



ARTIGO

## 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*

Ian Drumond Duarte<sup>1</sup>, Mauro Cesar Dias<sup>2</sup>,  
Jose Augusto de Oliveira David<sup>3</sup> e Silvia Tamie Matsumoto<sup>1\*</sup>

Recebido: 07 de outubro de 2011    Recebido após revisão: 13 de fevereiro de 2012    Aceito: 22 de fevereiro de 2012  
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2064>

**RESUMO:** (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*). Para a avaliação da qualidade da água, os critérios físico-químicos devem ser somados a aspectos bióticos que podem ser mensurados por testes citogenéticos. Evolutivamente próximos, os peixes apresentam metabolismo similar ao dos vertebrados superiores quando expostos a químicos nocivos. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) é ótimo modelo-teste para investigações a partir do ensaio do cometa e teste do micronúcleo, para avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade. A Lagoa Jacuném, localizada no município de Serra/ES, desempenha importante papel socioeconômico. Sua bacia de drenagem é ocupada por áreas residenciais e industriais que intensificam o processo de eutrofização. A avaliação da qualidade da água ocorreu durante época de alta e baixa precipitação em três pontos amostrais. Em laboratório, amostras de água foram armazenadas em reservatórios com alevinos. Dois aquários corresponderam aos controles negativo (água com qualidade) e positivo (ciclofosfamida injetada). Após 72 horas, os peixes foram anestesiados e o sangue retirado para realizar o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa. Valores dos parâmetros físico-químicos revelam que o IQA (Índice de Qualidade da Água) foi considerado bom, todavia outros parâmetros apresentaram valores fora do espectro aceito pela legislação, inclusive os metais Al e Cd. Sugere-se que a lagoa encontra-se impactada devido ao aporte de efluentes. Os resultados do teste do micronúcleo e ensaio do cometa indicam elevados potenciais mutagênico e genotóxico. A mutagenicidade e genotoxicidade podem estar relacionadas à presença de químicos. Os maiores valores de genotoxicidade e mutagenicidade ocorreram durante o período de chuva. Conclui-se que a lagoa apresenta elevado potencial genotóxico e mutagênico.

**Palavras-chave:** genotoxicidade, mutagenicidade, metais.

**ABSTRACT:** (The water quality of Pond Jacuném (Espírito Santo, Brazil) concerning genotoxic and mutagenic aspects, respectively measured by the comet assay and micronucleus test in fish species *Oreochromis niloticus*). For the assessment of water quality, physical-chemical criteria must be added to biotic aspects that can be measured by cytogenetic tests. Evolutionarily close, the fish have metabolism similar to that of higher vertebrates when exposed to harmful chemicals. *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) is a very good test-model for researches using the micronucleus test and comet assay, for assessment of genotoxic and mutagenic effects. The Pond Jacuném, municipality of Serra/ES, plays an important socioeconomic role. Its drainage basin is occupied by residential and industrial areas which enhance the process of eutrophication. The assessment of water quality occurred during high and low rainfall seasons in three take sampling sites. In laboratory, sampled water were stored in reservoirs with alevins. Two reservoirs corresponded the negative (water with quality) and positive (cyclophosphamide injected) controls. After 72 hours, fish were anaesthetized and blood taken to perform the micronucleus test and comet assay. Values of physicochemical parameters indicates that the WQI (Water Quality Index) was considered good, but other parameters showed values outside of the range levels accepted by the legislation, including metals Al and Cd. It is suggested that the pond is impacted due to effluents input. The results of the micronucleus test and comet assay indicate high mutagenic and genotoxic potential. The mutagenicity and genotoxicity may be related to the presence of chemicals. The highest values of genotoxicity and mutagenicity occurred during the rainfall period of the pond. It is concluded that the pond has a high genotoxic and mutagenic potential.

**Key words:** genotoxicity, mutagenicity, metals.

### INTRODUÇÃO

Algumas agências monitoram os níveis de poluição do ar e da água, porém testes de toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade são pouco realizados (Grover & Kaur 1999). A gestão dos recursos hídricos e sua pro-

teção não devem se basear apenas nos critérios físico-químicos e bacterianos, já que testes realizados longe da fonte poluidora podem ser insensíveis e não detectar pequenas perturbações sobre o ecossistema, além de fornecerem avaliação pontual (Békaert 2002, Buss *et al.* 2003).

1. Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). CEP 29075-910, Vitória, ES, Brasil.

2. Coordenadorias dos cursos Técnico em Química e Licenciatura em Química, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (IFES). CEP 29040-780, Vitória, ES, Brasil.

3. Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil.

\*Autor para contato. E-mail: [siltamie@gmail.com](mailto:siltamie@gmail.com)

Os critérios bióticos medem diretamente a condição de risco do recurso, detectam problemas que outros métodos podem subestimar ou não diagnosticar. Esses não substituem as tradicionais abordagens químicas e físicas, mas complementam a detecção da degradação (Karr 1981). Sendo assim, é necessária integração de modo a somar ao método tradicional, os aspectos bióticos que podem ser mensurados a partir de análises ecotoxicológicas, para a avaliação da qualidade da água (Buss *et al.* 2003).

Os peixes, sobretudo a espécie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758), são listados como bons bioindicadores, sendo utilizados no monitoramento da qualidade da água (Fontainhas-Fernandes 2005, Çavas & Könen 2008, Osman 2010), e na avaliação de efeitos genotóxicos e mutagênicos dos variados xenobióticos ao meio ambiente, por meio do teste do micronúcleo e ensaio do cometa (Cestari *et al.* 2004, Rocha *et al.* 2009, Barbosa *et al.* 2010).

O teste do micronúcleo é considerado uma técnica vantajosa cuja análise é relativamente simples. Os eritrócitos de peixes tem se mostrado de fácil análise de micronúcleos, portanto sendo adequado para o teste (Udroiu 2006, Polard *et al.* 2011). Além disso, a simplicidade e rapidez na obtenção do sangue periférico de peixe torna a técnica ainda mais adequada para a avaliação da contaminação ambiental (Grassi 2002). Já o ensaio do cometa apresenta potencial de aplicação quase ilimitado para o biomonitoramento ambiental, com vários organismos aquáticos sendo utilizados para este fim (Klobucar *et al.* 2003, Valverde & Rojas 2009, Nwani *et al.* 2010). E como posto por Rothfuss *et al.* (2010), esta técnica é importante por complementar as análises do teste do micronúcleo.

A Lagoa Jacuném é um ambiente lacustre costeiro localizado no município de Serra - Espírito Santo (22°10'S e 40°13'W). De acordo com a resolução CONAMA 357/2005, é classificada como ambiente de Classe 2. Cercada por bairros industriais e residenciais, sua área é de 1,46 km<sup>2</sup>. A lagoa se encontra em processo de eutrofização artificial devido ao constante aporte de efluentes domésticos e industriais lançados diretamente ou indiretamente por meio de córregos. A lagoa serviu de manancial para o abastecimento público até fins de 1983, ano em que foram desativados os sistemas de captação e tratamento convencional, todavia, ainda é local de pesca, recreação e lazer. Desde a década de 1980, este ecossistema sofre impactos ambientais pelo mau uso e ocupação do solo de sua bacia de drenagem (32,06 km<sup>2</sup>), sendo 48% desta situada em área urbana (Leal 2006, Léllis 2006).

Diante da contribuição das atividades residenciais, industriais e rurais na degradação dos corpos d'água pela emissão de efluentes pontuais e não pontuais contendo substâncias tóxicas que são potencialmente malélicas aos organismos que interagem com o ambiente em questão, observa-se a necessidade do monitoramento constante desses ambientes por testes

que sejam rápidos e sensíveis. Para atender a essa necessidade, este trabalho teve como objetivos avaliar a genotoxicidade a partir do ensaio do cometa e a mutagenicidade pelo teste do micronúcleo de amostras de água da Lagoa Jacuném, localizada no município de Serra - Espírito Santo, utilizando como organismo teste espécimes de *Oreochromis niloticus*. Além disso, procurou-se demonstrar a correlação e interdependência dos parâmetros físico-químicos e bióticos para a plena avaliação do ambiente aquático.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Pontos de Amostragem

Para a caracterização das condições da Lagoa Jacuném foram definidas três estações amostrais distribuídas ao longo da lagoa e de seu canal de drenagem (Fig. 1): J1: Localizado no bairro Barcelona, perímetro urbano. Latitude 20°10'10.80"S e longitude 40°14'21.80"O. Aproximadamente 536 m de J2 e 4508 m de J3.

J2: Localizado no bairro CIVIT I, perímetro industrial, na antiga estação de captação da CESAN (Companhia Espírito Santense de Saneamento). Latitude 20°9'58.80"S e longitude 40°14'6.10"O. Aproximadamente 4018 m de J3.

J3: Localizado no bairro Jacaraípe, perímetro urbano e rural, efluente da lagoa Jacuném. Sob a ponte na Estrada Jacaraípe - Serra. Latitude 20° 9'17.00"S e longitude 40°11'19.20"O.

As coletas consistiram de amostragem de água superficial, acondicionadas em frascos plásticos, armazenados com aeração durante cinco dias em local refrigerado. Foram realizadas duas campanhas, a primeira ocorreu no dia 20 de agosto de 2010 a segunda campanha ocorreu no dia 25 de setembro de 2010.

### Parâmetros físico-químicos

Foram determinados pelo Laboratório do Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos (IEMA) do estado do Espírito Santo, Brasil, os parâmetros físico-químicos: Condutividade (µS/cm), Clorofila-a (µg/L), Surfactantes (mg/L), Sólidos Dissolvidos (mg/L), N(NH<sub>3</sub>) (mg/L), N(kj) (mg/L), N(NO<sub>3</sub>) (mg/L), N(NO<sub>2</sub>) (mg/L), DQO (mg/L), DBO (mgO<sub>2</sub>/L), P total (mg/L), N total (mg/L), OD (mgO<sub>2</sub>/L), Sólidos Totais (mg/L), Temperatura do ar (°C), Temperatura da água (°C), Turbidez (UNT), pH, Coliformes termotolerantes (Colif.)(NMP/100 mL) e IQA (Índice de Qualidade da água).

Foram quantificados os seguintes metais (mg/L): Alumínio (Al); Bário (Ba), Cádmiu (Cd); Cobalto (Co); Cromo (Cr); Cobre (Cu); Manganês (Mn); Níquel (Ni); Chumbo (Pb); Selênio (Se) e Zinco (Zn). As análises foram feitas por espectrometria de emissão atômica, ICP (Inductive Coupled Plasm), em aparelho Varian Modelo 700, no Laboratório de Análise Instrumental do Instituto Federal do Espírito Santo, Vitória (IFES).

### Bioensaios com *Oreochromis niloticus*

Espécimes de *Oreochromis niloticus*, machos, apresentando em torno de 15cm de comprimento, adquiridos em estação de piscicultura livre de contaminação, foram transferidos para o laboratório de mutagênese *in vitro* e *in vivo* e aclimatados com sistema de aeração. Para cada bioensaio, os espécimes foram divididos aleatoriamente em cinco grupos experimentais com dez peixes cada.

Os grupos experimentais foram dispostos em cinco aquários contendo 25 L de água cada. Os três aquários correspondentes aos pontos J1, J2 e J3 receberam 20 L da água proveniente das estações de amostragem do ambiente e 5 L de água mineral para diluição das amostras com fins de evitar possível intoxicação dos peixes. Os outros dois aquários, referentes aos controles positivo e negativo, receberam 25 L de água mineral. Para o controle positivo, foram aplicadas nos peixes, intraperitonealmente próximo da nadadeira peitoral, 0,3 mL de ciclofosfamida (0,2 g/mL - ciclofosfamida/soro fisiológico - m/v) no início do tratamento.

Após 72 horas de tratamento, cinco peixes de cada tratamento foram retirados do aquário e anestesiados com benzocaína na concentração de 80 mg/L. Posteriormente, foi realizada a retirada do sangue pela veia caudal, utilizando seringas previamente lavadas com EDTA - anticoagulante.

### Teste do Micronúcleo

A confecção das lâminas com o sangue coletado foi

realizada por meio da técnica de esfregaços. Posteriormente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e após 24 horas, submetidas à reação de Feulgen & Rossenbeck (1924, *appud* Mello & Vidal 1978). Foram confeccionadas duas lâminas por espécime e analisados mil eritrócitos por lâmina, totalizando dez mil eritrócitos por grupo experimental. Foram observadas as frequências de eritrócitos portadores de micronúcleos - MN (parâmetro de mutagenicidade) calculado a partir da fórmula abaixo:

$$MN (\%) = \frac{\text{Número de eritrócitos contendo micronúcleos}}{\text{Número total de células contabilizadas}} \times 100$$

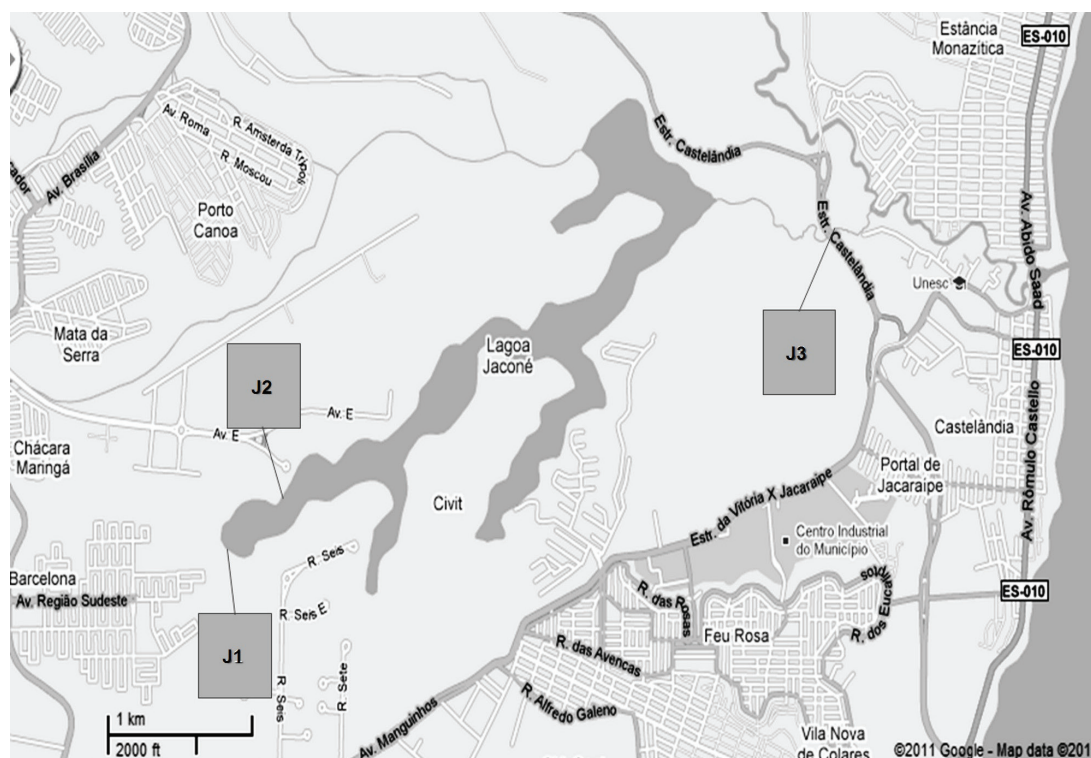
As frequências das anormalidades nucleares - AN (parâmetro de citogenotoxicidade), considerando as descritas por Carrasco *et al.* (1990), foram calculadas a partir da fórmula abaixo:

$$AN (\%) = \frac{\text{Número de eritrócitos contendo anormalidades nucleares}}{\text{Número total de células contabilizadas}} \times 100$$

Para a análise estatística, foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett's com 0,05 de significância.

### Ensaio do Cometa

O Ensaio do Cometa foi realizado para aferir a genotoxicidade. O método utilizado foi a técnica alcalina, descrita por Singh *et al.* (1988), com modificações. Primeiramente as lâminas foram mergulhadas em agarose comum (ponto de fusão normal) a 60 °C, secas e armazenadas em geladeira. As amostras de sangue



**Figura 1.** Mapa de distribuição dos pontos amostrais ao longo da Lagoa Jacuném/ES. J1 (Bairro Barcelona), J2 (Bairro Civit I), J3 (Bairro Jacaraípe). Todos os bairros estão situados no Município de Serra, Espírito Santo, Brasil (Fonte: <http://maps.google.com.br>).

utilizadas foram as mesmas do teste do micronúcleo. Para a montagem das lâminas, primeiramente 5 µL de sangue foram misturados a 1000 µL de solução tampão (PBS). 10 µL dessa solução foram adicionados a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), a 37 °C. E então essa mistura foi depositada sobre a lâmina pré-gelatinada com agarose comum (ponto de fusão normal).

Uma lamínula foi adicionada sobre cada lâmina e a seguir as mesmas foram acondicionadas em geladeira por 20 minutos para a solidificação do gel. Ao término deste período, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram mantidas em solução de lise gelada recém-preparada (1mL Triton X-100, 20 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque, pH10,0 - solução estoque: 146,1 g de NaCl 2,5M, 37,2 g de EDTA-titriplex 100 mM, 1,2 g de Tris 10 mM e 890 mL de água deionizada), em geladeira por no mínimo uma hora, sob proteção contra a luz. Após a 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 10 N e 1500 mL de água deionizada, pH~13), à baixa temperatura.

Dispostas na cuba, as lâminas permaneceram 20 minutos no escuro. Decorrido esse tempo iniciou-se a corrida de eletroforese, realizada com voltagem constante de 25 V e amperagem de 292-300 mA por 20 minutos, seguindo a relação 0,83 V/cm a qual está na faixa ideal de voltagem (0,7 - 1,0 V/cm). Encerrada a corrida, as lâminas foram neutralizadas com água destilada em três sessões de cinco minutos, totalizando 15 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em etanol absoluto por dez minutos. Todos os passos supracitados foram realizados na ausência de luz direta.

Para a análise, a coloração foi realizada com solução aquosa de brometo de etídio (0,002 mg/mL) no momento da análise. Foi utilizado microscópio de fluorescência combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram confeccionadas duas lâminas por espécime, e para cada peixe foram analisados aleatoriamente 100 nucleóides em objetiva de 40x. Para a análise de distribuição dos cometas e quantificação dos danos foi utilizada a classificação visual dos cometas e calculado o Índice de dano no DNA (ID<sub>ua</sub>) a partir da fórmula abaixo:

$$ID (ua) = \frac{N1 + (2 \times N2) + (3 \times N3) + (4 \times N4)}{S} \times 100$$

Onde: ID = Índice de dano no DNA, ua = unidade arbitrária,  
N1 - N4 = classe dos nucleóides (1,2,3,4),  
S = número total de nucleóides analisados.

Tal método é recomendado por diversos autores (Collins *et al.* 1997, Tice *et al.* 2000, Collins *et al.* 2004, Collins *et al.* 2008). No presente estudo utilizou-se a classificação visual proposta por Collins *et al.* (1995). Para análise estatística dos ID(ua)s encontrados foi uti-

lizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Dunnett's com 0,05 de significância.

## RESULTADOS

### *Dados pluviométricos*

A partir dos dados pluviométricos obtidos por meio do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (INMET 2011), no ano de 2010, o mês antecedente à primeira campanha foi marcado por uma precipitação acentuada que elevou o nível de água do ambiente em questão, podendo-se considerar um período de cheia com seus efeitos estendidos ao mês posterior, este relativo à primeira campanha. Já na segunda campanha, o mês anterior foi marcado por pouca precipitação que se estendeu ao mês da segunda campanha. Logo se configurou um período pós-chuva onde o nível de água da lagoa estava baixo.

### *Análise dos parâmetros físico-químicos*

A partir da análise dos parâmetros físico-químicos disponibilizados pelo Laboratório do IEMA (Tab. 1) e sua comparação com os índices propostos como aceitáveis pela resolução CONAMA 357/2005 para um ambiente lacustre de Classe 2, observa-se que os parâmetros clorofila-a, demanda bioquímica de oxigênio, fósforo total, oxigênio dissolvido e coliformes termotolerantes apresentaram valores fora do espectro aceito pela legislação em pelo menos um ponto amostral, durante as campanhas realizadas.

Os parâmetros condutividade elétrica, clorofila-a e fósforo total apresentaram valores mais acentuados durante a segunda campanha nos pontos J2 e J3. A demanda bioquímica de oxigênio mostrou-se mais acentuada em J2 e J3 durante a primeira campanha, e os coliformes termotolerantes mostraram-se mais acentuados durante a primeira campanha em J2. Todavia, parâmetros como sólidos dissolvidos, N(NH<sub>3</sub>), N(NO<sub>3</sub>), N(NO<sub>2</sub>), demanda química de oxigênio, sólidos totais e turbidez apresentaram valores aceitos pela legislação nos pontos amostrais em ambas as campanhas.

A partir do valor do IQA Anual, as amostras dos pontos J1 e J3 são classificadas como água de boa qualidade (51<IQA≤79) e do ponto J2 como regular (36<IQA≤51). Quanto aos valores de IQA correspondentes às campanhas, tiveram seus índices computados os pontos J2 (durante a segunda campanha) e J3 (durante ambas as campanhas), sendo esses qualificados como "bom" (51<IQA≤79) (Tab. 1). Os demais valores de IQA, conforme o Instituto Estadual de Meio Ambiente do Espírito Santo (IEMA), não foram possíveis ser computados.

As análises de metais revelaram concentrações de alumínio (Al) e cádmio (Cd) superiores ao estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005 para águas de ambientes lacustre de Classe 2. As concentrações de Al encontraram-se altas no ponto J1 durante a primeira

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos das amostras de água coletadas da Lagoa Jacuném no ano de 2010. Considera-se J1 (Bairro Barcelona), J2 (Bairro Civit I) e J3 (Bairro Jacaraípe) como os pontos de coleta ao longo da Lagoa Jacuném. Os bairros estão situados no Município de Serra, Espírito Santo, Brasil. (Instituto Estadual de Meio Ambiente - IEMA, 2010).

Parâmetros físico-químicos	J1		J2		J3		VP
	1ª Campanha	2ª Campanha	1ª Campanha	2ª Campanha	1ª Campanha	2ª Campanha	
Condutividade* (µS/cm)	180,00	**	190,00	231,00	211,00	222,00	-
Clorofila-a* (µg/L)	50,00	**	70,00	309,00	108,00	178,00	≤30,00
Surfactantes* (mg/L)	<0,10	**	<0,10	**	<0,10	**	-
Sol. Diss.* (mg/L)	90,00	**	90,00	160,00	30,00	150,00	≤500,00
N(NH3)*(mg/L)	**	**	**	0,79	0,76	0,68	≤3,70
N(kj)* (mg/L)	**	**	**	0,16	2,43	0,13	-
N(NO3)* (mg/L)	**	**	**	0,37	0,40	0,21	≤10,00
N(NO2)* (mg/L)	**	**	**	0,01	0,02	0,00	≤1,00
DQO* (mg/L)	53,00	**	57,00	36,00	43,00	28,00	≥5,00
DBO (mgO <sub>2</sub> /L)	35,00	**	38,00	6,27	6,16	5,11	≤5,00
P total (mg/L)	0,27	**	0,16	0,49	0,08	0,31	≤0,03
N total (mg/L)	**	**	**	0,54	2,85	0,34	-
OD (mgO <sub>2</sub> /L)	5,40	**	6,80	6,40	4,50	3,70	≥5,00
Sól. Totais (mg/L)	110,00	**	110,00	220,00	210,00	170,00	≤500,00
Temp. ar (°C)	24,30	**	25,00	26,00	26,60	27,00	-
Temp. água(°C)	24,10	**	24,90	24,70	24,40	24,90	-
Turbidez (UNT)	8,00	**	11,00	46,00	6,00	45,00	≤100,00
pH	6,22	**	6,26	6,04	6,19	6,01	6 a 9,00
Colif. (NMP/100 mL)	2400,00	**	1700,00	700,00	68,00	460,00	≤1000,00
IQA	Falta parâmetro	Falta parâmetro	Falta parâmetro	59,00	65,00	53,00	-
IQA Anual	68,00		50,00		56,00		-

VP, valor permitido para ambientes lênticos (Resolução CONAMA 357/2005 estabelecido para águas classe 2).

\* Parâmetros que não compõem o IQA.

**Tabela 2.** Quantificação dos metais (mg/L) e desvio padrão das amostras de água coletadas da Lagoa Jacuném no ano de 2010. Considera-se J1 (Bairro Barcelona), J2 (Bairro Civit I) e J3 (Bairro Jacaraípe) como os pontos de coleta ao longo da Lagoa Jacuném. Os bairros estão situados no Município de Serra, Espírito Santo, Brasil. (Instituto Estadual de Meio Ambiente - IEMA, 2010).

Metais pesados	J1		J2		J3		VP (mg/L)
	1ª Campanha	2ª Campanha	1ª Campanha	2ª Campanha	1ª Campanha	2ª Campanha	
Al	0,319 ± 0,005*	0,066 ± 0,001	0,096 ± 0,003	0,107 ± 0,002*	0,153 ± 0,003*	0,154 ± 0,002*	0,1
Ba	0,022 ± 0,0004	0,013 ± 0,0001	0,018 ± 0,0002	0,015 ± 0,0003	0,015 ± 0,0001	0,016 ± 0,0003	0,7
Cd	ND	ND	ND	ND	0,002 ± 0,0002*	ND	0,001
Co	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,05
Cr	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,0003	0,002 ± 0,0003	ND	0,001 ± 0,001	0,001 ± 0,0002	0,05
Cu	0,008 ± 0,001	0,005 ± 0,0005	0,009 ± 0,0003	0,004 ± 0,0004	0,005 ± 0,001	0,009 ± 0,0001	0,009
Mn	0,073 ± 0,001	0,056 ± 0,0005	0,056 ± 0,001	0,058 ± 0,001	0,052 ± 0,0004	0,052 ± 0,0001	0,1
Ni	0,010 ± 0,002	0,006 ± 0,002	0,009 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,005 ± 0,0003	0,025
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
Se	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,01
Zn	0,021 ± 0,004	0,024 ± 0,016	0,142 ± 0,018	0,010 ± 0,016	ND	0,152 ± 0,020	0,18

VP, valor permitido para ambientes lênticos (Resolução CONAMA 357/2005, estabelecido para águas classe 2).

\* Valores acima do estabelecido (Resolução CONAMA 357/2005 para águas classe 2).

Limite de Detecção (ppm) = Al:  $2 \times 10^{-3}$ , Ba:  $2 \times 10^{-3}$ , Cd:  $2 \times 10^{-3}$ , Co:  $2 \times 10^{-3}$ , Cr:  $0,3 \times 10^{-3}$ , Cu:  $0,1 \times 10^{-3}$ , Mn:  $0,06 \times 10^{-3}$ , Ni:  $0,4 \times 10^{-3}$ , Pb:  $2 \times 10^{-3}$ , Se:  $2 \times 10^{-3}$ , Zn:  $2 \times 10^{-3}$ .

ND, não detectado pelo método.

**Tabela 3.** Médias das frequências de micronúcleos (MN %), das frequências de anormalidades nucleares (AN %) e dos índices de danos no DNA (ID<sub>ua</sub>) em eritrócitos de *Oreochromis niloticus* submetidos a amostras coletadas nos três pontos da Lagoa Jacuném/ES e controles negativo (CON) e positivo (CON+) das duas campanhas realizadas.

		MN (%) (Média±SEM)	AN (%) (Média±SEM)	ID <sub>(ua)</sub> (Média±SEM)
1ª Campanha	CON	0,08 ± 0,03	0,61 ± 0,04	8,40 ± 0,68
	CON+	0,61 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,03 ± 0,28 <sup>b</sup>	267,60 ± 9,51 <sup>c</sup>
	J1	0,81 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,85 ± 0,22 <sup>b</sup>	251,40 ± 6,14 <sup>c</sup>
	J2	1,25 ± 0,07 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,06	240,40 ± 12,94 <sup>c</sup>
	J3	1,56 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,35	222,60 ± 2,52 <sup>c</sup>
2ª Campanha	CON	0,23 ± 0,03	1,45 ± 0,10	11,80 ± 1,20
	CON+	0,72 ± 0,08 <sup>a</sup>	3,23 ± 0,21 <sup>b</sup>	280,00 ± 9,38 <sup>c</sup>
	J1	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,37 ± 0,18 <sup>b</sup>	246,40 ± 12,27 <sup>c</sup>
	J2	0,78 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,23 ± 0,05 <sup>b</sup>	100,40 ± 16,76 <sup>c</sup>
	J3	0,34 ± 0,04	2,39 ± 0,16 <sup>b</sup>	117,80 ± 19,85 <sup>c</sup>

Os valores seguidos de letras diferem significativamente do controle negativo a 0,05 de probabilidade.

a, p < 0,05, MN(%); b, p < 0,05, AN(%); c, p < 0,05, ID(ua); ANOVA seguido de Dunnett's. SEM: erro padrão da média.

campanha, no ponto J2 durante a segunda campanha e no ponto J3 durante as duas campanhas. Já Cd apresentou valor elevado apenas no ponto J3 durante a primeira campanha (Tab. 2).

#### Teste do Micronúcleo e Ensaio do Cometa

Os resultados obtidos a partir do teste do micronúcleo demonstram que na avaliação do efeito mutagênico, utilizando amostras da primeira campanha, período de cheia da lagoa, todos os pontos amostrais apresentaram frequências de micronúcleos (MN %) significativas em relação ao controle negativo (Tab. 3). Já na segunda campanha, apenas J1 e J2 apresentaram frequências significativas (Tab. 3).

Na avaliação do efeito citogenotóxico a partir das anormalidades nucleares, os resultados das análises revelam que na primeira campanha, apenas o ponto J1 apresentou frequência de anormalidades nucleares (AN %) significativa em relação ao controle negativo (Tab. 3). Todavia, as análises referentes à segunda campanha demonstraram frequências significativas em todos os pontos (Tab. 3).

Os resultados obtidos a partir do ensaio do cometa, na avaliação da genotoxicidade, demonstram que durante a primeira e segunda campanha, todos os pontos amostrais apresentaram valores significativos de índice de dano no DNA (ID<sub>ua</sub>) em relação ao controle negativo (Tab. 3).

## DISCUSSÃO

A análise dos resultados físico-químicos das amostras revela que pelo IQA (Índice de Qualidade da Água) a água dos pontos J2 durante a segunda campanha e J3 durante ambas as campanhas é considerada boa, qualificando essas para o consumo humano após tratamento convencional como ocorreu até a década de 1980 na Lagoa Jacuném (CETESB 2011, Léllis 2006). Todavia, o IQA anual é considerado como bom para os pontos J1 e

J3 e regular para o ponto J2.

A variável condutividade elétrica representa medida indireta da concentração de poluentes, podendo ajudar a detectar fontes poluidoras dos ecossistemas aquáticos e fornecer dados sobre o metabolismo do ambiente e sobre fenômenos que ocorram na sua bacia de drenagem (Esteves 1998). Os valores deste parâmetro apresentavam-se superiores aos 100 µS/cm que é valor limite indicativo de ambientes impactados (CETESB 2011). Resultados similares foram obtidos durante o estudo de Leal (2006) na Lagoa Jacuném.

Os elevados índices de coliformes termotolerantes corroboram as observações de Léllis (2006) sobre os impactos que a lagoa sofre, principalmente de efluentes. Os valores elevados do parâmetro Clorofia-a, sobretudo durante a segunda campanha, podem estar relacionados com a floração de cianobactérias presente na lagoa, o que evidencia o quadro de eutrofização (Maia *et al.* 2009). Leal (2006) também constatou valores superiores a 30 µg/L, limite estabelecido pela resolução CONAMA 357/2005.

O alto índice de DBO observado é reflexo da maior atividade biológica no ambiente por conta de seu estado trófico. Alto teor de matéria orgânica pode levar à completa depleção do oxigênio na água, provocando sérias alterações sobre a comunidade aquática (CETESB 2011, Guerra 2009). Os baixos valores de OD decorrem do aporte de grandes cargas de matéria orgânica e resíduo industrial (Birungi *et al.* 2007, CETESB 2011, Gertel *et al.* 2003).

Os índices de Fósforo Total, assim como no estudo de Leal (2006), também se apresentou elevado. Altas concentrações de fósforo estão associadas com a eutrofização, pois o fósforo é considerado nutriente limitante para a produção primária no crescimento do fitoplâncton, por exemplo, em lagos tropicais (Huzsar 2006). O fósforo é oriundo, principalmente, de descargas de esgotos sanitários, efluentes industriais e drenagem agrícola (CETESB 2011).

A quantificação dos metais revelou elevada concentração de alumínio (Al) em todos os pontos amostrais, em pelo menos uma das campanhas e elevada concentração cádmio (Cd) em J3 durante a primeira campanha. Em relação aos efeitos sobre a divisão celular, o Cd é classificado como tendo efeitos bastante severos, e o Al efeito marcado (Patra *et al.* 2004). O alumínio constitui um dos maiores poluentes dos solos e águas, podendo ser transferido via trófica dos animais, e causar sérios problemas aos ecossistemas e à saúde humana (Krewski *et al.* 2007, Achary *et al.* 2008). Os estudos de Yabe & Oliveira (1998) relacionaram elevadas concentrações de alumínio e chumbo à presença de danos no DNA dos eritrócitos de *Tilapia rendalli* (Boulenger 1897). Al interfere na cinética de divisão celular, agindo na inibição da polimerização dos microtúbulos, promovendo aderência cromossômica e fragmentação nuclear (Voutsinas *et al.* 1997).

O cádmio apresenta alta toxicidade, larga distribuição no ambiente e longo período de meia-vida (Almeida *et al.* 2001). Indústrias químicas, de tintas e têxteis são as principais fontes de contaminação por Cd (Marcano *et al.* 2002). Estudos de Sanchez-Galan *et al.* (1999) e de Ayllón & Garcia-Vazquez (2000) reportaram a presença de micronúcleos em peixes expostos ao cádmio.

A indução de micronúcleos pode se relacionar a atrasos dos cromossomos durante a anáfase, devido ao mau funcionamento do fuso (Fernandes *et al.* 2007), ou pela presença de fragmentos acêntricos derivados de quebras cromossômicas (Matsumoto *et al.* 2006). Observaram-se elevadas frequências de micronúcleos em eritrócitos dos peixes expostos às águas dos pontos amostrais em ambas a campanhas, exceto o ponto J3 durante a segunda campanha. Esses resultados, como apresentados por Hoshina *et al.* (2008) e Matsumoto *et al.* (2006), indicam potencial mutagênico. Os pontos J2 e J3 apresentaram maior potencial mutagênico durante a primeira campanha, quando a lagoa encontrava-se cheia. Esse fenômeno também foi relatado nos estudos de Christofolletti (2008) em outro ambiente lacustre, contrariando as suposições de concentração dos poluentes durante períodos de níveis de água inferiores.

Nas análises dos eritrócitos, foram observadas anormalidades nucleares do tipo *lobed*, *notched*, *blebbed*, *broken-eggs* e células binucleadas. A presença de AN deve ser considerada como dados complementares aos registros de micronúcleo e como alterações decorrentes da indução por agentes citogenotóxicos (Ayllón & Garcia-Vazquez 2000, Gravato & Santos 2002).

A partir do ensaio do cometa, constatou-se grande perda de integridade do DNA pela observação de cometas de classes 1, 2, 3 e 4. O que resultou em elevados ID<sub>(ua)</sub>s, demonstrando o elevado potencial genotóxico das amostras. Segundo Kamman *et al.* (2001), eventos que são constatados pelo ensaio do cometa são considerados lesões potencialmente pré-mutagênicas. Novamente foram constatados valores mais acentuados de dano durante o período de chuva quando a lagoa encon-

trava-se com o nível de água elevado.

Diante dos resultados citogenéticos, observa-se a não interferência do período de pós-chuva sobre a intensificação dos danos. Os estudos realizados por Da Silva-Souza & Fontanetti (2006), em rio, apresentaram maiores índices de alterações em período de reduzido nível de água, indicando influência da sazonalidade e precipitação. Por outro lado, Christofolletti (2008) trabalhando com lagoa, observou a intensificação dos danos durante períodos de chuva, quando a lagoa apresentava nível de água elevado. Para tanto, Ergene *et al.* (2007) descrevem que as concentrações dos poluentes nas águas depende do fenômeno de enriquecimento ou diluição, causado pela chuva ou pela drenagem da água. A alta precipitação pode agravar os efeitos da poluição pela maior lixiviação dos poluentes provenientes do solo ou da rede de esgotos. E segundo Esteves (1998), em lagos muito raso, é possível que ocorra uma maior interação dos elementos presentes no sedimento com a coluna d'água.

As elevadas genotoxicidade e mutagênicidade observadas pelos testes citogenéticos, utilizados como parâmetro biótico, sugerem que a Lagoa Jacuném apresenta grandes quantidades de substâncias com potencial genotóxico e mutagênico, dentre elas os metais Al e Cd. Apesar disso, a Lagoa Jacuném é considerada um ambiente com bom índice de qualidade da água pelos órgãos ambientais competentes, sendo permitidas atividade em suas águas, como pesca e recreação. Logo, observa-se a necessidade de somar e integrar métodos mais sensíveis aos métodos tradicionais de classificação das águas para que se possam ter avaliações mais eficientes dos ambientes aquáticos (Rosenberg 1993). Ressalta-se também a necessidade do constante monitoramento da qualidade das águas de ambientes aquáticos com importância ecológica e socioeconômica, como a Lagoa Jacuném.

## AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho ocorreu graças à estrutura e empenho dos pesquisadores do Grupo de Estudo de Mutagênese e Toxicologia (GEMUT), juntamente com o apoio do Laboratório do Instituto Estadual de Meio Ambiente e Recursos Hídricos do estado do Espírito Santo (IEMA) e Laboratório de Análise Instrumental do Instituto Federal do Espírito Santo (IFES).

## REFERÊNCIAS

- ACHARY, V.M.M., JENA, S., PANDA, K.K. and PANDA, B.B. 2008. Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 300-310.
- ALMEIDA, J.A., NOVELLI, E.L.B., DAL PAI SILVA, M. & ALVES JÚNIOR, R. 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environmental Pollution*, 114: 169-175.
- AYLLÓN, F. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus*

- and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. *Mutation Research*, 467: 177-186.
- BARBOSA, J.S., CABRAL T.M., FERREIRA, D.N., AGNEZ-LIMA, L.F. & BATISTUZZO DE MEDEIROS, S.R. 2010. Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 320-325.
- BÉKAERT, C., FERRIER, F., MARTY, J., PFOHL-LESZKOWICZ, A., BISPO, A., JOURDAIN, M.J., JAUZEN, M., LAMBOLEZ-MICHEL, L. & BILLARD, H. 2002. Evaluations of and genotoxic potential of stabilized industrial waste and contaminated soils, *Waste management*, 22: 241 - 247.
- BIRUNGI, Z., MASOLA, B., ZARANYIKA, M.F., NAIGAGA, I. & MARSHALL, B. 2007. Active biomonitoring of trace heavy metals using fish (*Oreochromis niloticus*) as bioindicator species. The case os Nakiubo wetland along Lake Victoria. *Physics and Chemistry of the Earth*, 32: 1350-1358.
- BUSS, D.F., BATISTA, D.F. & NESSIMIAN, J.L. 2003. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade de água de rios. *Cadernos de Saúde Pública*, 19(4): 465-473.
- CARRASCO, R.K., TILBURY, K.L. & MYERS, M. 1990. Assessment of piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 2123-2136.
- ÇAVAS, T. & KÖNEN, S. 2008. In vivo genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology*, 90: 154-159.
- CESTARI, M.M., LEMOS, P.M.M., RIBEIRO, C.A.O., COSTA, J.R.M.A., PELLETIER, E., FERRARO, M.V.M., MANTOVANI, M.S. & FENOCCIO, A.S. 2004. Genetic damage induce by trophic doses os lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by comet assay and cromosomal aberrations. *Genetics and Molecular Biology*, 27: 270-274.
- CHRISTOFOLETTI, C.A. 2008. *Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lêntico, por meio dos sistemas-teste de Allium cepa e Oreochromis niloticus*. 129 f. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Instituto de Biociências - Rio Claro, São Paulo. 2008.
- COLLINS, A.R., MA, A.G. & DUTHIE, S.J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells. *Mutation Research*, 336: 69-77.
- COLLINS, A., DUSINSKA, M. & FRANKLIN, M. 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146.
- COLLINS, A. 2004. Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26: 249-261.
- COLLINS, A., OSCOZ, A., BRUNBORG, G., GAIVÃO, I., GIOVANNELLI, L., KRUSZEWSKI, M., SMITH, C. & STETINA, R. 2008. The Comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 30(3): 143-151.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 2011. Índice de qualidade de água bruta para fins de abastecimento público. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/%C3%A1guas-superficiais/108-%C3%ADndices-de-qualidade-das-%C3%A1guas>> Acesso em: 10 mai. 2011.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. 2011. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/125-variaveis-de-qualidade-das-aguas-e-dos-sedimentos>> Acesso em: 10 mai. 2011.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 2011. Alterações físico-químicas. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas\\_materia.php](http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causas_materia.php)> Acesso em: 10 mai. 2011.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio ambiente. Resolução 357/2005. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf)> Acesso em: 15 abr. 2011.
- DA SILVA SOUZA, T. & FONTANETTI, C.S. 2006. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. *Mutation Research*, 605: 87-93.
- ERGENE, S., ÇAVAS, T., ÇELIK, A., KOLELI, N., KAYA, F. & KARAHAN, A. 2007. Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the Goksu Delta (Turkey): genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology*, 16: 385-391.
- ESTEVES, F.A. 1998. Fundamentos de Limnologia. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência. 602 p.
- FERNANDES, T.C.C., MAZZEO, D.E.C. & MARIN-MORALES, M.A. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* expose to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 252-259.
- FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. 2005. The use of Biomarkers in Aquatic Toxicology Studies. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 12: 67-86.
- GERTEL, P., TAUKE-TORNISIELO, S.M. & MALAGUTTI, E.N. 2003. Water quality evaluation on São Joaquim and Ribeirão Claro stream, Microbasin of Corumbataí river, São Paulo State, Brazil. *Holos Environmental*, 3(2): 103-350.
- GRASSI, L.E.A. 2002. *Uso da técnica de micronúcleos para avaliação de genotoxicidade em peixes dos rios Jaguari e Atibaia - Bacia Hidrográfica do rio Piracicaba - São Paulo - Brasil*. In: *Hematologia, biometria, teor de compostos organoclorados e frequência de formação de micronúcleos em teleósteos de água doce, sob diferentes condições limnológicas*. 166 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo. 2002.
- GRAVATO, C. & SANTOS, M.A. 2002.  $\beta$ -Naoththiflavone liver EROD and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 69-74.
- GROVER, I.S. & KAUR, S. 1999. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by *Allium* root anaphases aberrations and micronucleus assays. *Mutation Research*, 426: 183-188.
- GUERRA, R.C. 2009. *Estudo do lodo gerado em reator biológico, pelo tratamento da água de produção do petróleo, no Terminal Marítimo Almirante Barroso, município de São Sebastião, SP*. Visando sua disposição final. 2009. 126 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP. 2009.
- HOSHINA, M.M., ANGELIS, D.F. & MARIN-MORALES, M.A. 2008. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. *Mutation Research*, 656: 44-48.
- HUZSAR, V.L.M. 2006. Nutrient - chlorophyll relationships in tropical - subtropical lakes: do temperate models fit? *Biogeochemistry*, 79: 239-250.
- INMET - INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2011. Parâmetros meteorológicos. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/sim/abre\\_Graficos.php?data=06/2011&data2=2010&lista=11,&est=83648&uf=ES](http://www.inmet.gov.br/sim/abre_Graficos.php?data=06/2011&data2=2010&lista=11,&est=83648&uf=ES)> Acesso em: 12 mai. 2011.
- 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*, 498: 61-77.
- KARR, J. R. 1981. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6: 21-27.
- KLOBUCAR, G., PAVLICA, M., ERBEN, R. & PAPES, D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology*, 64: 15-23.
- KREWSKI, D., YOKEL, R.A., NIEBOER, E., BORCHELT, D., COHEN, J., HARRY, J., KACEW, S., LINDSAY, J., MAHFOUZ, A.M. & RONDEAU, V. 2007. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 10: 1-269.
- LEAL, P.R. 2006. *Avaliação de Indicadores do estado trófico de uma lagoa costeira: Lagoa Jacuném* (Serra/ES). 65 f. Monografia (Trabalho



- de Conclusão de Curso - Oceanografia) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo. 2006.
- LÉLLIS, F. S. 2006. *Análise Ambiental de uma Bacia Hidrográfica como Subsídios ao Planejamento Costeiro. Bacia da Lagoa Jacuném* (Serra, ES). 91 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso - Oceanografia). Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo. 2006.
- MAIA, J.A., PINHEIRO, L.S & MORAIS, J.O. 2009. Monitoramento da qualidade de água na bacia do rio Maranguapinho-Fortaleza-CE. Disponível em: < [http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos\\_completos/eixo3/044.pdf](http://www.geo.ufv.br/simposio/simposio/trabalhos/trabalhos_completos/eixo3/044.pdf)> Acesso em: 11 mar. 2011.
- MARCANO, L., CARRUYO, I., DEL CAMPO, A. & MONTIEL, X. 2002. Effect of cadmium on the nucleoli of meristematic cells of onion *Allium cepa* L: an ultrastructural study. *Environmental Research*, Section A, 88: 30-35.
- MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI, M.S., MALAGUTTI, M.I.A., DIAS, A.L., FONSECA, I.C. & MARIN-MORALES, M.A. 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*, 29: 148-158.
- MELLO, M.S.L. & VIDAL, B.C. 1978. A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura*, 30: 665 - 676.
- NWANI, C.D., LAKRA, W.S., NAGPURE, N.S., KUMAR, R., KUSHWAHA, B. & SRIVASTAVA, S.K. 2010. Mutagenic and genotoxic effects of carbosulfan in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 202-208.
- OSMAN, A., ALI, E., HASHEM, M., MOSTAFA, M. & MEKKAWY, I. 2010. Genotoxicity of two pathogenic strains of zoospore fungi (*Achlya klebsiana* and *Aphanomyces laevis*) on erythrocytes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 24-31.
- PATRA, M., BHOWMIK, N., BANDOPADHYAY, B. & SHARMA, A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 199-223.
- POLARD, T., JEAN, S., MERLINA, G., LAPLANCHE, C., PINELLI, E. & GAUTHIER, L. 2011. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 144-149.
- ROCHA, P.S., LUVIZOTTO, J.L., KOSMEHL, T., BÖTTCHER, M., STORCH, V., BRAUNBECK, T. & HOLLERT, H. 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1842-1848.
- ROSENBERG, D.M. & RESH, V. 1993. (Orgs.) Freshwater Biomonitoring and benthic macroinvertebrates. *Chapman & Hall*. 488 p.
- ROTHFUSS, A., O'DONOVAN, M., DE BOECK, M., BRAULT, D., CZICH, A., CUSTER, L., HAMADA, S., PLAPPERT-HELBIG, U., HAYASHI, M., HOWE, J., KRAYNAK, A.R., VAN DER LEEDE, B.J., NAKAJIMA, M., PRIESTLEY, C., THYBAUD, V., SAIGO, K., SAWANT, S., SHI, J., STORER, R., STRUWE, M., VOCK, E. & GALLOWAY, S. 2010. Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutation Research*, 702(1): 40-69.
- SANCHEZ-GALAN, S., LINDE, A. R. & GARCIA-VAZQUEZ, E. 1999. Brown trout and European minnow as target species for genotoxicity tests: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 43: 301-304.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. & SCHNEIDER, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1): 184-191.
- TICE, R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C. & SASAKI, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- UDROIU, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 79: 201-204.
- VALVERDE, M. & ROJAS, E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681: 93-109.
- VOUTSINAS, G.; ZARANI, F.E. & KAPPAS, A. 1997. The effect of environmental aneuploidy-inducing agents on the microtubule architecture of mitotic meristematic root cells in *Hordeum vulgare*. *Cell Biology International*, 21(7): 411-418.
- YABE, M.I.S. & OLIVEIRA, E.O. 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, 21: 551-556.