

VANESSA MARQUES DE OLIVEIRA MORAES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E BIOACUMULADOR
DE METAIS PESADOS DE *Baccharis trimera* LESS E *Equisetum hyemale*
L**

ASSIS

2014

VANESSA MARQUES DE OLIVEIRA MORAES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E BIOACUMULADOR
DE METAIS PESADOS DE *Baccharis trimera* LESS E *Equisetum hyemale*
L**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador: Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

ASSIS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca da F.C.L. – Assis – UNESP

M837a Moraes, Vanessa Marques de Oliveira
Avaliação do potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de *Baccharis trimera* Less e *Equisetum hyemale* L. /
Vanessa Marques de Oliveira Moraes. - Assis, 2014
48 f. : il.

Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências e Letras de Assis - Universidade Estadual Paulista.

Orientador: Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Bioacumulação. 2. Indicadores (Biologia). 3. Carqueja. 4. Plantas medicinais. 5. Mutagênese. I. Título.

CDD 581.634

*“A educação é a arma mais poderosa que
temos para mudar o mundo”*

*“A educação é o grande motor do
desenvolvimento pessoal. É através dela que a
filha de um camponês pode se tornar uma
médica, que o filho de um mineiro pode se
tornar o diretor da mina, que uma criança de
peões de fazenda pode se tornar o presidente
de um país.”*

Nelson Mandela

Dedico este trabalho, a Deus, ao meu marido Flavio, aos meus pais Antonio e Rosângela, meus irmãos Vivian e Vinícius, pelo apoio, força, incentivo e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder o dom da vida, pois sem Ele nada seria possível.

Ao meu marido Flavio pelo carinho e atenção dedicados a mim, por sempre me apoiar e por muitas vezes me encorajar em todas as decisões. Por estar sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins. E sempre me incentivar a seguir meu caminho.

A minha família, meu pai Antonio, minha mãe Rosângela, meu irmão Vinicius, minha irmã Vivian, minhas cunhadas Thalita e Suzi, meu cunhado Renato, sobrinhos Pollyana, Miguel e Theo, meus sogros Paulo e Sandra, minha avó Marcília, aos quais amo muito, pelo carinho e incentivo, por todos os momentos em que eu precisei e eles estavam ao meu lado.

Ao meu orientador e amigo Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva por acreditar em mim em todos esses anos dedicados ao meu crescimento pessoal e profissional e por ser exemplo de profissional e de pessoa.

Às amigas Pamela, Kamille, Patrícia e Larissa que fizeram parte de muitos momentos, sempre me ajudando e incentivando, por tudo que eu aprendi com elas. A todos os amigos do Fitolab, Kamille, Patrícia, Pamela, Larissa, Amábile, Gustavo, Valter e muitos outros, que participaram diretamente deste trabalho e me ajudaram em todos os momentos.

A todos os colegas e professores da pós-graduação em Biociências pelo convívio e aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP, pelo apoio financeiro concedido ao projeto 2013/01331-0.

A todos que ajudaram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos.

Moraes, Vanessa Marques de Oliveira, Silva, Regildo Márcio Gonçalves. **Avaliação do potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de *Baccharis trimera* Less e *Equisetum hyemale* L.** 2014. 48 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

RESUMO

Alguns bioacumuladores são bioindicadores, pois determinam a presença de substâncias tóxicas. Estes são constituídos de organismos que podem sobreviver em um restrito espectro de condições naturais e as alterações ambientais podem causar modificações nas funções biológicas e no seu material genético. Os mutágenos são agentes que causam alterações na sequência do DNA correspondendo às mutações induzidas, sendo os metais pesados os mutágenos mais comuns em ambientes aquáticos. *Baccharis trimera* Less (carqueja) é uma planta arbustiva que se destaca pela sua capacidade de acumular metais pesados presentes na água. *Equisetum hyemale* L. (cavalinha) é uma planta vascular sem semente considerada como um depósito de minerais e vitaminas. O objetivo deste projeto foi avaliar o potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de *B. trimera* Less e *E. hyemale* L. Os espécimes de carqueja e cavalinha foram cultivados e expostos à solução de metal e controles por 30 dias. As partes vegetativas coletadas foram trituradas e secas em estufa para a preparação dos extratos. Os extratos etanólico e aquoso foram preparados em diferentes concentrações com água ultra pura. Os metais pesados presentes nos extratos foram quantificados por meio da análise de absorção atômica. O Teste de *Allium cepa* foi realizado para analisar a atividade genotóxica dos extratos. *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale* são espécies bioacumuladoras de diferentes metais pesados. O extrato etanólico e infuso de *B. trimera* e *E. hyemale* interferem no índice mitótico e são capazes de promover atividade genotóxica em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

Palavras-chave: Bioindicadores. Carqueja. Cavalinha. Mutagenicidade. Bioacumuladores.

Moraes, Vanessa Marques de Oliveira, Silva, Regildo Márcio Gonçalves. **Evaluation of the mutagenic potential of heavy metals and bioaccumulative *Baccharis trimera* Less and *Equisetum hyemale* L.** 2014 48 f. Dissertation (Masters in Bioscience) – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

ABSTRACT

Some biomarkers are bio-accumulators, as they determine the presence of toxic substances. These are made up of organisms that can survive in a restricted range of natural conditions and environmental changes can cause changes in biological functions and their genetic material. The mutagens are agents that cause alterations in the DNA sequence corresponding to the induced change, the heavy metals being the most common mutagens in aquatic environments. *Baccharis trimera* Less (gorse) is a shrubby plant that stands out for its ability to accumulate heavy metals present in the water. *Equisetum hyemale* L. (horsetail) is a vascular seedless considered a deposit of minerals and vitamins plant. The objective of this project was to evaluate the mutagenic potential of heavy metals and bioaccumulative *B. trimera* Less and *E. hyemale* L. specimens of gorse and horsetail were cultured and exposed to the metal solution and controls for 30 days. The collected vegetative parts were ground and dried in an oven for the preparation of extracts. The ethanolic and aqueous extracts were prepared at different concentrations with ultrapure water. Heavy metals present in the extracts were quantified by atomic absorption analysis. The *Allium cepa* test was performed to analyze the genotoxic activity of the extracts. *Baccharis trimera* and *Equisetum hyemale* bioaccumuladoras are different species of heavy metals. The ethanol extract and infusion of *B.trimera* and *E. hyemale* interfere with the mitotic index and are able to promote genotoxic activity in root meristematic cells of *Allium cepa*.

Key words: Bioindicators, Gorse, Horsetail, Mutagenicity, Biaccumulators.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
Bioacumuladores Naturais.....	10
Mutágenos ambientais e metal pesado.....	11
Teste <i>Allium cepa</i>	12
<i>Baccharis trimera</i> e <i>Equisetum hyemale</i>	13
2.OBJETIVO	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
4. Capítulo I	
Potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de <i>Baccharis trimera</i> (Less) e <i>Equisetum hyemale</i> L.....	22
Resumo.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados.....	28
Discussão.....	37
Referências Bibliográficas	39

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – Bioacumuladores Naturais

Há interesse em se detectar possíveis contaminações de metais em solo e água e encontrar meios que possibilitem a descontaminação do ambiente (UGOLINI et al., 2013). Estudos sobre biorremediação apresentam uma tecnologia emergente conhecida como fitorremediação (MCCUTCHEON e JORGENSEN, 2008; GERHARDT et al., 2009; SILVA et al., 2014a). Que se caracteriza pelo emprego de vegetais superiores na remoção, transferência ou na estabilização de elementos nocivos de locais contaminados (PLETSCH, 2004; BALI et al., 2010; ALI et al., 2013). Esta técnica está gerando grande interesse mundial, por apresentar custos financeiros viáveis e produzir menor impacto ao ambiente (SUSARLA et al., 2002; MEGATELI et al., 2009; JAGTAP et al., 2014).

Algumas espécies de plantas apresentam complexo mecanismo para minimização dos efeitos deletérios dos metais pesados, controlando a absorção, a acumulação e a translocação desses elementos no tecido vegetal (RASKIN et al., 2001; GERHARDT et al., 2009; OLOWOYO et al., 2012). Experimentos conduzidos nas últimas duas décadas mostram que diversas espécies de plantas extraem quantidades elevadas de metais de solos contaminados, sendo estas denominadas de bioacumuladoras das condições naturais (KAËRENLAMPI et al., 2000; PULFORD e WATSON, 2003; ABHILASH et al., 2009; BALI et al., 2010). O conceito de bioacumuladores foi desenvolvido para a realização de monitoramento das condições ambientais (ARIAS et al., 2007; CRISPIM et al., 2012).

Os bioacumuladores podem ser animais, vegetais, células e substâncias moleculares. Os representantes dos vegetais são as algas (PERES, 2002) e plantas arbustivas (MOREIRA et al., 2007; UGOLINI et al., 2013). E os representantes celulares são realizados o teste de micronúcleo em célula de vegetais e/ou animais e para os moleculares observa-se como exemplo a dosagem de acetilcolinesterase (ARIAS et al., 2007; BAGATINI et al., 2009).

A poluição por mutágenos na atmosfera e no ambiente aquático, por fontes antropogênicas, é avaliada por meio de bioindicadores, tais como: musgos, plantas, líquens, fungos, bactérias e animais (MONNET et al., 2005; ALI et al., 2013), os mesmos também vêm sendo utilizados para biomonitorar o solo no estudo da poluição ao longo das últimas décadas (BATZIAS e SIONTROU, 2006; BALI et al., 2010; JAGTAP et al., 2014).

Há interesse em pesquisas ambientais relacionadas ao estudo de organismos bioacumuladores como ferramenta para monitoração da poluição por elementos químicos (PULFORD e WATSON, 2003; JAGTAP et al., 2014; SILVA et al., 2014a). Plantas bioacumuladoras naturalmente concentram elementos químicos em maior quantidade em comparação com as demais espécies ocorrentes em um mesmo habitat, sendo reflexo de sua habilidade de concentrar e das características do meio (BALI et al., 2010; SILVA et al., 2014b).

1.2 - Mutágenos ambientais e metais pesados

Mutágenos são agentes que causam mutações, ou seja, alterações na sequência do DNA correspondendo às mutações induzidas, as quais podem ser atribuídas a causas ambientais conhecidas (GROVER e KAUR, 1999; OLOWOYO et al., 2012). Muitas substâncias no ambiente são sabidamente mutagênicas, incluindo as radiações ionizantes e não-ionizantes e as centenas de compostos químicos diferentes de origem urbana, agrícola e industrial (JORDE et al., 2004; CRISPIM et al., 2012).

A irrigação com águas residuais contribui para o aumento no teor de metais pesados no solo (YANG et al., 2014). Os metais pesados são prejudiciais devido à sua natureza não biodegradável e seu potencial para acumular-se em diferentes órgãos do corpo (SILVA et al., 2007). A maior parte dos metais pesados é extremamente tóxica devido à sua solubilidade na água e mesmo em baixas concentrações são prejudiciais para o homem e os animais (ARORA et al., 2008). Atualmente os metais pesados são os poluentes ambientais mais comuns por

causa da sua excessiva utilização em aplicações industriais e seu acúmulo nos solos agrícolas, afetando assim a qualidade e a segurança alimentar (POLETO e MARTINEZ, 2011; ALI et al., 2013).

Ainda sobre os metais pesados, os mesmos são um dos poluentes mais comuns em ambientes aquáticos, seja a partir de fontes naturais, tais como intemperismo geológico ou fontes antropogênicas (BENAVIDES et al., 2005). Podem ser absorvidos em sedimentos fluviais ou acumulados em organismos bentônicos, às vezes em níveis tóxicos (ARIAS et al., 2007). Além disso, podem contaminar a cadeia alimentar por meio da lixiviação para águas subterrâneas ou pela absorção vegetal (bioacumulação) (BATISTA e FREIRE, 2010). Podem ameaçar a saúde humana, pois os metais podem estar associados à neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em seres humanos (HANG et al., 2008; DIVAN JUNIOR, 2009; MACHADO et al., 2001).

Diante disso, torna-se importante a realização de bioensaios para detecção de mutagenicidade e genotoxicidade decorrentes da presença de metais pesados no ambiente. Além da necessidade da identificação das fontes contaminantes (HOUK, 1992), considerando também a avaliação das reações de organismos vivos, para a poluição ambiental e para uma indicação dos potenciais efeitos sinérgicos de vários poluentes (SMAKA-KINCL et al., 1995; CRISPIM et al., 2012).

1.3- Teste de *Allium cepa*

Entre as diferentes espécies utilizadas como bioindicadoras para avaliação da genotoxicidade ambiental, a espécie *Allium cepa* L. tem sido considerada um organismo teste eficiente para indicar a presença de produtos químicos mutagênicos (FISKESJÖ, 1985), devido à sua sensibilidade e boa correlação com sistemas teste de mamíferos (CHAUHAN e GUPTA, 2005), às suas características cinéticas de proliferação e presença de cromossomos grandes ($2n=16$) adequados para este tipo de estudo (MATSUMOTO et al, 2004;

MATSUMOTO et al., 2006). Este sistema teste é de curto prazo (MAJER et al., 2005) especialmente em ambientes aquáticos (SMAKA-KINCL et al., 1996). Tem sido utilizado pela Agência de Proteção Ambiental Norte Americana (EPA-E.U.A) para avaliar a toxicidade e genotoxicidade, por meio da determinação de distúrbios citogenéticos provocados em células meristemáticas de raiz, por efluentes industriais (FISKESJO, 1993; GRANT, 1994). Tem sua utilidade afirmada pela sua aplicação repetida para avaliar os riscos genotóxicos presentes em águas naturais, como rios e lagos, águas residuais e água potável (BLAGOJEVIC, et al 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009; MANN et al., 2011).

Além do monitoramento ambiental o teste de genotoxicidade em *A. cepa* está sendo aplicado em análises de compostos químicos naturais, principalmente para verificar a segurança e a genotoxicidade de extratos de plantas empregadas na medicina popular (CAMPAROTO et al., 2002; KNOLL et al., 2006; FACHINETTO et al., 2007; AKINBORO e BAKARE, 2007; PINHO et al., 2010).

1.4 – *Baccharis trimera* Less e *Equisetum hyemale* L

Duas espécies destacam-se por apresentar relatos de atividade bioacumuladora *Baccharis trimera* Less e *Equisetum hyemale* L (BROOKS et al., 1981; SOUZA et al., 2007; SILVA et al., 2012). A primeira espécie tem demonstrado capacidade de acumular metais, tais como Mn e Zn, que são encontrados em quantidade mais elevadas nas folhas, além de apresentar efeito mutagênico do chá em células vegetais (*Allium cepa*) sugerindo maior cautela no consumo desta planta (PINHO et al., 2010) mesmo quando utilizada em infusões (SOUZA et al., 2007; PINHO et al., 2010). Estudos recente têm demonstrado acúmulo de Cu, Cd, Pb e Zn nas folhas desta espécie, refletindo diretamente na citotoxicidade e genotoxicidade do extrato e do infuso obtido da planta (SILVA et al., 2012) *E. hyemale* espécie é uma planta vascular sem semente considerada como um depósito de minerais e vitaminas (WRIGHT et al., 2007).

Baccharis trimera Less. é conhecida popularmente como carqueja ou carqueja-amarga, é um subarbusto ramificado com ramos principais tetra- e triados na base, bialados nas ramificações laterais e com alas interrompidas formando articulas de alturas variáveis (OLIVEIRA et al., 2012). As flores são pequenas, alvas, dispostas em capítulos geralmente aglomerado, formando espigas interrompidas, ordenadas como panículas. O fruto é tipo aquênio linear, glabro, com cerda de 1,5mm (DURIGAN et al., 2004).

Trabalhos fitoquímicos com esta espécie demonstraram a presença de diterpenoides, flavonoides, saponinas e óleos essenciais (BORELLA et al., 2006). Esta planta é nativa dos campos e beiras das matas do sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (BONA et al., 2005). Ocorre em fisionomia campestre de cerrado, especialmente em terrenos mal-drenados (DURIGAN et al., 2004; ABOY et al., 2012).

Preparações como infusões e/ou decoctos desta planta são utilizadas na medicina popular para tratar doenças do fígado, reumatismo, diabetes, bem como doenças do sistema digestivo, hepático e renal (JANUÁRIO et al., 2004), sobretudo pelas populações de baixa condição socioeconômica (GRANCE et al., 2008; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012).

Equisetum hyemale L., também conhecida como rabo de cavalo ou cavalinha, é nativa da América Central e do Sul encontrada em locais quentes e úmidos (WRIGHT et al., 2007). É utilizada na medicina popular na forma de chá, produzido com a sua parte aérea. O chá é considerado diurético, hemostático e adstringente, sendo também adequado para diarreia, gonorreia e tratamento de pedras nos rins (MILOVANOVIĆ et al., 2007; TELLÉZ et al., 2007). Devido ao seu elevado teor de minerais, a planta é também recomendada para a revitalização das unhas e cabelo, entre outras aplicações (GUTIERREZ et al 1985; LEAL et al., 1999; DANIELSKI et al., 2007).

Além disso, *E. hyemale* contém grande quantidade de alcaloides, saponinas e flavonoides, tais como isoflavonas e flavonóis (DANIELSKI et al., 2007; HUSBY et al.,

2011). Por seu alto conteúdo mineral, principalmente o silício, a cavalinha é muito usada para recompor o tecido conjuntivo, por aumentar a atividade dos fibroblastos e a elasticidade dos tecidos, o que a torna útil na osteoporose e reumatismos (ZIN e WEISS, 1980). Por outro lado, tendo potássio, equisetonina e ácido gálico, é um bom diurético e anti-hipertensivo, além de ajudar nos tratamentos para emagrecer (VEIT et al., 1995).

2- OBJETIVO

O presente projeto teve por objetivo avaliar o potencial bioacumulador de metais pesados de *Baccharis trimera* Less e *Equisetum hyemale* L. Além de avaliar o potencial mutagênico dos extratos dessas espécies por meio do teste de aberrações cromossômicas, determinação da frequência de micronúcleos em raiz de *Allium cepa*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHILASH, P.C., JAMIL, S., SINGH, N. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. **Biotechnology Advances**, 27, 474–488, 2009.

ABOY, A. L., APEL, M. A., DEBENEDETTI, S., FRANCESCATO, L., ROSELLA, M. A., HENRIQUE, A. T. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1219, 147–153, 2012.

AKINBORO, A., BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, 112, 470–475, 2007.

ALI, H., KHAN, E., SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. **Chemosphere** 91, 869–881, 2013.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de Bioindicadores na avaliação de impacto no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva- Associação Brasileira de Pós-Graduação em Saúde Coletiva**, 2007.

ARORA, M., KIRAN, B., RANI, S., RANI, A., KAUR, B., MITTAL, N. Heavy metal accumulation in vegetables irrigated with water from different sources. **Food Chemistry** 111, 811–815, 2008.

BAGATINI, M. D., VASCONCELOS, T. G., LAUGHINGHOUSE IV, H. D., MARTINS A. F., TEDESCO, S. B. Biomonitoring Hospital Effluents by the *Allium cepa* L. Test. **Bull Environment Contamination Toxicology**, 82, 590–592, 2009.

BALI, R., SIEGELE, R., HARRIS, A. T.. Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. **Chemical Engineering Journal**, 156, 286–297, 2010.

BATISTA, F. G. A; FREIRE J. A. Avaliação de metais pesados no corpo aquático do Açude Velho, Campina Grande-Paraíba. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, n. 4, p. 166-179, 2010.

BATZIAS, F., SIONTOROU, C. G. A novel system for environmental monitoring through a cooperative/synergistic scheme between bioindicators and biosensors. **Journal of Environmental Management**, 82, 221–239, 2007.

BENAVIDES, M. P., GALLEGOS, S. M., TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 17,1, 21-34, 2005.

BLAGOJEVIC, J., STAMENKOVIC, G., VUJOŠEVIC, MLADEN. Potential genotoxic effects of melted snow from an urban area revealed by the *Allium cepa* test. **Chemosphere**, 76 1344–1347, 2009.

BONA, C. M. DE.; BIASI, L. A.; ZANETTE, F.; NAKASHIMA, T. Estaquia de três espécies de *Baccharis*. Universidade Federal de Santa Maria. **Ciência Rural**, 2005.

BORELLA, J. C.; DUARTE, D. P.; NOVARETTI, A. A. G.; MENEZES JR, A.; FRANÇA, S. C.; RUFATO, C. B.; SANTOS, P. A. S.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2006.

- CAMPAROTO, M. L., TEIXEIRA, R. O., MANTOVANI, M. S., VICENTINI V. E. P. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**, 25, 1, 85-89 2002.
- CHAUHAN, L. K. S., GUPTA, S. K. Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 82, 27–35, 2005.
- CRISPIM, B. A., VAINI, J. O. GRISOLIA, A. B., TEIXEIRA, T. Z., MUSSURY, R. M., SENO, L. O. Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil. **Environment Science Pollution Reserch** 19,7 18–723, 2012.
- DANIELSKI, L., MICHELIN, E. M.Z. B., FERREIRA, S. R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: Experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering** 78, 1054–1059,2007.
- DIVAN JUNIOR, A. M., OLIVEIRA, P. L., PERRY C. T., ATZ V. L., AZZARINI-ROSTIROLA, L. N., RAYA-RODRIGUEZ M. T. Using wild plant species as indicators for the accumulation of emissions from a thermal power plant, Candiota, South Brazil. **Ecological Indicators**, 9, 1156–1162, 2009.
- DURIGAN, G.; BARTELLO, J.B.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. **Plantas do Cerrado Paulista: Imagens de uma paisagem ameaçada**. - São Paulo: Páginas e Letras Editora e Gráfica, Pág.64. 2004.
- FACHINETTO, J. M., BAGATINI, M. D., DURIGON, J., SILVA, A. C.F., TEDESCO, S. B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1): 49-54, Jan./Mar. 2007.
- FISKESJÖ G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, 102:99-112, 1985.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test – a potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: Gorsuch, J.W. (Ed.), ASTM (American Society of Testing Materials) Special Technical Publication 1216, **Environmental Toxicology and Risk Assessment**, pp. 331–345, 1993.
- FISKESJÖ, G. The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions, **Mutation Research**, 197, 243-260, 1988.
- FISKESJÖ, G. WANG, W., GORSUCH, J.W., HUGHES, J.S. (EDS.). *Allium* test for screening chemicals evaluation of cytologic parameters. In: Plants for Environmental Studies. **CRC Lewis Publishers Boca Raton**, New York, 308–333, 1997.
- GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, 99:273–91, 1982.
- GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, 310, 175–185, 1994.
- GERHARDT, K. E., HUANG, X. D. GLICK, B. R., GREENBERG, B. M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. **Plant Science**, 176, 20–30, 2009.
- GRANCE, S, R.M., TEIXEIRA M, A., LEITE, R, S., GUIMARÃES, E, B., SIQUEIRA, J.M., FILIU, W, F, O., VASCONCELOS, S, B,S., VIEIRA, M, C. *Baccharis trimera*: Effect on

hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats, **Journal of Ethnopharmacology**, 117, 28–33. 2008.

GROVER, I. S., KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assays. **Mutation Research**, 426:183-188, 1999.

GUTIERREZ, R. M. P., LAGUNA, G. Y., e WALKOWSKI, A. Diuretic activity of Mexican *Equisetum*. **Journal of Ethnopharmacology**, 14(2–3) 269–272, 1985.

HANG, X.; WANG, H.; ZHOU, J.; DU, C.; CHEN, X. Characteristics and accumulation of heavy metals in sediments originated from an electroplating plant, **Journal of Hazardous**, 163,922-930,2008.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents—a review. *Mutation Research*. 277, 91–138, 1992.

HUSBY, C, E., DELATORRE, J., ORESTE, V., OBERBAUER, S. F., PALOW D. T., NOVARA, L., GRAU, A. Salinity tolerance ecophysiology of *Equisetum giganteum* in South America: a study of 11 sites providing a natural gradient of salinity stress. **AoB PLANTS** 2011. available online at www.aobplants.oxfordjournals.org

JAGTAP, S. S., WOOB, S. M., KIM, T., DHIMAN, S. S., KIM, D., LEE, J. Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. **Fuel** 116, 292–298, 2014.

JANUÁRIO, A.H., SANTOS, S.L., MARCUSSI, S., MAZZI, M.V., PIETRO, R.C.L.R., SATO, D.N., ELLENA, J., SAMPAIO, S.V., FRANÇA, S.C., SOARES, A.M. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, 150, 243–251, 2004.

JORDE, L. B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M. J.; WHITE, R. L. *Genética Médica*. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. p.41.

KAËRENLAMPI, S., SCHAT, H., VANGRONSVELD, J., VERKLEIJ, J.A.C., VAN DER LELIE, D., MERGEAY, M., TERVAHAUTA, A.I. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. **Environmental Pollution**, 107, 225-231, 2000.

KNOLL, M. F., SILVA, A. C. F., CANTO-DOROW, T. SCOTTI, TEDESCO, S. B. Effects of *Pterocaulon polystachyum* DC. (Asteraceae) on onion (*Allium cepa*) root-tip cells. **Genetics and Molecular Biology**, 29, 3, 539-542, 2006.

LEAL, D. P., ISLA, M. I., VATTUONE, M. A., e SAMPIETRO, A. R. A hysteretic invertase from *Equisetum giganteum* L. **Phytochemistry**, 52, 1009–1016, 1999.

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

MAJER, B.J., GRUMMT, T., UHL, M., KNASMULER, S. Use of plant bioassays for the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydroch. Hydrob.** 33, 45–55, 2005.

MANN, R.S., ROUSEFF, R.L., SMOOT, J.M., CASTLE, W.S., STELINSKI, L.L. Sulfur volatiles from *Allium* spp. Affect Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), response to citrus volatiles. **Bulletin of Entomological Research**, 101, 89–97, 2011.

MATSUMOTO, S.T., COMBER, S.D.W., GUNN, A.M., 1996. Heavy metals entering sewage treatment works from domestic sources. Effluents on the Contamination of Water Resources in the

Region of Franca-SP, Ph.D. Thesis. State University of São Paulo/São José do Rio Preto – SP, p. 216 (in Portuguese). Study on the Influence of Potentially Genotoxic Tannery. **Journal of Chartered Institution of Water and Environmental Management**, 10, 137–142. 2004.

MACHADO, Ê. L., SALES DAMBROS, V., KIST, L. T., ALCAYAGA LOBO, E. A., TEDESCO, S. B., MORO, C. C. Use of Ozonization for the Treatment of Dye Wastewaters Containing Rhodamine B in the Agate Industry. **Water Air Soil Pollution**, 2011.

MATSUMOTO, S.T., MANTOVANI, M.S., MALAGUTTI, M.I., DIAS, A.L., FONSECA, I.C., MARIN-MORALES, M.A. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genetic Molecular Biology**, 29, 148–158, 2006.

MCCUTCHEON, S.C., JORGENSEN, S.E. Phytoremediation. **Encyclopedia of Ecology**, 2751-2766, 2008.

MEGATELI, S.; SEMSARI, S.; COUDERCHET, M. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba* Smain. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 72: 1774–1780. 2009.

MILOVANOVIĆ, V., RADULOVIĆ, N., TODOROVIĆ, Z., STANKOVIĆ, M., STOJANOVIĆ, G. Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five serbian *Equisetum* species. **Plant Foods for Human Nutrition** 62:113–119, 2007.

MONNET, F., BORDAS, F., DELUCHAT, V., CHATENET, P., BOTINEAU, M., BAUDU, M. Use of the aquatic lichen *Dermatocarpon luridum* as bioindicator of copper pollution: Accumulation and cellular distribution tests. **Environmental Pollution**, 138, 455-461, 2005.

MOREIRA, SILVANA; VIVES, ANA ELISA SIRITO DE; FARIA, B. F.; Utilização dos anéis de crescimento de espécies arbóreas para o monitoramento da poluição ambiental por SR-TXRF, 02/2007, **17ª Reunião Anual de Usuários (RAU)**, Vol. 1, pp.100-100, Campinas, SP, Brasil, 2007.

OLIVEIRA, C. B., COMUNELLO, L. N., LUNARDELLI, A., AMARAL, R. H., PIRES, M. G. S., SILVA, G. L., MANFREDIN, V., VARGAS, C. R., GNOATTO, S. C. B., OLIVEIRA, J. R., GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Molecules**, 17, 1113-1123, 2012.

OLOWOYO, J.O., OKEDYEI, O.O., MKOLO, N.M., LION, G.N., MDAKANE, S.T.R Uptake and translocation of heavy metals by medicinal plants growing around a waste dump site in Pretoria, South Africa. **South African Journal of Botany** 78, 116–121, 2012.

PERES, A. C. Uso de macroalgas e variáveis físicas para avaliação da qualidade da água do rio do Monjolinho, São Carlos-SP. PERES, A. C. Uso de macroalgas e variáveis físicas para avaliação da qualidade da água do rio do Monjolinho, São Carlos-SP. **Universidade Federal de São Carlos**, 2002.

PINHO, D. S., STURBELLE, R. T., MARTINO-ROTH, M. G., GARCIA, G. L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20(2): 165-170, Abr./Mai. 2010.

PLETSCH, M. Plants and the Environment: Phytoremediation. **Encyclopedia of Applied Plant Sciences**, 781-786, 2004.

POLETO, C., Martinez, L.L.G., Sedimentos urbanos: água e ambiente. **Hollos Environment**, 11, 1, 2011.

PULFORD, I.D., WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees—a review. **Environment International**, 29, 529– 540, 2003.

RASKIN, B. E., WILEY, J. Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment, Edited by I., Inc., New York. **International Standard Book Number** 0-471-19254-6; 58.50, 304 pp. 2000.

SILVA, M. L. S., VITTI, G. C., TREVIZAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 42:4, 527-535, 2007.

SILVA, R. M. G., OLIVEIRA, V. M., VALADARES; F., MECINA. G. F., SILVA, L. P. Genotoxic activity and toxicity of *Baccharis trimera* Less. regarding the bioaccumulation of heavy metals. **Journal of Medicinal Plants Research** Vol. 6:26, 4321- 4327, 2012.

SILVA, M. N., MUCHA, A. P., ROCHA, A. C., SILVA, C., CARLI, C., GOMES, C. R., C. ALMEIDA, M. R. Evaluation of the ability of two plants for the phytoremediation of Cd in salt marshes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** 141, 78 e 84, 2014a.

SILVA, M. N., MUCHA, A. P., ROCHA, A. C, TEIXEIRA, C., GOMES, C. R., ALMEIDA, C. M. R. A strategy to potentiate Cd phytoremediation by saltmarsh plants e Autochthonous bioaugmentation. **Journal of Environmental Management** 134, 136e144, 2014b.

SMAKA-KINCL, V., STEGNAR, P., LOVKA, M., TOMAN, M. J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. **Mutation Research** 368, 171 – 179, 1996.

SOUZA, P. Z.; COSTA S.; ZOCHE, J. J. *Baccharis trimera* Less. DC. como indicadora da Recuperação de Áreas Mineradas de Carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 702-704, jul. 2007.

SUSARLA, S., MEDINA, V. F., MCCUTCHEON, S. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, 18, 647–658, 2002.

TÉLLEZ, M. G. O. RODRIGUEZ, H. B., OLIVARES, G. Q., SORTIBRAN A. N. C., CETTO, A. A., RODRIGUEZ-ARNAIZ, R. A phytotherapeutic extract of *Equisetum myriochaetum* is not genotóxica either in the *in vivo* wing somatic test of *Drosophila* or in the *in vitro* human micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology** 111, 182–189, 2007.

TROJAN-RODRIGUES, M., ALVES, T.L.S., SOARES, G.L.G., RITTER, M.R. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 139 155– 163, 2012.

UGOLINI, F., TOGNETTI, R., RASCHI, A., BACCIA, L. *Quercus ilex* L. as bioaccumulator for heavy metals in urban areas: Effectiveness of leaf washing with distilled water and considerations on the trees distance from traffic. **Urban Forestry e Urban Greening** 12, 576–584, 2013.

VEIT, M., BECKER, C., HOHNE, C., BAUER, K. AND GEIGER, H. Interspecific and intraspecific variation of pheno- lics in the genus *Equisetum* subgenus *Equisetum*. **Phyto-chemisto** 38, 881-891, 1995.

WRIGHT, C.I., VAN-BUREN, L., KRONER, C.I., KONING, M.M.G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology** 114, 1–31, 2007.

YANG L., HUANG, B., HU, W., CHEN, Y., MAO, M., YAO, L. The impact of greenhouse vegetable farming duration and soil types on phytoavailability of heavy metals and their health risk in eastern China. **Chemosphere** 103, 121–130, 2014.

ZIN, J., WEISS, C. La Salud por Medio de las Plantas Medicinales. **Editorial Salesiana, Santiago, Chile**, pp. 113-114, 1980.

CAPÍTULO I

Ecotoxicology and Environmental Safety

Potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. e *Equisetum hyemale* L.

Vanessa Marques de Oliveira Moraes^a, Regildo Márcio Gonçalves da Silva^a

^aUniversidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Ciências Biológicas – Laboratório de Fitoterápicos, Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Avenida Dom Antônio 2100, CEP 19806-900, Assis, São Paulo, Brasil.

Resumo

Baccharis trimera (carqueja) é uma planta utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças do fígado e do trato gastrointestinal. *Equisetum hyemale* (cavalinha) tem sido utilizada na medicina tradicional para tratamento da hipertensão e doenças inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial mutagênico e bioacumulador de metais pesados de *B. trimera* Less e *E. hyemale* L. Os espécimes de carqueja e cavalinha foram cultivados e expostos à solução de metal e controles por 30 dias. As partes vegetativas coletadas foram trituradas e secas em estufa para a preparação dos extratos. Os extratos etanólico e aquoso foram preparados em diferentes concentrações com água ultra pura. Os metais pesados presentes nos extratos foram quantificados por meio da análise de absorção atômica. O Teste de *Allium cepa* foi realizado para analisar a atividade genotóxica dos extratos. Os extratos aquoso e etanólico foram os que mais acumularam metais. E a concentração de 100µg/mL do extrato etanólico de *B. trimera* e os extratos de *E. hyemale* interferiram no índice mitótico. Conclui-se que *B. trimera* e *E. hyemale* são espécies bioacumuladoras de diferentes metais pesados. Os extratos de *B. trimera* e *E. hyemale* interferem no índice mitótico e são capazes de promover atividade genotóxica em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

Palavras Chave: mutagenicidade, *Allium cepa*, genotoxicidade, bioacumulação.

1. Introdução:

A poluição do solo e água por metais pesados tem se tornado um desafio nos últimos tempos e surgiu devido ao rápido crescimento industrial e avanços nas práticas agrícolas (Orisakwe et al., 2012, Brudzinska-Kosior et al., 2012; Zhou et al., 2014). A dispersão desses elementos no ambiente tem ocasionado a sua entrada na cadeia alimentar, pois tais metais podem atingir e contaminar as plantas por meio da água e do solo durante o cultivo (Olowoyo et al., 2012, Awodele et al., 2013; Mahmood et al., 2013).

Solos contaminados podem elevar a fitodisponibilidade de metal em relação aos solos não contaminados (Sharma et al., 2007; Silva e Vitti, 2008). Os elementos essenciais tais como de Cu e de Zn, em baixas concentrações, atuam como micronutrientes para manter a função normal do corpo, a excessiva ingestão destes pode ser prejudicial para o homem (Powers et al., 2003. Além disso, a ingestão de elementos não essenciais, tais como Cd e Pb, pode causar efeitos deletérios sobre a saúde humana (Jarup, 2003; Khlifi Hamza-Chaffai, 2010). Do mesmo modo, a água de irrigação que contém metais pesados pode contaminar plantas cultivadas em solo não contaminado (Katsou et al., 2011; Stasinou e Zabetakis, 2013).

A liberação de metais por meio de atividades humanas para o meio ambiente tem aumentado ao longo dos anos (Olowoyo et al., 2010; Olowoyo et al., 2012). A acumulação de metais pelas plantas é uma preocupação ambiental crescentemente, pois a contaminação por metais pesados em ambientes agrícolas pode ocorrer por meio das formulações de pesticidas, por fertilizantes químicos e irrigação com água de má qualidade (Marcovecchio et al., 2007; Ye et al., 2013; Yang et al., 2014), sendo que os metais pesados estão entre os principais contaminantes de legumes e plantas medicinais (Ajasa et al., 2004; Carvalho et al., 2010).

A bioacumulação de metais pesados por meio da alimentação podem causar riscos para a saúde, tanto a médio quanto em longo prazo, tais como dor abdominal, problemas para o conceito (causando aborto ou parto prematuro) entre outras teratogêneses (Awodele et al., 2013; Shachar et al., 2013). Adultos também podem apresentar pressão arterial elevada, fadiga, distúrbios renais e cerebrais (Hifsa et al., 2009). A ingestão crônica de metais pesados também pode levar a erupções cutâneas, úlcera intestinal e diferentes tipos de câncer (Turkdogan et al., 2002; Shad et al., 2008; Khlifi e Hamza-Chaffai, 2010). O consumo de plantas medicinais, seja na forma de infusões ou extrato, contaminados com metais pesados, pode resultar na acumulação crônica destes em órgãos (Ajasa et al., 2004; Ang e Lee, 2006; Arzani et al., 2007).

Experimentos têm demonstrado que diversas espécies de plantas podem representar importantes ferramentas para descoberta de novos bioindicadores e bioacumuladores. Esta

característica se deve a capacidade destas espécies em extrair quantidades elevadas de metais pesados e outros xenobióticos de águas e solos contaminados (Cunningham et al., 1995; Prasad e Freitas, 2003; Bali et al., 2010).

Baccharis trimera (Less) DC, popularmente conhecida como carqueja, é muito comum na América do Sul. Infusões, decoctos, e tinturas de suas partes aéreas são usadas na medicina popular brasileira (Oliveira et al., 2012 e Trojan-Rodrigues et al., 2012). Análises fitoquímicas verificaram que *B. trimera* contém lactonas, diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, saponinas, taninos, compostos fenólicos e os óleos essenciais, cuja substância ativa principal é carquejol (Borella et al., 2006). Algumas das suas propriedades farmacológicas estão relacionadas com o tratamento de doenças do fígado e do trato gastrointestinal (Grance et al., 2004, e Januário et al., 2004), processos inflamatórios (Nogueira et al., 2011) e diabetes (Oliveira et al., 2005). Seu composto de gosto amargo, de ação diurética, é relatado como depurador do sangue (Grance et al., 2008). Recentemente, a atividade esquistossomicida de *B. trimera* foi evidenciada por testes *in vitro* utilizando óleos essenciais, extrato hidroalcoólico bruto e fração hexânica em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Allegretti et al., 2012; Oliveira et al., 2012; Oliveira et al., 2013). Pinho et al (2010) demonstraram um efeito mutagênico do chá de *B. trimera* em células vegetais de *Allium cepa* e em linfócitos humanos (aberrações cromossômicas) cultivadas. Silva et al (2012) demonstraram que *B. trimera* é capaz de bioacumular metais pesados de solo contaminado e ainda podem promover a atividade genotóxica em células meristemáticas de *A. cepa*.

Equisetum hyemale é uma das plantas herbáceas mais comum e amplamente distribuídas em quase todo o mundo, exceto na Austrália e Nova Zelândia (WHO, 1998). Esta planta tem sido utilizada na medicina tradicional para tratamento da hipertensão (WHO, 1998), doenças inflamatórias (Park e Jeon, 2008), acidente vascular cerebral agudo (Sucher, 2006), hemorragia e câncer (WHO, 1998). As análises químicas verificaram que *E. hyemale* contém compostos fenólicos (Dogan et al., 2010), flavonoides e alcalóides (Andrade - Cetto e Heinrich, 2005).

Este estudo teve como objetivo quantificar os metais pesados presentes nas espécies de plantas medicinais *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale*, assim como quantificar os metais no solo utilizado para o plantio e também avaliar o potencial mutagênico dos extratos dessas espécies.

2. Materiais e métodos:

2.1 Preparação da Solução aquosa de metal pesado

Os seguintes sais metálicos foram utilizados na preparação da solução aquosa de metal pesado: $K_2Cr_2O_7$, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $CdCl_2 \cdot H_2O$ e $Pb(NO_3)_2$. A solução sintética contendo os metais pesados foi preparada por dissolução com água ultra-pura a uma concentração de 0,25mM de acordo com as metodologias propostas por Li et al (2010); Meunier et al (2003) e Katsou et al (2011). A solução foi utilizada para irrigar o grupo tratado de *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale*.

2.2 - Exposição e coleta das plantas

Os espécimes de *B. trimera* e *E. hyemale* foram cultivados na Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-UNESP, Câmpus de Assis (22°38'49.85"S e 50°26'14.54"O; altitude 577m) em vasos de poliestireno de 3000g de capacidade, por um período de 30 dias. Durante este período um grupo de plantas recebeu uma solução contendo metal pesado previamente preparado em laboratório (item 2.1) e outro grupo recebeu água isenta de qualquer contaminante metálico. Este fornecimento foi realizado de acordo com o delineamento estatístico estabelecido, onde foram realizados seis repetições para os grupos: tratado com a solução de metal pesado e o controle que recebeu água potável. O volume diário por vaso foi de 300 mL dos tratamentos, de acordo com a capacidade de absorção e vazão, em consideração ao volume do vaso e quantidade de substrato utilizado.

No trigésimo dia de tratamento as partes vegetativas das plantas foram coletadas, selecionadas e colocadas em estufa para secagem por 48 horas, na temperatura média de 40°C. Logo após foram trituradas, pulverizadas e armazenadas em local seco e protegido da luz.

2.3 Determinação de metais pesados no solo

Foram pesados 20g de amostra do solo do grupo controle e 20g do grupo tratado com metal, em frascos cônicos de polietileno e adicionou-se 40 mL de solução extratora DTPA – ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA 0,005 mol.L⁻¹) +trietanolamina (TEA 0,1 mol.L⁻¹) + cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,01 mol.L⁻¹), pH 7,3. Em seguida as misturas foram agitadas por duas horas a 220 rpm em agitador mecânico orbital e filtradas imediatamente, a suspensão foi utilizada para quantificação dos metais. As concentrações dos metais pesados foram determinadas em triplicata em Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (AAS) em aparelho Varian modelo AA-1275, de acordo metodologia descrita por Lindsay e Norvell, 1978.

2.5 Determinação de metais pesados nos extratos

Para o preparo do extrato etanólico as partes vegetativas de *B. trimera* e *E. hyemale* foram pulverizadas e extraídas por meio maceração mecânica com solvente orgânico, álcool etílico absoluto na proporção 1:10 (peso/volume), a temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período o extrato foi filtrado. O infuso foi preparado na proporção 1:10 (peso/volume) dos pulverizados *B. trimera* e *E. hyemale* em água ultra pura à temperatura de $97\pm 2^\circ\text{C}$. O infuso foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente, após esse período foi realizada a filtração por meio de um funil revestido com papel de filtro de acordo com metodologia descrita por Barthwal et al. (2008).

Para a análise de metais pesados no extrato etanólico e no infuso, foram retirados 100mL de cada extrato e adicionado 20mL de ácido nítrico P.A. sendo levado ao aquecimento até evaporar 60mL de cada solução. Após atingir a temperatura ambiente, foram adicionados 40mL de água ultra pura a fim de obter uma solução final de 100mL de amostra para análise.

Para o extrato aquoso, 3g do pulverizado de cada espécie de planta foi diluído em 100mL de água ultra pura (30g/L). Em seguida foi acrescentado 10mL da mistura de ácido nítrico (HNO_3) e ácido perclórico (HClO_4) na proporção de 6:1. As soluções foram aquecidas até obtenção de um precipitado branco, que foi separado e dissolvido em um balão volumétrico com 10mL HNO_3 (0,1N) de acordo com metodologia descrita por Barthwal et al. (2008).

A leitura dos metais pesados presentes nos extratos foi realizada em triplicata e obtida por meio do espectrofotômetro de absorção atômica (Varian AA-1275). Neste estudo foram analisados os seguintes metais: Chumbo (Pb), cobalto (Co), Cobre (Cu), Cromo(Cr), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Zinco (Zn). Os gases utilizados para a leitura foram acetileno e ar comprimido em análise de chama com lâmpadas de cátodo oco, procedimento realizado de acordo com Santos et al. (2006).

2.5 - Preparação dos extratos para o Teste *Allium cepa*

2.5.1 - Infuso

O pó das folhas de *B. trimera* e da parte aérea *E. hyemale* foi pesado para realização dos infusos em diferentes concentrações (1,0; 0,5 e 0,01mg/mL), logo após foram colocados em água ultra pura à temperatura de $97\pm 2^\circ\text{C}$. Os infusos foram deixados em repouso até atingir a temperatura ambiente, após esse período foi realizada a filtração por meio de um funil revestido com papel de filtro.

2.5.2 - Extrato etanólico

As partes vegetativas de *B. trimera* e *E. hyemale* foram pulverizadas e extraídas por meio maceração mecânica com solvente orgânico, álcool etílico absoluto na proporção 1:10 (peso/volume), a temperatura ambiente por 24 horas. Após este período o extrato foi filtrado e o resíduo extraído novamente, sendo este procedimento realizado em três repetições.

O extrato obtido foi reunido e evaporado em aparelho rotaevaporador até secura total do mesmo. O extrato seco obtido foi quantificado e diluído em água ultra pura nas concentrações (1, 10, 50 e 100µg/mL) para a realização dos ensaios.

2.6 Teste *Allium cepa*

O teste do *Allium cepa* foi realizado de acordo com metodologia descrita por Caritá e Marin-Morales (2008). Cem sementes foram colocadas para germinar em estufa BOD (fotoperíodo 12/12, a 25°C) em placas de Petri forradas com papel filtro e com 2 mL de água destilada. Após as sementes germinarem e as raízes atingirem 1 cm de comprimento (aproximadamente 72 horas) as placas de Petri foram trocadas e colocadas 40 sementes por tratamento. Foram adicionados nas placas de Petri 2 mL de cada concentração dos extratos de cada planta, sem e com tratamento com metal pesado, etanólico (1, 10, 50 e 100µg/mL) e aquoso (1,0; 0,5 e 0,01mg/mL). Para o controle negativo foi utilizada água destilada e o controle positivo solução de MMS (metil metanosulfonato). As sementes foram mantidas em BOD por 48 horas, na mesma temperatura e fotoperíodo.

Após esse período as sementes foram coletadas e fixadas em álcool-ácido acético (3:1) por 24 h. Em seguida foram lavadas com água destilada e hidrolisadas com HCl 1N a 60°C por 11 minutos. As raízes foram transferidas para um recipiente de vidro âmbar contendo reativo de Schiff por 45 minutos. As lâminas foram preparadas utilizando a região meristemática F1e as lamínulas foram montadas com duas gotas de carmim acético 2%. Foram analisadas 5000 células para cada tratamento, a fim de avaliar e quantificar aberrações cromossômicas, micronúcleos, índice de mutagenicidade, índice de alterações cromossômicas índice mitótico, sendo este último parâmetro de análise calculado pelo número de células em divisão por 1000 células observadas (Fiskesjö, 1985; Fiskejo et al., 1997). Os micronúcleos foram quantificados e expressos em MN/5000 células (Akinboro e Bakare, 2007).

O índice mitótico, de mutagenicidade, de alterações cromossômicas, as frequências de cromossomos aberrantes e micronúcleos obtidos para cada tratamento durante o período de exposição e entre as amostras foram comparadas com os controles e analisadas

estatisticamente por meio do teste de Kruskal–Wallis ($p < 0.05$), conforme descrito por Grisolia et al (2005) e Leme e Marin-Morales et al (2009).

3. Resultados

Na tabela 1 são apresentados os teores de metais pesados presentes no solo do plantio de *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale*, controle e tratado com a solução de metal. Na Tabela 2 estão os valores orientados de referência de metais em solo de acordo com a CETESB (2009) *Valor de Referência de Qualidade*: solo considerado limpo ou de águas subterrâneas em seu estado natural. *Valor de Prevenção*: Indica uma possível alteração da qualidade natural dos solos. Nos solos controles todos os metais quantificados apresentaram valores inferiores ao recomendado pela CETESB (2009). No solo de *B. trimera* tratado com a solução de metal, os metais Pb, Co e Zn apresentaram teores superiores ao recomendado pela CETESB (2009). E os metais Cu e Cr apresentaram valores inferiores ao recomendado pela CETESB (2009), porém houve um aumento em relação aos solos controle. Já no solo tratado de *E. hyemale* os metais Pb, Cu, Co e Zn apresentaram valores superiores aos valores de referência e de prevenção recomendados pela CETESB (2009). Cr apresentou valor inferior ao recomendado pela CETESB (2009). A CETESB (2009) não apresenta parâmetros de referência para os metais Mn e Fe.

Tabela 1 - Teores (mg/L) de metais pesados (Pb, Cu, Co, Mn, Zn, Fe e Cr) presentes no solo do plantio de *B. trimera*, controle e tratado com a solução de metal.

Espécie	Solo	Metais no Solo (mg/L)						
		Pb	Cu	Co	Mn	Zn	Fe	Cr
<i>B. trimera</i>	Controle	04,53±0,05	06,33±0,05	0,77±0,05	170,00±0,00	43,00±0,00	143,33±0,03	0,10±0,00
	Tratado	60,33±1,52	24,60±0,2	14,37±0,11	153,33±0,32	173,33±0,20	132,00±0,46	2,93±0,21
<i>E. hyemale</i>	Controle	04,23±0,05	06,53±0,11	0,73±0,05	213,33±0,11	43,66±0,57	108,00±1,00	0,10±0,00
	Tratado	93,00±1,00	86,90±1,76	33,80±0,91	182,33±0,30	252,67±0,20	127,33±0,47	4,07±0,15

Tabela 2 - Valores Orientadores para solo no Estado de São Paulo (CETESB, 2005).

Orientações	Metais no Solo (mg/Kg)					
	Pb	Cu	Co	Zn	Fe	Cr
Referência	17	35	13	60	-	40
Prevenção	72	60	25	300	-	75
Agrícola	180	200	35	450	-	150
Residencial	300	400	65	1000	-	300
Industrial	900	600	90	2000	-	400

A tabela 3 apresenta a análise da quantificação dos metais presentes nos diferentes extratos de *B. trimera*. Quanto ao metal Pb, os extratos tratados, aquoso e etanólico, apresentaram diferença estatística entre os controles, sendo que o infuso não apresentou diferença dos controles. Para o Cu os extratos tratados, aquoso e etanólico apresentaram diferença entre os controles. Para os metais Co, Mn, Zn Fe e Cr os extratos tratados apresentaram diferença entre os controles. Na Figura 1-A observa-se os espécimes de *B. trimera* cultivadas sem tratamento com a solução de metal. Na Figura 1-B *B. trimera* cultivada com o tratamento da solução de metais pesados.

Tabela 3 - Teores (mg/L) de metais pesados (Pb, Cu,Co, Mn, Zn, Fe e Cr) presentes nos diferentes extratos de *B. trimera*.

Extrato	Metais Avaliados (mg/L)						
	Pb	Cu	Co	Mn	Zn	Fe	Cr
Controle							
Aquoso	0,74±0,03a	0,72±0,04a	0,08±0,005a	1,42±0,06a	2,91±0,01a	2,74±0,12a	0,14±0,005a
Etanólico	0,74±0,05a	0,35±0,01b	0,09±0,007a	0,60±0,04b	0,80±0,02b	2,07±0,10b	0,07±0,01a
Infuso	0,42±0,02a	0,07±0,005c	0,05±0,005a	0,11±0,01c	0,22±0,01c	1,07±0,04c	0,13±0,005a
Tratamento							
Aquoso	28,08±0,91b	3,27±0,12d	2,43±0,04b	3,19±0,03d	5,43±0,06d	3,10±0,06d	4,62±0,07b
Etanólico	18,34±0,20c	1,43±0,01e	0,76±0,01c	0,86±0,03e	1,37±0,02e	3,64±0,07e	3,23±0,07c
Infuso	01,07±0,02a	0,29±0,01b	0,37±0,01d	0,22±0,01f	0,36±0,01f	0,61±0,01f	0,37±0,01d

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

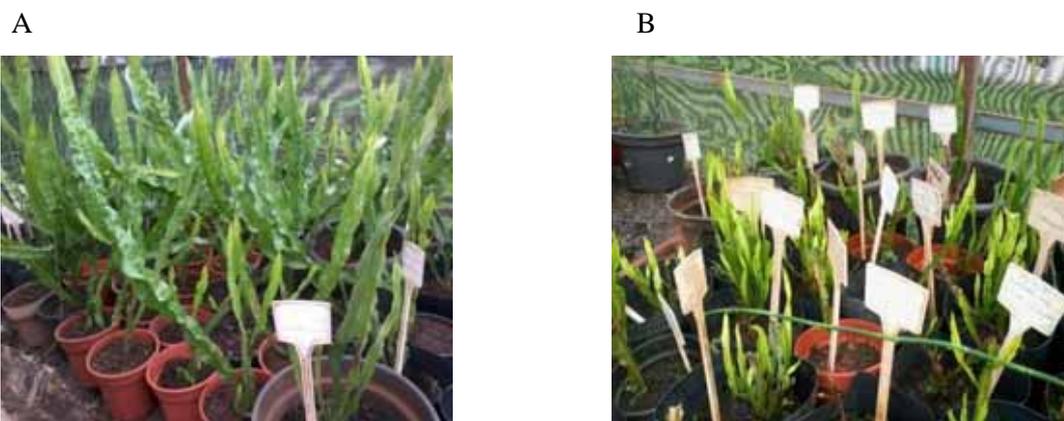


Figura 1. *Baccharis trimera* sem tratamento (A) e tratadas com metal pesado (B).

Na tabela 4 estão os resultados para a quantificação dos metais nos extratos de *E. hyemale*. Quanto à determinação de Pb, os extratos tratados, aquoso e etanólico, apresentaram diferença estatística entre os controles e , sendo que o infuso não apresentou diferença entre o extrato aquoso controle. Para os metais Co, Fe e Cr os extratos tratados apresentaram diferenças entre os controles. Para o Cu e Mn, os extratos tratados, aquoso e etanólico, apresentaram diferenças estatísticas entre os controles, sendo que o infuso não apresentou

diferença entre os controles. Para o Zn os extratos tratados, aquoso e etanólico apresentaram diferenças estatísticas entre os controles, sendo que o infuso não apresentou diferença entre o infuso controle. Na Figura 2-A se podem observar os espécimes de *E. hyemale* cultivadas sem tratamento com a solução de metal. Na Figura 2-B *E. hyemale* cultivada com o tratamento da solução de metais pesados.

Tabela 4: Teores (mg/L) de metais pesados (Pb, Cu, Co, Mn, Zn, Fe e Cr) presentes nos diferentes extratos de *E. hyemale*.

Extrato	Metais Avaliados (mg/L)						
	Pb	Cu	Co	Mn	Zn	Fe	Cr
Controle							
Aquoso	0,65±0,03abc	0,73±0,02a	0,08±0,01a	1,05±0,04a	3,70±0,25a	6,68±0,07a	0,11±0,01a
Etanólico	0,84±0,04b	0,15±0,005b	0,08±0,005a	0,08±0,005b	0,91±0,01b	2,41±0,01b	0,16±0,005a
Infuso	0,50±0,02c	0,07±0,005b	0,05±0,005a	0,08±0,005b	0,19±0,01c	1,65±0,06c	0,16±0,005a
Tratamento							
Aquoso	19,25±0,10d	3,17±0,06c	1,43±0,04b	1,72±0,03c	5,90±0,1d	4,10±0,22d	2,73±0,05b
Etanólico	10,32±0,07e	1,55±0,03d	0,44±0,01c	0,37±0,01d	5,05±0,05e	3,60±0,02e	1,69±0,01c
Infuso	0,66±0,02a	0,16±0,01b	0,17±0,01d	0,07±0,005b	0,17±0,005c	0,56±0,04f	0,23±0,01d

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

A



B



Figura 2. *Equisetum hyemale* sem tratamento (A) e tratada com metal (B).

Na tabela 5 estão apresentados os comprimentos das raízes de *Allium cepa* tratadas com extrato etanólico e infuso de *Baccharis trimera* sem tratamento com metal. Observa-se que o comprimento das raízes de todas as concentrações do extrato etanólico diferiram dos controles, apresentando uma diminuição do comprimento das raízes em relação ao controle negativo. Em relação ao infuso o mesmo ocorreu a partir da concentração de 1mg/mL.

Tabela 5 – Comprimento das raízes (mm) de *Allium cepa* tratadas com extratos etanólico e infuso de *Baccharis trimera*. Controle negativo (CN) tratado com água destilada e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L. Grupo Controle.

Tratamento	Comprimento das raízes (mm)
CN	42,00±1,44a
Extrato etanólico (µg/ml)	
1	28,00±1,27b
10	36,32±1,89c
50	39,72±1,45c
100	24,69±1,63d
Infuso (mg/mL)	
0,01	45,56±1,52a
0,5	44,23±1,61a
1	38,65±1,64c
CP	14,92±1,04e

10 raízes analisadas. Médias ± Desvio padrão. Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Na tabela 6 estão apresentados os comprimentos das raízes de *Allium cepa* tratadas com extrato etanólico e infuso de *Baccharis trimera* com tratamento com metal. Observa-se que o comprimento das raízes de todas as concentrações do extrato etanólico diferiram dos controles, apresentando diminuição, de aproximadamente duas vezes, o comprimento das raízes em relação ao controle negativo. O comprimento das raízes de todas as concentrações do infuso não diferiram do controle negativo.

Tabela 6 – Comprimento das raízes (mm) de *Allium cepa* tratadas com extratos etanólico e infuso de *Baccharis trimera* tratados com a solução de metal. Controle negativo (CN) tratado com água destilada e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L. Grupo Tratado.

Tratamento	Comprimento das raízes (mm)
CN	42,00±1,44 ^a
Extrato etanólico (µg/ml)	
1	25,69±1,05b
10	19,35±1,65c
50	24,69±1,77b
100	13,64±1,98d
Infuso (mg/mL)	
0,01	44,70±1,34 ^a
0,5	44,05±1,89 ^a
1	42,68±1,94 ^a
CP	14,92±1,04d

10 raízes analisadas. Médias ± Desvio padrão. Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)

Na tabela 7 estão apresentados os valores para o Teste de *Allium cepa* das raízes expostas aos diferentes extratos de *B. trimera* cultivadas em solo sem tratamento, na qual observa-se que o índice mitótico de todas as concentrações do infuso e a concentração de 1µg/mL do extrato etanólico não diferiram do controle negativo, porém o índice mitótico obtido com as concentrações de 10, 50 e 100µg/mL do extrato etanólico diferiram dos

controles negativo e positivo apresentando diminuição no índice mitótico. Para metáfase aberrante, as concentrações 100, 50 e 10 μ g/mL extrato etanólico e a concentração de 1,0mg/mL do infuso diferiram do controle negativo apresentando aumento na frequência de metáfase aberrante. As concentrações de 0,5 e 0,01mg/mL do infuso e a concentração de 1 μ g/mL do extrato etanólico não apresentaram diferença entre o controle positivo. Para anáfase aberrante as concentrações de 1,0 e 0,5 mg/mL do infuso não apresentaram diferença com o controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento significativo na frequência de anáfase aberrante. Para telófase aberrante as concentrações de 50 μ g/mL do extrato etanólico e de 0,01mg/mL do infuso não diferiam em relação ao controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento significativo na frequência de telófase aberrante. Para o índice de aberrações cromossômicas (IAC) a concentração de 0,01mg/mL não diferiu do controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento significativo no índice de aberrações cromossômicas. Para o índice de mutagenicidade (IMt) pode-se observar que a concentração de 1,0mg/mL não apresentou diferença entre o controle positivo. As concentrações de 1, 10 e 50 μ g/mL do extrato etanólico e a concentração de 0,01mg/mL do infuso não apresentaram diferença com controle negativo. As concentrações de 100 μ g/mL do extrato etanólico e a de 0,5mg/mL do infuso apresentaram diferença em relação aos controles. Quanto ao micronúcleo, a concentração de 1 μ g/mL do extrato etanólico não apresentou diferença entre o controle negativo. As concentrações de 50 e 100 μ g/mL do extrato etanólico e todas as concentrações do infuso apresentaram diferença em relação ao controle negativo apresentando aumento na frequência de micronúcleo.

Tabela 7 - Índice Mitótico (IM), Aberrações cromossômicas, Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de Mutagenicidade (IMt) e Micronúcleo para extrato etanólico e infuso de *Baccharis trimera*. Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metil metanosulfonato (MMS). Grupo Controle.

Extratos	IM ^a	Metáfase Aberrante	Anáfase Aberrante	Telófase Aberrante	IAC ^b	IMt ^c	Micronúcleo
CN	13,2±1,97a	2,41±0,16a	1,28±0,17a	0,24±0,21a	0,67±0,45a	0,12±0,05a	0,75±0,95a
Etanólico (µg/mL)							
1	14,20±0,28a	6,40±1,14b	5,60±1,14b	2,40±0,54b	2,62±0,23b	0,42±0,13a	1,08±0,84a
10	11,90±0,02b	11,8±1,92c	10,2±0,84c	3,80±0,57c	3,39±0,36c	0,62±0,23a	2,40±0,81b
50	9,98±0,67c	12,8±1,64c	11,8±1,64c	5,60±1,34d	3,02±0,13c	0,72±0,16a	1,60±0,54c
100	11,64±0,07b	14,6±1,07d	11,2±0,84c	7,40±0,89e	3,32±0,25c	1,02±0,13b	1,80±0,44c
Infuso (mg/mL)							
0,01	13,44±1,35a	4,60±1,01b	5,80±0,84b	5,80±0,84d	1,68±0,08d	0,92±0,19a	2,08±0,84c
0,5	12,48±1,52ab	5,60±0,57b	7,60±1,14d	7,60±1,14e	2,14±0,36b	1,04±0,11b	2,20±0,84cb
1,0	14,68±1,43a	10,2±0,57c	8,20±1,09d	8,20±1,09e	3,20±0,25c	1,84±0,31c	4,80±0,84d
CP	8,60±0,72d	7,56±1,30b	7,64±1,67d	6,26±1,34d	1,98±0,59d	1,22±0,27c	7,84±1,29e

^aÍndice Mitótico (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), ^bíndice de alterações cromossômicas (n° total de células alteradas/n° total de células analisadas x 100) e ^cíndice de mutagenicidade (n° de células com micronúcleo e quebras/n° total de células analisadas x 100).

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Na tabela 8 estão apresentados os valores para o Teste de *Allium cepa* das raízes expostas aos diferentes extratos de *B. trimera* cultivadas em solo com o tratamento de metais pesados. Para o índice mitótico (Figura 3) observa-se que as concentrações de 10µg/mL do extrato etanólico e a de 1,0mg/mL do infuso não diferiram entre o controle negativo. As concentrações de 0,01 e 0,5mg/mL do infuso e a concentração de 1µg/mL do extrato etanólico não apresentaram diferença entre o controle positivo. As concentrações de 50 e 100µg/mL do extrato etanólico apresentaram diferença entre o controle negativo, apresentando aumento no índice mitótico. Para metáfase aberrante (Figura 4) as concentrações de 0,01 e 0,5mg/mL de infuso não diferiram entre o controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento da frequência de metáfase aberrante. Para anáfase aberrante (Figura 4) as concentrações de 1µg/mL do extrato etanólico e a de 0,01mg/mL do infuso não apresentaram diferença entre o controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento da frequência de anáfase aberrante. Para telófase aberrante (Figura 4) as concentrações de 0,01 e 0,5mg/mL do infuso e a de 1µg/mL do extrato etanólico não apresentaram diferença entre o controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento da frequência de telófase aberrante. Quanto ao índice de aberrações cromossômicas (IAC) e índice de mutagenicidade (IMt) as concentrações de 0,01 e 0,5mg/mL do infuso e a concentração de 1µg/mL do extrato etanólico não apresentaram diferença em relação ao controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento no índice de aberrações cromossômicas. Quanto à frequência de micronúcleo a concentração de 50µg/mL do extrato etanólico não

apresentou diferença entre o controle positivo. As demais concentrações diferiram do controle negativo apresentando aumento da frequência de micronúcleo.

Tabela 8 – Índice Mitótico (IM), Aberrações cromossômicas, Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de Mutagenicidade (IMt) e Micronúcleos para extratos etanólico e aquoso de *Baccharis trimera* tratados com a solução de metal. Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS). Grupo Tratado com a solução de metal.

Extratos	IM ^a	Metáfase Aberrante	Anáfase Aberrante	Telófase Aberrante	IAC ^b	IMt ^c	Micronúcleo
CN	13,2±1,97a	2,41±0,16a	1,28±0,17a	0,24±0,21 ^a	0,67±0,45a	0,12±0,15a	0,75±0,95 ^a
Etanólico (µg/mL)							
1	8,78±0,83b	9,23±1,30b	8,05±1,29b	7,09±1,58b	2,42±0,24b	1,24±0,20b	3,23±0,95b
10	11,44±1,02a	15,4±1,95c	12,0±1,53c	10,2±1,30c	3,76±0,47c	2,12±0,19c	5,82±0,84c
50	16,52±1,15c	28,8±1,07d	22,6±1,52d	11,0±1,58c	6,24±0,10d	3,07±0,65c	8,25±1,25d
100	22,04±1,67d	39,6±1,15e	28,0±1,41e	17,8±1,52d	8,54±0,63e	5,18±0,58d	12,2±1,82e
Aquoso (mg/mL)							
0,01	8,44±0,30b	5,61±1,14f	7,09±1,58b	7,01±1,58b	1,96±0,35b	1,24±0,15b	4,43±1,14b
0,5	9,68±0,70b	7,82±1,15f	12,2±1,29c	6,63±1,51b	2,46±0,36b	1,40±0,20b	6,28±0,84c
1,0	13,26±1,25a	15,67±1,9c	13,0±1,58c	9,49±1,52e	3,18±0,71c	2,14±0,46c	12,0±1,12e
CP	8,60±0,72b	7,56±1,30f	7,64±1,67b	6,26±1,34b	1,98±0,59b	1,22±0,77b	7,84±1,29d

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p<0,05$).

Na tabela 9 estão apresentados os comprimentos das raízes de *Allium cepa* tratadas com extrato etanólico e infuso de *Equisetum hyemale* sem o tratamento com metal. O comprimento das raízes tratadas com extrato etanólico, somente a concentração de 1µg/ml não diferiu do controle negativo, as demais concentrações diferiram dos controles positivo e negativo, apresentando uma diminuição no comprimento das raízes. O comprimento das raízes tratadas com infuso a concentração de 0,5mg/mL não diferiu do controle negativo. As concentrações de 1 e 0,01mg/mL diferiram dos controles, sendo que a concentração de 0,01mg/mL apresentou um aumento no comprimento da raízes em relação ao controle negativo.

Tabela 9 – Comprimento das raízes de *Allium cepa* tratadas com extratos etanólico e infuso de *Equisetum hyemale*. Controle negativo (CN) tratado com água destilada e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L. Grupo Controle.

Tratamento	Comprimento das raízes (mm)
CN	42,00±1,44a
Extrato Etanólico (µg/ml)	
1	42,58±1,24a
10	29,62±1,90b
50	23,87±1,85c
100	23,71±1,37c
Infuso (mg/ml)	
0,01	58,10±1,45d
0,5	46,10±1,30a
1	33,67±1,79e
CP	14,92±1,104f

10 raízes analisadas. Médias ± Desvio padrão. Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p<0,05$).

Na tabela 10 estão os comprimentos das raízes de *Allium cepa* tratadas com extrato etanólico e infuso de *Equisetum hyemale* tratados com a solução de metal. Pode observar que o comprimento de todas as concentrações, tanto do extrato etanólico quanto do infuso, diferiram com os controles, apresentando uma diminuição no comprimentos das raízes.

Tabela 10 – Comprimento das raízes de *Allium cepa* tratadas com extratos etanólico e infuso de *Equisetum hyemale* tratados com a solução de metal. Controle negativo (CN) tratado com água destilada e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS) a 10mg/L. Grupo Tratado com a solução de metal.

Tratamento	Comprimento das raízes (mm)
CN	42,00±1,44a
Extrato Etanólico (µg/ml)	
1	31,66±2,16b
10	37,01±1,14c
50	34,44±1,44b
100	27,15±1,47d
Infuso (mg/ml)	
0,01	30,09±1,23b
0,5	35,53±1,77c
1	29,35±1,70d
CP	14,92±1,04e

10 raízes analisadas. Médias ± Desvio padrão. Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$)

Na tabela 11 estão apresentados os resultados do teste *Allium cepa* para as raízes expostas aos diferentes extratos de *E. hyemale*, cultivadas em solos sem tratamento, o índice mitótico das concentrações de 1, 10 e 50µg/mL do extrato etanólico e a concentração de 0,5mg/mL do infuso não diferiram e em relação ao controle negativo. As demais concentrações diferiam em relação aos controles apresentado aumento no índice mitótico. Para metáfase aberrante todas as concentrações do infuso e a concentração de 50µg/mL do extrato etanólico não diferiram do controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento na frequência de metáfase aberrante. Para anáfase aberrante todas as concentrações do infuso e as concentrações de 10 e 50µg/mL do extrato etanólico não diferiram do controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento na frequência de anáfase aberrante. Para telófase aberrante a concentração de 1,0mg/mL do infuso não diferiu estatisticamente do controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento na frequência de telófase aberrante. Para o índice de aberrações cromossômicas (IAC), todas as concentrações do infuso e a concentração de 10 e 50µg/mL do extrato etanólico não apresentaram diferença em relação ao controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento no índice de aberrações cromossômicas. Para o índice de mutagenicidade (IMt) as concentrações de 10, 50 e 100µg/mL do extrato etanólico e a concentração de 1,0mg/mL do infuso não apresentaram

diferença entre o controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento no índice de mutagenicidade. Em relação ao micronúcleo, todas as concentrações tanto do infuso quanto do extrato etanólico diferiram em relação aos controles apresentando aumento na frequência de micronúcleo.

Tabela 11 - Índice Mitótico (IM), Aberrações cromossômicas, Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de Mutagenicidade (IMt) e Micronúcleo para extrato etanólico e infuso de *Equisetum hyemale*. Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS). Grupo Controle.

Extratos	IM ^a	Metáfase Aberrante	Anáfase Aberrante	Telófase Aberrante	IAC ^b	IMt ^c	Micronúcleo
CN	13,2±1,97a	2,41±0,16a	1,28±0,17a	0,24±0,21a	0,67±0,45a	0,12±0,15a	0,75±0,95a
Etanólico (µg/mL)							
1	14,4±0,16a	4,20±0,95b	2,80±0,84b	4,08±1,29b	1,10±0,29b	0,60±0,14b	1,80±0,45b
10	12,0±1,14a	11,2±1,29c	6,60±0,89c	9,40±1,29c	2,22±0,36c	1,38±0,23c	2,60±0,83c
50	14,2±0,22a	8,08±0,95d	8,02±1,30c	4,80±1,15b	2,62±0,46c	1,28±0,10c	4,00±1,22d
100	21,4±0,46b	13,4±1,52c	10,2±1,29d	6,02±0,95d	2,98±0,24d	1,92±0,62c	6,60±1,50e
Infuso (mg/mL)							
0,01	18,0±1,44c	7,40±1,70d	5,80±1,53c	9,40±1,70c	2,26±0,50c	0,68±0,32b	1,40±0,54b
0,5	14,5±1,68a	7,60±1,15d	5,89±1,52c	8,60±1,25c	2,20±0,45c	0,92±0,31b	1,60±0,55b
1,0	17,0±1,02c	9,50±1,29d	7,67±1,64c	6,83±1,52d	2,40±0,31c	1,22±0,11c	2,17±0,44c
CP	8,60±0,72d	7,56±1,30d	7,64±1,67c	6,26±1,34d	1,98±0,59c	1,22±0,77c	7,84±1,29e

^aÍndice Mitótico (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), ^bíndice de alterações cromossômicas (n° total de células alteradas/n° total de células analisadas x 100) e ^cíndice de mutagenicidade (n° de células com micronúcleo e quebras/n° total de células analisadas x 100).

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

Na tabela 12 estão apresentados os resultados do teste *Allium cepa* para as raízes expostas aos diferentes extratos de *E. hyemale*, cultivadas em solos com tratamento com metal pesado. O índice mitótico das concentrações de 0,01 e de 0,5 mg/mL do infuso e a concentração de 1µg/mL do extrato etanólico não diferiram em relação ao controle negativo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento no índice mitótico. Para anáfase, metáfase e telófase aberrantes todas as concentrações tanto do infuso quanto do extrato etanólico diferiram em relação aos controles apresentando aumento significativo na frequência destas aberrações. Da mesma maneira para os índices de aberrações cromossômicas (IAC) e mutagenicidade (MMt) todas as concentrações tanto do infuso quanto do extrato etanólico diferiram em relação aos controles apresentando aumento significativo destes índices. Para a frequência de micronúcleos observa-se que concentração de 50µg/mL não apresentou diferença em relação ao controle positivo. As demais concentrações diferiram em relação ao controle negativo apresentando aumento na frequência de micronúcleo.

Tabela 12– Índice Mitótico (IM), Aberrações cromossômicas, Índice de alterações cromossômicas (IAC), Índice de Mutagenicidade (IMt) e para extratos etanólico e aquoso de *Equisetum hyemale* tratados com a solução de metal. Controle negativo (CN) tratado com Água mineral e Controle positivo (CP) tratado com Metilmetanosulfonato (MMS).

Extratos	IM ^a	Anáfase aberrante	Metáfase Aberrante	Telófase Aberrante	IAC ^b	IMt ^c	Micronúcleo
CN	13,2±1,97a	2,41±0,16a	1,28±0,17a	0,24±0,21a	0,67±0,45a	0,12±0,15a	0,75±0,95a
Etanólico (µg/mL)							
1	12,74±1,48a	25,4±1,32b	15,0±0,85b	13,4±1,22b	5,38±1,08b	3,02±0,66b	4,80±1,30b
10	17,15±0,40b	31,0±0,69c	20,8±0,39c	19,4±0,30c	7,12±0,77c	3,60±0,52b	5,01±1,58b
50	19,32±1,46b	35,4±1,44d	24,0±0,71d	18,2±1,39c	7,76±1,20c	4,36±0,69c	8,20±0,77c
100	24,84±1,35c	43,0±1,16e	29,2±0,76e	24,4±1,28d	9,66±0,91d	5,30±0,32c	10,0±1,58d
Aquoso (mg/mL)							
0,01	12,34±1,07a	30,6±0,97c	21,2±1,11c	15,6±1,36e	6,84±0,60c	3,62±0,38b	5,60±1,14b
0,5	14,92±0,94a	43,0±1,32e	23,0±0,70d	16,6±0,58e	8,16±0,93c	4,94±0,52c	6,40±1,40b
1,0	19,0±0,91b	46,8±0,79f	25,8±1,32d	18,4±1,07c	9,10±0,37d	5,76±0,53c	10,8±0,70d
CP	8,60±0,72d	7,56±1,30g	7,64±1,67f	6,26±1,34f	1,98±0,59e	1,22±0,77d	7,84±1,29c

^aÍndice Mitótico (n° total de células em divisão/n° total de células analisadas x 100), ^bíndice de alterações cromossômicas (n° total de células alteradas/n° total de células analisadas x 100) e ^cíndice de mutagenicidade (n° de células com micronúcleo e quebras/n° total de células analisadas x 100).

Letras iguais em coluna não diferem estatisticamente, médias avaliadas com teste de Kruskal–Wallis ($p < 0,05$).

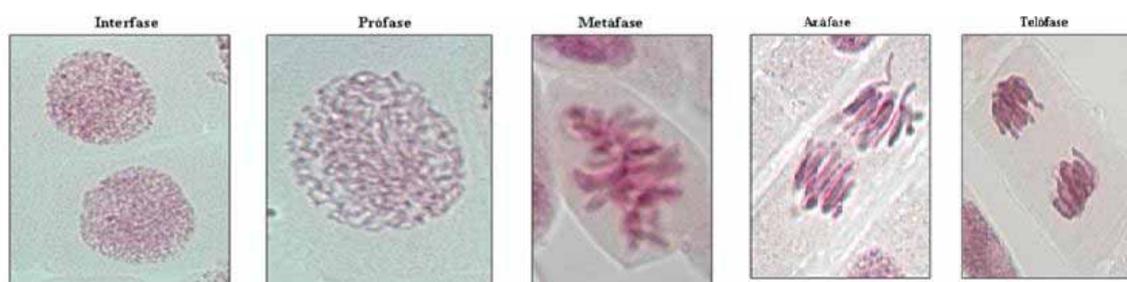


Figura 3. Células normais da divisão mitótica.



Figura 4. Células aberrantes da divisão mitótica.

4 Discussão

De acordo com Koedrith et al (2013), Huang et al (2014) e Khlif e Hamza-Chaffai(2010) os metais pesados são poluentes ambientais com maior potencial mutagênico, resultando em vários tipos de câncer. Os metais são notáveis por sua ampla dispersão

ambiental, sua tendência para se acumular em tecidos do corpo humano, e seu potencial é tóxico mesmo com baixo nível de exposição. Estes elementos tóxicos não são biodegradáveis no solo e, por conseguinte, são extremamente persistentes no ambiente. Fato este que corrobora com os resultados obtidos quanto aos teores de metais quantificados nos solos, onde observa-se que os teores de todos os metais aumentaram nos solos tratados (Tabela 1), portanto, permanecendo estes metais disponíveis para a absorção pelos vegetais.

Perry et al (2010) demonstraram que a *Psidium guajava* (goiaba) é bioacumulador e bioindicador de níquel, indicando os locais que são mais sujeitos a exposição por este metal. Wang e Jia (2009) demonstraram que a espécie *Phragmites australis* absorve do solo o metal Cd, e ainda imobiliza esse metal nas raízes com pouca translocação para parte aérea. Souza et al (2007) evidenciaram que a espécie *B. trimera* pode ser considerada bioindicadora da presença de Zinco e Manganês no solo, mesmo em quantidades muito baixas. Silva et al (2012) demonstraram que *B. trimera* é capaz de bioacumular metais pesados e ainda que estes podem promover a atividade genotóxica em células meristemáticas de *A. cepa*. Estes resultados científicos nortearam a seleção da espécie *B. trimera* para avaliação neste estudo e assim também foi possível constatar a presença de diferentes variedades de metais pesados (Pb, Cu, Co, Mn, Zn, Fe, Cr) passíveis de serem absorvidos por esta espécie (Tabela 3).

Quanto à espécie *E. hyemale*, Brooks et al (1981) evidenciaram que o gênero Equisetum contém espécies que são na verdade indicadores de locais contaminados com arsênio. Juárez-Santillán et al (2010) demonstraram que *E. hyemale* é uma espécie bioacumuladora do Manganês. A presença dos níveis elevados de diferentes metais pesados nos extratos tratados de *E. hyemale* encontrado neste estudo é devido à capacidade das espécie em acumular metais pesados presentes no solo, principalmente nos extratos aquosos e etanólicos. Além de ser um dado importante para caracterizar a espécie como bioacumuladora para diferentes metais, principalmente aquele ainda não relatado na literatura científica.

Laughinghouse et al (2012) demonstraram que o teste *A. cepa* é uma das espécies de plantas mais utilizadas para avaliar danos de DNA, alterações cromossômicas e perturbações do ciclo mitótico. El-Shahaby (2003) reforçou a importância de utilizar o teste de *A. cepa* para detectar toxicidade e genotoxicidade, e da importância como um indicador para a saúde humana. Leme e Marin-Morales (2009) comprovaram a utilização do bioensaio para testar a contaminação ambiental, reconhecendo o bioensaio como excelente modelo genético para detectar mutagênicos ambientais frequentemente utilizados em estudos de monitoramento. Diante disso, as análises dos diferentes extratos obtidos das plantas, por meio do teste do *A. cepa*, apresentaram aberrações cromossômicas e aumento na frequência tanto para metáfases,

anáfases, telófases, micronúcleo e alterações dos índices: mitótico, de mutagenicidade e alterações cromossômicas em ambas as espécies (Tabelas 6 e 10). Para a espécie *B. trimera*, os resultados estão de acordo com os descritos por Pinho et al (2010) que evidenciaram, efeito mutagênico do chá de *B. trimera* em células vegetais (*Allium cepa*) e em células humanas (aberrações cromossômicas) cultivadas. Os resultados observados para a espécie *E. hyemale* de aberrações cromossômicas e aumento na frequência tanto para metáfases, anáfases, telófases, micronúcleo e alterações dos índices mitótico, de mutagenicidade e alterações cromossômicas (Tabela 10), foram primeiramente relatados neste estudo.

Conforme Fernandes et al (2007) o nível de citotoxicidade de um composto teste pode ser determinado com base no aumento ou diminuição do índice mitótico (IM), que pode ser utilizado como um parâmetro de citotoxicidade em estudos de biomonitoramento ambiental. Os resultados do teste de *A. cepa* (tabelas 8 e 12) encontrados para ambas as espécies tratadas com a solução de metal estão de acordo com Silva et al (2000) e Borboa e De la Torre (1996) que demonstraram que produtos químicos, como metais pesados, podem causar a morte celular e alteração no IM, podendo interferir no desenvolvimento normal da mitose. A diminuição do crescimento da raiz indica o retardo de crescimento e citotoxicidade (tabelas 7 e 11). Dimitrova e Ivanova (2003) relataram que algumas concentrações de metais pesados inibiu o crescimento de órgãos vegetativos em algumas espécies de plantas.

5 Conclusão

Diante do exposto conclui-se que *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale* são espécies bioacumuladoras de diferentes metais pesados, sendo que os extratos aquosos e etanólicos foram os que mais acumularam metais. O extrato etanólico e infuso de *B. trimera* e *E. hyemale* interferem no índice mitótico e são capazes de promover atividade genotóxica em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Os diferentes tipos de metais pesados presentes nos extratos e infusos de ambas as espécies possivelmente causaram as alterações no índice mitótico, índice de mutagenicidade, índice de alterações cromossômicas e frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (número do projeto 2013/01331-0).

Referências bibliográficas

- Ajasa, A.M., Bello, M.O., Ibrahim, A.O., Ogunwande, I.A., Olawore, N.O., 2004. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. *Food Chemistry* 85,67–71.
- Akinboro, A., Bakare, A. A. , 2007. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 470–475.
- Allegretti, S.M., Oliveira, C.N.F., Oliveira, R.N., Frezza, T.F., Rehder, V.L.G., 2012. The use of Brazilian medicinal plants to combat *Schistosoma mansoni*. In: Rokni, M.B. (Ed.), *Schistosomiasis*. InTech, Rijeka, pp. 27–70.
- Ang, H.H., Lee, K.L., 2006. Contamination of mercury in tongkat Ali hitam herbal preparations. *Food and Chemical Toxicology* 44, 1245–1250.
- Arzani, A., Zeinali, H., Razmjo, K., 2007. Iron and magnesium concentrations of mint accessions (*Mentha* spp.). *Plant Physiology and Biochemistry* 45, 323–329.
- Awodele, O., Popoola, T.D., Amadi, K.C., Coker, H.A.B., Akintonwa, A., 2013. Traditional medicinal plants in Nigeria – Remedies or risks. *Journal of Ethnopharmacology* 150, 614–618.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M., 2005. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 325–348.
- Bali, R., Siegele, R., Harris, A. T.. Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. *Chemical Engineering Journal*, 156, 286–297, 2010.
- Barthwal, J., Nair, S., Kakkar, P., 2008. Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites. *Biomedical and Environmental Sciences*, 21, 319-324.
- Borboa, L., De la Torre, C., 1996. The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa*

root meristematic cells. *New Phytol.* 134, 481–486.

Borella, J. C., Duarte, D. P., Novaretti, A. A. G., Menezes Jr, A., França, S. C., Rufato, C. B., Santos, P. A. S., Veneziani, R. C. S., 2006. Lopes, N. P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona, *Revista Brasileira de Farmacognosia*.

Brudzinska-Kosior, A., Kosior, G., Samecka-Cymerman, A., Kolon, K., Mroz, L., Kempers, A. J., 2012. Metal contents in *Centaureum erythraea* and its biometry at various levels of environmental pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 349–354.

Brooks, R.R., Holzbecher, J., Ryan, D.E. 1981. Horsetails (*Equisetum*) as indirect indicators of gold Mineralization. *Journal of Geochemical Exploration*, 16, 21-26.

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

Carvalho, L. M., Costa, J. A. M., Canelossi, M. A. G., 2010. Qualidade em plantas medicinais– Aracaju : Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1517-1329; 162.

Cunningham, S.D.; Berti, W.R. Huang, J.W. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnology*, v. 13, n. 9, p. 393-397, 1995.

Dimitrova I., Ivanova E. 2003. Effect of heavy metals-soil pollution on some morphological and cytogenetical characteristics of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Balkan Ecology*. 6, 2: 212-218.

Dogan, S., Diken, M.E., Dogan, M., 2010. Antioxidant, phenolic and protein contents of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research* 4, 2566–2573.

Dorea, J. G., 2000. Zinc in human milk. *Nutrition Research*. Vol. 20, No. 11, pp. 1645-1687.

El-Shahaby, A. O., 2003. Genotoxicity Screening of Industrial Wasterwater Using the *Allium Cepa* Chromosome Aberration Assay. Pakistan Journal Biological Sciences, Baltimore, v. 42, n. 6, p. 181-189.

Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E.C., Marin-Morales, M.A., 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Pestic. Biochem. Phys. 88, 252–259.

Fiskesjö, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring., 1985. Hereditas, 102:99-112.

Fiskesjö, G. Wang, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (EDS.), 1997 *Allium* test for screening chemicals evaluation of cytologic parameters. In: Plants for Environmental Studies. CRC Lewis Publishers Boca Raton, New York, 308–333.

Grance, S.R.M., Barros, A.L.C., Martins, F.I., Matida, E.T., Trulli, E.O., Teixeira, M.A., Carvalho, T.B.S., Cunha-Laura, A.L., 2004. Efeito do extrato de carqueja (*Baccharis trimera*) em ratas prenhes. Revista Universidade Rural 24, 209–210.

Grance, S, R.M., Teixeira M, A., Leite, R, S., Guimarães, E, B., Siqueira, J,M., Filiu, W, F, O., Vasconcelos, S, B,S., Vieira, M, C., 2008. *Baccharis trimera*: Effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats, Journal of Ethnopharmacology, 117, 28–33.

Grisolia, C.K., Oliveira, A.B.B., Bonfim, H., Klautau-Guimarães, M.N., 2005. Genotoxicity evaluation of domestic sewage in a municipal wastewater treatment plant. Genetics and Molecular Biology. 28: 334-338.

Hifsa, M., Naeem, I., Taskeen, A., Zeb,S., 2009. Investigation of heavy metals in commercial spices brands. New York Science Journal 2(5), 1554–2200.

Huang, Z., Pan, X., Wu, P., Han, J., Chen, Q., 2014. Heavy metals in vegetables and the health risk to population in Zhejiang, China. Food Control 36, 248-252.

Januário, A.H., Santos, S.L., Marcussi, S., Mazzi, M.V., Pietro, R.C.L.R., Sato, D.N., Ellena, J., Sampaio, S.V., França, S.C., Soares, A.M., 2004. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chemico-Biological Interactions*, 150, 243–251.

Jarup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68, 167–182.

Juárez-Santillán, L. F., Lucho-Constantino, C. A., Vázquez-Rodríguez, G. A., Cerón-Ubilla, N. M., Beltrán-Hernández, R. I., 2010. Manganese accumulation in plants of the mining zone of Hidalgo, Mexico. *Bioresource Technology* 101, 5836–5841.

Katsou, E., Malamis, S., Haralambous, K. J., 2011. Industrial wastewater pre-treatment for heavy metal reduction by employing a sorbent-assisted ultrafiltration system. *Chemosphere*, 82, 557–564.

Khelifi, R., Hamza-Chaffai, A., 2010. Head and neck cancer due to heavy metal exposure via tobacco smoking and professional exposure: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 248, 71–88.

Koedrith, P., Kim, H., Weon, J., Seo, Y. R., 2013. Toxicogenomic approaches for understanding molecular mechanisms of heavy metal mutagenicity and carcinogenicity. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216, 587–598.

Laughinghouse, H. D., Prá, D., Silva-Stenico, M. E., Rieger, A., Frescura, V. D., Fiore, M. F., Tedesco, S. B., 2012. Biomonitoring genotoxicity and cytotoxicity of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria) using the *Allium cepa* test. *Science of the Total Environment* 432, 180–188.

Leme, D. M., Marin-Morales, M. A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 682: 71-81.

Li, You-Zhi., Pana, H., Xua, J., Fana, X., Songa, X., Zhanga, Q., Xua, J., Liu, Y., 2010. Characterization of metal removal by os sepiae of *Sepiella maindroni* Rochebrune from aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 179, 266–275.

Lindsay, W.L.; Norvell, W.A. Development of DTPA soil for zinc, iron, manganese and copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42:421-428, 1978.

Mahmood, A., Rashid, S., Malik, R. N., 2013. Determination of toxic heavy metals in indigenous medicinal plants used in Rawalpindi and Islamabad cities, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 148, 158–164.

Marcovecchio, J.E., Botté, S.E., Freije, R.H., 2007. Heavy metals, major metals, trace elements, In: Nollet, L.M.L. (Ed.), *Handbook of water analysis*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 275–311.

Meunier, N., Laroulandie, J., B, Blais, J.F., Tyagi, R.D., 2003. Cocoa shells for heavy metal removal from acidic solutions. *Bioresource Technology*, 90, 255–263.

Nanjing University of Chinese Medicine, 2006. *Zhong Yao Da Ci Dian*. Shanghai Technology and Science Publishing House Shanghai.

Nogueira, N.P.A., Reis, P.A., Laranja, G.A.T., Pinto, A.C., Aiub, C.A.F., Felzenszwalb, I., Paes, M.C., Bastos, F.F., Bastos, V.L.F.C., Sabino, K.C.C., Coelho, M.G.P., 2011. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extract and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 138 513– 522.

Oliveira, A.C.P., Endringer, D.C., Amorim, L.A.S., Brandaão, M.G.L., Coelho, M.M., 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology* 102, 465–469.

Oliveira, C. B., Comunello, I. N., Lunardelli, A., Amaral, R. H., Pires, M. G. S., Silva, G. L., Manfredin, V., Vargas, C. R., Gnoatto, S. C. B., Oliveira, J. R., Gosmann, G., 2012. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. *Molecules*, 17, 1113-1123.

Oliveira, R. N., Rehder, V. L. G., Oliveira, A. S. S., Montanari Júnior, Í., Carvalho, J. E., Ruiz, A. L. T. G., Jeraldo, V. L. S., Linhares, A. X., Allegretti, S. M., 2012. *Schistosoma*

mansoni: In vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. Experimental Parasitology 132, 135–143.

Oliveira, C.N.F., De Oliveira, R.N., Frezza, T.F., Rehder, V.L.G., Allegretti, S.M., 2013. Tegument of *Schistosoma mansoni* as a Therapeutic Target. In Parasitic Diseases – Schistosomiasis, Edit. In Tech., 151–177.

Olowoyo, J.O., Van Heerden, E., Fischer, J.L., Baker, C., 2010. Trace metals in soil and leaves of *Jacaranda mimosifolia* in Tshwane area, South Africa. Atmospheric Environment 44, 1826–1830.

Olowoyo, J.O., Okedeyi, O.O., Mkololo, N.M., Lion, G.N., Mdakane, S.T.R., 2012. Uptake and translocation of heavy metals by medicinal plants growing around a waste dump site in Pretoria, South Africa. South African Journal of Botany 78, 116–121.

Orisakwe, O.S., Nduka, J.K., Amadi, C.N., Dike, D.O., Bede, O., 2012. Heavy metals health risk assessment for population via consumption of food crops and fruits in Owerri, South Eastern Nigeria. Chemistry Central Journal 6, 77.

Park, E.Y., Jeon, H., 2008. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Equisetum hyemale*. Natural Product Sciences 14, 239–243.

Perry, C. T., Divan Jr, A. M., Rodriguez, M. T. R., Atz, V. L., 2010. *Psidium guajava* as a bioaccumulator of nickel around an oil refinery, southern Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 647–654.

Pinho, D. S., Sturbelle, R. T., Martino-Roth, M. G., Garcias G. L., 2010. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy, 20(2): 165-170.

Powers, K.M., Smith-Weller, T., Franklin, G.M., Longstreth, W.T., Swanson, P.D., Checkoway, H., 2003. Parkinson's disease risks associated with dietary iron, manganese and other nutrient intakes. Neurology 60, 1761–1766.

Prasad, M.N.V., Freitas, H.M.O. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.6, n.3, p.15-22, 2003

Santos, D.M., Bossini J.A.T., Preussler K.H., Vasconcelos, E.C., Carvalho-Neto, F.S., Carvalho-Filho M.A.S., 2006. Avaliação de Metais Pesados na Baía de Paranaguá, PR, Brasil, sob Influência das Atividades Antrópicas. *Journal Brazilian Society Ecotoxicology* 1:157-160.

Shachar, B. Z., Carmichael, S. L., Stevenson, D. K., Shaw, G. M., 2013. Could genetic polymorphisms related to oxidative stress modulate effects of heavy metals for risk of human preterm birth? *Reproductive Toxicology* 42, 24– 26.

Shad, A.K., Lajbar, K., Iqbal,H., Khan, B.M., Naveed, A., 2008. Profile of heavy metals in selected medicinal plants. *Pakistan Journal of Weed Science Research* 14(1– 2), 101–110.

Sharma, R.K., Agrawal, M., Marshall, F.M., 2007. Heavy metals contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. *Ecotoxicology Environment Safety* 66, 258–266.

Silva, J., Freitas, T. R. O., Marinho, J. R., Speit, G., Erdtmann, B. (2000). An alkylene single-cell gel electrophoresis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*. 23, 241-245.

Silva, m. L. S., Vitti, G. C., 2008. Fracionamento de metais pesados em solo contaminado antes e após cultivo de arroz. *Química Nova*, Vol. 31, No. 6, 1385-1391.

Silva, R. M. G., Oliveira, V. M., Valadares; F., Mecina. G. F., Silva, L. P., 2012. Genotoxic activity and toxicity of *Baccharis trimera* Less. regarding the bioaccumulation of heavy metals. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 6:26, 4321- 4327.

Souza, P. Z.; Costa S.; Zocche, J. J. *Baccharis trimera* Less. DC. como indicadora da Recuperação de Áreas Mineradas de Carvão. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 702-704, jul. 2007.

Stasinos, S., Zabetakis, I., 2013. The uptake of nickel and chromium from irrigation water by potatoes, carrots and onions. *Ecotoxicology Environment Safety* 91, 122–128.

Sucher, N.J., 2006. Insights from molecular investigations of traditional Chinese herbal stroke medicines: implications for neuroprotective epilepsy therapy. *Epilepsy e Behavior* 8, 350–362.

Trojan-Rodrigues, M., Alves, T.L.S., Soares, G.L.G., Ritter, M.R., 2012. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 139 155– 163.

Turkdogan, M. K., Kilicel, F., Kara, K., Tuncer, I., Uygan, I., 2002. Heavy metals in soil, vegetables and fruits in the endemic upper gastrointestinal cancer region of Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 175-179.

Wang He, Jia Yongfeng., 2009 Bioaccumulation of heavy metals by *Phragmites australis* cultivated in synthesized substrates. *Journal of Environmental Sciences* 21, 1409–1414.

WHO, 1998. Medicinal plants in the Republic of Korea: information on 150 commonly used medicinal plants.

WHO, 2004. Guidelines on Safety Monitoring of Herbal Medicines in Pharmacovigilance Systems, Geneva.

Yang, L., Huang, B., Hu, W., Chen, Y., Mao, M., Yao, L., 2014. The impact of greenhouse vegetable farming duration and soil types on phytoavailability of heavy metals and their health risk in eastern China. *Chemosphere* 103, 121–130.

Ye, J., Liu, C., Zhao, Z., Li, Y., Yu, S., 2013. Heavy metals in plants and substrate from simulated extensive green roofs. *Ecological Engineering* 55, 29– 34.

Zhou, H., Zhou, X., Zeng, M., Liao, B., Liu, L., Yang, W., Wu, Y., Qiu, Q., W., 2014. Effects of combined amendments on heavy metal accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) planted on contaminated paddy soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 101, 226–232.

Considerações finais

Diante do exposto foi possível concluir que *Baccharis trimera* e *Equisetum hyemale* são espécies bioacumuladoras de diferentes metais pesados, sendo que os extratos aquosos e etanólicos foram os que mais acumularam metais. O extrato etanólico e infuso de *B. trimera* e *E. hyemale* interferem no índice mitótico e são capazes de promover atividade genotóxica em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*. Os diferentes tipos de metais pesados presentes nos extratos e infusos de ambas as espécies possivelmente causaram as alterações no índice mitótico, índice de mutagenicidade, índice de alterações cromossômicas e frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas.