



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO – RS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – LICENCIATURA

NATAN KASPER

**BIOMONITORAMENTO PARA AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL
GENOTÓXICO DAS ÁGUAS DO ARROIO CLARIMUNDO DO MUNICÍPIO
DE CERRO LARGO, RS, BRASIL**

CERRO LARGO

2015

NATAN KASPER

**BIOMONITORAMENTO PARA AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL
GENOTÓXICO DAS ÁGUAS DO ARROIO CLARIMUNDO DO MUNICÍPIO
DE CERRO LARGO, RS, BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado como requisito para obtenção de
grau de Licenciatura em Ciências Biológicas da
Universidade Federal Fronteira Sul - *Campus*
Cerro Largo.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suzymeire Baroni

CERRO LARGO

2015

AGRADECIMENTOS

A os meus familiares pelo apoio e incentivo durante todo o tempo de graduação.

A Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), por oportunizar a mim e a inúmeras pessoas, o acesso ao ensino superior de qualidade e gratuito.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas.

A professora Dr^a Suzymeire Baroni pelas suas orientações e dedicação para que esse trabalho fosse realizado.

Aos colegas de laboratório que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos colegas de graduação que oportunizaram momentos de dialogo e trocas de experiencia.

SUMÁRIO

Introdução.....	6
Material e Métodos.....	8
Resultados.....	10
Discussão.....	15
Conclusão.....	18
Referências.....	18
Anexo I: Regras da revista Biotemas.....	22

Biomonitoramento para avaliação do potencial genotóxico das águas do Arroio Clarimundo localizado no município de Cerro Largo – RS, Brasil

Natan Kasper ^{1*}

Mailcol de Mattos ¹

Rodrigo Patera Barcelos ¹

Suzymeire Baroni ¹

¹ Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, Rua Jacob Reinaldo Hauptenthal, 1580, Bairro São Pedro, Bloco A
CEP 97900-000, Cerro Largo – RS, Brasil.

*natank420@gmail.com

Submetido em

Aceito para publicação em

Biomonitoramento para avaliação do potencial genotóxico da água do Arroio Clarimundo localizado no município de Cerro Largo – RS, Brasil

Resumo

Inúmeros fatores de poluição geram alterações na qualidade da água e nos organismos que dela dependem, visto que podem conter substâncias com propriedades mutagênicas, genotóxicas e citotóxicas que afetam a integridade genética dos seres vivos. No município de Cerro Largo – RS localiza-se o Arroio Clarimundo, que no seu fluxo passa por uma área agrícola e atravessa a cidade recebendo descarga de resíduos domésticos não tratados. Este trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial genotóxico dessas águas por meio do bioensaio com *Allium cepa* usualmente empregado em estudos de biomonitoramento. Para a realização das análises foram feitas quatro coletas de água, para cada estação do ano e em três pontos demarcados. Os bulbos de *Allium cepa* foram postos para germinar, durante 72 horas, na proporção de três para cada amostra dos pontos de coleta e três em água destilada para parâmetro de controle. Posteriormente, as raízes foram submetidas ao protocolo de Feulgen com modificações, para a confecção das lâminas. Foram observadas alterações nos valores de Índice Mitótico e Alterações Cromossômicas. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística pelo teste Qui-quadrado. Os resultados sugerem que a água do Arroio Clarimundo tem potencial para causar danos no genoma de organismos eucariotos.

Palavras-chave: *Allium cepa*; Bioensaio; Mutagenicidade; Toxicidade ambiental.

Biomonitoring to evaluate the genotoxic potential of the water from Arroio Clarimundo located in Cerro Largo, RS, Brazil

Abstract

Countless pollution factors can generate changes in water quality and in water dependent organisms, since they can carry mutagenic, genotoxic and cytotoxic substances, which affect the genetic integrity of living beings. The Arroio Clarimundo, a river located in Cerro Largo county, at Rio Grande do Sul – Brazil, flows through an agricultural area and bypasses the Cerro Largo city, receiving domestic raw wastewaters. This work aimed to evaluate the genotoxic potential of Arroio Clarimundo waters with *Allium cepa* bioassay, usually used in biomonitoring studies. The analysis were performed by collecting the water, four samples for each season, in three specific river locations. The *Allium cepa* bulb were germinated during 72, three bulbs for each sample collected, and three bulbs in distilled water for control parameter. Then, the roots were submitted to a modified Feulgen protocol, in order to do the microscopic slides. Alteration on the mitotic index and chromosomic alterations were observed. The data were statistical analyzed with Qui-Quadrat test and the results suggest the Arroio Clarimundo water can potentially cause damage to the eukaryotes genome

Key-words: *Allium cepa*; Bioassay; Mutagenicity; Environmental toxicity.

Título abreviado: “Genotoxicidade das águas do Arroio Clarimundo

Introdução

Os cursos hídricos possuem grande importância para os ecossistemas, porque são eles que servem como fonte de água e alimento para várias espécies de vertebrados, abastecem os reservatórios subterrâneos, fonte que fornece água para o consumo humano em geral. Os cursos hídricos são habitados por diversas espécies de plantas, micro-organismos e macro invertebrados, que possuem função ecológica significativa, desde a decomposição de matéria orgânica e participação na cadeia alimentar servindo de alimentos para diversos peixes e anfíbios. Ainda, contaminação dos vários ambientes pode resultar em consequências, muitas vezes irreversíveis, para os biomas que habitam estes ambientes (PERON, CANESIN E CARDOSO, 2009).

Segundo a Organização da Nações Unidas (ONU), um terço da população mundial é afetada pela escassez e má qualidade da água, sendo, que mais da metade dos leitos hospitalares do mundo está ocupado por pessoas com doenças relacionadas à qualidade da água. Ainda, até 2010, 900 milhões de pessoas no planeta não tinham acesso a fontes confiáveis de água. De acordo com Goulart e Calistro (2003), observa-se que em áreas onde se concentram as moradias de menor nível social e econômico, os ecossistemas aquáticos transformam-se em grandes corredores de esgoto a céu aberto, muitas vezes sendo também local de despejo de lixo, com enorme potencial de veiculação de inúmeras doenças.

A contaminação dos cursos hídricos é ocasionada por ações antrópicas, oriundas da agricultura, devido a utilização de agroquímicos e resíduos industriais não tratados adequadamente. Todos esses fatores de contaminação geram alterações na qualidade da água afetando organismos que dela dependem, já que podem conter substâncias com propriedades mutagênicas, genotóxicas e citotóxicas que afetam a integridade genética dos seres vivos. Assim, conforme ressalta Fox (1995), esses poluentes afetam não só direta e indiretamente os organismos individuais, em termos toxicológicos, como também provocam efeitos nas comunidades e ecossistemas.

O Arroio Clarimundo está localizado no município de Cerro Largo – RS e logo na sua nascente recebe descarga de resíduos industriais, em seguida passa por uma área agrícola, e atravessa a cidade de uma extremidade a outra, recebendo diretamente os

resíduos domésticos de grande parte da população , pois o município não possui um centro de tratamento de esgoto.

Para a avaliação, monitoramento e detecção de genotóxicos no ambiente os bioensaios com plantas superiores têm sido recomendados desde a década de 70 (GRANT, 1999). Células vegetais geralmente possuem enzimas necessárias para ativação e metabolização de compostos promutagênicos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), como é o caso das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*.

Segundo Arraes & Longhin (2012), há uma desvantagem em usar somente análises físicas e químicas em relação às respostas biológicas dos bioindicadores de degradação ambiental, já que esses resultados mostram somente o registro momentâneo da biota aquática, assim, as medições químicas não conseguem detectar perturbações sutis no ecossistema quando realizadas distante da fonte poluidora e quando não se correlaciona com a vida de organismos nele presente (BUSS et al., 2003).

O teste *Allium* é bem conhecido e comumente, utilizado em laboratórios do mundo inteiro para análise de várias substâncias das quais se deseja conhecer o possível potencial mutagênico, estimado pela frequência de aberrações e quebras cromossômicas indicando riscos de aneuploidias e fornecendo valiosas informações em relação à avaliação de amostras ambientais (RANK e NIELSEN, 1993).

Ainda o uso do *Allium cepa*, segundo Matsumoto e Marim-Morales (2012) se dá pelo fato de que são organismos fáceis de serem armazenados e manuseados. As células das raízes constituem um sistema apropriado, tanto para parâmetros macroscópicos, quanto para parâmetros microscópicos, além de possuírem um baixo custo e serem de fácil manipulação.

Trabalhos relacionados utilizando o sistema *Allium cepa* foram feitos por Oliveira et al., (2011) a fim de verificar o potencial mutagênico das águas do Rio Paraíba do Sul- Tremembé- SP, assim como Peron et al., (2008) também o fizeram para analisar as águas do Rio Pirapó- Apucarana- Pr.

Dessa maneira, o presente trabalho propôs uma análise qualitativa do potencial genotóxico da água do Arroio Clarimundo, utilizando para isso, o teste *Allium cepa*, analisando as alterações cromossômicas, o índice mitótico, e por fim, aplicando teste

estatístico para a análise dos dados obtidos.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de água no Arroio Clarimundo, localizado na região noroeste do Rio Grande do Sul, inserido no município de Cerro Largo que encontra-se em latitude de 28°08'49" sul, longitude 54°44'17", e 211 metros.

Essas amostras foram coletadas nas quatro estações do ano (verão, outono, inverno e primavera), em três pontos do Arroio Clarimundo pré determinados como: (P1) nascente, (P2): ponto antes do arroio percolar a cidade e, (P3): posterior a cidade (Figura 1).

FIGURA 1: Pontos de coleta pré determinados no Arroio Clarimundo que atravessa o município de Cerro Largo - RS. Fonte: Google Maps, 2014.

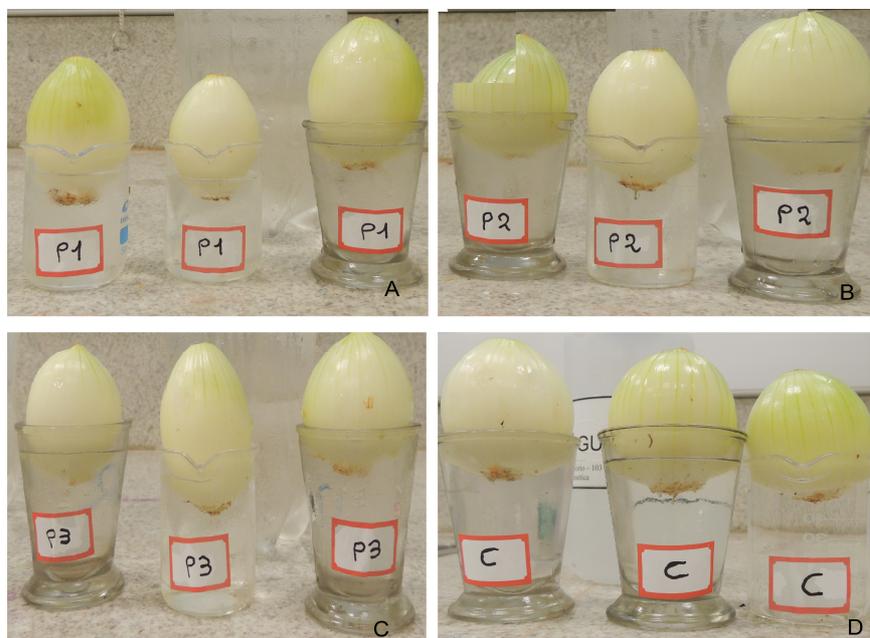


A condução dos testes foi realizado no Laboratório de Genética da Universidade Federal da Fronteira Sul – *campus* Cerro Largo – RS (UFFS), onde imediatamente após as coletas, as amostras foram levadas para serem armazenadas em refrigeração até serem utilizadas.

Foi utilizada como indicador biológico a espécie *Allium cepa* da variedade Baia Periforme, adquiridas no comércio local.

Os bulbos de *Allium cepa* foram expostos às amostras de água (P1; P2 e P3) e controle em água destilada, por 72 horas, sendo realizadas três baterias por estação. Após 72 horas, foram retiradas dos bulbos as raízes com a coifa, as quais correspondem à parte mais jovem da raiz, com um tamanho de aproximadamente 2 cm de comprimento.

FIGURA 2: A) Bulbos em tratamento com água do ponto 1. B) Bulbos em tratamento com água do ponto 2. C) Bulbos em tratamento com água do ponto 3. D) Bulbos do controle em tratamento com água destilada. Fonte: Kasper, 2015.



Os meristemas radiculares após coletados, foram acondicionadas em microtubos contendo fixador Carnoy por 24 horas. Posteriormente, as raízes foram lavadas em água

destilada e armazenadas em álcool 70 % sob refrigeração até a confecção das lâminas.

As lâminas foram confeccionadas seguindo o protocolo de Feulgen, e as raízes foram imediatamente transferidas para a lâmina, onde descartou-se a região lisa, ficando apenas com a coifa, lugar que há grande divisão celular. Sobre a coifa foram adicionadas 2 a 3 gotas de orceína acética e por fim, realizado o processo de esmagamento, o fechamento com lamínula para observação em Microscopia Óptica, para contagem de células em divisão mitótica e avaliação de danos cromossômicos.

Os dados foram submetidos ao teste estatístico Qui-quadrado em nível de 0,05% de confiabilidade.

Resultados

Foram analisadas cinco mil células para cada ponto de coleta (P1, P2, P3) contabilizando as células em interfase e as que estavam nas fases da mitose para o cálculo de Índice Mitótico (IM), onde: $IM = \frac{\text{número de células em divisão}}{\text{número total de células contadas}} \times 100$. Foram analisadas as células que apresentaram danos cromossômicos como, “stikiness”, pontes anafásicas, micronúcleos, atraso de anáfase, núcleos mal-formados e c-mitoses.

Os resultados dos índices mitóticos obtidos para as amostras coletadas na primavera estão expostos na tabela 1. Pode-se notar que o IM dos tratamentos foi menor do que o obtido no controle. Esses resultados se repetem nos dados coletados em todas as outras estações, como pode ser visto nas tabelas 2, 3 e 4.

Para a análise estatística utilizou-se o teste Qui-quadrado, sendo ele um teste de hipóteses o qual se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, e avaliar a associação existente entre variáveis qualitativas (PLACKETT, 1983), utilizando um nível de significância de 0,05%. As variáveis observadas, foram os valores de cada fase mitótica (Prófase, Metáfase, Anáfase e Telófase), dos pontos analisados (P1, P2, P3) em relação as fases mitóticas observadas no controle (C).

TABELA 1: Valores obtidos no tratamento da Primavera, apresentando as respectivas contagens em 5.000 células/triplicata, de P (prófase) M (metáfase) A (anáfase) e T (telófase) e o IM (índice mitótico) triplicata. *Todos os valores foram estatisticamente significativos em relação ao controle em nível de $p= 0,05\%$.

Amostra	P	M	A	T	Total	IM %
P1	87	41	47	52	227	4,5*
P2	85	66	51	76	278	5,5*
P3	67	9	19	14	109	2,1*
C	167	128	66	90	451	9,0

TABELA 2: Valores obtidos no tratamento do Verão, apresentando as respectivas contagens em 5.000 células/triplicata, de P (prófase) M (metáfase) A (anáfase) e T (telófase) e o IM (índice mitótico) triplicata. *Todos os valores foram estatisticamente significativos em relação ao controle em nível de $p= 0,05\%$.

Amostra	P	M	A	T	Total	IM %
P1	173	39	43	82	337	6,7*
P2	121	60	42	61	284	5,5*
P3	138	50	33	67	288	5,6*
C	167	128	66	90	451	9,0

TABELA 3: Valores obtidos no tratamento do Outono, apresentando as respectivas contagens em 5.000 células/triplicata, de P (prófase) M (metáfase) A (anáfase) e T (telófase) e o IM (índice mitótico) triplicata. *Todos os valores foram estatisticamente significativos em relação ao controle em nível de $p= 0,05\%$.

Amostra	P	M	A	T	Total	IM %
P1	136	41	36	44	257	5,1*
P2	113	48	32	71	264	5,3*
P3	92	40	39	34	205	4,1*
C	167	128	66	90	451	9,0

TABELA 4: Valores obtidos no tratamento do Inverno, apresentando as respectivas contagens em 5.000 células/triplicata, de P (prófase) M (metáfase) A (anáfase) e T (telófase) e o IM (índice mitótico) triplicata. *Todos os valores foram estatisticamente significativos em relação ao controle em nível de $p= 0,05\%$.

Amostra	P	M	A	T	Total	IM %
P1	128	42	58	32	260	5,2*
P2	139	40	33	58	270	5,4*
P3	119	55	55	48	277	5,5*
C	167	128	66	90	451	9,0

Quando comparadas às fases normais da mitose segundo a FIGURA 3, os dados observados em M.O referentes às aberrações cromossômicas, nos achados dos tratamentos com amostras do P1, P2 e P3 nas quatro estações foram: pontes anafásicas, núcleos mal-formados, stickiness, metáfases irregulares, cromossomos perdidos e micronúcleo (FIGURA 4 e FIGURA 5).

FIGURA 3 : Células normais em Mitose: A) prófase, B) metáfase, C) anáfase e D) telófase. Barra de escala 50 μ . Fonte: Kasper, 2015.

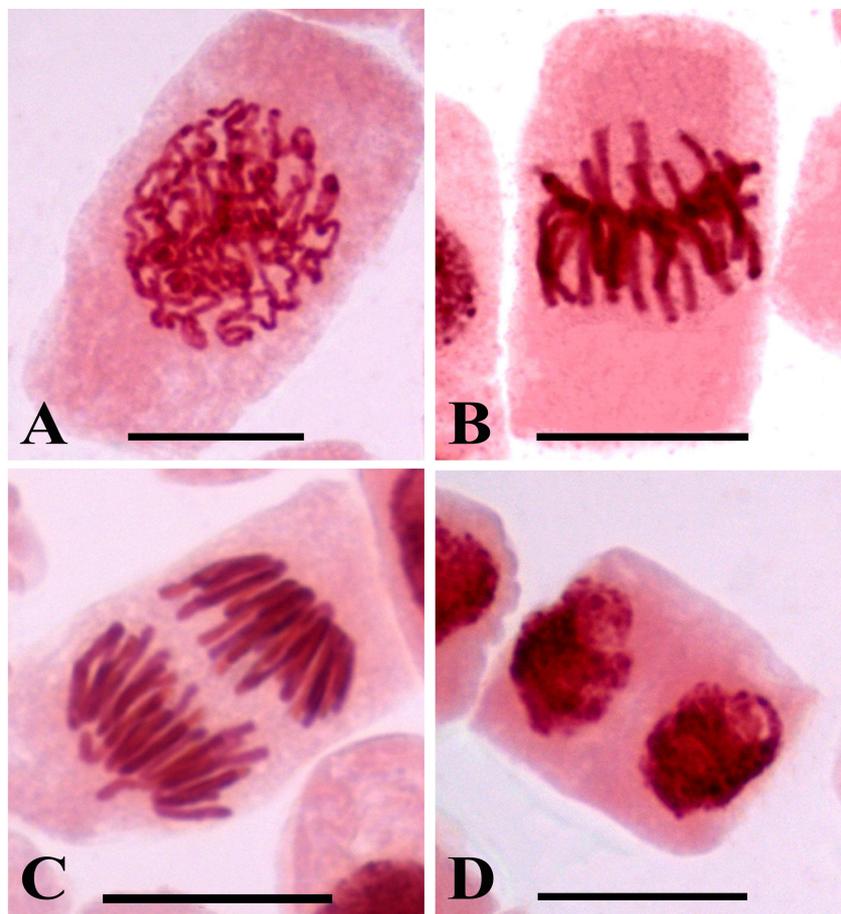


FIGURA 4: alterações cromossômicas encontradas nas células das raízes submetidas água do Arroio Clarimundo: A) pontes anafásicas; B) c-mitose; C) núcleos mal-formados ; D) micronúcleos. Barra de escala 50 μ . Fonte: Kasper, 2015.

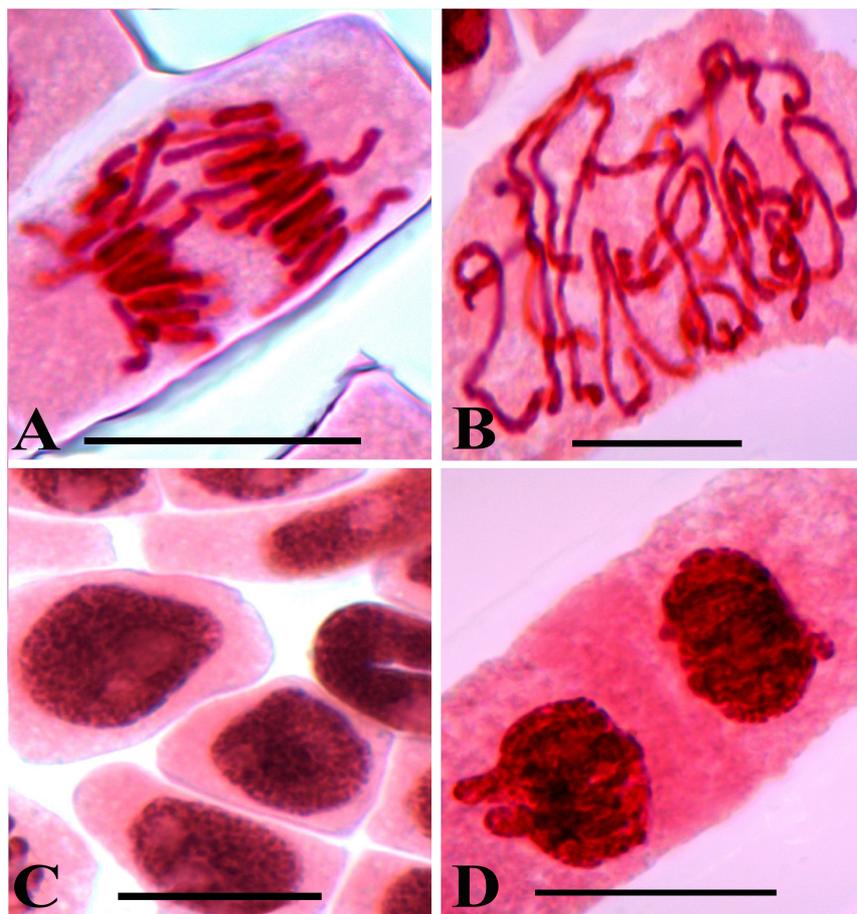
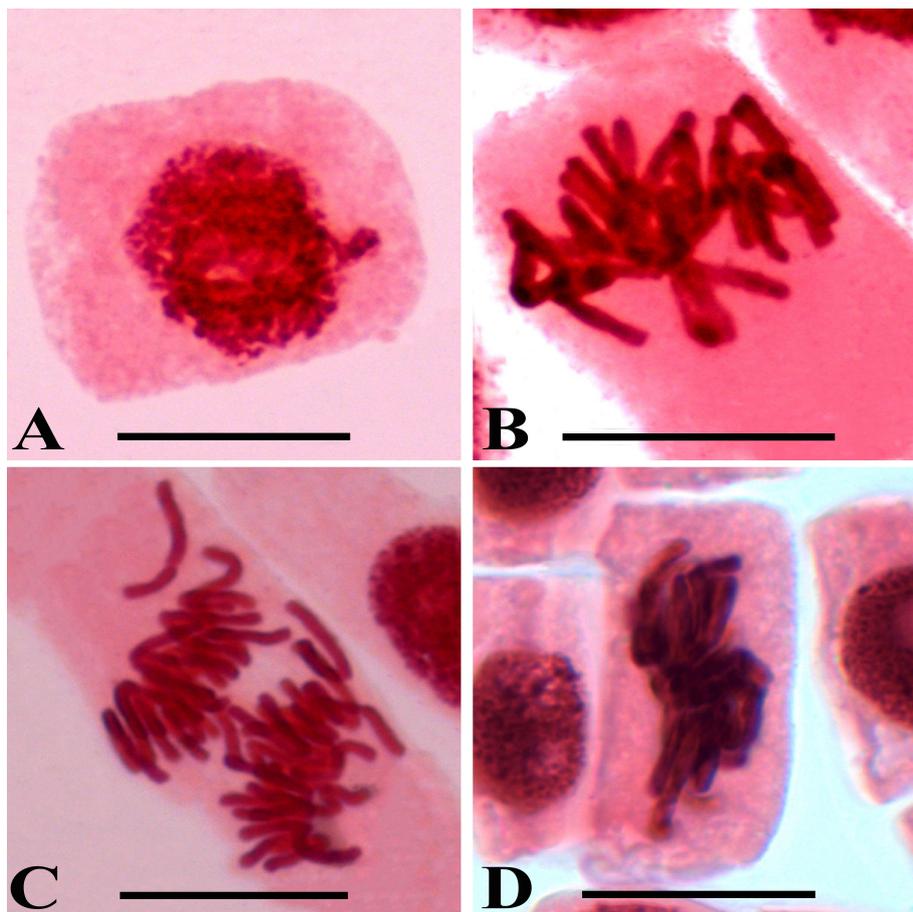


FIGURA 5: alterações cromossômicas encontradas nas células das raízes submetidas água do Arroio Clarimundo: A) micronúcleo; B) metáfase irregular; C) perda de cromossomos; D) stikiness. Barra de escala 50 μ . Fonte: Kasper, 2015.



A análise estatística dos dados, através do teste Qui-quadrado por Adequação, demonstrou que os dados da primavera, verão, outono e inverno dispostos na Tabela 1, 2, 3 e 4, foram todos significativos em nível de confiança de 0,05.

Discussão

Os dados observados nas tabelas 1, 2, 3 e 4 referentes as estações de primavera, verão, outono e inverno, respectivamente, nos mostra que o número de células em

divisão celular das raízes submetidas aos tratamentos, se mostraram abaixo do que se pode observar no controle. O I.M nas quatro estações sazonais também mostram um valor abaixo do calculado para o controle. Esses dados sugerem que a água do Arroio possui componentes que interferem nos processos mitóticos das células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*. Os dados de Oliveira, Voltolini e Barberio, (2011) que analisaram as águas do Rio Paraíba do Sul, também apresentaram resultados similares aos achados nesse trabalho.

Se compararmos os dados entre as quatro estações sazonais, podemos observar que na primavera (Tabela 1) a quantidade de células em divisão mitótica se mostrou menor que as outras estações. Cabe ressaltar que nesta época ainda estava em atividade no município, um Laticínio que depositava seus resíduos nas águas do Arroio próximo ao P1. Isso mostra que citotoxicidade induzida por produtos presentes na amostra, interferiram no ciclo celular, dados semelhantes também foram encontrados no trabalho de Barberio et al. (2009).

A Tabela 2 apresenta os dados coletados na estação de verão, onde os I.M foram os maiores obtidos em relação às outras estações. A variação encontrada na sazonalidade é um fator que pode influenciar de forma significativa a frequência de danos genéticos e I.M além de promover alterações fisiológicas nos organismos expostos. Essa variação pode sofrer alterações de acordo com o nível de poluição em determinado local (RUIZ et al., 1992; HAYASHI et al., 1998).

Segundo César et al. (1997) pode-se determinar o tempo e as concentrações em que o agente químico ou poluente é potencialmente prejudicial nos organismos vivos. Se a concentração do produto for baixa ou o tempo de contato for insuficiente o efeito pode não ser adverso, sendo que altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (CARNIATO et al., 2007) ao passo que pequenas concentrações geralmente produzem efeitos crônicos sub-letais e, até mesmo, letais durante longos períodos de exposição.

Nos resultados desse trabalho podemos notar que, embora tenha havido variação entre as diferentes estações nos vários tratamentos, houve uniformidade no que se refere a presença de alterações quando comparados ao controle, o que reporta que durante todo o tempo de avaliação houve presença de substâncias na água que alteraram o ciclo

celular e os eventos genéticos.

O trabalho não objetivou buscar quais substâncias presentes na água poderiam ter causado as diferenças no ciclo celular das raízes expostas aos tratamentos sabemos, porém, segundo Cazenave et al (2009) que as atividades antrópicas são fatores chave no aumento dos níveis de contaminantes aquáticos e nela é possível detectar uma diversidade de compostos químicos persistentes que apresentam propriedades mutagênicas e clastogênicas.

A genotoxicidade pode ser identificada por alterações cromossômicas, resultando em anomalias nos cromossomos como: stickiness, micronúcleos, pontes cromossômicas, deformações do núcleo (FISKESJÖ, 1985). O primeiro mecanismo de ação dos agentes genotóxicos é promover lesões no DNA (OLIVEIRA et al., 2011), e ainda, segundo (MAJER et al., 2005) essas alterações podem provocar uma tentativa de reparo que nem sempre é bem sucedido, fazendo com que as alterações se tornem irreversíveis, podendo trazer a morte celular.

Na análise genotóxica, as alterações cromossômicas observadas foram: pontes anafásicas, stickiness, deformações nucleares, cromossomos perdidos, micronúcleos e multipolaridade. As fases normais da mitose podem ser vistas na Figura 3 e os achados das alterações em todos os tratamentos podem ser vistos nas Figura 4 e 5.

A ação de agentes genotóxicos tem como objetivo promover lesões no DNA (oxidação e dimerização, adutos de DNA entre outras). Os danos como Micronúcleo (MN), pontes anafásicas, encontrados nesse estudo, são indicativos da presença de substâncias clastogênicas nas amostras testadas. Outros achados neste estudo foram da forma stickiness (Figura 5D), que é determinada por falhas no processo de disjunção indicando a presença de substâncias aneugênicas, que interferem na formação do fuso acromático. Os eventos de c-mitoses (Figura 4B) se originam quando há inativação do fuso de modo que, os cromossomos ficam dispersos na célula. Muitas substâncias químicas como as que estão presentes em pesticidas, podem promover esses eventos.

Segundo Leme e Marin-Morales, 2009, as anormalidades nos cromossomos de células meristemáticas de *Allium cepa*, são eficientes parâmetros para a investigação de genotoxicidade. Vale ressaltar que, estudos com esse modelo biológico, mostram que nem sempre a toxicidade está correlacionada com a genotoxicidade, porque alterações

relacionadas com o crescimento da raiz e IM são parâmetros indicativos de citotoxicidade. Por outro lado, alterações como anomalias cromossômicas (stickiness, micronúcleos, pontes cromossômicas, entre outras), indicam genotoxicidade (FRISKESJÖ, 1985).

Como o Arroio percola uma porção agrícola e uma urbana podemos inferir que os contaminantes mais prováveis sejam de origem agrícola e resíduos domésticos.

De maneira geral, a genotoxicidade está relacionada com eventos de poluição ambiental e, estando todos os seres vivos em interação com o meio ambiente, os mesmos sofrem influência desse meio ocasionando modificações no material genético desses organismos, desta forma podemos sugerir que os organismos que vivem nas águas do Arroio ou fazem uso dele estão expostos a esses danos genotóxicos (MINISSI e LOMBI, 1997; PASCALICCHIO, 2002; MATSUMOTO et al., 2006; KLAUCK et al., 2014).

Conclusão

Diante dos resultados obtidos através das análises da água do corpo hídrico, podemos sugerir que, nas diferentes estações sazonais, a água dos três pontos do Arroio apresentaram potencial genotóxico e citotóxico para células eucarióticas, o que são fortes indícios da presença de substâncias tóxicas aneugênicas, clastogênicas que interferem nos processos de divisão celular e no material genético dos organismos presentes nesse ecossistema.

Devido à importância em se preservar recursos naturais, podemos sugerir que para este Arroio, fazem-se necessários propostas de programas de biomonitoramento de modo a auxiliar e contribuir com ações de manejo e proteção.

Agradecimentos: À Universidade Federal da Fronteira Sul pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica ao acadêmico Natan Kasper.

Referências

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização do teste de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera, Centro**

Científico Conhecer – Goiânia, v.8, N14; p. 1958 – 2012.

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

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

CARNIATO, J.G.; GERALDO, S. M.; *et al.* Avaliação d atoxicidade de percolado de resíduo sólidos pós tratamento biológico e fotocatalítico. **Engenharia ambiental – Espírito Santo do Pinhal**. v. 4, n. 2, p. 92 – 101. 2007.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M. J.; SCARABOTT, P. A.; WUNDERLIN, D. A. Multiple biomarkers responses in *prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado river basin (Santa Fe, Argentina). **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1-9, 2009.

CESAR, A.; SILVA, S. L.; SANTOS, A. R. **Teste de toxicidade aquática no controle de poluição**. 4ª ed. Universidade Santa Cecília – UNISANTA. Santos, SP. 1997.

FISKESJÖ, G. The *Allium cepa* test as standard in environmental monitoring. **Hereditas**. V.102, p.99-112, 1985.

FOX, G.A. Tinkering with the tinkerer: pollution versus evolution. **Environ. Health Perspect.**, 103 (suplemento 4): 93-100, 1995.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de Qualidade de Água como Ferramenta em Estudos de Impacto Ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n.1. 2003.

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

HAYASHI, M.; UEDA, T.; UYENO, K.; WADA, K.; KINAE, N.; SAOTOME, T. *et al.* Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. **Mutation Research**, Leiden, v. 399, n. 2, p. 125-133, 1998.

KLAUCK, R. C.; RODRIGUES, S. A. M.; SILVA, B. L. **Toxicological evaluation of landfill leachate using plant (*Allium cepa*) and fish (*Leporinus obtusidens*) bioassays**. Waste Manag Res, 2013. The online version of this article can be found at: <http://wmr.sagepub.com/content/31/11/1148>

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

MAJER, B. J.; GRUMMT, T.; UHL, M.; KNASMÜLLER, S. Use of plant bioassays of the detection of genotoxins in the aquatic environment. **Acta Hydrochimica Hydrobiologica**, weinheim, v. 33, n. 1, p. 45-55, 2005.

MASUMOTO, S. T.; MARIM-MORALES, M. A. Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**. 69: 399-408. 2004.

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

MINISSI, S.; LOMBI, E. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. **Mutation Research**, v. 39, p. 317-321, 1997.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C.; BARBÉRIO, A. Potencial mutagênico dos poluentes do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Ambi-Agua**, Taubaté, v. 6, n. 1, p. 90-103, 2013.

OLIVEIRA, L. M.; VOLTOLINI, J. C. Potencial mutagênico dos poluentes na água do rio Paraíba do Sul em Tremembé, SP, Brasil, utilizando o teste *Allium cepa*. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**: v. 6, n. 1, 2011.

PASCALICCHIO, A. E. **Contaminação por metais pesados**. São Paulo: Annablume, 2002. 132p.

PERON, P. A.; CANESIN, A. E.; CARDOSO, V. M. C. Potencial mutagênico das águas do Rio Pirapó (Apucarana, Paraná, Brasil) em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 155-159. 2009

PLACKETT, R. L. "Karl Pearson and the Chi-Squared Test". **International Statistical Review**. v. 51, p. 59-72, 1983.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutation Research**, v. 418, p. 113-119, 1998.

RUIZ, E. F.; RABAGO, V. M. E.; LECONA, S. U.; PEREZ, A. B.; MA, T. H.

Tradescantiamicronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. **Mutation Research**, Leiden, v. 270, n. 1, p. 45-51, 1992.

Anexo I: Regras da revista Biotemas/periódicos UFSC

Normas para publicação

O período de submissão de manuscritos será de **01 de março a 30 de novembro** de cada ano. Submissões fora deste período serão rejeitadas de imediato.

I – Sobre a formatação dos manuscritos

1) Os trabalhos de Revisão só poderão ser submetidos em inglês. As demais formas de publicação podem ser redigidas em português, inglês ou espanhol, mas a revista recomenda a publicação em inglês sempre que possível. Deverão ser enviados em versão eletrônica (arquivo .doc), digitados com espaçamento de 1,5, fonte Times New Roman, tamanho 12; obedecendo as margens de 3cm. [ACESSE E FAÇA O DOWNLOAD DESTA MODELO](#) e use como base para o manuscrito.

2) Na página de rosto, deverão constar o título do manuscrito, o nome completo dos autores e das instituições envolvidas. A autoria deve ser limitada àqueles que participaram e contribuíram substancialmente para o trabalho. Caso não esteja enquadrada nessa situação, a pessoa deverá ser incluída nos agradecimentos. Deve-se indicar o autor para correspondência e seus endereços: postal completo e eletrônico (estas informações serão retiradas pela Comissão Editorial durante o processo de revisão, para garantir o anonimato dos autores). Na segunda página, o título completo deve ser repetido e, abaixo, devem vir: resumo, palavras-chave (máximo de cinco, colocadas em ordem alfabética), abstract, key words (máximo de cinco, colocadas em ordem alfabética e separadas por ponto e vírgula) e título abreviado (máximo de 60 caracteres).

3) O resumo e o abstract não poderão exceder 200 palavras.

4) O limite de páginas de Artigos e Revisões, incluindo figuras, tabelas e referências, é de 25 enquanto que para as Comunicações Breves e Resenhas de livros esse limite é de sete páginas.

5) Os Artigos deverão conter Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (opcional) e Referências. As demais formas de publicação não necessitam apresentar as subdivisões acima, mas devem seguir esta ordem na apresentação do texto.

6) Quando for o caso, o título deve indicar a classificação do táxon estudado. Por exemplo: "Influência de baixas temperaturas no desenvolvimento e aspectos bionômicos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera, Muscidae)"; "Características biológicas de *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) nos hospedeiros *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) e *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae)".

7) No caso de trabalhos envolvendo experimentação animal (em acordo com a lei nº 11.794/08), o número da autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais deve constar na seção Material e Métodos. Da mesma forma, trabalhos envolvendo a captura ou coleta de animais regulados pela legislação vigente devem apresentar o número da autorização do órgão fiscalizador (IBAMA, SISBIO ou o respectivo órgão estadual/municipal).

8) As citações de referências no texto devem obedecer ao seguinte padrão: um autor (NETTO, 2001); dois autores (MOTTA-JÚNIOR; LOMBARDI, 2002); três ou mais autores (RAMOS et al., 2002).

9) No caso dos nomes dos autores fazerem parte da frase, devem ser grafados apenas com a inicial maiúscula e o ano da publicação deve vir entre parênteses. Por exemplo: "Segundo Assis e Pereira (2010), as aves migram para regiões mais quentes."

10) Quando houver, no mesmo ano, mais de um artigo de mesma autoria, devem-se acrescentar letras minúsculas após o ano, conforme o exemplo: (DAVIDSON et al., 2000a; 2000b). Quando houver mais de uma citação dentro dos mesmos parênteses, essas devem ser colocadas em ordem cronológica. Exemplo: (GIRARD, 1984; GROVUM, 1988; 2007; DE TONI et al., 2000).

11) As citações de referências no final do artigo devem obedecer às normas da ABNT, seguindo a ordem alfabética do sobrenome do primeiro autor (e assim sucessivamente para os demais autores). Os nomes dos periódicos e livros não devem ser abreviados. É obrigatória a citação da cidade em que o periódico é editado, bem como da editora do livro (ou capítulo de livro). Apenas citações que aparecem no texto devem constar na lista de referências. As citações de resumos de congressos e reuniões científicas não poderão ultrapassar 10% do total de referências citadas. Trabalhos aceitos para publicação devem ser referidos como "no prelo" ou "in press", quando se tratar de artigo redigido em inglês. Dados não publicados devem ser citados apenas no texto como "dados não publicados" ou "comunicação pessoal", entre parênteses.

Exemplos de citação na lista final de referências

a) artigos em periódicos

ALBUQUERQUE, U. P.; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da Caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco. **Interciência**, Caracas, v. 2, n. 28, p. 336-346, 2002.

b) livros na íntegra

MILLIKEN, W.; MILLER, R. P.; POLLARD, S. R.; WANDELLI, E. V. I. **Ethnobotany of the Waimiri atroari indians**. London: Royal Botanic Gardens Kew, 1992. 146 p.

c) capítulo de livros

COLLEAUX, L. Genetic basis of mental retardation. In: JONES, B. C.; MORMÈDE, P. (Ed.). **Neurobehavioral Genetics – Methods and applications**. 2 ed. New York: CRC Press, 1999. p. 275-290.

d) teses, dissertações e monografias

FARIA, P. E. P. **Uso de biomarcadores de estresse oxidativo no berbigão *Anomalocardia brasiliana* (GMELIN, 1971) para avaliação de poluição aquática em dois sítios em Florianópolis - Santa Catarina - BRASIL**. 2008. 37 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2008.

e) publicações em Congressos, Reuniões Científicas, Simpósios, etc.

SILVA, J. F., BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; BOZZI, A.; GÓES, A. M.; SERAKIDES, R. Efeito dose-dependente da Triiodotironina (T3) na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 60, 2008, Campinas. **Resumos...** Campinas: SBPC, 2008. Versão eletrônica (ou colocar o intervalo de páginas no caso de anais impressos).

f) páginas da Internet

FOX, R. **Invertebrate Anatomy - *Daphnia magna***. 2002. Disponível em <<http://www.science.lander.edu/refox/daphnia.html>>. Acesso em: 22 maio 2003.

11) As figuras (fotografias, desenhos, etc.) e as tabelas já devem ser inseridas no corpo do texto, no melhor local após o final do parágrafo em que foram citadas pela primeira vez. Quando for o caso, as figuras devem conter a representação da escala em barras. Sempre que possível, as ilustrações deverão ser coloridas. Tabelas e figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos de acordo com sua sequência no texto, sendo que este deve incluir referências a todas elas. As tabelas e figuras deverão ter um título (em cima das mesmas) breve e auto-explicativo. Informações adicionais, necessárias à compreensão das tabelas e figuras, deverão ser dadas em forma de nota de rodapé, embaixo das mesmas.

12) A identificação taxonômica correta das espécies incluídas no trabalho é de responsabilidade dos autores, mas a revista se reserva ao direito de exigir modificações ou rejeitar trabalhos com taxonomia incorreta. Esse ponto será avaliado tanto pelos Editores de Área quanto pelos Avaliadores e, portanto, recomenda-se que os autores forneçam o maior número de informações possível para esta conferência. Devem obrigatoriamente constar no texto: métodos usados para identificação, procedência geográfica dos exemplares e coleção na qual foram tombados. Fotos e números de tombamento podem ser fornecidas como documentos suplementares.

II – Sobre a avaliação e a publicação dos manuscritos

1) Preliminarmente, todos os manuscritos serão avaliados pelos editores em relação à adequação ao escopo e à formatação da revista. **Artigos com problemas de formatação serão rejeitados de imediato.** No caso de manuscritos em áreas cuja revista possui Editores de Área, este emitirá um parecer sobre sua relevância e qualidade de redação.

2) Em caso de parecer favorável ao início da tramitação, o manuscrito será analisado por no mínimo dois avaliadores, especialistas no tema do mesmo, sendo sua aceitação baseada no seu conteúdo científico.

3) Os autores receberão os pareceres dos avaliadores e deverão encaminhar a nova versão, em um prazo máximo de 15 dias, com as alterações sugeridas, em formato eletrônico (.doc). No caso do não atendimento de alguma sugestão dos avaliadores, os autores deverão apresentar uma justificativa circunstanciada, em documento anexado à parte.

4) A versão corrigida será re-submetida aos avaliadores para que as alterações procedidas sejam avaliadas.

5) Uma vez aceito quanto ao mérito científico, os autores se responsabilizarão pelo envio do texto em inglês a um dos revisores da língua inglesa indicados pela revista. Após a correção do inglês, os autores deverão encaminhar a versão corrigida juntamente com a certificação do revisor do texto em inglês.

6) Após aceita a correção do inglês, os autores deverão enviar o comprovante de pagamento da taxa de publicação, conforme compromisso firmado no momento da submissão. Tão logo o pagamento seja confirmado, será enviada uma declaração de aceite do manuscrito, indicando o volume em que será publicado.

7) Após a aceitação para publicação, provas definitivas do artigo, em formato pdf, serão

enviadas para a última correção dos autores. Erros nessa última forma serão de total responsabilidade dos autores.

8) Os PDFs dos manuscritos aceitos serão disponibilizados, com acesso livre, na página da revista (<http://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/index>).

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. **O manuscrito foi adequado às normas da revista, vigentes a partir de 21/02/2014, e disponíveis em [Diretrizes para Autores](#).** Os autores devem checar com atenção as diretrizes e o modelo disponível, pois problemas de formato causarão rejeição imediata do manuscrito.
2. A submissão está sendo feita dentro do período entre 01/03 e 30/11 do ano vigente, estando os autores cientes de que se a submissão for feita fora deste período o manuscrito será rejeitado sem avaliação do mérito científico.
3. O tema do manuscrito se enquadra no escopo da Revista.
4. A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista.
5. O autor que submeter o artigo através do Portal de Periódicos garante que todos os coautores estão cientes e em concordância com a submissão.
6. Todos os autores listados contribuíram substancialmente para a execução do trabalho.
7. Os dados completos de todos os autores foram inseridos no momento da submissão (nome completo, e-mail, endereço e vínculo institucional, resumo do currículo).
8. As espécies foram corretamente identificadas e a classificação taxonômica utilizada é a mais atualizada possível.

9. Quando for o caso, o número de autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais e/ou da licença de coleta do órgão fiscalizador consta na seção Material e Métodos.

10. O(s) autor(es) se compromete(m), caso o manuscrito seja aceito, a submeter e arcar com as despesas da correção do texto em inglês (seja apenas o abstract, seja o texto completo). Esta correção deverá ser feita por um dos revisores da confiança da comissão editorial da revista. Após a correção ser realizada, o(s) autor(es) deverá(ão) encaminhar a cópia da correção feita pelo revisor, bem como uma certificação da correção realizada.

11. O(s) autor(es) se compromete(m), no caso da aceitação do manuscrito, a realizar um depósito de acordo com os seguintes valores: Artigos e Revisões: R\$ 150,00 (quando redigidos em inglês) ou R\$ 300,00 (em português ou espanhol). Comunicações Breves e Resenhas: R\$ 100,00 (em inglês) e R\$ 200,00 (em português ou espanhol).