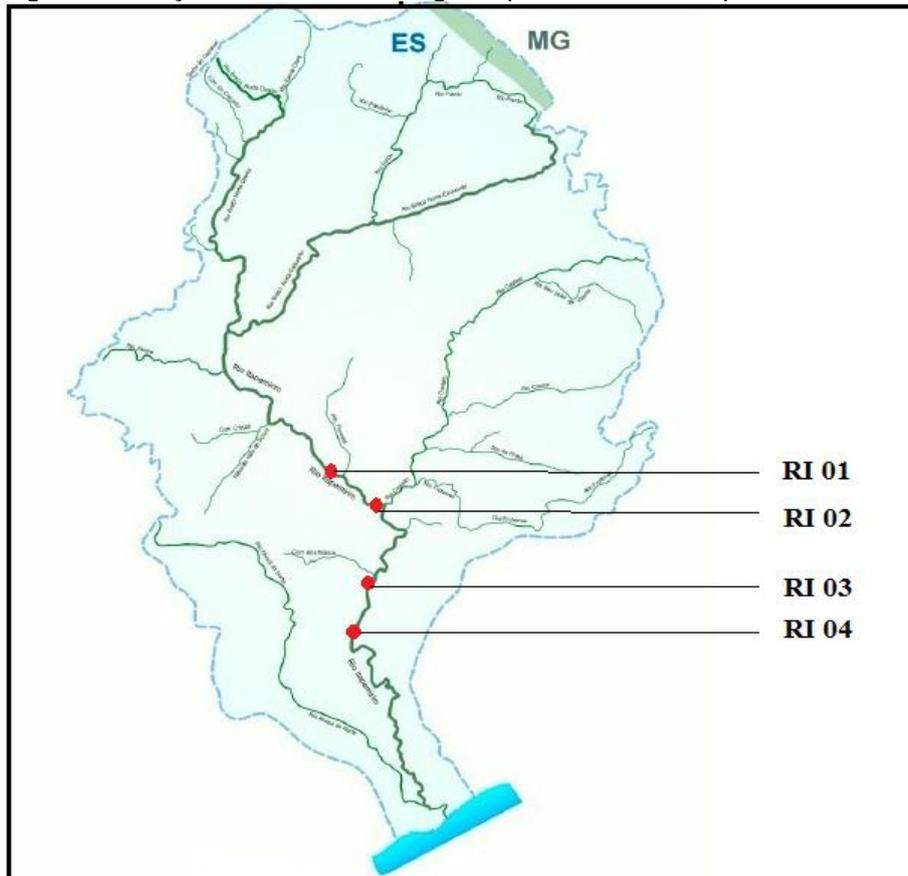
### 4.2 - Estações amostrais

Para a caracterização da água do rio Itapemirim/ES, foram definidas 4 estações amostrais ao longo do percurso do rio (Figura 7 e 8):

- \* RI 01 – Latitude 20°45'34.76"S e longitude 41°16'8.04"O.
- \* RI 02 – Latitude 20°47'55.81"S e longitude 41° 8'9.89"O.
- \* RI 03 – Latitude 20°53'11.13"S e longitude 41° 5'38.94"O.
- \* RI 04 – Latitude 20°55'6.13"S e longitude 41° 4'29.69"O.

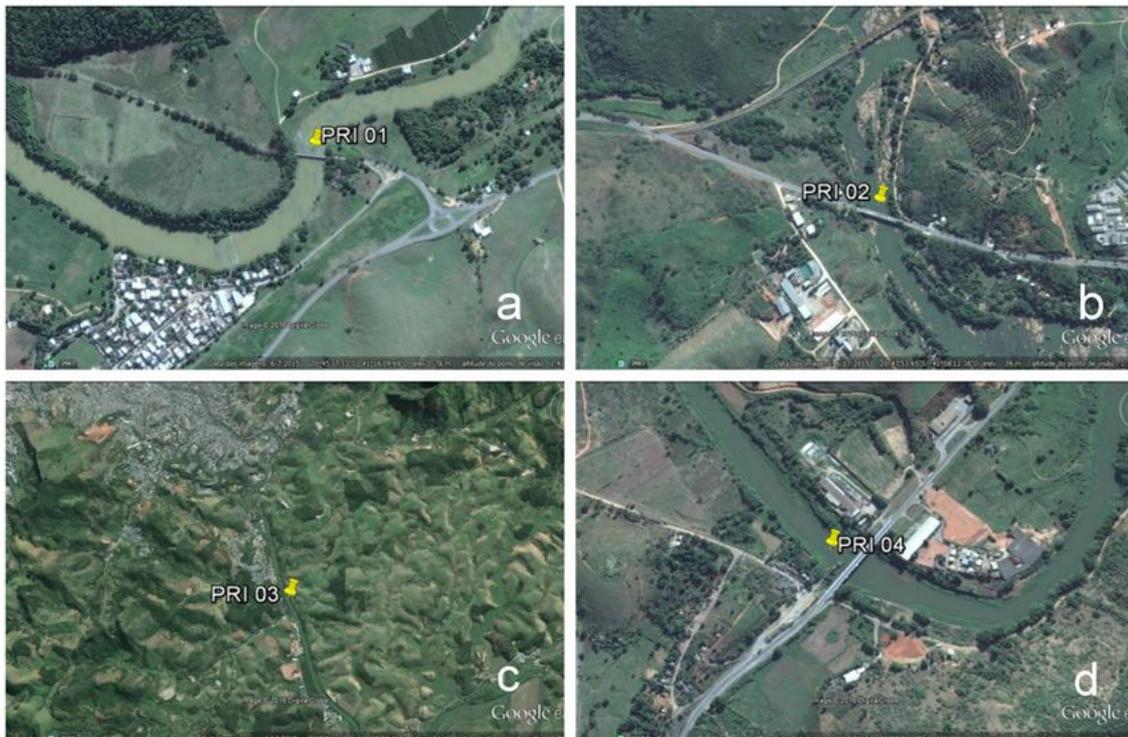
As coletas das amostras foram realizadas em duas campanhas, em março de 2015, considerado historicamente período de chuva e outra em outubro de 2015, historicamente período de estiagem. As águas superficiais foram acondicionadas em frascos polietileno de 500ml e galões de polietileno de 25L mantidos sob refrigeração até a realização dos ensaios. Os frascos destinados à análise de metais foram previamente higienizados com ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 10%, e na coleta foram adicionados 5 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado em 500 ml de amostra.

Figura 7- Estações amostrais ao longo do percurso do rio Itapemirim/ES.



Fonte: PASTRO, 2012.

Figura 8- Estações de coleta ao longo rio Itapemirim/ES. a) RI 01, b) RI 02, c) RI 03 e d) RI 04.



Fonte: Google Earth

### 4.3 - Parâmetros físicos e químicos

No momento da coleta e nos dias de exposição do *Oreochromis niloticus* aos tratamentos foram verificados de cada estação a condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH da água por meio do multiparâmetro e oxigênio dissolvido ( $\text{mg}/\text{L}$ ) por meio do oxímetro.

As análises de metais foram realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), em aparelho 7000, DV Perkin Elmer, em parceria com o Laboratório de Espectrometria Atômica, da Universidade Federal do Espírito Santo, onde foram quantificados os metais ( $\text{mg}/\text{L}$ ): Alumínio (Al); Bário (Ba), Cromo (Cr); Cobre (Cu); Níquel (Ni); Selênio (Se) e Zinco (Zn). E em Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP MS), aparelho Nexlon, Perkin Elmer, onde os metais quantificados ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) foram: Cádmio (Cd); Cobalto (Co); Manganês (Mn) e Chumbo (Pb).

### 4.4 - Bioensaios com *Allium cepa*

Os testes de *A. cepa* foram realizados para avaliar o efeito da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das amostras de água em diferentes estações. Para tal, foi utilizado o protocolo de Fiskesjö (1985), com modificações.

Bulbos de *A. cepa* apresentando 2 cm de diâmetro foram previamente selecionados, padronizando-se os bulbos que apresentavam ausência de traumas, deformidades naturais ou indícios de fungos. As raízes envelhecidas foram cuidadosamente removidas, tomando-se o cuidado de manter intacto o anel de primórdios radiculares. Os bulbos foram lavados em água corrente e mantidos imersos em água para evitar a desidratação dos primórdios radiculares até a exposição.

Subsequentemente, 5 bulbos por tratamento foram acondicionados em tubos de ensaio contendo amostras de água coletadas das estações RI01, RI02, RI03 e RI04, e dos controles positivo (solução de metil-metanosulfonato,  $4 \times 10^{-4}$  mM) e negativo (água destilada).

Toda a exposição foi realizada em temperatura de  $24^{\circ}\text{C}$  e protegida da incidência direta da luz do sol. Os tubos de ensaio foram, diariamente, completados

com água das respectivas amostras para restabelecer o volume perdido por absorção e/ou evaporação.

#### 4.4.1 - Crescimento radicular e análise citogenética

Após 72h de exposição, as raízes dos bulbos de cebola foram observadas e medidas com auxílio de paquímetro para a análise do comprimento radicular. Posteriormente, as raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por, no mínimo, 24 horas. As células meristemáticas e as células em F1 passaram por hidrólise ácida em HCl 1N à 60°C, por 8 minutos, e depois foram submetidas ao método de coloração de Feulgen (Feulgen e Rossenbeck, 1924). As lâminas foram confeccionadas pelo método de esmagamento suave. Para cada tratamento, 5 lâminas foram analisadas. A citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM), onde foi contabilizado o número de células em prófase, metáfase, anáfase e telófase dividido pelo número total de células observadas em cada tratamento, multiplicado por 100.

$$IM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células em divisão}}{\text{N}^\circ \text{ de células observadas}} \times 100$$

As frequências das alterações mitóticas (AM) e de micronúcleo (MN) foram obtidas dividindo o número de alteração (mitótica ou micronúcleo, respectivamente) pelo número total de células avaliadas vezes 100. As alterações cromossômicas consideradas foram: c-metáfase, cromossomo pegajoso, ponte, perda cromossômica e anáfase multipolar.

$$AM = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células com alterações mitóticas}}{\text{N}^\circ \text{ de células observadas}} \times 100$$

$$MN = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células micronucleadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células observadas}} \times 100$$

O efeito mutagênico observado nas células em F1 foi contabilizado dividindo o número de células em F1 com micronúcleo dividido pelo número de célula observada vezes 100.

$$MN \text{ F1} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células F1 micronucleadas}}{\text{N}^\circ \text{ de células observadas}} \times 100$$

#### **4.5 - Bioensaios com *Oreochromis niloticus***

Espécimes de *O. niloticus* inicialmente foram aclimatados em sistema de filtragem e aeração por 24 horas. Os grupos experimentais foram dispostos em seis aquários contendo 25L de água cada com sistema de aeração. Em cada tratamento foram acondicionados 15 peixes. Quatro destes aquários receberam as amostras de água das estações definidas anteriormente e os outros dois corresponderam, respectivamente, ao controle positivo e negativo que receberam água potável desclorificada. Para o controle positivo, foi aplicado no início do tratamento 0,1 ml de ciclofosfamida (concentração de 2 mg/ml) na região intraperitoneal dos peixes.

Após 96 horas de exposição, 10 peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína na concentração de 80 mg/L. De cada espécie, foram extraídos aproximadamente 0,5 ml de sangue da região caudal, utilizando seringas heparinizadas.

Durante a execução do experimento, foi monitorado a cada 24 horas a mortalidade dos peixes, a condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), pH e oxigênio dissolvido (mg/L) dos tratamentos por meio de multiparâmetro e de oxímetro, respectivamente, afim de se manter as mesmas condições experimentais durante o tempo de exposição. Os peixes sacrificados e os que, por ventura, morreram durante a execução do experimento foram congelados em embalagens adequadas e recolhidos pela empresa que coleta o descarte de material biológico mensalmente no Centro de Ciências Agrárias (CCA-UFES).

##### **4.5.1 Teste do micronúcleo**

Para a análise do potencial mutagênico, foram confeccionadas duas lâminas de cada peixe por meio da técnica de esfregaço sanguíneo dos diferentes tratamentos. Em seguida, as lâminas foram submetidas à coloração com corante rápido do tipo panótico e analisadas sob microscópio de luz.

Foram analisados 3000 eritrócitos por lâmina, totalizando 30 mil eritrócitos por tratamento. Para determinar o índice de frequência mutagênica (IEM), foi calculada a razão entre a soma dos eritrócitos micronucleados pelo total de eritrócitos analisados em cada lâmina, e o resultado multiplicado por 100.

$$\text{IEM} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de eritrócitos micronucleados}}{\text{N}^\circ \text{ de eritrócitos observados}} \times 100$$

Células portadoras de alterações nucleares, classificadas de acordo com Carrasco et al. (1990) como “blebbed”, “lobed”, “notched”, foram analisadas para determinar o índice de anormalidades nucleares (IAN) das amostras de água. O IAN foi calculado por meio da razão entre a soma dos eritrócitos com anormalidades na morfologia dos núcleos pelo número total de eritrócitos, multiplicando-se o resultado por 100.

$$\text{IAN} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de eritrócitos com anormalidades}}{\text{N}^\circ \text{ de eritrócitos observados}} \times 100$$

## **4.6 -Cultura celular**

### **4.6.1 - Linhagem celular e condições de cultivo de células CHO-K1**

Para a realização do ensaio foi utilizado linhagem de células de ovário de Hamster chinês (CHO-K1). As células foram cultivadas em meio contendo DMEN + HAM-F12 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (meio completo), sendo mantidas em frascos de cultura (25cm<sup>2</sup>) na forma de monocamada. Os frascos foram mantidos em estufa tipo BOD à temperatura de 37°C possibilitando o ciclo celular de 12 horas.

### **4.6.2 - Ensaio citotóxico do MTT**

A metodologia adotada foi baseada em Mosmann (1983). Primeiramente, foram semeadas 1x10<sup>5</sup> células CHO-K1 em placas de 96 poços, conteúdo meio F12/DMEN suplementado com 10% de soro bovino fetal e posteriormente mantidas em estufa BOD a 37°C por um período de 12 horas para a estabilização. Após este período, descartou-se o meio completo de cada poço da placa e realizou-se os tratamentos descritos abaixo:

Controle Negativo	150 µl meio incompleto + 50µl PBS
Controle Positivo	150 µl meio incompleto + 50µl MMS ( $4 \times 10^{-4}$ )
RI 01	150 µl meio incompleto + 50µl RI 01
RI 02	150 µl meio incompleto + 50µl RI 02
RI 03	150 µl meio incompleto + 50µl RI 03
RI 04	150 µl meio incompleto + 50µl RI 04

Após os tratamentos, as placas de 96 poços foram incubadas na estufa por mais 12 horas. Posteriormente, os tratamentos foram removidos e adicionou-se 100 µl de solução de MTT (5,0 mg/ml diluído em meio incompleto) para incubação por 4 horas. Passado esse tempo, a solução de MTT foi aspirada e adicionado 200 µl de DMSO para a solubilização dos cristais de formazan. Logo após, foi realizada leitura em espectrofotômetro, tipo Elisa, a 550 nm. O experimento foi repetido três vezes de forma independente.

#### **4.7- Ensaio do cometa**

##### **4.7.1 – Suspensão celular – *Oreochromis niloticus***

A metodologia utilizada foi a técnica alcalina descrita por Singh et al. (1988) e modificada por Duarte et al. (2012). Para tal, lâminas foram mergulhadas em agarose normal 1,5% a 60°C, secas e armazenadas em geladeira. Amostras de 5 µl de sangue, foram diluídas em 1000 µl de solução tampão (PBS). Desta suspensão, 10 µl foram adicionados a 100 µl de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%) a 37°C para a montagem das lâminas. Após depositar essa mistura às lâminas, foi adicionada uma lamínula sobre cada lâmina e as mesmas foram refrigeradas por 20 minutos para a solidificação do gel.

##### **4.7.2– Suspensão celular e teste de viabilidade - Cultura de células CHO-K1**

A metodologia utilizada foi de acordo com Tice et al. (2000), com modificações. Foram semeadas aproximadamente  $1 \times 10^5$  de célula em frascos de culturas e montadas três repetições para cada tratamento, totalizando 18 frascos. Depois de semeadas, as células foram cultivadas em meio completo por 12 horas.

Decorrido o período de estabilização das células, o meio de cultivo celular foi retirado e as células lavadas com PBS. Foram adicionados 3750 µl de meio incompleto em todos os frascos e em seguida, realizados os tratamentos que consistiram em acrescentar aos frascos 1250 µl de: PBS (controle negativo), metilmetanosulfonato (MMS) na concentração  $4 \times 10^{-4}$  mM (controle positivo) e amostras dos quatro estações ao longo do rio Itapemirim-ES (PRI01, PRI02, PRI03 e PRI04).

Posterior ao tratamento, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas (0,025%) e levadas para a estufa tipo BOD, por 3 minutos. Após as células se desprenderem, foi adicionado meio de cultura completo para inativação da tripsina, seguido de transferência para tubos falcon de 15 ml. Os tubos foram centrifugados a 1000 r.p.m. por 5 minutos, o sobrenadante descartado mantendo-se 0,5 ml de solução para solubilização do pellet.

O preparo das lâminas consistiu da mistura de 20 µl de alíquota da suspensão celular com 120 µl de agarose de baixo ponto de fusão (37°C).

Para a realização do ensaio do cometa, foi executado testes de viabilidade celular. Estes consistiram em misturar 10 µl de suspensão celular com 10 µl de azul de Tripán (0,4%). Após isso, 10 µl de solução foram transferidos para câmara de Neubauer para a quantificação de células viáveis (incolor) e inviáveis (coradas de azul), até totalizar 100 células. Como todos os tratamentos apresentaram viabilidade superior a 90%, deu-se continuidade ao ensaio do cometa.

#### **4.7.3 – A Técnica**

Posteriormente à confecção das lâminas dos bioensaios com *O. niloticus* e células CHO-K1, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em uma solução de lise, gelada, recém preparada (1 ml Triton X-100, 20 ml de DMSO e 89 ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 146,1 g de NaCl 2,5M, 37,2g de EDTA-titriplex 100 mM, 1,2 g de Tris 10 mM e 890 ml de água deionizada). Dessa forma, foram armazenadas por uma hora, sob proteção contra luz e em baixa temperatura.

Ao término da lise, as lâminas foram transferidas para uma cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino (7,5 ml de EDTA-titriplex 200 mM, 45 ml de NaOH 10N e 1500 ml de água deionizada, pH  $\approx$  13) em baixa temperatura. Na cuba, as lâminas permaneceram 20 minutos no escuro para desnaturação do material

antes do início da corrida de eletroforese, que ocorreu por mais 20 minutos. Encerrada a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, secas em temperatura ambiente e posteriormente, fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. Os passos realizados acima foram executados na ausência de luz direta.

As lâminas foram coradas com GelRed e analisados em microscópio de fluorescência em aumento de 400X. Foram avaliados 100 nucleóides, totalizando 500 nucleóides por tratamento em *O. niloticus* e 300 em cultura de CHO-K1. Para a quantificação dos danos, foi utilizada a classificação visual dos cometas/nucleóides proposta por Collins et al. (1995) e calculado o  $ID_{(ua)}$  conforme a fórmula:

$$ID = (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD) + (4xE)$$

onde:

- A – classe 0 = sem danos;
- B – classe 1= danos mínimos;
- C – classe 2= danos médios;
- D – classe 3= danos intensos;
- E – classe 4= danos máximos.

#### 4.8 - Análise Estatística

Os dados avaliados em *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de célula de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A partir do programa Infostat (DiRienzo et al. 2010), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ) a fim de comparar as médias obtidas de cada parâmetro avaliado entre os controles e as amostras de água estudadas. Já para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Scott Knott ( $P < 0,05$ ), com a mesma finalidade.

Por meio do programa Graph-Pad Prism 7.0 (Trial version) foi comparado os dados entre as duas campanhas realizadas, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn's ( $P < 0,05$ ).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. M. Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). **Tese** – (Genética), Universidade Federal de Pernambuco, 133 f., 2014.
- AGÊNCIA Estadual de Recursos Hídricos. **História**. Disponível em: < <http://agerh.es.gov.br/quem-somos>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2016.
- AGÊNCIA Nacional de Águas (Brasil). **Panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil** / Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. - Brasília: ANA, SPR, 2005.
- AL-SABTI, K.; METCALFE, C.D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, Amsterdam, v.343, p.121-135, 1995.
- ALVES, L. M. C. Qualidade da água de múltiplos usos na microrregião de Itapecuru-Mirim-MA. **Tese** – Medicina Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, 2010.
- ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L.C. Cytogenetic alterations induced by SPL (Spent Pot Liner) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego. In Press. Doi:10.1016/j.ecoenv. 18 fev. 2008.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Linner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n. 73, p.626-631, 25 jan. 2010.
- ARYA, S. K.; MUKHERJEE, A. Sensitivity of *Allium cepa* and *Vicia faba* towards cadmium toxicity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 14 (2), 447-458, 2014.
- BABICH, H.; SEGALL, M.A.; FOX, K.D. The Allium test - a simple, eukaryotegenotoxicity assay. **The American Biology Teacher**, Reston, v. 59, n. 9, p. 580-583, nov.-dec. 1997.
- BAIRD, C.; **Química Ambiental**, 2a ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
- BAPTISTA, M.; CARDOSO, A. Rios e Cidades: uma longa e sinuosa história... **Rev. UFMG**, Belo Horizonte, v. 20, n.2, p. 124-153, jul./dez. 2013.
- BELLAN, D. L. Avaliação “*in vitro*” da atividade antitumoral de polissacarídeo obtido da espécie *Lentinus edodes*. **Monografia** - Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2013.
- BERNADES, P. M. Prospecção de toxicidade de fungicidas por análises macroscópicas, microscópicas e moleculares em *Allium cepa*. **Dissertação** – Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

BIANCHI, E.; GOLDONI, A.; TRINTINAGLIA, L.; LESSING, G.; SILVA, C. E. M.; NASCIMENTO, C. A.; ZIULKOSKI, A.L.; SPILKI, F.R.; SILVA, L.B. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. **Braz. J. Biol.** Vol. 75, no. 2 (suppl.), p. S68-S74, 2015.

BOER, J.; HOEIJMAKERS, H. Nucleotide excision repair and human syndromes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, pp. 453-460, 2000.

BORGES, M. J; GALBIATI, J. A; FERRAUDO, A. S. Monitoramento da qualidade hídrica e eficiência de interceptores de esgoto em cursos d'água urbanos da bacia hidrográfica do córrego Jaboticabal. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 8, n. 2, p. 161-171, abr./jun., 2003.

BRAGA, J. R. M.; LOPES, D. M. Citotoxicidade e genotoxicidade da água do rio Subaé (Humildes, Bahia, Brasil) usando *Allium cepa* L. como bioindicador. **Revista Ambiente & Água**. v. 10, n. 1, Taubaté, Jan./Mar., 2015.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal**: da era clássica à molecular. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2007. 9p. html. (Embrapa Trigo. Documentos Online, 85). Disponível em: [http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p\\_do85.pdf](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do85.pdf).

BRASIL - Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº357**. Diário Oficial da União de 18/03/2005. Brasília, 2005.

BRASIL - Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA nº396**. Diário Oficial da União de 07/04/2008. Brasília, 2008.

BRASIL. Constituição (1988). **Constituição da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF: Senado Federal: Centro Gráfico, 1988. 292 p.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional do Meio Ambiente II PNMA II - Fase 2**, 2009 – 2014. Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde**, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 112 p., 2014.

BRANDÃO, C. A. Remoção de cromo (IV) e carbono orgânico total em biorreatores hídricos sequenciais. **Dissertação** – Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

BRAVO, Carlos Magno Rodrigues. **O Alegre até o ano de 1920**: fatos e biografias. Alegre, ES: Prefeitura Municipal de Alegre, 1998.

BRITO, L. O. LUZ, L. D. Avaliação e monitoramento da qualidade das águas: usando análises moleculares. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais (GESTA)**. v. 3, n. 2, p. 76-90, 2015.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.

BUGIN, A.; DARUY, M. V.; JOHN, A. A.; LAPORTE, G. A. Relatório trimestral de monitoramento limnológico e da qualidade das águas superficiais – pós-enchimento. Programa de Monitoramento Limnológico e de Qualidade da Água. **ABG Engenharia e Meio Ambiente**, 2011.

CAMDESSUS, M.; BADRÉ, B.; CHÉRET, I. et al. **Água: oito milhões de mortos por ano: um escândalo mundial**; Rio de Janeiro: Bertrand, Brasil, 2005, 271p.

CAMPOS, J. M. S.; VICCINI, L. F.; ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; RODRIGUES G. S. Chapter 5: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. In: **Narwal t al. (eds.), Plant Bioassays, Studium Press, Houston, Texas**. pp. 81-96, 2008.

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

CARITÁ, R. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes - SP. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências Unesp, Rio Claro, São Paulo, 2010.

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

CARRASCO, R.K., TILBURY, K.L. and MYERS, M. Assessment of piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.47, p.2123-2136, 1990.

CASTRO, S. V. Efeitos de metais pesados presentes na água sobre a estrutura das comunidades bentônicas do alto rio das Velhas-MG. **Dissertação** - Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.

CÉLICO, A. S. Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças. **Dissertação** - Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 2015

CETESB – Companhia Ambiental de São Paulo. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2011**. São Paulo: CETESB, 2011.

COMITÊS de Bacias Hidrográficas. O que é um CBH?. Disponível em:<  
<http://www.cbh.gov.br/GestaoComites.aspx>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2016.

COSTA, A. C.; DOMINGUES, G.; DÜSMAN, E.; ALMEIDA, I. V.; VICENTINI, V. L. P. Citotoxicidade das águas do rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 248-258, Jan./Feb., 2015.

ÇAVAS, T. ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. **Aquatic toxicology**, v.74, p.264- 271, 2005.

DOURADO, P. L. R. Biomonitoramento da qualidade de água superficial em áreas agroindustriais no Mato Grosso do Sul. **Dissertação** (Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade De Federal da Grande Dourados, Dourados/MS, p. 146, 2014.

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

DUTKA, B. J. Short-term root elongation toxicity bioassay methods for toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments. **National Water Research Institute (NWRI)**, 1989.

ESPÍRITO SANTO (Estado). Disponível em:<  
<https://www.hitpages.com/doc/5276646764445696/3#pageTop>>. Acesso em: 26 de abril de 2016.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

FARIAS, Y. M. M. Biossorção de metais pesados pelo fungo *Penicillium corylophilum*. **Dissertação** - Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

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, 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**, New York, v.72, p.1680-1686, 2009.

FERRAZ, Manoel P. **Alegre, a terra e o povo**. Alegre: Jornal mensagem, 1986.

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

FIORRUCI, A. R.; BENEDETTI-FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química Nova na Escola**, N° 22, p. 10-22, 2005.

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

KLIGERMAN, Débora Cynamon. Gestão Ambiental Integrada: Recursos Hídricos, Saneamento e Saúde. **Tese** (Doutorado) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 314 f, 2001.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, set./dez. 2008.

GOMES, M. V. T.; SATO, Y. Avaliação da contaminação por metais pesados em peixes do Rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias, Minas Gerais, Brasil. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 6, n. 1, p. 24-30, 2011.

GOPALAN, H.N.B. Ecosystem health and human wellbeing: the mission of the international programme plant bioassays. **Mutation Research**, v.426, p.99–102, 1999.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation Research**, Leiden, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassay for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n.2, p. 175-185, Oct. 1994.

GROVER, I. S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by *Allium* root anaphases aberrations and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 426, p. 183 – 188, 1999.

HARA, R. V. Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia E Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia – SP. **Dissertação** (Instituto de Biociências), Universidade Estadual Paulista, p. 170, 2012.

HOSHINA, M.M. Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro – município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa*. **Trabalho de conclusão** (Bacharel em Licenciatura – Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 52 p., 2002.

IBGE. **Censo Demográfico 2010**: Características urbanísticas do entorno dos domicílios: Domicílios particulares permanentes em áreas urbanas com ordenamento regular, por forma de abastecimento de água e existência e característica de entorno -Rede geral de distribuição-Pavimentação existe. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/comparamun/compara.php?lang=&coduf=32&idtema=89&codv=v23&search=espírito-santo|juna|síntese-das-informações->>>. Acesso em 22 de janeiro de 2016.

IEMA. **Região Hidrográfica do Rio Itapemirim**. Disponível em: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/default.asp>> Acessado em novembro de 2015.

JOVTCHEV, G.; MENKE, M.; SCHUBERT, I. The comet assay detects adaptation to MNU-induced DNA damage in barley. **Mutation Research**. 493, 95–100, 2001.

JUSTUS, C. M. Monitoramento de parâmetros físicos de águas superficiais da microbacia hidrográfica do Rio São Pedro em Faxinal – PR. **Monografia de especialização** - Geociências, Universidade Estadual de Londrina, 2012.

KERN, D. I. Avaliação da eficiência da ozonização fotocatalítica no tratamento de efluentes de lavanderia hospitalar, por meio de ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos. **Dissertação** - Gestão e Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2012.

KOSZ-VNENCHAK, M.; ROKOSZ, ROKOSZ, K. The comet assay for detection of potential genotoxicity of polluted water. **Folia biologica, Praha**, v.45, n.3-4, p.153-156, 1997.

LEME, D.M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v.88, n. 4, p. 214–219, 2008.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water – a case study. **Mutation Research**, Amsterdam, 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., p.71-81, 22 jul. 2009.

LEMOS, C.T., RÖDEL, P.M., TERRA, N.R., OLIVEIRA, N.C.D., ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using the micronucleus assay in fish erythrocytes, **Ecotox. Environ. Saf.** 66, 391–401, 2007.

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

LIMA, D. P. Avaliação da contaminação por metais pesados na água e nos peixes da bacia do rio Cassiporé, Estado do Amapá, Amazônia, Brasil. **Dissertação** – Biodiversidade Tropical, Universidade federal do Amapá, 2013.

LÚCIO NETO, M. P., **Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina-2,4-diona em células eucarióticas.** UFPI, Teresina, 2011.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Revista Ambiental Água**, vol. 10 n. 1 Taubaté – Jan. / Mar, 2015.

MACEDO, J. F. M. SILVA, M. S. BATISTA, N.J.C. UCHOA, V.T. ALVES, W.S. Estudo da genotoxicidade do extrato de *Abelmoschus esculentus* (quiabo) pelo teste *Allium cepa*. **Revista Saúde em Foco**, Teresina, v. 1, n. 1, art. 2, p. 15-28, 2014.

MACHADO, A. T. avaliação do potencial mutagênico do efluente do terminal petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório – RS – Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa*. **Monografia** – Gestão Ambiental Marinha e Costeira, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO-FILHO, A.S. (2008). A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis** 12(3): 355-381, 2008.

MALAQUIAS, A.C. Exposição a concentração subletal de metilmercúrio: genotoxicidade e alterações na proliferação celular. **Dissertação** (Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, p. 79, 2015.

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

MAFFAZZIOLI, T. F. Eficiência de ensaios ecotoxicológicos na detecção de toxicidade em efluentes de refinaria de petróleo. **Dissertação** – Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2011.

MANSOURI, B.; EBRAHIMPOUR, M.; BABAEI, H. Bioaccumulation and elimination of nickel in the organs of black fish (*Capoeta fusca*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 4, p. 361-368, 2012.

MAZZEO, D. E. C. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do btex, antes e após o processo de biorremediação por microrganismos, utilizando os sistemas teste de *Allium cepa* e cultura de células de mamífero. **Dissertação** -

Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Universidade Estadual Paulista, 2009.

MITCHELMORE, C.L. CHIPMAN, J.K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v.339, p.135-147, 1998.

MONTEITH, D.K.; VANSTONE, J. Comparison of the microgel eletrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of the DNA damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.345, n.3, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 65, 55-63, 1983.

MORTIMER, M. R. Pesticide and trace metal concentration in Queensland Estuarine Crabs. **Marine Pollution Bulletin** 41, p. 7-12, 2000.

NAME, L.; MONTEZUMA, R. C. M.; GOMES, E. S. **Legislação Urbanística e Produção de Riscos**: O caso de PEU das Vargens, Rio de Janeiro. *Territorium* 18, 201-218, 2011.

NATARAJAN, A.T. Chromosome Aberrations: past, present and future, **Mutation Research**, 504, 3-16, 2002.

NIKOLOVA, I.; GEORGIEVA, M.; STOILOV, L.; KATEROVA, Z.; TODOROVA, D. Optimization of Neutral Comet Assay for studying DNA double-strand breaks in pea and wheat. **J. BioSci. Biotech.** 2(3): 151-157, 2013.

OLIVEIRA, G. L. S. Avaliação da toxicidade de efluente kraft após tratamento por processos oxidativos avançados. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Tecnólogo em Processos Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2010.

OSHIRO, A. N., MARTINS, C. Estudo da qualidade da água do Ribeirão Guaratinguetá. **Monografia** - Engenharia Civil, Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, 2011.

PALMIEIRI, M.J., Análise Comparativa do Efeito Citotóxico do SPL e seus Principais Componentes Fracionais, **Dissertação** (Mestrado – Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG, 2012.

PASTRO, M. S.; 2012. ESTABELECIMENTO DE DIRETRIZES PARA UM PROGRAMA DE MANEJO DE NASCENTES NA BACIA DO RIO ITAPEMIRIM – ES. **Monografia** (Trabalho de conclusão de curso - Engenharia Florestal) Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, Rio de Janeiro.

PAULA, M. Inimigo invisível: metais pesados e a saúde humana. **Tchê-Química**, v. 3, n. 6, p. 37-44, 2006.

PAVÃO, P. R. G. et al. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.** São Paulo, Jan./Mar. v. 21, n. 1, p. 5-10, 2007.

PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. H.; MOCELIN, A. J.; TUTIDA, L. A.; FAVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. **J Bras Nefrol.** 30/1:48-53, 2008.

PARRON, L. M. MUNIZ, D. H. F. Manual de procedimentos de amostragem e análise físico-química de água. Colombo: **Embrapa Florestas**, 2011.

PIRES, E. C., CHAPARRO, T. R. Toxicity evaluation as a tool to assess the performance of an anaerobic immobilized biomass reactor. **Dyna rev.fac.nac.minas**, Medellín, v.77, n.164, p.284-391, Oct./Dec. 2010.

PIZZAIA, D. Genotoxicidade do cádmio em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). **Tese** – Genética e Melhoramento, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

PREFEITURA de Cachoeiro de Itapemirim. **História da Cidade**. Disponível em:< [http://www.cachoeiro.es.gov.br/site1.php?pag\\_site=CIDADE&subPagina=CIDADE&id1=4HISTOR](http://www.cachoeiro.es.gov.br/site1.php?pag_site=CIDADE&subPagina=CIDADE&id1=4HISTOR)> Acesso em: 17 de janeiro de 2016.

RADIĆ, S.; STIPANIČEV, D.; VUJČIĆ, V.; RAJČIĆ, M. M.; ŠIRAC, S. PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test. **Science of the Total Environment** 408, 1228–1233, 2010.

RAMSDORF, W. Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B e A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Angüiri – UFPR). **Dissertação** – Genética, Universidade Federal do Paraná, 2007.

RIBEIRO, I. O.; BARBOSA, B.; BALIEIRO, F. P.; BEIJO, L. A.; SANTOS, B. R.; GOUVEA, C. M. C. P.; PAIVA, L. V. Fitotoxicidade de extratos foliares de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] em bioensaio com alface. **Revista Brasileira de Biociência**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 220-225, abr./jun. 2012.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª edição, 2003.

ROCHA, C. H. B.; SOUZA, J. H. Análise ambiental do processo de extração e beneficiamento de rochas ornamentais com vistas a uma produção mais limpa: aplicação Cachoeiro de Itapemirim – ES. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, vol.6, n.9, 2010.

ROSA, T. B. C. Estudo da eficiência das lâmpadas UV para tratamento de água contaminada por bactérias termotolerantes. **Frutal-Prospectiva**, 128p., 2015.

RUSSEL, P. J. Chromosomal Mutation. In: CUMMINGS, B. (Ed). **Genetics**, Pearson Education Inc, p. 595-621, 2002.

SANTANA, N. R. F.; MARTINS, A. K. S.; SANTOS, F. A. S. As Nascentes e os Nossos Rios: Importância De Levantar Dados Sobre Este Recurso Em Zona Rural. In: **II simposio regional de desenvolvimento rural**, Aracaju. Novas ruralidades e políticas públicas para a agricultura. Aracaju: GEPRU-NPGEO/UFS, 2012.

SANTILLI, J. F. R. A política nacional de recursos hídricos (Lei 9.433/97) e sua implementação no Distrito Federal. In: **Revista da Fundação Escola Superior do Ministério Público do Distrito Federal e Territórios**, Brasília, Ano 9, V. 17, p. 144 – 179, jan./jun. 2001.

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

SANTOS, N. O. Depuração acelerada de rios poluídos usando peróxido de hidrogênio. **Dissertação** – Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos, Pontifícia Universidade Católica, 2015.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, Vol. 5, N. 3, 2013.

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

SILVA, A. E. P.; MOURA, J. W.M.; NETO, M. P. L. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica da *turnera Ulmifolia* L. (Chanana) em células eucarióticas. **Revista Saúde em foco**, Teresina, v. 2, n. 1, art. 3, p. 25-48, jan./jul., 2015.

SILVA, A. M. Avaliação da qualidade do rio São Lourenço, SP, sob influência de estações de tratamento de água e estações de tratamento de esgoto. 176 f. **Tese** – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2008.

SILVA, G. M. F. Zoneamento urbano e qualidade hídrica: monitoramento de alguns parâmetros físico-químicos das águas superficiais da zona urbana de Londrina – PR. **Monografia** – Geografia, Universidade Estadual de Londrina, 2012.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; Genética Toxicologia. Porto Alegre, **Alcance**. 422p, 2003.

SILVA, J. F. Estudos etnopedológicos em neossolos sob diferentes usos agrícolas no assentamento Santa Agostinha, RN. **Dissertação** - Manejo de Solo e Água, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, 2015.

SILVA, K. C. Qualidade da água ao longo do rio Capivara no município de Botucatu – SP. 70f. **Dissertação** – Agronomia (Irrigação e Drenagem), Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP – Campus de Botucatu, 2007.

SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. and SCHNEIDER, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, n.1, p.184-191. 1988.

SOUSA, C.C. PADULA, L. SILVA, L. F. IRAZUSTA, S. P. Validação dos Bioensaios de Toxicidade como Adjuvantes no Monitoramento de Efluentes para Descarte. **Ecotoxicol. Environ. Contam**, v. 8, n. 2, 2013.

SOUZA, J. G. Análise ambiental do processo de extração e beneficiamento de rochas ornamentais com vistas a uma produção mais limpa: aplicação em Cachoeiro de Itapemirim – ES. **Trabalho de Conclusão de Curso** - Análise Ambiental, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2007.

SOUZA, L. L. Avaliação in vivo e in vitro do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da água e do sedimento do rio Corumbataí – São Paulo, Brasil. **Dissertação** - Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 2014.

SOUZA, T. S. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do rio paraíba do sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo, utilizando *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) como organismo-teste. **Dissertação** - Ciências Biológicas, Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2005.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S. **Ensaio do cometa para avaliação da qualidade das águas do rio Paraíba do Sul, numa área sob influência de uma refinaria de petróleo**. Universidade Estadual Paulista – UNESP. 2007.

SOUZA, S. A. M. **Biotestes na Avaliação da Fitotoxicidade de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais Nativas do Rio Grande do Sul**. 2005. 89f. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas). Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS. 2005.

TICE R. R.; AGURELL E.; ANDERSON D.; BURLINSON B.; HARTMANN A.; KOBAYASHI H.; MIYAMAE Y.; ROJAS E.; RYU J. C.; SASAKI Y. F. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen**; 35: 206-21, 2000.

TRINTINAGLIA, L.; BIANCHI, E.; SILVA, L. B.; NASCIMENTO, C. A.; SPILKI, F. R.; ZIULKOSKI, A.L. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinô River basin. **Braz. J. Biol.** Vol. 75, no. 2 (suppl.), p. S75-S80, 2015.

TUCCI, C. A. M., HESPANHOL, I., NETTO, O. M. C. **“Gestão da Água no Brasil”**. Brasília: Unesco, 2001.

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

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Food privation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 199, p. 2467-2475, 1996.

VOIGHT, C. L.; SILVA, C. P.; CAMPOS, S. X. Avaliação da bioacumulação de metais em *Cyprinus carpio* pela interação com sedimento e água de reservatório. **Química Nova**, Vol. 39, No. 2, 180-188, 2016.

YILDIZ, M.; CIG̃ERCI, I. H.; KONUK, M.; FIDAN, A. F.; TERZI, H. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, 75, 934–938, 2009.

YOUNG, B. J. et al. Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 76, p. 182-186, 2012.

## 6 – RESULTADOS

### Artigo 1

Após tradução este artigo será submetido à revista “Environmental Science and Pollution Research”.

ISSN: 0944-1344 (versão para impressão)

ISSN: 1614-7499 (versão eletrônica)

Autores: Iasmini Nicoli Galter<sup>a</sup>, Ian Drumond Duarte<sup>b</sup>, Maressa Malini<sup>b</sup>, Francielen Barroso Aragão<sup>b</sup>, Ian de Oliveira Martins<sup>b</sup>, Maria Tereza Weitzel Dias Carneiro Lima<sup>c</sup>, Kamila Soares do Espírito Santo<sup>c</sup>, José Augusto de Oliveira David<sup>a</sup> e Silvia Tamie Matsumoto<sup>b</sup>.

### **AVALIAÇÃO DA ÁGUA DO RIO ITAPEMIRIM/ES (BRASIL): ASPECTOS ABIÓTICOS E TOXICOGENÉTICOS**

<sup>a</sup> Departamento de Biologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Rua Alto Universitário, sem número, Guararema, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

<sup>b</sup> Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Fernando Ferrari, 514, 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

**RESUMO:** O rio Itapemirim é considerado um dos mais importantes recursos hídricos do Espírito Santo. Todavia, problemas ambientais devido a sua contaminação estão ameaçando sua potencialidade de uso. O estudo teve a finalidade de avaliar a qualidade da água do rio Itapemirim/ES, coletadas em temporadas de estiagem e de alta precipitação, por meio de análise dos aspectos abióticos e toxicogenéticos de quatro estações ao longo do rio, utilizando como bioindicador *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de células de mamífero. A maioria das variáveis abióticas avaliadas demonstraram que as águas das duas campanhas estão de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, assim como a maioria dos metais. Todavia, os índices de Al e Cu na água estavam acima do permitido pela legislação. As amostras coletadas ao longo do rio Itapemirim/ES demonstraram potencial fitotóxico nas células meristemáticas de *A. cepa*, na primeira campanha. Já o efeito genotóxico das amostras de água foram observados nos teste do *A. cepa*, do micronúcleo em *O. niloticus* e no ensaio do cometa em *O. niloticus* e células CHO-K1. O efeito mutagênico foi significativo nas estações RI 02, RI 03 e RI 04 da primeira campanha em células FI de *A. cepa*. E nas estações RI 01 e RI 03, da segunda campanha, no teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe. De maneira geral, todas as amostras avaliadas nas duas campanhas apresentaram danos nas células de *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de CHO-K1. Indicando assim, que a qualidade da água do rio Itapemirim/ES encontra-se comprometida e necessita de planos de ação com medidas para a sua recuperação.

Palavras-chaves: metais, aberrações cromossômicas, micronúcleo, ensaio do cometa, MTT, *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de células.

## 1 - INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são considerados renováveis, porém sua disponibilidade e potencialidade encontram-se ameaçadas devido a sua contaminação que pode ser resultado de mudanças físicas, químicas e/ou biológica da água causadas por processos naturais e/ou, principalmente, pela ação do homem (Baptista e CARDOSO 2013). Assim, destacam-se a concentração populacional, a perda da mata nativa, o pastoreio, o esgoto doméstico e os resíduos sólidos da produção agrícola e industrial lançados em locais inapropriados como os principais fatores que podem causar a degradação dos corpos de água (Santana et al. 2012).

O Estado do Espírito Santo possui 12 bacias hidrográficas, destacando-se a do rio Itapemirim que constitui o principal sustentáculo do desenvolvimento do sul do Estado (Pastro 2012). O rio Itapemirim tem sua nascente na Serra do Caparaó-ES entre os meridianos 40°48' e 41°52' O e os paralelos 20°10' e 21°15' S, possuindo aproximadamente 5.919,5 km<sup>2</sup> de extensão (IEMA 2015). Sua bacia abrange número considerável de municípios, sendo 16 no Estado Espírito Santo e parte do município de Lajinha, no Estado de Minas Gerais, Brasil. Conferindo, assim, grande heterogeneidade entre as regiões (Pastro 2012).

Tendo em vista a importâncias dos ecossistemas aquáticos, algumas agências realizam o monitoramento da qualidade da água usualmente por meio de análises abióticas que possibilitam verificar as influências atmosféricas, as condições climáticas, antrópicas e litologia do local (Duarte et al. 2012). Entretanto, estas não levam em consideração os testes de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade (Grover e Kaur 1999). Nesse sentido, a precisão dos níveis de tolerância estabelecidos pelos parâmetros abióticos preocupam, uma vez que alguns estudos de genética toxicológica revelam resultados significativos mesmo quando os valores da

contaminação apresentam-se inferiores aos permitidos pela legislação (Matsumoto et al. 2006; Pires e Chaparro 2010; Oliveira 2013).

Os biomarcadores de níveis biomolecular e celular como indicadores de contaminação ambiental tem sido utilizados devido às suas atuações como receptores biológicos diretos dos agentes presentes no ambiente (Fernandes et al. 2009). Dentre os bioindicadores, destacam-se as plantas superiores, os peixes e a cultura de célula de mamíferos. Costa et al. (2015) e Grippa et al. (2011) avaliaram a qualidade de ambientes lóticos por meio de bioensaios com *Allium cepa* e observaram alterações significativas. A eficiência da avaliação de ambientes lênticos e lóticos também já foi comprovada por Duarte et al. (2012) e Bianchi et al. (2013), utilizando como bioindicador peixe. O uso de cultura de célula em bioensaios também já foi considerada apropriada por Matsumoto et al. (2003) e Trintinaglia et al. (2013).

Tendo em vista a importância ecológica e socioeconômica dos ecossistemas aquáticos, faz-se necessário a sua avaliação por abordagens que possam integrar os aspectos abióticos aos ensaios toxicogenéticos. Assim, esse estudo objetivou avaliar a qualidade da água do rio Itapemirim/ES por meio da análise dos aspectos abióticos, citogenéticos e molecular utilizando espécimes de *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1).

## 2 – MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - Material biológico

Os materiais biológicos utilizados como sistemas-teste foram bulbos de *Allium cepa* (cebola), espécimes de *Oreochromis niloticus* (tilápia) e linhagens de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1). Para a realização do bioensaio com *O. niloticus* o projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Espírito Santo, sobre o protocolo número 16/2015.

### 2.2 - Estações amostrais

Para a caracterização da água do rio Itapemirim/ES foram realizadas duas campanhas, sendo uma no final de março de 2015 e uma no começo de outubro de 2015, onde foram coletadas amostras de água de quatro estações ao longo do percurso do rio (Fig. 1): PRI01 - 20°45'34.76"S / 41°16'8.04"O; PRI02 – 20°47'55.81"S / 41° 8'9.89"O; PRI03 – 20°53'11.13"S / 41° 5'38.94"O; PRI04 – 20°55'6.13"S / 41° 4'29.69"O.

### 2.3 - Parâmetros físico e químicos

Durante a amostragem, em campo foram avaliadas por meio de sonda multiparâmetro (Sanxin 5X723) a condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e pH da água e por meio do oxímetro (Lutron DO-5519) para avaliar o oxigênio dissolvido ( $\text{mg}/\text{L}$ ) da água.

As análises de metais foram realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), em aparelho 7000, DV Perkin Elmer, onde foram quantificados os metais ( $\text{mg}/\text{L}$ ): Alumínio (Al); Bário (Ba), Cromo (Cr); Cobre (Cu); Níquel (Ni); Selênio (Se) e Zinco (Zn). E em Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP MS), aparelho NexIon, Perkin Elmer, onde os metais quantificados ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) foram: Cádmio (Cd); Cobalto (Co); Manganês (Mn) e Chumbo (Pb).

### 2.4 - Bioensaios com *Allium cepa*

Para avaliar o efeito fitotóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de amostras de água do rio Itapemirim, foi realizado o teste do *A. cepa* a partir do método de Fiskesjö (1985), com modificações. Bulbos de *A. cepa* foram previamente selecionados e acondicionados em tubos de ensaio contendo amostras de água coletadas das estações RI01, RI02, RI03 e RI04. Além destes foram estabelecidos os controles positivo, a partir de solução de metil-metanosulfonato ( $4 \times 10^{-4}$  mM) e negativo, contendo água destilada. Para avaliação, foram considerados cinco bulbos para cada tratamento.

#### 2.4.1 - Crescimento radicular e análise citogenética

Após 72 horas de exposição aos tratamentos, as raízes dos bulbos de cebola foram observadas e mensuradas com auxílio de paquímetro para a análise do comprimento radicular. Posteriormente, as raízes foram coletadas e fixadas em solução Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por no mínimo 24 horas. As células meristemáticas e as células em F1 passaram por uma hidrólise ácida em HCl 1N à 60°C e depois foram submetidas ao método de coloração de Feulgen (Feulgen e Rossenbeck, 1924). As lâminas foram confeccionadas pelo método comum de esmagamento suave.

Para cada tratamento, 5 lâminas foram analisadas, sendo contabilizadas 1000 células por lâmina. A partir da análise das células meristemáticas, a citotoxicidade foi avaliada pelo índice mitótico (IM) que foi contabilizado pela razão do número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) pelo número total de células observadas em cada tratamento, multiplicado por 100. Já as frequências das alterações mitóticas (AM) que determinam a genotoxicidade e de micronúcleo (MN) que determinam a mutagenicidade, foram obtidas dividindo-se o número de alterações (cromossômica ou micronúcleo, respectivamente) pelo número total de células avaliadas, vezes 100. Também foram consideradas as frequências de micronúcleos nas células em F1, sendo esta contabilizada pela razão do número de células em F1 com micronúcleo pelo número de células observadas, vezes 100.

#### 2.5 - Bioensaios com *Oreochromis niloticus*

Foram realizados o teste do micronúcleo e ensaio do cometa em *O. niloticus* com a finalidade de avaliar o efeito mutagênico e genotóxico das amostras de água do rio Itapemirim/ES. Para isso, peixes livres de contaminação foram primeiramente aclimatados em sistema de filtragem e aeração por 24 horas. Os grupos experimentais foram dispostos em aquários contendo 25L de água cada, com sistema de aeração, onde quatro destes aquários receberam as amostras de água das estações e outros dois correspondentes, respectivamente, ao controle positivo e negativo, receberam água potável desclorificada. Os espécimes do controle positivo receberam aplicação no início do tratamento de 0,1mL de ciclofosfamida (2mg/mL) na região intraperitoneal.

Após 96 horas de exposição, 10 peixes de cada tratamento foram anestesiados com benzocaína (80mg/L). A partir de cada espécime, foram extraídos aproximadamente 0,5mL de sangue da região caudal, utilizando seringas heparinizadas.

##### 2.5.1 - Teste do micronúcleo

Para o teste do micronúcleo foram confeccionadas duas lâminas a partir do sangue periférico de cada peixe dos tratamentos e controles, por meio da técnica de esfregaço. Em seguida, as lâminas foram submetidas à coloração com corante rápido do tipo panótico e analisadas sob microscópio de luz em aumento 1000X.

Foram analisados 3000 eritrócitos por lâmina, totalizando 30000 eritrócitos por tratamento. Para determinar o índice de efeito mutagênica (IEM), foi calculada a razão entre a soma dos eritrócitos micronucleados pelo total de eritrócitos analisados em cada lâmina e o resultado multiplicado por 100. Células portadoras de alterações nucleares, classificadas de acordo com Carrasco et al. (1990) como “blebbed”, “lobed”, “notched” foram quantificadas para determinar o índice de anormalidades nucleares (IAN) das amostras de água. O IAN foi calculado por meio da razão entre a soma dos eritrócitos com anormalidades na morfologia dos núcleos pelo número total de eritrócitos, multiplicando-se o resultado por 100.

#### 2.5.2 – Ensaio do cometa

O método utilizado no ensaio com *O. niloticus* foi a técnica alcalina descrita por Singh et al. (1988), com modificações de Duarte et al. (2012). Para o preparo das lâminas, 10µL de suspensão celular (5µL de sangue + 1000µL de PBS) foram misturadas a 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), depositadas em lâminas pré gelatinizadas e cobertas por lamínula.

Posteriormente as lamínulas foram removidas, as lâminas incubadas em solução de lise (1ml Triton X-100, 20ml de DMSO e 89ml de solução de lise estoque, pH 10,0 – solução estoque: 146,1g de NaCl 2,5M, 37,2g de EDTA-titriplex 100mM, 1,2g de Tris 10mM e 890ml de água deionizada) e armazenadas por no mínimo uma hora sob proteção contra de luz.

Após a lise, as lâminas foram submetidas a eletroforese com tampão alcalino (7,5ml de EDTA-titriplex 200mM, 45ml de NaOH 10N e 1500ml de água deionizada, pH ~ 13) em baixa temperatura. Encerrada a corrida, as lâminas foram neutralizadas e fixada em etanol absoluto por 10 minutos. Os passos realizados acima foram executados na ausência de luz direta.

Para a avaliação dos nucleóides, as lâminas foram coradas com GelRed e analisadas em microscópio de fluorescência em aumento de 400X. Foram avaliados 100 nucleóides, totalizando 500 nucleóides por tratamento. Para a quantificação dos danos, foi utilizada a classificação visual dos cometas/nucleóides proposta por Collins et al. (1995) e calculado o índice de danos (ID) conforme a fórmula:  $ID(ua) = (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD) + (4xE)$ , onde: A, B, C, D e E correspondem ao número de células em cada uma das classes. (A) classe 0 = sem danos, (B) classe 1= danos mínimos, (C) classe 2= danos médios, (D) classe 3= danos intensos e (E) classe 4= danos máximos.

## 2.6 - Cultura celular

### 2.6.1 - Linhagem celular e condições de cultivo de células CHO-K1

Para a realização do ensaio *in vitro*, foi utilizado linhagem de células de ovário de Hamster chinês (CHO-K1). As células foram cultivadas em meio contendo DMen + HAM-F12 (1:1) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (meio completo), sendo mantidas em frascos de cultura (25cm<sup>2</sup>) na forma de monocamada. O cultivo ocorreu em estufa tipo BOD à temperatura de 37°C, possibilitando o ciclo celular de 12 horas. As células cultivadas foram expostas às amostras de água e dos controles negativo e positivo diluídos em meio incompleto (1:3). Para os controles negativo e positivo foram utilizados PBS e MMS (4x10<sup>-4</sup>mM), respectivamente.

### 2.6.2 - Ensaio Citotóxico do MTT

A metodologia adotada foi baseada em Mosmann (1983). Primeiramente, foram semeadas  $1 \times 10^5$  células CHO-K1 em placas de 96 poços contendo meio F12/DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal. Posteriormente, as placas foram mantidas em estufa BOD a 37°C por um período de 12 horas para a estabilização. Após este período, descartou-se o meio completo de cada poço da placa e realizou-se os tratamentos com 200µL de amostras das quatro estações diluídas em 25% em meio incompleto e incubou-se por mais 12 horas.

Posteriormente, foram adicionados em cada poço 100µL de solução de MTT (5,0mg/mL) diluído em meio sem soro e seguido de nova incubação em estufa por 4 horas. Passado esse tempo, a solução de MTT foi aspirada e logo adicionaram-se 200µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de formazan + DMSO foi homogeneizada para a realização da leitura em espectrofotômetro a 550nm. O experimento foi repetido três vezes de forma independente e os resultados foram expressos em termos de inibição da viabilidade celular (%)

## 2.7 - Ensaio do Cometa em cultura celular

Para o ensaio com células CHO-K1 foi utilizado o protocolo proposto por Tice (2000), com modificações. Foram semeadas aproximadamente  $1 \times 10^5$  de célula em frascos de cultura. Depois de semeadas as células, foram realizados os subseqüentes tratamentos na concentração 1:3, totalizando 5mL de solução total. Posteriormente uma alíquota de 20uL da suspensão celular misturada com 120uL de agarose de baixo ponto de fusão (37°C) foi espalhada sobre lâmina pré gelatinizada.

Para a realização do ensaio foi executado o testes de viabilidade celular. Este consistiu em misturar 10µl de suspensão celular com 10µl de azul de Tripan (0,4%). Após isso, 10µl da solução resultante foram transferidos para câmara de Neubauer para a quantificação das células viáveis (incolor) e inviáveis (coradas de azul) até totalizar 100 células. Como todos os tratamentos apresentaram viabilidade superior a 90%, deu-se continuidade ao ensaio do cometa.

Após o preparo das lâminas o prosseguimento quanto a realização do ensaio do cometa em células CHO-K1 seguiu os mesmos procedimentos do ensaio com *O. niloticus* descrito na seção 2.5.2.

## 2.8 – Análise estatística

Os dados avaliados em *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. A partir do programa Infostat (DiRienzo et al. 2010), foi utilizado o teste de Shapiro-Wilks para checar a distribuição normal das médias. Os dados que não seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Kruskal Wallis ( $P < 0,05$ ) a fim de comparar as médias obtidas de cada parâmetro avaliado entre os controles e as amostras de água estudadas. Já para os dados que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste de Scott Knott ( $P < 0,05$ ), com a mesma finalidade. Por meio do programa GraphPad Prism 7 (Trial Registration) foi comparado os dados entre as duas campanhas realizadas, utilizando o teste de Kruskal-Wallis seguido de Teste de Dunn's ( $P < 0,05$ ).

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 - Parâmetros abióticos

Os dados pluviométricos trimestrais do ano de 2015 (Fig. 2) caracterizam a primeira campanha como de maior precipitação (307,66 mm) em relação a segunda campanha (148,27 mm). Os parâmetros físicos e químicos

avaliados nas estações e respectivas amostras de água do rio Itapemirim/ES estão representados na tabela 1. Os valores de pH apresentaram-se próximos à neutralidade e dentro do valor permitido pela Resolução CONAMA 357/2005 para os corpos hídricos lóticos de classe 3. A proximidade à neutralidade observada na maioria das amostras coletadas sugere condições propícias à biota aquática, exceto em RI 03 da segunda campanha que apresentou pH 5,41.

Outra variável avaliada foi a condutividade elétrica que é influenciada pela presença de íons dissolvidos, de modo que a maior concentração de íons dissolvidos na água resultará em maior condutividade. Segundo Manzano et al. (2015) a condutividade indica a quantidade de sais na água, tornando-se medida indireta da concentração de poluentes. Ainda segundo o mesmo autor, níveis de condutividade acima de 100µS são característicos de ambientes impactados. Os dados obtidos demonstraram que as amostras de água das estações RI 03, das duas campanhas, e RI 04 da segunda campanha apresentaram valores superiores a 100 µS. O fato da estação RI 03 ter sido superior nas duas campanhas pode ser explicado pela presença de concentrações elevada de íons dissolvidos decorrentes do lançamento de efluentes domésticos oriundos da cidade de Cachoeiro de Itapemirim (Steffens et al. 2015; Rodrigues et al. 2015).

Com relação ao oxigênio dissolvido não houve variação entre as estações amostrais no mesmo período avaliado e os valores encontrados estão de acordo com o recomendado na resolução CONAMA 357/2005. Por outro lado, a avaliação entre as campanhas realizadas demonstrou que a primeira apresentou níveis mais altos de oxigênio dissolvido. Este fato pode estar relacionado ao aumento da vazão da água decorrente da maior precipitação, formando uma turbulência no leito do rio (Ferreira e Cunha-Santino 2014).

A maioria dos metais quantificados nas amostras de água das duas campanhas (Tabela 2) apresentaram níveis dentro do limite estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005. Todavia, os níveis de Cu nas duas campanhas e Al na segunda campanha foram superiores ao permitido na resolução. A concentração elevada de Cu pode estar relacionada ao despejo incorreto ou a lixiviação de resíduos das indústrias de mármore e granito, uma vez que o Cu é um dos constituintes das rochas, principalmente do granito (Trindade et al 2012). Quando presente em altas concentrações na água, este elemento é capaz de intoxicar os organismos aquáticos (Caritá 2010). Já a concentração de Al na água superficial geralmente aumenta devido à lixiviação do solo e processos de erosão das margens dos rios no período chuvoso (Gomes et al. 2013). O Al é um dos maiores poluentes dos solos e águas, podendo ser transferido entre os organismo via cadeia trófica, e causar sérios problemas aos ecossistemas e à saúde humana (Krewski et al. 2007; Achary et al. 2008).

Apesar da maioria dos metais estarem dentro do limite estabelecido pela legislação, pode ocorrer interações entre os componentes químicos presente na água tornando, por sinergismo, a mistura mais tóxica do que cada um dos elementos avaliados separadamente (Teixeira 2014). Estudo realizado por Andrade-Vieira et al. (2012) revelam a genotoxicidade do SPL, um resíduo gerado na indústria de alumínio e que é constituído por mais de um tipo de contaminante, o qual atribuíram com a indução de anormalidades nas células meristemáticas de *A. cepa* ao efeito sinérgicos desses componentes. Além disso, animais e plantas podem concentrar os metais em níveis extremamente superiores aos encontrados no ambiente, de modo que este acúmulo pode possibilitar o transporte dos contaminantes para diversos níveis da cadeia alimentar. Este efeito culmina na ocorrência das altas taxas de contaminação nos níveis mais altos da teia trófica (Papagiannis et al. 2004).

### 3.2 - Fitotoxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em *A. cepa*

As médias e o desvio padrão do tamanho das raízes expostas à quatro estações do rio Itapemirim/ES, nas duas campanhas, estão apresentadas na tabela 3. Os resultados demonstraram que na primeira campanha houve redução significativa no crescimento radicular em relação ao controle negativo, exceto em RI 03. Já na segunda campanha, não foi observado redução significativa do crescimento das raízes, podendo-se sugerir que as amostras de água de RI 01, RI 02 e RI 04 da primeira campanha apresentaram efeito fitotóxico nas raízes de *A. cepa*. A fitotoxicidade é a ação tóxica que uma substância provoca nas plantas, sendo comprovada pela diminuição do crescimento das raízes (Palmieri 2012). Os dados demonstram ainda que a estação RI 03 foi o que apresentou os maiores índices de crescimento radicular, o que corrobora com o elevado valor da condutividade nesta estação. Além de indicar o input de matéria orgânica proveniente de efluentes domésticos da cidade mais próxima, Cachoeiro de Itapemirim, que é situada à montante da referida estação. Os trabalhos de Tigini et al. (2011) e Alvim et al. (2011) também discorrem sobre os efeitos estimulantes do crescimento radicular em plantas expostas a efluentes domésticos e industriais. Segundo esses autores, a quantidade de matéria orgânica advinda principalmente de efluente doméstico, pode proporcionar maior oferta de nutrientes, contribuindo para o aumento do crescimento radicular.

Ao comparar os dados das duas campanhas é possível observar menor crescimento radicular de *A. cepa* após exposição às amostras da segunda campanha (Fig. 3). Nesse aspecto, Rodrigues et al. (2013) sugerem que períodos de chuva e conseqüente aumento na vazão fluvial, há o aumento da disponibilidade de nutrientes na coluna d'água. Por outro lado, a diminuição da vazão devido a menor precipitação promove o aumento da concentração de contaminantes o que resulta no efeito fitotóxico.

A fitotoxicidade observada na primeira campanha e a redução do crescimento radicular de *A. cepa* exposta as amostras da segunda campanha quando comparada com as da primeira, podem estar relacionada com a presença do alumínio na água. Tal efeito pode ser decorrente do acúmulo de alumínio na região meristemática da raiz no espaço interior à membrana plasmática, chamado de simplasto, reduzindo a proliferação celular (Matsumoto, 2000). Além do alumínio, foi quantificado nas amostras a presença de cádmio e chumbo (Tabela 2), elementos que não fazem parte do metabolismo primário/secundário das plantas, sendo causadores de estresse em qualquer quantidade (Ferreira et al. 2010; Célico 2015).

Com relação às diferentes fases de divisão mitótica e do índice mitótico em células meristemática de *A. cepa* (tabela 4), foi observado que na primeira campanha o IM e a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle negativo, exceto a porcentagem de células em anáfase que diminuiu. Portanto, podemos inferir que nenhuma das estações exibiram efeito citotóxico sobre as células meristemáticas de *A. cepa*. Constatações semelhantes foram observadas nos trabalhos de Peron et al. (2009), Bianchi et al. (2011) e Ferreira et al. (2012) que avaliaram ambientes lóticos distintos impactados por lançamentos de efluentes domésticos e industriais.

Entretanto, na segunda campanha, RI 03 apresentou índice mitótico significativamente inferior ao controle negativo e às estações RI 01 e 02. Essa diminuição também foi observada comparando-se o IM de RI 03 entre as campanhas (Fig. 4). Este resultado relaciona-se com o aumento de células na fase de interfase e diminuição de células na fase de prófase (Tabela 4), o que pode ocorrer, provavelmente, devido a ação dos pontos de checagem G1/S e G2 do ciclo celular que inibem a síntese de DNA e/ou bloqueiam o ciclo celular (Alberts et al., 2008).

Foi observado diminuição significativa de células meristemáticas em anáfase nas duas campanhas, o que pode estar relacionado com o último ponto de checagem do ciclo celular que é o ponto de verificação metáfase-anáfase. A finalidade deste ponto de controle é verificar se os cromossomos estão unidos corretamente ao fuso mitótico, garantindo a manutenção da integridade genômica (Molinari 2000; Swanton 2004). A presença de alteração do tipo C-metáfase pode ser uma das consequências da diminuição da anáfase, uma vez que essa alteração é originada pela inativação completa do fuso mitótico devido a não formação da placa equatorial, levando a interrupção da divisão celular (Fernandes et al. 2009).

Com relação ao potencial genotóxico, as estações amostrais apresentaram AC significativamente superior em relação ao controle negativo na primeira campanha, exceto em RI 04 (Tabela 5) e as alterações mais frequentes foram: c-metáfase, aderência, atraso, ponte e perda. Já na segunda todas as estações apresentaram genotoxicidade significativa, sendo as alterações mais frequentes: aderência, atraso e ponte. Com isso, podemos inferir que os compostos presente nas amostras de água apresentaram tanto ação aneugênica quanto clastogênicas. Estas provocam quebras cromossômicas, enquanto as aneugênicas inativam a estrutura celular (Almeida 2014; Fenech 2000; Leme e Marin-Morales 2009).

As substâncias presentes na água possivelmente apresentaram afinidade de interação com o fuso mitótico, já que as alterações de alta frequência foram c-metáfase e atraso cromossômico, respectivamente, na primeira e na segunda campanha. As ações dos metais como Al, Pb, e Cd sobre os microtúbulos já foram relatadas por diversos autores (Samardakiewicz e Woźny 2005; Liu et al. 2003; Fusconi et al. 2006).

A presença de alterações cromossômicas podem estar relacionadas pelo alto teor de alumínio quantificado em todas as amostras coletadas ao longo do rio Itapemirim, nas duas campanhas (Tabela 2). O estudo realizado por Rajeshwari et al. (2015) discutiu a influência da monopartículas de óxido de alumínio no ciclo celular de *A. cepa*, onde as células meristemáticas apresentaram alterações cromossômicas do tipo anáfase multipolar, cromossomo pegajoso, quebra e perda cromossômica, caracterizando este composto como genotóxico.

A presença de células portadoras de micronúcleos são consideradas *endpoints* de ação mutagênica (Leme 2010; Shi et al. 2010). Na tabela 5 é possível perceber que apenas as células meristemáticas expostas a amostra de água da estação RI 02, da primeira campanha, apresentaram frequência significativa de micronúcleo. Já com relação ao MN das células F1, as estações RI 02, RI 03 e RI 04 apresentaram frequência significativa em relação ao controle negativo. Pode-se sugerir que a perda de cromossomos inteiros observados em frequências significativas nas células meristemáticas contribuíram para a formação de micronúcleos nas células da geração F1, uma vez que as frequências dessa aberração cromossômica e de micronúcleo em F1 foram significativas nas mesmas estações. Os dados sugerem que a frequência significativa de MN em células F1 expostas a amostras de água da primeira campanha são decorrentes desses danos cromossômicos e/ou nucleares em células meristemáticas não reparadas ou reparados incompletamente que foram fixados nas células diferenciadas (Fernandes et al. 2007; Leme e Marin-Morales 2008; Ribeiro 2003).

Por outro lado, as amostras de água da segunda campanha não induziram significativamente a formação de MN nas células meristemáticas e F1 de *A. cepa*. A baixa frequência de células F1 com MN pode ser explicada provavelmente devido a ação do mecanismo de reparo do ciclo celular nas células meristemáticas que apresentaram AC. Nossos dados corroboram com os de Martins (2015) e Christofolletti et al. (2013) que

discutem que a taxa de MN em células F1 de *A. cepa* foram reduzidas após tratamento de recuperação, provavelmente devido ao mecanismo de reparo celular.

Souza et al. (2013) avaliou a eficiência dos tratamentos de efluentes por meio do hidróxido de sódio e sulfeto de sódio para reduzir os índices dos contaminantes químicos presente nestes. Os resultados encontrados pelo autor demonstram que mesmo as concentrações dos metais prata, cromo, cobre, ferro, níquel, chumbo, estanho e zinco, quantificados no efluentes estarem adequados para descarte após o tratamento, segundo a legislação, o potencial mutagênico do efluente permaneceu. Assim, como nos resultados encontrados no estudo de Souza et al. (2013), o presente estudo indica a contribuição dos metais, mesmo em níveis abaixo do permitido pela legislação brasileira, para a causa do efeito mutagênico dos efluentes.

As altas concentrações de Cu observadas sugerem a ação deste elemento sobre o crescimento radicular e ciclo celular de *A. cepa*. Hemachandra e Pathiratne (2015) avaliaram os efeitos toxicogênicos de Cu, Cr e Cd em três combinações de misturas binárias e uma mistura ternária destes elementos nas concentrações limites estabelecidas pela legislação local e concluíram que o Cu e suas combinações exibiu as maiores porcentagens de inibição do crescimento radicular, do índice mitótico e de alterações nucleares em comparação com o controle e com os outros metais.

Estudo realizado por Pathiratne et al. (2015) relataram a eficiência do uso de bioensaios com *A. cepa* para avaliar efluentes industriais tratados descarregados no rio Kelani no Sri Lanka. No estudo a maioria dos metais avaliados (arsênio, cádmio, cromo, cobre, chumbo, níquel e zinco) estavam abaixo do permitido na legislação local e apenas alumínio e ferro estavam em nível superior ao permitido. Entretanto, os efluentes afetaram o crescimento das raízes, o índice mitótico e a frequência de aberrações cromossômicas de maneira significativa. Para estes autores o bioensaio com *A. cepa* apresenta fortes evidências científicas para incorporá-lo à regulamentação de gestão de efluentes como um complemento simples e economicamente viável.

### 3.4 – Genotoxicidade e mutagênicidade em *O. niloticus*

O teste do micronúcleo realizado em espécimes de *O. niloticus* revelaram que as amostras de água de RI 01 e RI 03 apresentaram frequências significativas de MN na segunda campanha (Tabela 7) onde foi observado aumento significativo de MN, com exceção da estação de RI 04, em comparação à primeira campanha (fig. 5a). O potencial mutagênico aliado à frequência de micronúcleo é observado em diversos estudos, como o de Duarte et al. (2012) ao estudar um ambiente lântico impactado por metais, o de Souza e Fontanetti (2006) ao analisar amostras de água de rio afetado por efluentes de refinaria de petróleo, o de Aguiar et al. (2016) ao avaliar efluentes do beneficiamento de rochas e o de Ventura et al. (2008) ao investigar os efeitos do herbicida Atrazina.

Concomitante ao estudo do micronúcleo, estudos das anormalidades nucleares tem sido realizados. Nesse caso, essas anormalidades tem sido relacionadas à presença de agente genotóxicos (Ayyilon e Garcia-Vazquez 2000; Serrano-Garcia e Montero-Montoya 2001). Com relação a frequência de anormalidades nucleares, foi observado valores de AN significativamente superior ao controle negativo, exceto em RI 04 na primeira campanha e RI 02 na segunda (Tabela 6). Sendo que esta apresentou NA significativamente superior em relação à primeira campanha (fig. 5b). Em ambas as campanhas realizadas, as anormalidades nucleares mais frequentes foram blebbed e notched.

De acordo com Ghandially (1982) as alterações nucleares do tipo “notched” podem estar associada a eventos de aneuploidia, enquanto Çavaş e Ergene-Gözükar (2005) sugerem a relação de “lobbed” e “blebbed” a

problemas de segregação dos cromossomos. Com relação aos mesmos danos, Shimizu et al (1998) sugerem que a amplificação gênica devido ao ciclo “breakage–fusion–bridg (BFB)” seria umas das causas da formação dessas anormalidades durante a eliminação do DNA amplificado. Todavia, estudos complementares são necessários para esclarecimentos. Além disso, Souza e Fontanetti (2006) relacionam a ocorrência dessas anormalidades a formação de micronúcleos, corroborando os resultados observados neste estudo que demonstram que as estações onde AN foi mais elevado, houve resultados significativos de MN.

Diante do exposto, observa-se que a utilização do teste do micronúcleo em *O. niloticus* é uma ferramenta eficiente em estudos toxicogenéticos (Ayllon e Garcia-Vazquez 2000; Bianchi et al. 2015; Bolognesi et al. 2006; Ergene et al. 2007; Matsumoto et al. 2006; Summak et al. 2010).

Os danos causados na fita do DNA quantificados por meio do ensaio do cometa demonstraram que no período de alta precipitação, todas as estações apresentaram valores significativos de índice de danos (ID) em relação ao controle negativo, sobretudo RI 02 e 03 que apresentaram os maiores valores de ID. Sendo que as classes mais frequentes de danos dos nucleóides em relação ao controle foram as do tipo 1, 2 e 3. Da mesma forma, na segunda campanha, as estações amostrais apresentaram ID significativos. Porém, neste período, as classes de dano 1, 2 e 3 não apresentaram diferença significativa do controle negativo. A comparação entre as campanhas amostrais não demonstrou diferença significativa entre os ID das estações, exceto em RI 03 (Fig. 5c).

O ensaio do cometa possibilita quantificar as quebras de fita simples na molécula de DNA e/ou sítios álcali-lábeis, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e/ou oxidantes (Tice et al. 2000). Segundo Kamman et al. (2001), essas lesões constatadas pelo ensaio do cometa são consideradas potencialmente pré-mutagênicas. Portanto, os ensaios de cometa e micronúcleos podem ser considerados como exames complementares na avaliação de genotoxicidade, devido às suas capacidades para detectar os diferentes aspectos da genotoxicidade e clastogenicidade (Frenzilli et al. 2009).

Diversos autores comprovaram a vantagem de se utilizar o teste do micronúcleo integrada com o ensaio do cometa na detecção de danos na molécula de DNA, utilizando como organismo teste peixe (Botelho et al. 2015; Maceda et al. 2015; Nan et al. 2013; Russo et al. 2004). Em alguns desses estudos os autores relatam a sensibilidade do teste do cometa comparado com o de MN, como no de Bücken et al. (2006) ao avaliar a mutagenicidade e genotoxicidade em peixes elétricos da espécie *Eingenmannia virescens*, pela exposição ao benzeno (50ppm) e no de Bianchi et al. (2015) avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade da Bacia do Rio dos Sinos, Rio Grande do Sul (Brasil) utilizando como bioensaio a espécie *Astyanax jacuhiensis*. Além deste, destacam-se os estudos de Sunjog et al. (2016) que avaliaram a genotoxicidade de três corpos de água na Sérvia e o de Hemachandra e Pathiratne (2016) que avaliaram a genotoxicidade de efluentes da indústria têxtil no rio Kelani na Sri Lanka, na avaliação do potencial genotóxico de ecossistemas aquáticos.

Com relação aos potenciais genotóxicos e mutagênicos observados as amostras do rio Itapemirim/ES, sugere-se a relação destes, sobretudo, com as concentrações de Al e Cu constatadas nas estações amostrais. Concentrações de alumínio acima do limite estabelecido pela legislação também foram observadas por Freitas et al. (2001), ao avaliar a qualidade da água de poço e de rede, consumidas em duas micro-regiões dos municípios de Duque de Caxias e São Gonçalo no Rio de Janeiro (Brasil), e no estudo de Oliveira (2012) ao analisar a concentração de metais pesados no sedimento e na água da bacia do rio Pitimbu, Rio grande do Norte (Brasil). Enquanto Benites et al. (2014) demonstraram o potencial mutagênico do cobre após exposição a espécie *Danio rerio*.

Morais et al. (2016) utilizando *Geophagus brasiliensis* como bioindicador para examinar o rio Mumbuca localizada em Monte Carmelo/MG, Brasil detectaram altos níveis de metais potencialmente tóxicos (cromo, chumbo, alumínio e níquel) e os relacionaram às induções de MN em *G. brasiliensis*. Por outro lado, Aguiar et al (2016) revelaram em seu estudo que mesmo as concentrações de metais apresentando-se abaixo dos limites permitidos pela legislação brasileira, elas podem ser a causa do potencial mutagênico observado em espécimes de *O. niloticus*. Demonstrando a importância de análises toxicogenéticas para avaliar a qualidade de ambientes aquáticos, uma vez que no rio Itapemerim/ES as amostras de água de todas as estações, mesmo não apresentando níveis acima do preconizado pela legislação, resultaram em danos significativos sobre o DNA.

Metais como cobre, cádmio, zinco, prata, alumínio, entre outros, são considerados potencialmente genotóxicos, promotores de estresse oxidativo e de problemas osmorregulatórios em diversos organismos aquáticos (Camargo et al. 2009; Costa et al. 2009). Nesse sentido, Ergene et al. (2007) sugeriram que a presença de metais pesados nas amostras de água da lagoa da Turquia (no Delta Goksu) são provavelmente os principais causadores dos efeitos genotóxicos observados em eritrócitos de peixes.

A presença de metais na água é preocupante tendo em vista a capacidade dos peixes em capturarem esses elementos e os bioacumular, principalmente, em seus tecidos, sendo frequentemente encontrado concentrações nos tecidos que suplantam as do próprio meio (Cardoso e Chasin 2001; Lima e Lopes 2007). Noor e Zutshi (2016) relatam em a bioacumulação de Al, Pb, Cd, Cu, Zn e Fe nos tecidos branquiais e musculares de *Labeo rohita* após exposição as águas dos lagos Vengaiyah e Yellamallappa Chetty localizados em Karnataka. A bioacumulação dos metais por peixe é alarmante devido a posição deste na cadeia alimentar. Estudos com alumínio, por exemplo, indicam que a intoxicação com este elemento em seres humanos pode estar relacionada à doença de Alzheimer e também a duas outras síndromes neuro-degenerativas graves, Parkinson e esclerose amiotrófica lateral (Chapuis e Favier, 1999; Garrunto et al., 1990).

O efeito genotóxico do cobre e do alumínio também já foi relatado no estudo realizado por Costa (2011), que demonstrou que o sulfato de cobre em tratamento subcrônico em *Rhamdia quelen* induziu quebras no DNA deflagradas pelo ensaio cometa nos tecidos cerebral, sanguíneo, renal e hepático, assim como o sulfato de alumínio. O ensaio do cometa também foi utilizado por Simonyan et al. (2015) para avaliar a genotoxicidade da bacia do Lago Sevan, na Armênia. Para os autores os resultados encontrados sustenta a hipótese de que o alterações genéticas observadas em peixes podem ser manifestações dos efeitos da contaminação da água por íons de nitrato, Si, Al, Fe, Mn e Cu.

### 3.5 - Citotoxicidade e genotoxicidade em cultura celular

As células CHO-K1 submetidas aos tratamento com as amostras de água coletadas não apresentaram perda significativa da função mitocondrial em comparação ao controle negativo, já que os tratamentos apresentaram alta porcentagem de células viáveis (Fig. 6). Com isso, podemos afirmar que as amostras de água não apresentaram efeito citotóxico, corroborando com os resultados observados no bioensaio com *A. cepa*. A eficiência do MTT como método para a avaliação citotóxica de amostras de águas superficiais e de abastecimento urbanos foi relatada por diversos autores (Bianchi et al. 2015; Marabini et al. 2007; Trintinaglia et al. 2015; Zegura et al. 2009;).

Com relação ao efeito genotóxico das amostras de água em CHO-K1 (Tabela 8), o ensaio do cometa demonstrou que na primeira campanha o índice de danos (ID) foi significativamente superior em RI 02 em

comparação ao controle negativo e a RI 04, indicando o potencial genotóxico desta estação. Neste caso, os danos de maior frequência foram os de classe 2. No período de estiagem, além de RI 02, RI 03 também apresentou ID significativamente superior ao controle negativo. Nesta campanha, as classes de danos mais frequentes foram as classes 1 e 2. Estudos similares também observaram danos genotóxicos de amostras de água, como o de Matsumoto et al. (2003) no qual foram avaliadas amostras de água contaminada com cromo, e o de Rodrigues et al. (2010) que avaliou a contaminação por hidrocarbonetos aromáticos policíclicos que é comumente encontrados nos efluentes das refinarias de petróleo.

Por outro lado os estudos de Leme (2010) com amostras de água e solo contaminadas por biodiesel e o trabalho de Hara (2012) na avaliação de ecossistemas lóticos impactados por efluentes de petróleo, não observaram genotoxicidade. No primeiro caso, o autor sugeriu que o processo de filtração das amostras poderia ter retido os contaminantes, enquanto no segundo estudo foi sugerido a não metabolização pelas CHO-K1 como limitação. Entretanto, destaca-se que os testes *in vitro* são ferramentas eficientes na avaliação de amostras ambientais uma vez que o ensaio demanda de poucos indivíduos para sua execução e as condições do teste são controláveis com relação a disponibilidade e reprodutibilidade (Hara 2012; Malaquias 2015).

Com relação ao Al e Cu que foram os metais de maiores concentrações observadas discutido nos tópicos nas amostras do rio Itapemirim/ES, outros trabalhos evidenciaram a presença de danos em cultivos celulares. Pereira et al. (2013) demonstraram o potencial genotóxico de Al e Cd sobre células embrionárias de zebrafish, enquanto Pereira et al. (2015), observou os efeitos de ZnCl<sub>2</sub> em leucócitos humanos. Já Manzano et al. (2014), ao avaliar a qualidade de água de um ambiente lótico, assim como observado nas amostras do rio Itapemirim/ES, também constataram a presença dos metais alumínio, cádmio, chumbo, cromo e zinco e as relacionaram aos danos observados após realização do ensaio do cometa em células de mamíferos (hepatoma de cultura de tecidos - HTC).

#### 4 – Conclusão

A maioria das variáveis abióticas avaliadas demonstraram que as águas coletadas ao longo do rio Itapemirim/ES, nas duas campanhas, estão de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005. Os níveis de Cu nas duas campanhas e Al na segunda campanha foram superiores ao permitido pela legislação.

Os testes toxicogénicos sugerem que os compostos presentes, mesmo àqueles abaixo da legislação, nas amostras de águas coletadas nas duas campanhas ao longo do rio Itapemirim/ES apresentaram potencial fitotóxico, genotóxico e mutagênico para os três bioindicadores, *Allium cepa*, *Oreochromis niloticus* e cultura de célula CHO-K1.

De maneira geral, todas as amostras avaliadas nas duas campanhas, em particular a estação RI 03, localizada ao final do centro urbano de Cachoeiro de Itapemirim, apresentaram danos nas células de *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de CHO-K1, demonstrando a funcionalidade destes bioensaios como parâmetros de monitoramento da qualidade da água.

Conclui-se que a qualidade da água do rio Itapemirim/ES encontra-se comprometida e salienta-se a necessidade de planos de ação para a recuperação do rio e do ecossistema no qual está inserido, em razão de sua importância ecológica e sócio econômica.

#### 5 - Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pelo suporte financeiro. Ao Instituto Federal do Espírito Santo – campus Alegre, ao Laboratório de Mutagênese e Oncogenética, da Universidade Estadual de Londrina e ao Laboratório de Espectrometria Atômica, da Universidade Federal do Espírito Santo pelas colaborações.

#### Referências

- Achary VMM, Jena S, Panda KK, Panda BB (2008) Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.10.022
- Aguiar LL, Tonon CB, Nunes ET, Braga ACA, Neves MP, David JAO (2016) Mutagenic potential of fine wastes from dimension stone industry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.035
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2008) *Molecular Biology of the Cell*. 5 ed. New York: Garland Publishing.
- Almeida PM (2014) Potencial Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão-Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.). Tese Universidade Federal de Pernambuco.
- Alvim LB, Kummrow F, Beijo LA, Lima CAA, Barbosa S (2011) Avaliação da citogenotoxicidade de efluentes têxteis utilizando *Allium cepa* L. *Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, v.6, p.255-165. doi:10.4136/1980-993X
- Andrade-Vieira LF, Campos JMS, David LC (2012) Effects os Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. *Journal of Environmental Management*. doi:10.1016/j.jenvman.2012.04.008
- Ayylon F, Garcia-Vazquez G (2000) Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Paecilia latipinna*: An assessment of the fish micronucleus test. *Mutat Res*. doi:10.1016/S1383-5718(00)00033-4
- Baptista M, Cardoso A (2013) Rios e Cidades: uma longa e sinuosa história... *Rev. UFMG, Belo Horizonte*, v. 20, n.2, p. 124-153.
- Benites LM, Doncato KB, Minho TS, Perazzo GX (2014) Avaliação do potencial mutagênico de cobre da água do rio Uruguai. *Ciência e Natura*. doi:10.5902/2179460X13610

Bianchi E, Goldoni A, Trintinaglia L, Lessing G, Silva CEM, NASCIMENTO CA, Ziulkoski AI, Spilki Fr, Silva LB (2015) Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of water samples from the Sinos River Basin, southern Brazil. *Braz. J. Biol.* Vol. 75, no. 2 (suppl.), p. S68-S74. doi.org/10.1590/1519-6984.1913

Bianchi j, Espindola ELG, Marin-Morales MA (2011) Genotoxicity and mutagenicity of water samples from the Monjolinho River (Brazil) after receiving untreated effluents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* doi:10.1016/j.ecoenv.2010.11.006

Bolognesi C, Perrone E, Roggeri P, Pampanin DM, Sciutto A (2006) Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology.* doi:10.1016/j.aquatox.2006.02.015

Botelho RG, Christofolletti CA, Correia JE, Ansoar Y, Olinda RA, Tornisielo VL (Genotoxic responses of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to florfenicol and oxytetracycline. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2015.02.053

Bücker A, Carvalho W, Alves-Gomes JA (2006) Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. *Acta Amaz.* doi.org/10.1590/S0044-59672006000300011

Camargo MMP, Fernandes MN, Martinez CBR (2009) How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquatic Toxicology.* doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.017

Caritá, R. (2010) Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes - SP. Dissertação Universidade Estadual Paulista

Cardoso LMN, Chasin AAM (2001). *Ecotoxicologia do cádmio e seus compostos*. CRA, vol 6, Salvador

Célico AS (2015) Influência da adubação orgânica na qualidade da água destinada à irrigação de hortaliças. Dissertação Universidade Estadual Paulista

Christofolletti CA (2013) Avaliação da toxicidade de resíduos industriais e urbanos aplicados na agricultura. 2013. 199 f. Tese Universidade Estadual Paulista.

Costa PM (2011) Avaliação do efeito tóxico de sulfato de alumínio e sulfato de cobre em bioensaio de contaminação subcrônica via trófica no bioindicador *Rhamdia quelen* (Siluriforme). Tese Universidade Federal do Paraná

Costa DDM (2009) Caracterização da molécula de vitelogenina expressa por machos de *Rhamdia quelen* (Teleostei, Heptapteridae) e sua utilização no biomonitoramento de ambientes aquáticos. Trabalho de graduação Universidade Federal do Paraná

Costa AC, Domingues G, Düsman E, Almeida IV, Vicentini VLP (2015) Citotoxicidade das águas do rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 248-258. doi.org/10.14393/BJ-v31n1a2015-15069

Çavas, T.; Eergene-Gözükar, S. (2005) Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ monitoring of genotoxic pollution in marine environment. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.06.001

Duarte ID, Dias MC, David JAO, Matsumoto ST (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 (Online)*, v. 10, p. 211-2019.

Ergene S, Çavas T, Çelik A, Koleli N, Aymak C (2007) Evaluation of river water genotoxicity using the piscine micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Doi: 10.1002/em.20291

Fenech M (2002) Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology, *Toxicology*. doi:10.1016/S0300-483X(02)00480-8

Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2007) Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pest. Biochem. Physiol.* doi: 10.1016/j.pestbp.2006.12.003

Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.03.014

Ferreira AP, Horta MAP, Cunha CLN (2010) Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Revista da Gestão Costeira Integrada*. doi: 10.5894/rgci186

Ferreira CF, Frueh AB, Düsman E, Heck MC, Vicentini VEP (2012) Avaliação da citotoxicidade das águas dos Ribeirões Varginha (Califórnia-PR) e Tabatinha (Mandaguari-PR), em *Allium cepa* L. *SaBios Rev. Saúde Biol.* ISSN:1980-0002

Ferreira CS, Cunha-Santino MB (2014) Monitoramento da qualidade da água do rio Monjolinho: a limnologia como uma ferramenta para a gestão ambiental. REA – Revista de estudos ambientais ISSN 1983 1501

Freitas MB, Brilhante OM, Almeida LM (2001) Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. Cad. Saúde Pública. doi.org/10.1590/S0102-311X2001000300019.

Frenzilli M, Nigro BP (2009) Lyons The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments Mutat. Res. doi:10.1016/j.mrrev.2008.03.001

Fusconi A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumasgaudot E, Berta G (2006) Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. Environmental and Experimental Botany. doi:10.1016/j.envexpbot.2005.09.008

Gomes OVO, Marques ED, Souza MDC, Silva-Filho EV (2013) Influência antrópica nas águas superficiais da cidade de Três Rios, (RJ). Geochimica Brasiliensis. doi: 10.5327/Z0102-9800201300010007

Grippa GA, Nati N, Matsumoto ST (2011) Evaluation of water samples from a river by cytologic analysis in *Allium cepa*. Cytologia 77(1): 3–9. doi:10.1508/cytologia.77.3

Grover IS, Kaur S (1999) Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by *Allium* root anaphases aberrations and micronucleus assays. Mutation Research, v. 426, p. 183 – 188. doi:10.1016/S0027-5107(99)00065- 2

Hara RV, Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade das águas dos rios Jaguari, Atibaia e Piracicaba, na região de influência da refinaria de Paulínia – SP. Dissertação, Universidade Estadual Paulista

Hemachandra CH, Pathiratne A (2016) Combination of physico-chemical analysis, *Allium cepa* test system and *Oreochromis niloticus* erythrocyte based comet assay/nuclear abnormalities tests for cyto-genotoxicity assessments of treated effluents discharged from textile industries. Ecotoxicology and Environmental Safety. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.05.010

IEMA. Região Hidrográfica do Rio Itapemirim. Disponível em: <<http://www.meioambiente.es.gov.br/default.asp>> Acessado em novembro de 2015.

Kamman U, Bunke M, Steinhart H (2001) A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. Mutation Research. doi:10.1016/S1383-5718(01)00268-6

Krewski D, Yokel RA, Nieboer E, Borchelt, D, Cohen J, Harry J, Kacew S, Lindsay J, Mahfouz AM, Rondeau V (2007) Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of toxicology and environmental health*. doi: 10.1080/10937400701597766

Leme DM (2010) Avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de misturas comerciais de diesel e biodiesel puras e em simulações de vazamento em água e solo. Tese, Universidade Estadual Paulista

Leme DM, Marin-Morales MA (2008) Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. *Mutat Res*. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.10.006

Leme DM, Marin-Morales MA (2009) *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002

Lima ELG, Lopes JP (2007) Avaliação dos níveis de cádmio em material aquático do complexo hidrelétrico de Paulo Afonso. *Rev. Bras. Enga. Pesca*. <http://ppg.revistas.uema.br/index.php/REPESCA/article/view/46/42>. Acessado 12 jun 2016.

Liu D, Jiang W, Gao X (2003) Effects of cadmium on root growth, cell division and nucleoli in root tip cells of garlic. *Biologia Plantarum*. doi: 10.1023/A:1027384932338

Maceda EB, Grisolia AB, Vaini J O, Candido LS (2015) Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brillhante, MS, Brasil. *Revista Ambiental Água*. doi.org/10.4136/ambi-agua.1500

Manzano BC, Roberto MM, Hoshina MM, Menegário AA, Marin-Morales MA (2014) Evaluation of the genotoxicity of waters impacted by domestic and industrial effluents of a highly industrialized region of São Paulo State, Brazil, by the comet assay in HTC cells. *Environ Sci Pollut Res* 2:1399–1407. Doi: 10.1007/s11356-014-3476-5

Marabini L, Frigerio S, Chiesara E, Maffei F, Forti GC, Hrelia P, Buschini A, Martino A, Poli P, Rossi C, Radice S (2007) In vitro cytotoxicity and genotoxicity of chlorinated drinking waters sampled along the distribution system of two municipal networks. *Mutation Research*. doi:10.1016/j.mrgentox.2007.05.017

Martins MNC (2015) Análise do potencial genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto em *Allium cepa*. Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo

Matsumoto H (2000) Cell biology of aluminum toxicity and tolerance in higher plants. *International Review of Cytology*. doi:10.1016/S0074-7696(00)00001-2

Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MIA, Dias AL, Fonseca IC, Marin-Morales MA (2006) Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148 158. doi:10.1590/S1415-47572006000100028

Matsumoto ST, Mantovani MS, Mallaguti MI, Marin-Morales MA, (2003) Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. *Cytologia* 68(4): 395–401. doi.org/10.1508/cytologia.68.395

Molinari M (2000) Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*. doi: 10.1046/j.1365-2184.2000.00191.x

Morais CR, Carvalho SM, Araujo GR, Souto HN, Bonetti AM, Morelli S, Campos-Junior EO (2016) Assessment of water quality and genotoxic impact by toxic metals in *Geophagus brasiliensis*. *Chemosphere*. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.001

Nan P, Xia X, Du Q, Chen J, Wu X, Chang Z (2013) Genotoxic effects of 8-hydroxylquinoline in loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) assessed by the micronucleus test, comet assay and RAPD analysis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. doi:10.1016/j.etap.2013.02.005

Noor N, Zutshi B (2016) Bioaccumulation of Trace Metals in Tissues of Rohu Fish for Environmental Risk Assessment. *Journal of Water Resource and Protection*. doi.org/10.4236/jwarp.2016.84040

Oliveira GLS (2010) Avaliação da toxicidade de efluente após tratamento por processos oxidativos avançados. Trabalho de Conclusão de Curso Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Oliveira-Filho EC, Ramos MG, Freire IS, Muniz DHF (2011) Comparison between the efficiency of two bioindicators for determining surface water quality in an urban environment. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. doi: 10.4025/actascibiolsci.v33i3.7725

Palmieiri MJ (2012) Análise Comparativa do Efeito Citotóxico do SPL e seus Principais Componentes Fracionais, Dissertação Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Pathiratne A, Hemachandra CK, Silva N (2015) Efficacy of *Allium cepa* test system for screening cytotoxicity and genotoxicity of industrial effluents originated from different industrial activities *Environ Monit Assess*. doi: 10.1007/s10661-015-4954-z

Papagiannis I, Kagalou I, Leonardos J, Petridis D, Kalfakakou V (2007) Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). *Environment International*. doi:10.1016/j.envint.2003.08.002

Pastro MS (2012) Estabelecimento de diretrizes para um programa de manejo de nascentes na bacia do rio Itapemirim – ES. Monografia, Instituto de Florestas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Peron AP, Canesin EA, Cardoso CMV (2009) Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. Rev. Bras. Biociênc. ISSN 1980-4849

Pereira LP, Silva FEB, Flores EMM, Schrekker HS, Machado MM, Oliveira LFS (2015) *In vitro* ZnCl<sub>2</sub> cytotoxicity and genotoxicity in human leukocytes: Zero-order kinetic cellular zinc influx. Acta Scientiarum. doi: 10.4025/actascihealthsci.v37i1.25011

Pereira S, Cavalie I, Camilleri V, Gilbin R, Adam-Guillermin C (2013) Comparative genotoxicity of aluminium and cadmium in embryonic zebrafish cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.07.007

Pires EC, Chaparro TR (2010) Toxicity evaluation as a tool to assess the performance of an anaerobic immobilized biomass reactor. Dyna rev.fac.nac.minas, Medellín, v.77, n.164, p.284-391.

Ribeiro LR, (2003) Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo, in: L.R. Ribeiro, D.M. Salvadori, E.K. Marques (Eds.), Mutagênese Ambiental, Canoas, Ulbra, 2003, pp. 201–219.

Rodrigues FP, Angeli JPF, Mantovani MS, Guedes CLB, Jordão BQ (2010) Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. Genetics and Molecular Biology. doi.org/10.1590/S1415-47572010005000006

Rodrigues LA, Torres NH, Tornisielo VL, Ferreira LFR, Maranhão LA (2015) Determination of toxicity assays, trophic state index, and physicochemical parameters on Piracicaba River and Itapeva Stream. Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science. doi: 10.4136/1980-993X

Rodrigues LCA, Barbosa S, Pazin M, Maselli BS, Beijo LA, Kummrow F (2013) Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.

Russo C, Lucia R, Morescalchi MA, Stingo V (2004) Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. Ecotoxicology and Environmental Safety. doi:10.1016/S0147-6513(03)00027-7

Samardakiewicz S, Woźny A (2005) Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. Aquatic Botany. doi:10.1016/j.aquabot.2005.06.007

- Serrano-Garcia, L.; Montero-Montoya, R. (2001) Micronuclei ad chromatin buds are related genotoxic events. *Environmental Molecular Mutagenic*. doi: 10.1002/em.1048
- Shi J, Bezabhe R, Szkudlinska A (2010) Further evaluation of flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*. doi: 10.1093/mutage/geb040
- Simonyan A, Gabrielyan B, Minasyan S, Hovhannisyan G, Aroutiounian R (2015) Genotoxicity of Water Contaminants from the Basin of Lake Sevan, Armenia Evaluated by the Comet Assay in Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) and *Tradescantia Bioassays*. *Bull Environ Contam Toxicol*. doi 10.1007/s00128-015-1720-4
- Souza CC, Padula L, Silva LF, Irazusta SP (2013) Validação dos Bioensaios de Toxicidade como Adjuvantes no Monitoramento de Efluentes para Descarte. *Ecotoxicol. Environ. Contam*. doi: 10.5132/eec.2013.02.001
- Souza TS, Fontanetti CS (2006) Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutat Res*. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.02.010
- Steffens C, Klaucka CR, Benvenuti T, Silva LB, Rodrigues MAS (2015) Water quality assessment of the Sinos River – RS, Brazil. *Braz. J. Biol*. doi.org/10.1590/1519-6984.01613suppl
- Summak S, Aydemir NC, Vatan O, Yilmaz D, Zorlu T, Bilaloglu R (2010) Evaluation of genotoxicity from Nilufer Stream (Bursa/Turkey) water using piscine micronucleus test. *Food and Chemical Toxicology*. doi:10.1016/j.fct.2010.06.007
- Sunjog K, Kolarević S, Kračun-Kolarević M, Višnjić-Jeftić Z, Skorić S, Gačić Z, Lenhardt M, Vasić V, Vuković-Gačić B (2016) Assessment of status of three water bodies in Serbia based on tissue metal and metalloids concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). *Environmental Pollution*. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.008
- Swanton C (2004) Cell-cycle targeted therapies. *Lancet Oncology*. doi.org/10.1016/S1470-2045(03)01321-4
- Teixeira MB (2014) Genotoxicidade e modificações anatômicas radiculares em *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) provocadas pelo efluente do beneficiamento de rochas ornamentais. *Dissertação Universidade Federal de Lavras*
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen*. doi: 10737956

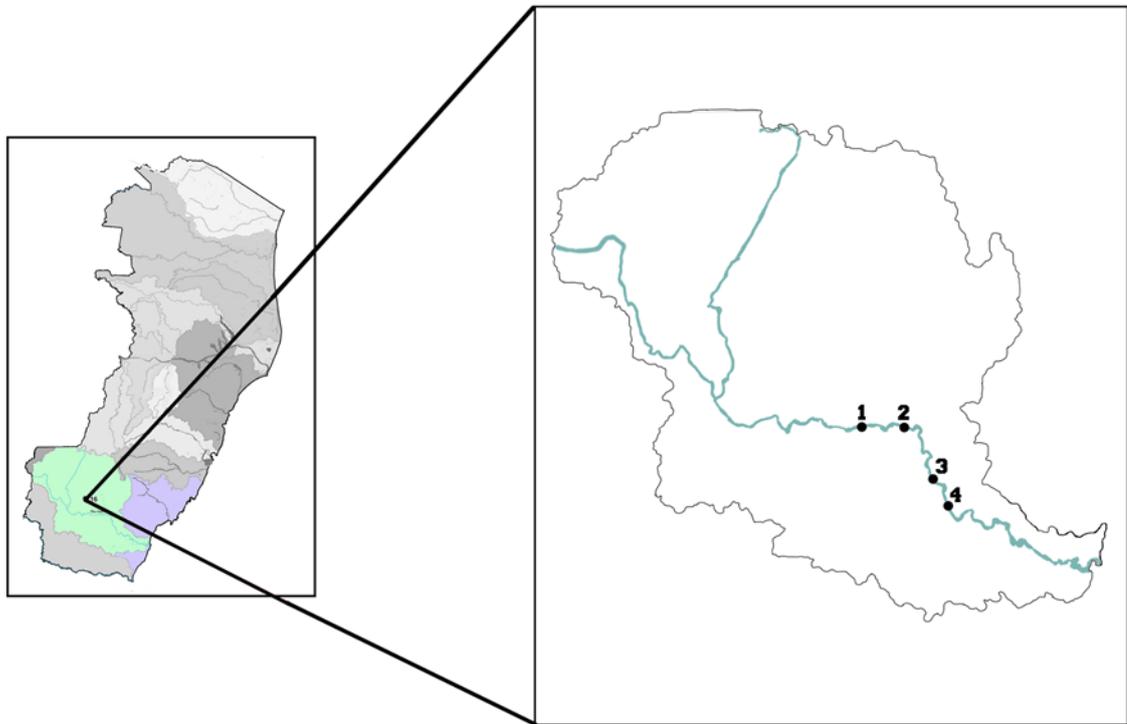
Tigini V, Giansanti P, Mangiavillano A, Pannocchia A, Varese GC (2011) Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, p.866-873. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.12.001

Trindade WM, Horn AH, Ribeiro EV (2012) Concentrações de metais pesados em sedimentos do rio São Francisco entre Três Marias e Pirapora-MG: geoquímica e classificação de risco ambiental. *Geonomos*. doi.org/10.18285/geonomos.v20i1.28

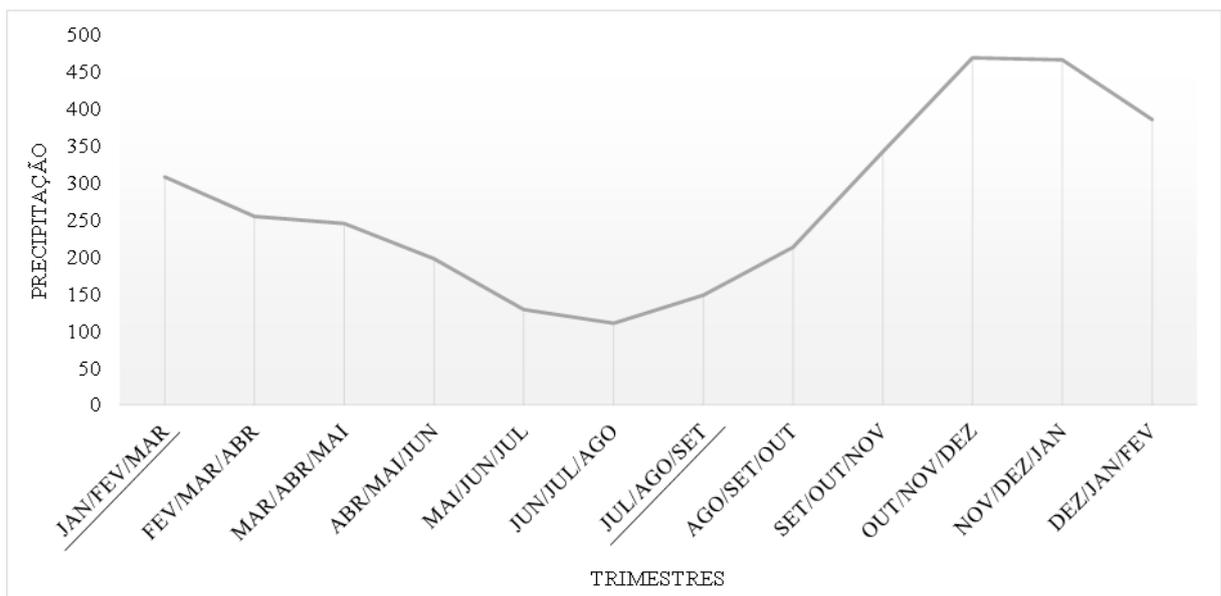
Trintinaglia L, Bianchi E, Silva LB, Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL (2015) Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. *Braz. J. Biol.* Vol. 75, no. 2 (suppl.), p. S75-S80. doi.org/10.1590/1519-6984.0113

Ventura BC, Angelis DF, Marin-Morales MA (2008) Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. doi:10.1016/j.pestbp.2007.07.009

Zegura B, Heath E, Cernoša A, Filipic M (2009) Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.041



**Fig. 1-** Bacia Hidrográfica do rio Itapemirim/ES e regiões de coleta ao longo rio (1) RI 01, (2) RI 02, (3) RI 03 e (4) RI 04



**Fig. 2-** Média da precipitação acumulada trimestral (mm) na região da estação meteorológica Cachoeiro de Itapemirim/ES. Ano 2015. Primeira campanha enquadra-se dentro do período de JANFEV/MAR, uma vez que essa foi realizada no final de março e a segunda campanha enquadra-se no período de JUL/AGO/SET, uma vez que foi realizada no início de outubro

**Tabela 1** - Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas ao longo do rio Itapemirim-ES no ano de 2016, nas duas campanhas realizadas

Tratamentos	VP*	Condutividade (uS)		pH		Temperatura (°C)		Oxigênio Dissolvido	
		-	-	6,0 a 9,0		-		> 2,0 mg/L	
		1° cam	2° cam	1° cam	2° cam	1° cam	2° cam	1° cam	2° cam
<b>RI 01</b>		90.5	95.7	7.4	7.24	30	26.1	9.2	6.1
<b>RI 02</b>		65.8	95.6	7.4	7.22	31.9	25.7	8.2	6.3
<b>RI 03</b>		159.5	102.9	7.4	5.41	32.7	26.2	8.5	6.1
<b>RI 04</b>		81.7	114.4	6.9	6.84	31.7	25.8	8.1	6.2

Nota: \*Valor permitido para ambientes lóticos na Resolução CONAMA 357/2005 estabelecido para águas classe 3. Os controles negativos e positivos foram inseridos após as coletas.

**Tabela 2**- Quantificação dos metais das amostras de água do rio Itapemirim/ES nas duas campanhas realizadas

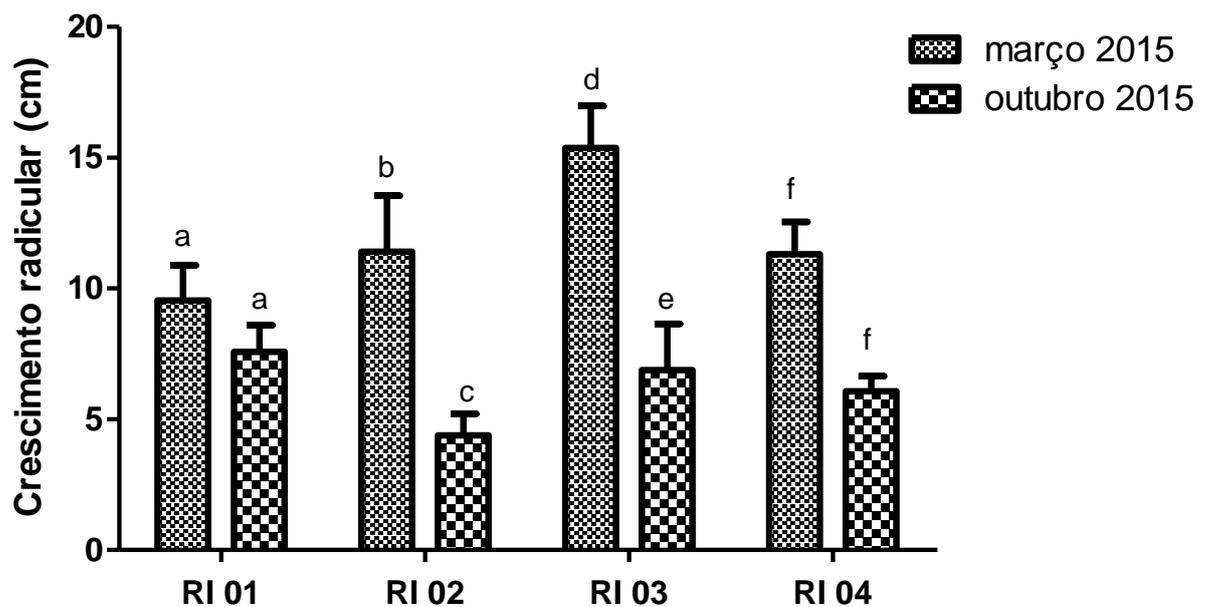
Amostras	VP*(mg/L)	Ni	Cr	Se	Al	Ba	Zn	Cu	Co	Mn	Pb	Cd
		(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)							
		0,025	0,05	0,05	0,2	1,0	5,0	0,013	0,2	0,5	0,033	0,01
<i>1° campanha</i>												
RI 01		<LD	<LD	<LD	0,1341	0,0072	0,021	0,0264	0,000207	0,026307	0,002	1,28x10 <sup>-5</sup>
RI 02		<LD	<LD	<LD	0,1564	0,0166	0,0250	0,0303	0,000222	0,027958	0,001265	1,92 x10 <sup>-5</sup>
RI 03		<LD	<LD	<LD	0,1555	0,0129	0,0276	0,0293	0,000340	0,039705	0,001777	1,13 x10 <sup>-5</sup>
RI 04		<LD	<LD	<LD	0,0474	0,0075	0,0225	0,0242	0,000243	0,047996	0,001189	1,82 x10 <sup>-5</sup>
<i>2° campanha</i>												
RI 01		<LD	<LD	<LD	0,5053	0,0134	0,0201	0,0268	0,000228	0,038736	0,001423	2,58 x10 <sup>-5</sup>
RI 02		<LD	<LD	<LD	0,5231	0,0148	0,0227	0,0303	0,000317	0,047259	0,000894	3,7x10 <sup>-6</sup>
RI 03		<LD	<LD	<LD	0,9065	0,0249	0,0384	0,0374	0,000262	0,042451	0,001412	7,8 x10 <sup>-6</sup>
RI 04		<LD	<LD	<LD	0,5991	0,0164	0,0310	0,0304	0,000305	0,063014	0,002271	1,48 x10 <sup>-5</sup>
<b>Limite de Detecção</b>		0,0018	0,0013	0,0093	0,0006	0,0005	0,001	0,0018	1,5x10 <sup>-6</sup>	2,66x10 <sup>-5</sup>	1,44x10 <sup>-5</sup>	4,2 x10 <sup>-6</sup>

Nota: VP = valor permitido pela Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas classe 3. LD = Limite de detecção.

**Tabela 3-** Crescimento médio das raízes (mm) de *Allium cepa* após exposição a amostras de água do rio Itapemirim/ES na primeira e na segunda campanha

Tratamento	1º campanha	2º campanha
Controle Negativo	14.86 ± 1.74 <sup>a</sup>	6.32 ± 1.68 <sup>a</sup>
Controle Positivo	8.85 ± 2.90 <sup>b</sup>	4.86 ± 3.14 <sup>a</sup>
RI 01	9.54 ± 3.03 <sup>b</sup>	7.58 ± 2.28 <sup>a</sup>
RI 02	11.41 ± 4.78 <sup>b</sup>	4.37 ± 1.86 <sup>a</sup>
RI 03	15.36 ± 3.58 <sup>a</sup>	6.88 ± 3.97 <sup>a</sup>
RI 04	11.32 ± 2.75 <sup>b</sup>	6.06 ± 1.30 <sup>a</sup>

Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média.

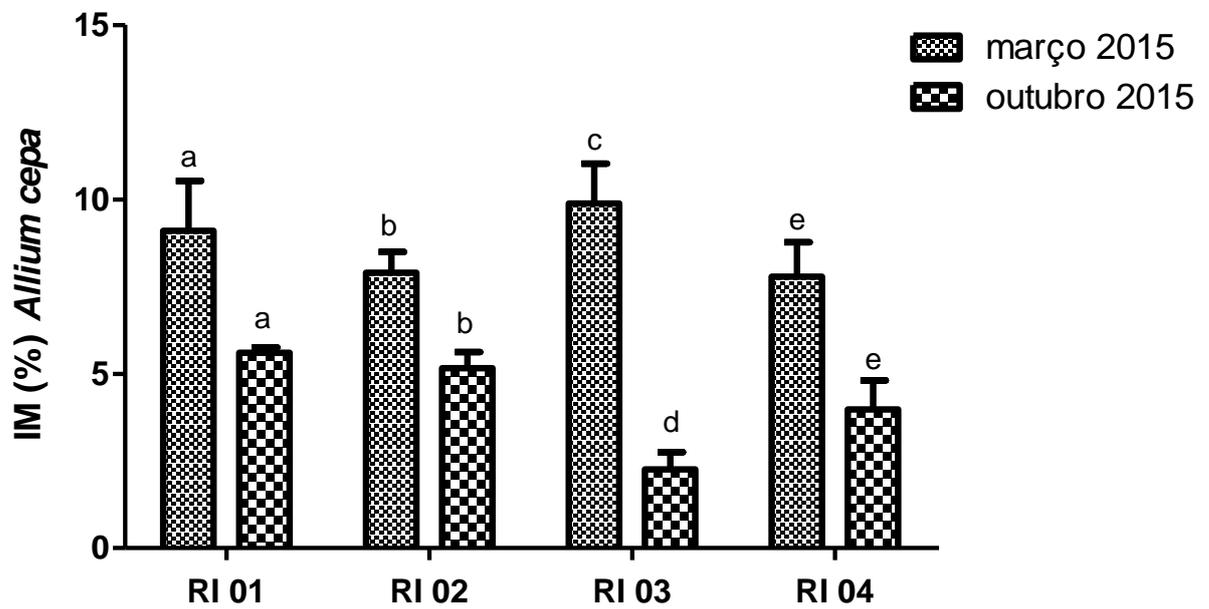


**Fig. 3-** Comparação do crescimento radicular de raízes de *A. cepa* submetidas as amostras de água do rio Itapemirim, nas duas campanhas realizadas. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos

**Tabela 4-** Frequência das fases do ciclo celular e IM (índice mitótico) de células meristemáticas de *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas do rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM)

Parâmetros	1° Campanha						2° Campanha					
	Controle Negativo	Controle Positivo	RI 01	RI 02	RI 03	RI 04	Controle Negativo	Controle Positivo	RI 01	RI 02	RI 03	RI 04
<b>Interfase</b>	90.2±3.39 <sup>a</sup>	89.36±1.75 <sup>a</sup>	88.72±3.26 <sup>a</sup>	88.98±0.54 <sup>a</sup>	87.04±3.2 <sup>a</sup>	90.92±2.65 <sup>a</sup>	92.42±3.65 <sup>a</sup>	93.64±0.9 <sup>ab</sup>	92.36±0.46 <sup>a</sup>	92.1±1.51 <sup>a</sup>	95.92±0.97 <sup>b</sup>	93.92±2.68 <sup>ab</sup>
<b>Prófase</b>	6.16±3.04 <sup>a</sup>	5.54±1.33 <sup>a</sup>	6.74±2.67 <sup>a</sup>	5.74±1.61 <sup>a</sup>	7.68±2.78 <sup>a</sup>	5.54±1.94 <sup>a</sup>	5.38±2.51 <sup>a</sup>	3.26±0.79 <sup>ab</sup>	4.08±0.34 <sup>a</sup>	3.78±0.99 <sup>a</sup>	1.74±0.91 <sup>b</sup>	3.12±1.41 <sup>ab</sup>
<b>Metáfase</b>	1.04±1.13 <sup>a</sup>	0.88±0.13 <sup>a</sup>	0.8±0.57 <sup>a</sup>	0.78±0.23 <sup>a</sup>	0.68±0.16 <sup>a</sup>	0.94±0.73 <sup>a</sup>	0.26±0.26 <sup>a</sup>	0.44±0.38 <sup>a</sup>	0.8±0.27 <sup>a</sup>	0.72±0.22 <sup>a</sup>	0.32±0.23 <sup>a</sup>	0.58±0.41 <sup>a</sup>
<b>Anáfase</b>	1.46±0.29 <sup>a</sup>	0.52±0.31 <sup>b</sup>	0.76±0.36 <sup>b</sup>	0.7±0.41 <sup>b</sup>	0.72±0.15 <sup>b</sup>	0.68±0.16 <sup>b</sup>	0.96±1.32 <sup>a</sup>	0.32±0.26 <sup>ab</sup>	0.38±0.19 <sup>ab</sup>	0.3±0.12 <sup>ab</sup>	0.1±0.07 <sup>c</sup>	0.16±0.09 <sup>bc</sup>
<b>Telófase</b>	1.08±0.25 <sup>a</sup>	0.54±0.30 <sup>a</sup>	0.8±0.34 <sup>a</sup>	0.68±0.37 <sup>a</sup>	0.8±0.23 <sup>a</sup>	0.62±0.26 <sup>a</sup>	0.36±0.32 <sup>a</sup>	0.18±0.08 <sup>a</sup>	0.34±0.23 <sup>a</sup>	0.36±0.18 <sup>a</sup>	0.1±0.10 <sup>a</sup>	0.12±0.13 <sup>a</sup>
<b>IM</b>	9.74±3.41 <sup>a</sup>	7.48±1.54 <sup>a</sup>	9.1±3.19 <sup>a</sup>	7.9±1.32 <sup>a</sup>	9.88±2.56 <sup>a</sup>	7.78±2.22 <sup>a</sup>	6.96±3.74 <sup>a</sup>	4.2±1.12 <sup>ab</sup>	5.6±0.35 <sup>a</sup>	5.16±1.03 <sup>a</sup>	2.26±1.09 <sup>b</sup>	3.98±1.89 <sup>ab</sup>

Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média.



**Fig. 4-** Comparação do Índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* submetidas as amostras de água do rio Itapemirim, nas duas campanhas realizadas. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos

**Tabela 5-** Frequência de aberrações cromossômicas avaliados pelo ensaio com *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas no rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM)

<b>Aberrações Cromossômicas</b>	<b>Controle Negativo</b>	<b>Controle Positivo</b>	<b>RI 01</b>	<b>RI 02</b>	<b>RI 03</b>	<b>RI 04</b>
<b><i>1ª Campanha</i></b>						
C-metáfase	0.1±0.12 <sup>a</sup>	1.02±0.22 <sup>b</sup>	0.8±0.51 <sup>b</sup>	0.96±0.55 <sup>b</sup>	1.16±0.38 <sup>b</sup>	0.54±0.42 <sup>a</sup>
Aderência	0.08±0.08 <sup>a</sup>	1.16±0.15 <sup>c</sup>	0.48±0.11 <sup>b</sup>	0.5±0.19 <sup>b</sup>	0.86±0.36 <sup>c</sup>	0.4±0.38 <sup>b</sup>
Ponte	0.04±0.05 <sup>a</sup>	0.36±0.21 <sup>b</sup>	0.4±0.27 <sup>b</sup>	0.44±0.21 <sup>b</sup>	0.28±0.04 <sup>b</sup>	0.18±0.16 <sup>a</sup>
Quebra	0±0 <sup>a</sup>	0.06±0.09 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>	0.06±0.09 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>
Perda	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.12±0.13 <sup>b</sup>	0.08±0.08 <sup>b</sup>	0.06±0.05 <sup>b</sup>
Atraso	0±0 <sup>a</sup>	0.26±0.11 <sup>b</sup>	0.14±0.05 <sup>b</sup>	0.18±0.16 <sup>b</sup>	0.2±0.07 <sup>b</sup>	0.04±0.09 <sup>b</sup>
A. multipolar	0±0 <sup>a</sup>	0.04±0.05 <sup>a</sup>	0.16±0.21 <sup>a</sup>	0.08±0.04 <sup>a</sup>	0.08±0.08 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>
AC	0.22±0.16 <sup>a</sup>	2.84±0.27 <sup>c</sup>	1.98±0.59 <sup>bc</sup>	2.28±0.81 <sup>bc</sup>	2.66±0.51 <sup>c</sup>	1.24±0.61 <sup>ab</sup>
<b><i>2ª campanha</i></b>						
C-metáfase	0.14±0.22 <sup>a</sup>	0.52±0.23 <sup>a</sup>	0.46±0.22 <sup>a</sup>	1.1±0.34 <sup>a</sup>	0.48±0.26 <sup>a</sup>	0.66±0.26 <sup>a</sup>
Aderência	0.1±0.14 <sup>a</sup>	0.34±0.26 <sup>abc</sup>	0.44±0.26 <sup>c</sup>	0.44±0.15 <sup>c</sup>	0.26±0.15 <sup>abc</sup>	0.18±0.18 <sup>ab</sup>
Ponte	0.04±0.09 <sup>a</sup>	0.18±0.15 <sup>ab</sup>	0.46±0.22 <sup>b</sup>	0.36±0.22 <sup>b</sup>	0.18±0.19 <sup>ab</sup>	0.34±0.24 <sup>b</sup>
Quebra	0.04±0.09 <sup>a</sup>	0.12±0.13 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>	0.1±0.07 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>
Perda	0.04±0.05 <sup>a</sup>	0.06±0.09 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.02±0.04 <sup>a</sup>
Atraso	0.1±0.22 <sup>a</sup>	0.18±0.15 <sup>ab</sup>	0.52±0.16 <sup>bc</sup>	0.5±0.12 <sup>bc</sup>	0.72±0.30 <sup>c</sup>	0.72±0.48 <sup>c</sup>
A. multipolar	0±0 <sup>a</sup>	0.12±0.12 <sup>a</sup>	0.12±0.22 <sup>a</sup>	0.22±0.08 <sup>a</sup>	0.16±0.13 <sup>a</sup>	0.16±0.15 <sup>a</sup>
AC	0.42±0.41 <sup>a</sup>	1.40±0.38 <sup>ab</sup>	2.02±0.37 <sup>bc</sup>	2.62±0.72 <sup>c</sup>	1.80±0.37 <sup>bc</sup>	2.08±1.0 <sup>bc</sup>

Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média.

**Tabela 6-** Frequência de micronúcleos (MN) em células meristemáticas e F1, avaliados pelo ensaio com *Allium cepa* após exposição às amostras de água coletadas no rio Itapemirim/ES e controles negativo e positivo (MMS  $4 \times 10^{-4}$  mM)

Tratamento	1° Campanha		2° campanha	
	MN (Meristemática)	MN (F1)	MN (Meristemática)	MN (F1)
<b>Controle Negativo</b>	0.02±0.04 <sup>a</sup>	0.0±0.00 <sup>a</sup>	0.16±0.26 <sup>ab</sup>	0.0±0.00 <sup>a</sup>
<b>Controle Positivo</b>	0.26±0.24 <sup>a</sup>	0.56±0.40 <sup>c</sup>	0.28±0.23 <sup>b</sup>	0.40±0.32 <sup>b</sup>
<b>RI 01</b>	0.10±0.12 <sup>a</sup>	0.10±0.07 <sup>ab</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.12±0.08 <sup>ab</sup>
<b>RI 02</b>	0.82±0.51 <sup>b</sup>	0.34±0.18 <sup>bc</sup>	0.02±0.04 <sup>ab</sup>	0.0±0.0 <sup>a</sup>
<b>RI 03</b>	0.34±0.42 <sup>a</sup>	0.46±0.34 <sup>bc</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.10±0.12 <sup>ab</sup>
<b>RI 04</b>	0.04±0.05 <sup>a</sup>	0.12±0.18 <sup>c</sup>	0±0 <sup>a</sup>	0.10±0.12 <sup>ab</sup>

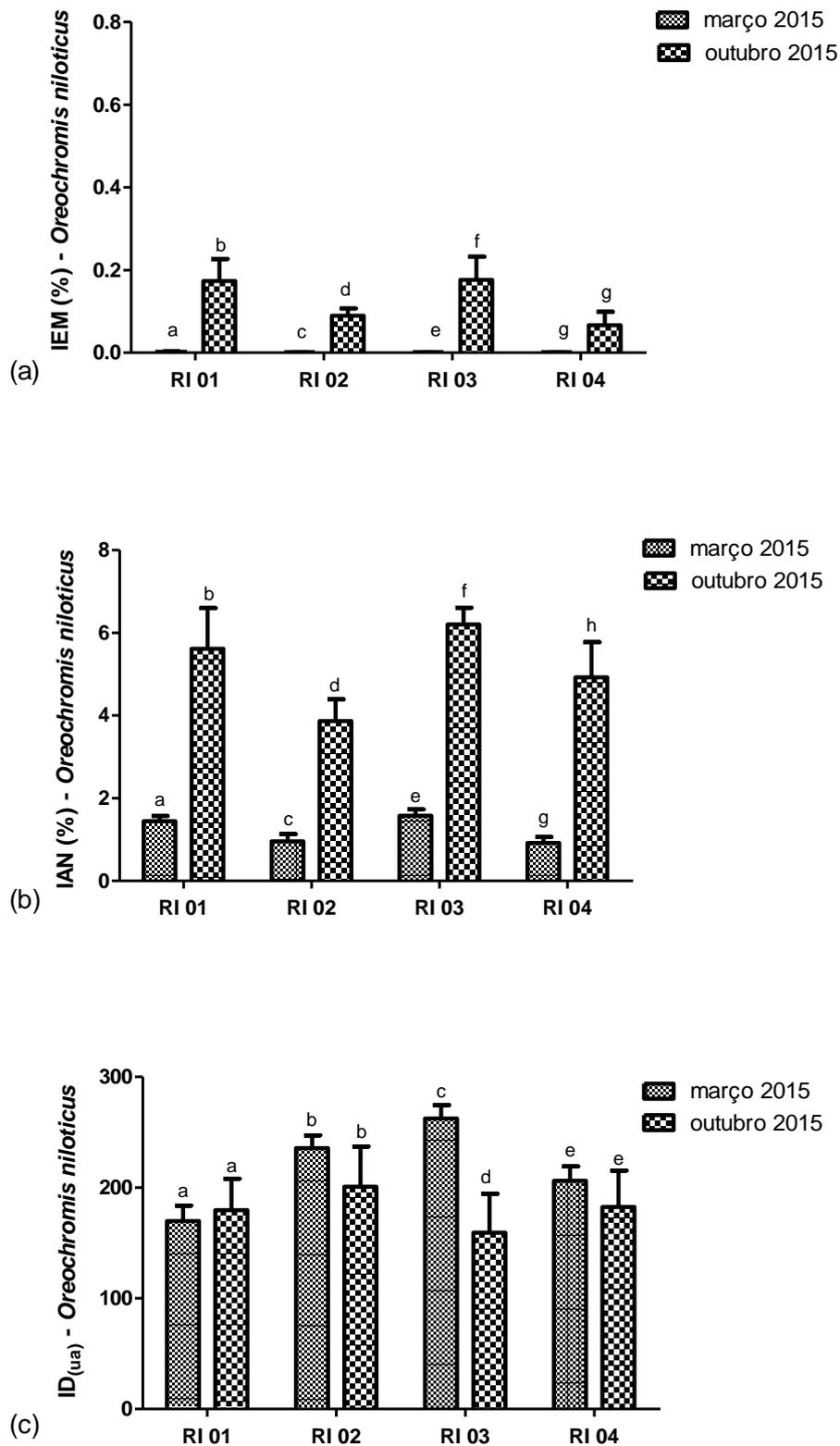
Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média.

**Tabela 7-** Avaliação alterações nucleares e mutagênica de amostras de água de quatro estações ao longo do rio Itapemirim/ES em eritrócitos de *O. nilóticos* com base no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa, nas duas campanhas realizadas

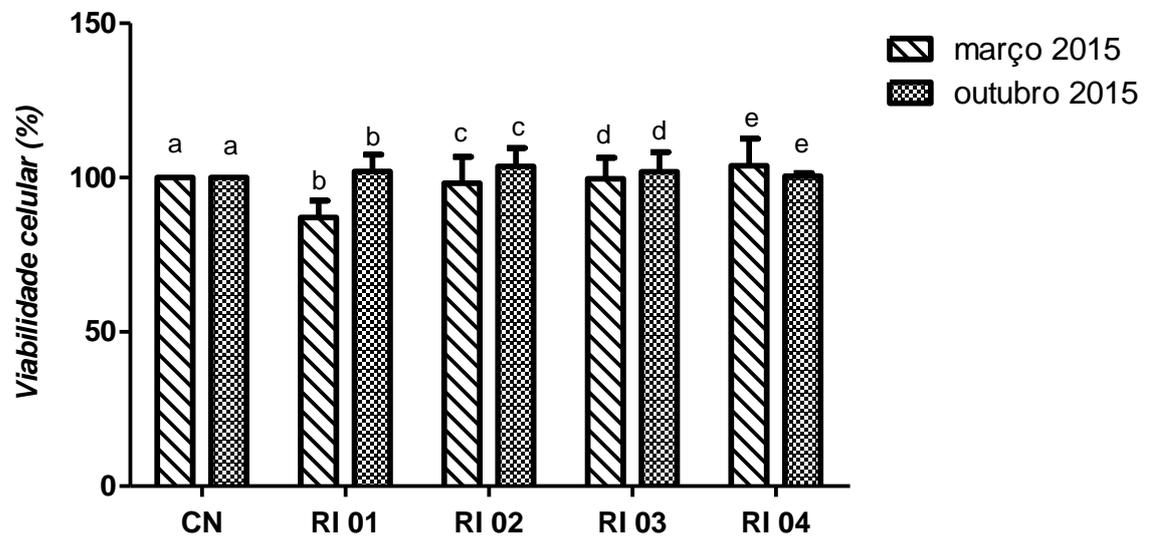
Tratamentos	Teste do Micronúcleo		Ensaio do cometa					I.D. <sub>(ua)</sub>
	IAN	IEM	Classes					
			0	1	2	3	4	
<i>1° campanha</i>								
Controle Negativo	0.44±0.18 <sup>a</sup>	0.023±0.05 <sup>a</sup>	94.0±1.94 <sup>a</sup>	5.80±1.98 <sup>a</sup>	0.2±4.07 <sup>a</sup>	0.00±2.31 <sup>a</sup>	0.00±3.780.00 <sup>a</sup>	6.20±11.3 <sup>a</sup>
Controle Positivo	1.88±0.63 <sup>c</sup>	0.063±0.05 <sup>a</sup>	1.60±1.94 <sup>c</sup>	13.2±1.98 <sup>a</sup>	28.2±4.07 <sup>b</sup>	34.6±2.31 <sup>c</sup>	22.4±3.78 <sup>b</sup>	263.0±11.3 <sup>c</sup>
RI 01	1.44±0.40 <sup>bc</sup>	0.067±0.09 <sup>a</sup>	11.8±1.94 <sup>b</sup>	37.8±1.98 <sup>b</sup>	27.2±4.07 <sup>b</sup>	15.2±2.31 <sup>b</sup>	8.00±3.78 <sup>a</sup>	169.8±11.3 <sup>b</sup>
RI 02	0.96±0.55 <sup>b</sup>	0.047±0.03 <sup>a</sup>	2.80±1.94 <sup>c</sup>	20.2±1.98 <sup>a</sup>	31.8±4.07 <sup>b</sup>	28.8±2.31 <sup>c</sup>	16.4±3.78 <sup>b</sup>	235.8±11.3 <sup>c</sup>
RI 03	1.58±0.49 <sup>c</sup>	0.04±0.04 <sup>a</sup>	0.20±1.94 <sup>c</sup>	11.4±1.98 <sup>a</sup>	34.6±4.07 <sup>b</sup>	33.4±2.31 <sup>c</sup>	20.4±3.78 <sup>b</sup>	262.4±11.3 <sup>c</sup>
RI 04	0.92±0.46 <sup>ab</sup>	0.037±0.03 <sup>a</sup>	3.40±1.94 <sup>c</sup>	28.4±1.98 <sup>b</sup>	37.4±4.07 <sup>b</sup>	20.2±2.31 <sup>b</sup>	10.6±3.78 <sup>a</sup>	206.2±11.3 <sup>b</sup>
<i>2° campanha</i>								
Controle Negativo	1.99±0.87 <sup>a</sup>	0.03±0.03 <sup>a</sup>	3.20±3.98 <sup>a</sup>	82.6±10.97 <sup>a</sup>	13.6±5.19 <sup>a</sup>	0.60±10.64 <sup>a</sup>	nd	78,67±27.4 <sup>a</sup>
Controle Positivo	7.25±2.03 <sup>d</sup>	0.15±0.07 <sup>b</sup>	2.40±3.98 <sup>b</sup>	7.40±10.97 <sup>a</sup>	36.6±5.19 <sup>a</sup>	37.8±10.64 <sup>a</sup>	nd	184.7±27.4 <sup>b</sup>
RI 01	5.61±3.11 <sup>bcd</sup>	0.17±0.17 <sup>b</sup>	8.40±3.98 <sup>b</sup>	30.8±10.97 <sup>a</sup>	39.6±5.19 <sup>a</sup>	17.8±10.64 <sup>a</sup>	nd	179.67±27.4 <sup>b</sup>
RI 02	3.87±1.67 <sup>ab</sup>	0.09±0.05 <sup>ab</sup>	2.80±3.98 <sup>b</sup>	36.6±10.97 <sup>a</sup>	40.2±5.19 <sup>a</sup>	16.4±10.64 <sup>a</sup>	nd	201±27.4 <sup>b</sup>
RI 03	6.2±1.29 <sup>cd</sup>	0.18±0.18 <sup>b</sup>	3.20±3.98 <sup>b</sup>	70.6±10.97 <sup>a</sup>	17.8±5.19 <sup>a</sup>	6.60±10.64 <sup>a</sup>	nd	159.33±27.4 <sup>b</sup>
RI 04	4.93±2.68 <sup>bc</sup>	0.07±0.10 <sup>a</sup>	1.80±3.98 <sup>b</sup>	51.2±10.97 <sup>a</sup>	26.8±5.19 <sup>a</sup>	15.20±10.64 <sup>a</sup>	nd	182.67±27.4 <sup>b</sup>

AN e MN: Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média. ID: Médias ± EP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Scott e Knott ( $p < 0.05$ ). EP: Erro padrão da média.

Nota: IAN = anormalidades nucleares; IEM = índice de efeito mutagênico e I.D = índice de danos.



**Fig. 5-** Comparação entre as campanhas para o índice de alterações genotóxicas (a), mutagênicas(b) e o índice de danos no DNA (c) em eritrócitos de *O. niloticus* expostos as amostras de água do rio Itapemirim/ES. Colunas das estações com letras diferentes apresentaram resultados significativos



**Fig. 6-** Viabilidade celular de células de ovário de hamster chinês expostas a amostras de água do rio Itapemirim/ES, em duas campanhas. Médias  $\pm$  SD de acordo com Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Colunas com as mesmas letras nas estações não diferem estatisticamente

**Tabela 8-** Valores médios e desvio padrão das classes de dano no DNA e do escore, obtidos por meio do ensaio cometa em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) expostas as águas do rio Itapemirim-ES, em época de alta precipitação (1° campanha) e estiagem (2° campanha)

Tratamentos	Classes					I.D. <sub>(ua)</sub>
	0	1	2	3	4	
<i>1° campanha</i>						
Controle Negativo	89.7±2.52 <sup>a</sup>	7.67±3.05 <sup>a</sup>	1.00±1.00 <sup>a</sup>	1.67±0.58 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	14.7±2.02 <sup>ab</sup>
Controle Positivo	12.3±8.14 <sup>b</sup>	31.7±10.5 <sup>a</sup>	37.3±4.73 <sup>c</sup>	17.3±6.35 <sup>a</sup>	1.33±1.53 <sup>a</sup>	163.7±26.6 <sup>c</sup>
RI 01	86.7±8.08 <sup>a</sup>	5.00±4.36 <sup>a</sup>	4.67±3.79 <sup>ab</sup>	3.33±2.31 <sup>a</sup>	0.33±0.58 <sup>a</sup>	25.7±15.00 <sup>ab</sup>
RI 02	67.7±17.9 <sup>ab</sup>	13.0±7.94 <sup>a</sup>	11.0±3.61 <sup>bc</sup>	4.67±3.78 <sup>a</sup>	3.67±3.05 <sup>a</sup>	63.7±38.0 <sup>bc</sup>
RI 03	76.3±13.8 <sup>ab</sup>	9.33±6.81 <sup>a</sup>	8.67±6.03 <sup>abc</sup>	4.33±4.16 <sup>a</sup>	1.33±1.53 <sup>a</sup>	45.0±31.5 <sup>abc</sup>
RI 04	91.7±5.86 <sup>a</sup>	4.33±1.53 <sup>a</sup>	2.67±2.52 <sup>ab</sup>	1.33±2.31 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	13.7±12.7 <sup>a</sup>
<i>2° campanha</i>						
Controle Negativo	92.67±1.53 <sup>a</sup>	4.00±1.00 <sup>a</sup>	1.33±0.58 <sup>a</sup>	2.00±1.41 <sup>a</sup>	0.67±0.58 <sup>a</sup>	13.33±5.86 <sup>a</sup>
Controle Positivo	1.67±2.89 <sup>c</sup>	13.33±6.66 <sup>abc</sup>	37.67±11.06 <sup>c</sup>	39.33±12.06 <sup>b</sup>	8.00±7.00 <sup>b</sup>	238.67±34.06 <sup>c</sup>
RI 01	84.67±0.58 <sup>ab</sup>	6.00±2.00 <sup>ab</sup>	3.00±1.00 <sup>ab</sup>	2.67±2.08 <sup>a</sup>	3.67±0.58 <sup>b</sup>	34.67±4.04 <sup>ab</sup>
RI 02	35.33±28.88 <sup>bc</sup>	43.67±37.58 <sup>c</sup>	10.67±6.51 <sup>bc</sup>	6.00±4.36 <sup>ab</sup>	4.33±1.53 <sup>b</sup>	100.33±17.04 <sup>bc</sup>
RI 03	49.00±42.51 <sup>bc</sup>	37.00±40.71 <sup>bc</sup>	5.67±2.08 <sup>abc</sup>	5.00±1.73 <sup>ab</sup>	3.33±1.15 <sup>ab</sup>	76.67±45.17 <sup>bc</sup>
RI 04	74.00±6.00 <sup>abc</sup>	15.67±8.33 <sup>bc</sup>	5.67±4.62 <sup>abc</sup>	2.33±0.58 <sup>a</sup>	2.33±0.58 <sup>ab</sup>	43.33±9.61 <sup>ab</sup>

Médias ± DP seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o Teste de Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ). DP: Desvio padrão da média. Nota: I.D = índice de danos.

## 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria das variáveis abióticas avaliadas demonstraram que as águas coletadas ao longo do rio Itapemirim/ES estavam de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005.

Com relação aos testes toxicogenéticos (Tabela 2), os resultados indicam potencial fitotóxico das amostras de águas na primeira campanha, por meio do teste de crescimento radicular nas células meristemáticas de *A. cepa*. O efeito citotóxico foi avaliado pelo índice mitótico das células meristemáticas de *A. cepa* e pelo teste do MTT em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1), onde os resultados não apresentaram valores significativos, exceto na estação RI 03 da segunda campanha. Já o efeito genotóxico das amostras de água das quatro estações ao longo do rio Itapemirim foram analisadas por meio do teste com *A. cepa*, do micronúcleo em eritrócitos de *O. niloticus* e no ensaio do cometa em *O. niloticus* e células CHO-K1. Com relação ao efeito mutagênico, percebeu-se uma sensibilidade maior das células em F1 de *A. cepa* quando comparadas com as células meristemáticas das mesmas, sendo que as primeiras demonstraram um efeito positivo para as estações RI 02, RI 03 e RI 04 da primeira campanha. No entanto, os dados encontrados no teste do micronúcleo em eritrócitos de peixe comprovaram o efeito mutagênico das amostras de água da segunda campanha.

Os resultados obtidos na quantificação dos metais das amostras de água sugerem que os danos causados as células e eritrócitos estudados estão relacionadas com as concentrações acima do permitido pela legislação de Al e Cu, bem como, pelo efeito sinérgicos dos componentes químicos presente na água.

De maneira geral, todas as amostras avaliadas em particular a estação RI 03, localizada ao final do centro urbano de Cachoeiro de Itapemirim, apresentaram danos nas células de *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de CHO-K1. E que as duas campanhas analisadas demonstraram efeito negativo nos bioensaios, com ênfase no período de estiagem, o que sugere que no período de alta precipitação os contaminantes chegam no rio por meio da lixiviação das águas da chuva e que com a diminuição da turbulência ocorre o aumento da concentração desses contaminantes.

Indicando assim, que a qualidade da água do rio Itapemirim/ES encontra-se comprometida e necessita de planos de ação com medidas para a recuperação do

rio em razão de ser subsidio para diversas forma de uso em toda a região. Além de demonstrar a importância do biomonitoramento na região.

Tabela 2- Resumo dos resultados encontrados nos testes com *A. cepa*, *O. niloticus* e cultura de CHO-K1

Efeitos	Bioensaios		
	<i>A. cepa</i>	<i>O. niloticus</i>	Cultura CHO-K1
<i>1° campanha</i>			
Fitotóxico	RI 01, RI 02 e RI 04	–	–
Citotóxico	NE	–	NE
Genotóxico	RI 01, RI 02 e RI 03	Teste MN RI 01, RI 02 e RI 03	Cometa RI 01, RI 02, RI 03 e RI 04
Mutagênico	Meristemática	NE	–
	F1 RI 02      RI 02 e RI 03		
<i>2° campanha</i>			
Fitotóxico	NE	–	–
Citotóxico	RI 03	–	NE
Genotóxico	RI 01, RI 02, RI 03 e RI 04	Teste MN RI 01, RI 03 e RI 04	Cometa RI 01, RI 02, RI 03 e RI 04
Mutagênico	NE	RI 01 e RI 03	–

Nota: NE = nenhuma estação. Traço (-) = não foi realizado o teste para o bioensaio.