UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
ELISANGELA BORTOLUCI MACEDA

USO DE BIOMARCADORES PARA MONITORAMENTO DAS ÁGUAS DO CÓRREGO ARARA NO MUNICÍPIO DE RIO BRILHANTE, MS, BRASIL

Dourados – MS
2014

ELISANGELA BORTOLUCI MACEDA

USO DE BIOMARCADORES PARA MONITORAMENTO DAS ÁGUAS DO CÓRREGO ARARA NO MUNICÍPIO DE RIO BRILHANTE, MS, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.
Universidade Federal da Grande Dourados.
Orientadora: Prof. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia.
Coorientadora: Msc. Jussara Oliveira Vaini.

Dourados – MS

2014

ELISANGELA BORTOLUCI MACEDA

USO DE BIOMARCADORES PARA MONITORAMENTO DAS ÁGUAS DO CÓRREGO ARARA NO MUNICÍPIO DE RIO BRILHANTE, MS, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

_____

Prof. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia

_____

Msc. Bruno do Amaral Crispim

_____

Prof. Dra. Liliam Silvia Candido

Dourados, 26 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho a todos meus familiares e amigos, pelo amor, paciência, apoio e incentivo durante toda graduação, que de uma forma ou outra contribuíram para minha formação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por guiar meus passos e sempre estar ao meu lado ajudando a realizar meus sonhos e vencer meus obstáculos, e a Nossa Senhora por sempre me iluminar e interceder por mim junto ao Vosso filho.

Aos meus pais, Elenira e Luiz Carlos, pelo amor, apoio, dedicação e incentivo nessa fase do meu curso de graduação e durante toda minha vida, e à minha irmã, Elaine, pelo apoio e conselhos a todo o momento que precisei.

A todos meus amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos, em especial à Ana Taniely, Gabriel, Geovani, Hugo, Ionara, Isabela, João Paulo, Ketlyn e Natalia, pelas palavras de incentivo, alegrias e tristezas compartilhadas, apoio emocional e momentos de distração.

Aos amigos da faculdade que me acompanharam durante esses anos em especial à Alexandre, Danilo, Isabella e Luana pela amizade, apoio e força em todos os momentos que passamos juntos, esses anos não teriam graça sem vocês.

A UFGD pelo suporte financeiro e facilidades oferecidas para o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Alexeia Barufatti Grisolia, pela orientação, apoio e confiança durante todas as etapas, e a Jussara Oliveira Vaini pela dedicação, compreensão e apoio não somente na parte teórica, mas também na parte experimental.

A todos os alunos do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal que direta ou indiretamente ajudaram para realização deste trabalho, em especial à Lucas e Jéssica, por terem ajudado nas primeiras coletas e Priscila e Bruno, por terem ajudado na parte experimental dos testes.

A Douradense Piscicultura por gentilmente ter cedido os peixes para realização dos bioensaios.

Ao professor Joelson Gonçalves Pereira e sua aluna Chun Pun Hung por terem ajudado na criação do mapa do meu trabalho; ao professor Jorge Luiz Raposo Junior por ter realizado as análises químicas das amostras de água; e a professora Liliam Silvia Candido pela paciência, dedicação e atenção ao realizar as análises estatísticas.

Ao Pablo Centenaro Thomaz, sua mãe Andréia e seu pai Leonardo (in memoriam) por terem autorizado a entrada em sua propriedade, a fim de se coletar as amostras de água no terceiro ponto.

E finalmente, agradeço a todos que de alguma forma fizeram e/ou ainda fazem parte da minha vida, me ajudando chegar até aqui.

“Pois eu, o Senhor, teu Deus, eu te seguro pela mão e te digo: Nada temas, eu venho em teu auxílio.”

(Isaías 41:13)

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 8
1. INTRODUÇÃO 9
2. MATERIAL E MÉTODOS 10
2.1. Local de coleta 10
2.2. Testes de mutagenicidade e genotoxicidade em animal 11
2.2.1. Teste de micronúcleo utilizando *Astyanax* sp. 11
2.2.2. Ensaio cometa utilizando *Astyanax* sp. 12
2.3. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade em vegetais 12
2.3.1. Teste de *Allium cepa* 12
2.4. Análise química da água 12
2.5. Análise estatística 13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 13
4. CONCLUSÃO 18
5. REFERÊNCIAS 19
ANEXO I – Normas da Revista a qual o artigo será submetido

Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil

Elisangela Bortoluci Maceda*, Alexéia Barufatti Grisolia

Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
*Autor correspondente: e-mail: elisangela_maceda@hotmail.com,
alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade da água do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil, por meio de testes toxicológicos utilizando biomarcadores. Para avaliar mutagenicidade utilizou o teste de micronúcleo, genotoxicidade realizou o ensaio cometa, ambos em *Astyanax* sp., e para analisar a citotoxicidade utilizou o teste de *Allium cepa*. As coletas foram realizadas nos meses de Abril e Junho de 2013. Os dados dos testes de micronúcleo e *Allium cepa*, foram submetidos à análise de variância e teste Tukey, e do ensaio cometa ao teste qui-quadrado ($p>0,05$). Os resultados indicaram aumento significativo na frequência de micronúcleos na coleta realizada em Junho, quando comparada a de Abril. No teste de *Allium cepa*, o efeito citotóxico apresentou-se significativamente maior na coleta de Abril, porém a genotoxicidade das águas não apresentou diferença estatística entre os meses de coleta. O maior número de danos no ensaio cometa ocorreu nos pontos 1 e 4, nas coletas de Abril e Junho respectivamente. Nos resultados da análise química, observou-se níveis de cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel, com valores superiores ao permitido pela legislação. Devido à presença de agentes poluidores, as amostras analisadas do Córrego Arara apresentaram possível potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico aos organismos, sendo estes poluentes derivados ou não de ações antrópicas. Assim, acredita-se que este trabalho servirá como ferramenta adicional ao controle da qualidade da água do Córrego Arara, considerando sua utilização e importância para o município.

Palavras-chave: anormalidade cromossômica, ambiente aquático, contaminação.

Use of biomarkers for monitoring of waters from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil

ABSTRACT

The aim of this paper is to avaluate the mutagenicity, genotoxicity and cytotoxicity of water from the Arara Stream in the city of Rio Brilhante, MS, Brazil, it was realized through toxicological tests using biomarkers. In order to evaluate the mutagenicity it was utilized the micronuclei test, the genotoxicity utilized the comet assay, both in *Astyanax* sp., and to analize the cytotoxicity it was the *Allium cepa* test. The collections were placed on April and June months in 2013. The data of the micronuclei tests and *Allium cepa*, were submitted to analyze of variance and Tukey test, and of the assay comet to chi-square test ($p>0,05$). The results indicated a meaningful increasing at the frequency of micronucleus th collection realized on June, if is compared to April's collection. At the *Allium cepa* test, the citotocity effect showed meaningfully larger at the April's collection, however the genotocity of water didn't showed statistic differences among the months of the collection. The greatest number of damage at the comet assay occurred at points 1 and 4, on April's and June's collection

respectively. At the chemical analyze results, it was observed the levels of cadmium, chromium, copper and nickel, spear with higher values will legislation. Due to the presence of pollutants, the samples analyzed of the Arara Stream show possible potential mutagenic, genotoxic and cytotoxic to bodies, these pollutants are derived or not from human action. Thus, is credited with this work is going to serve as additional tool to the quality control of water from the Arara Stream, considering its utilization and importance to the city.

Keywords: chromosomal abnormality, aquatic environment, contamination.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são utilizados em todo o mundo com diversos intuitos, entre eles abastecimento de água, geração de energia elétrica, irrigação, navegação, aquicultura, recreação e lazer (Sperling, 1993; Bassoi e Guazelli, 2004). Porém, se utilizados inapropriadamente podem acarretar prejuízos (Moraes e Jordão, 2002), como a perda da biodiversidade, além de colocar em risco a saúde humana. A contaminação dos ecossistemas aquáticos é problema crescente proveniente de ações antrópicas, em consequência de atividades inadequadas por liberação de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas sem tratamento adequado, uso indiscriminado de substâncias químicas, lixo urbano e descarte indevido de materiais e resíduos (White e Rasmussen, 1998; Philippi Jr e Martins, 2005).

Algumas das substâncias químicas liberadas no ambiente aquático, como compostos orgânicos e metais pesados, são capazes de inibir a atividade celular ou alterar o material genético podendo comprometer a fisiologia e sobrevivência de organismos aquáticos, transmitindo esta contaminação aos níveis tróficos superiores, (Handy, 1994; Lemos e Terra, 2003), incluindo o ser humano (Von Burg e Liu, 1993). Diante do exposto, faz-se necessária a utilização de testes citogenéticos, que por sua vez, empregam biomarcadores (Rabello-Gay et al., 1991). Para Livingstone (1993) estes são os fluídos corpóreos, as células, os tecidos e as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos que indicam a presença de contaminantes.

Os elementos químicos no meio aquático podem ser neurotóxicos como o chumbo e manganês (Landrigan e Todd, 1994; Neal e Guilarte, 2013), ser bioacumulativos como o cádmio, zinco e níquel (Calamari et al., 1982; Glynn, 1991; CETESB, 2009), ser cancerígenos como o cromo (Gochfeld, 1991), causarem distúrbios fisiológicos e bioquímicos como o cobre (Baldwin et al., 2003), bem como gerar impactos ao ecossistema aquático (Hudson, 1998).

Desta forma, o uso de peixes, como bioindicadores de contaminação aquática, é explicado pela resposta destes aos tóxicos de maneira similar aos grandes vertebrados (Scalon et al., 2010). Os peixes são capazes de sofrer bioacumulação, assim como os mamíferos, respondendo a agentes mutagênicos mesmo em baixas concentrações (Sasaki et al., 1997).

Segundo Sánchez-Galán et al. (1998), uma espécie de peixe considerada ideal, para estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, necessita ser: distribuída em vários ecossistemas; sensível para detectar poluentes em baixas concentrações; e de fácil manuseio no laboratório, sendo assim, o *Astyanax* sp. (lambari) tem sido o biomarcador mais utilizado, pois é comum, pequeno, detritívoro, possui considerável importância econômica e sensível para detectar poluentes em baixas concentrações (Matsumoto e Colus, 2000). Este pode ser utilizado para identificar a ação de agentes genotóxicos através de danos cromossômicos, como os micronúcleos.

Micronúcleos são constituídos de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, envolvidos por uma membrana nuclear, que são perdidos no citoplasma por não terem sido ligados ao fuso na divisão celular, resultando em um pequeno núcleo separado do núcleo

principal (Fenech, 2000; Ribeiro, 2003). Esses fragmentos cromossômicos podem se prender ao fuso por não terem polímeros formadores de tubulina, que é responsável pela formação desses fusos, por isso, são excluídos do núcleo principal das células filhas (Fenech, 2000).

O teste de micronúcleo em peixe desenvolvido inicialmente por Schmid (1975) é amplamente utilizado, pois é uma técnica vantajosa, simples, sensível e de baixo custo para detecção de danos mutagênicos causados em organismos aquáticos (Al-Sabti e Metcalfe, 1995; Russo et al., 2004).

A avaliação de danos no material genético de peixes pode-se dar também pelo ensaio cometa, ou eletroforese em gel de célula única. Este ensaio apresenta diversas vantagens e características quando comparado a outros testes genotóxicos (Liao et al., 2009), pois exige um número menor de células para a análise, é sensível à detecção de danos no material genético mesmo em baixa quantidade, possui custo relativamente baixo, necessita de curto período de tempo para sua realização (Tice et al., 2000).

O ensaio cometa é utilizado para monitorar a qualidade da água, avaliando agentes genotóxicos de efluentes industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA (White e Rasmussen, 1998; Matsumoto et al., 2003), porém não é utilizado para identificar mutações, mas sim danos genômicos que podem resultar em mutações. Estes danos observados com o ensaio cometa, diferente das mutações, podem ser reparados (Gontijo e Tice, 2003).

Outro teste utilizado para avaliar a qualidade da água é o teste de *Allium cepa*, uma vez que ensaios utilizando vegetais podem ser considerados mais simples quando comparado aos testes utilizando modelo animal (Radić et al., 2010). O teste de *Allium cepa* possui curta duração, baixo custo (Fiskesjö, 1985), e permite avaliar agentes citotóxicos no ambiente aquático (Grant, 1982, 1999), pois possui cromossomos grandes e em pequena quantidade, deixando visível assim os danos cromossômicos e os distúrbios do ciclo mitótico (Fiskesjö, 1985; Leme e Marin-Morales, 2009).

O município de Rio Brilhante, localizado no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, caracteriza-se por representar região agropecuária, sucroalcooleira, por estar situado entre dois rios, Vacaria e Brilhante, e possui diversos cursos d'água, sendo o seu principal, o Córrego Arara. As águas deste são utilizadas, principalmente, para irrigação de lavouras e dessedentação de animais, assim como, recebe efluentes da estação de tratamento de esgoto da cidade e há destruição da sua mata ciliar original ao longo do percurso (IMAP/MS, 2006; IBGE, 2013).

Assim, espera-se que essa pesquisa ressalte a importância de adoção de planos de medidas de conservação dos mananciais de água que recebem efluentes decorrentes das diversas atividades humanas. A avaliação da qualidade da água do Córrego Arara é necessária em decorrência da sua importância para o município, onde até o momento não há registros de pesquisas realizadas para este fim. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a mutagenicidade, genotoxicidade e citotoxicidade dos elementos presentes na água em diferentes pontos do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil, por meio do teste de micronúcleo e ensaio cometa em *Astyanax* sp., teste de *Allium cepa* e análise química da água.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de coleta

Amostras de água do Córrego Arara, situado na Bacia do Rio Paraná e pertencente ao município de Rio Brilhante, MS, Brasil, foram coletadas nos meses de Abril e Junho de 2013, em três pontos distintos (1, 2 e 3), conforme ilustrado na Figura 1 e Figura 2. O ponto1 (21°47'40.60"S 54°31'58.37"O) caracteriza-se por possuir resquícios de poluição decorrente

da ação humana, o ponto 2 (21°48'20.77"S 54°31'38.12"O) localiza-se 100 metros após o efluente da unidade de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) do município, estando próximo a propriedades agrícolas, e o ponto 3 (21°48'45.32"S 54°31'44.60"O) caracteriza-se pela ausência de mata ciliar ao redor de suas margens e lavouras em suas proximidades. Houve ainda a coleta de água no Tanque de Irrigação da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), caracterizado como ponto 4, sendo utilizado apenas para fins comparativos. Cerca de 20 litros de água foram coletados em cada ponto de coleta em profundidade de aproximadamente 10 cm da superfície do espelho d'água. As amostras coletadas foram armazenadas em galões de polietileno e encaminhadas para o Laboratório de Mutagênese da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da UFGD.

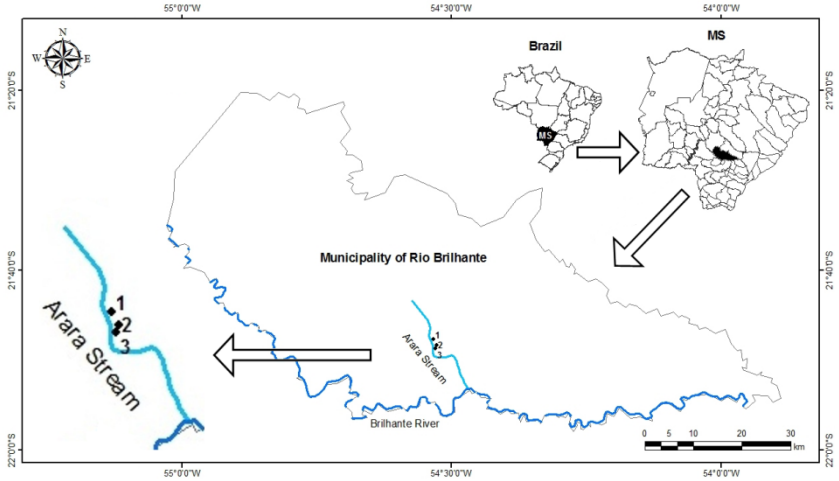

Figura 1. Mapa dos locais de coleta no Córrego Arara, município de Rio Brilhante, MS, Brasil. 1 (Ponto 1), 2 (Ponto 2), 3 (Ponto 3).

Figura 2. Córrego Arara, município de Rio Brilhante, MS, Brasil. A) Ponto 1; B) Ponto 2; C) Ponto 3.

2.2. Testes de mutagenicidade e genotoxicidade em animal

2.2.1. Teste de micronúcleo utilizando *Astyanax* sp.

As amostras de água coletadas foram acondicionadas em quatro aquários, sendo três deles para as amostras provenientes do Córrego Arara (ponto 1, 2 e 3) e outro para a amostra de água do Tanque de irrigação da UFGD (ponto 4). O preparo consistiu em colocar a água previamente coletada dos pontos e armazenar em aquários de vidro (40 x 30 x 20 mm) durante um período de 24-h, devidamente aerados, no Laboratório de Mutagênese da FCBA.

Após este período, dez espécimes de *Astyanax* sp., cedidos por uma piscicultura do município de Dourados, MS, foram adicionados em cada aquário, onde ficaram expostos pelo período de 72-h, com aeração e em temperatura ambiente.

Após o período do bioensaio, cinco espécimes de *Astyanax* sp. de cada aquário foram utilizados para o teste. Para isso, eles foram anestesiados em benzocaína 1%, e em seguida colheu-se o sangue periférico e procedeu-se com a extensão sanguínea em lâminas de microscopia. De cada peixe montou-se uma lâmina, que após secas foram fixadas em etanol

96% durante 30 minutos e coradas com Panótico Rápido. Ao microscópio óptico (Bioval), foram analisadas 2000 células de cada peixe, no aumento total de 400X, para verificação da presença ou ausência de micronúcleos.

2.2.2. Ensaio cometa utilizando *Astyanax* sp.

Para avaliação da genotoxicidade realizou o ensaio cometa, técnica descrita por Ventura (2004), com algumas modificações. Foram utilizados os cinco espécimes restantes de *Astyanax* sp. provenientes de cada aquário contendo as amostras dos quatro pontos analisados. A fim de se confeccionar duas lâminas por peixe, cerca de 6,0 µl de sangue da brânquia foram colhidos de cada animal e eluidos em 2,0 mL de PBS 1x. Dessa suspensão celular, 20,0 µl foram retirados e adicionados em 120,0 µl de agarose *Low Melting* de baixo ponto de fusão (0,5%), a 37°C, pingando este volume sobre a lâmina de microscopia, previamente gelatinizada com agarose comum e identificada, cobrindo-as com lamínulas e acondicionando-as sob refrigeração durante 15 minutos. Passado o tempo, elas foram transferidas para solução de lise final sendo mantidas na geladeira por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese contendo uma solução tampão por 20 minutos para desnaturação do DNA, sendo posteriormente submetidas a uma corrida de eletroforese a 25 V, 300 mA, por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 M por 15 minutos, fixadas em etanol P.A. por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (0,02 mg mL^{-1}), onde para cada lâmina analisou-se 100 nucleóides, que foram classificados visualmente em microscópio de fluorescência Nikon, em aumento total de 200X.

2.3. Teste de citotoxicidade e genotoxicidade em vegetais

2.3.1. Teste de *Allium cepa*

A citotoxicidade da água foi avaliada por meio do índice mitótico e a genotoxicidade através das anormalidades cromossômicas, em raízes de *Allium cepa*, variedade Baia Periforme. As sementes foram submetidas à germinação em placas de Petri com papel-filtro, contendo as amostras de água de cada ponto a ser analisado, sendo uma placa para cada ponto de estudo. Após 72-h de germinação, as sementes foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol/ácido acético glacial) durante 6-h a temperatura ambiente e em seguida, transferidas para uma nova solução de Carnoy 3:1, mantendo-se as mesmas na geladeira até sua utilização. As raízes foram submetidas à hidrólise com ácido clorídrico (HCl) 1N a 60 °C durante 10 minutos, lavadas com água destilada e coradas em Reativo de Schiff durante um período de 2-h, no escuro. Confeccionou-se 5 lâminas por ponto de cada coleta realizada, e a montagem das mesmas se fez por meio de esmagamento do meristema. Um total de 1000 células por lâmina foram contadas, sendo estas analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), no aumento total de 400X.

2.4. Análise química da água

A análise química da água foi realizada no Laboratório de Espectrometria e Cromatografia Aplicada (LECA) da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET) da UFGD. Para isso, coletou-se, em frasco âmbar, 1000 mL de água de cada ponto de coleta, acrescentando-se aproximadamente 11 gotas de ácido nítrico (para deixar o pH da água inferior à 2,0). Posteriormente, as amostras de água foram filtradas e armazenadas sobre refrigeração até o seu processamento. As análises foram realizadas por meio do método de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (FAAS – "*Flame Atomic Absorption Spectrometry*"), que é uma técnica rápida e extremamente sensível (Moffett, 2010). Os elementos químicos analisados foram: cádmio, cálcio, chumbo, cobalto, cobre, cromo, ferro, magnésio, manganês, níquel e zinco.

2.5. Análise estatística

Os dados dos testes de micronúcleo e *Allium cepa*, foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) aplicando-se o Teste F para verificar se as variações observadas foram estatisticamente significativas, e posteriormente as médias foram comparadas por meio do Teste Tukey ($p<0,05$), sendo realizadas com auxílio do pacote computacional SAS® (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Os dados do ensaio cometa foram submetidos ao teste qui-quadrado (χ^2) por meio do Programa BioEstat 4.0 (Ayres et al., 2005), a fim de se comparar o total de núcleos alterados de peixes expostos aos pontos de coleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do teste de micronúcleo (MCN) em *Astyanax* sp. nos dois períodos de coleta (Abril e Junho de 2013) estão apresentados na Tabela 1. Não foi verificada interação significativa entre as coletas, no entanto a coleta realizada em Junho, independente do local, apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos quando comparada a coleta realizada em Abril (Tabela 2). Na coleta do mês de Abril, não houve diferença estatística na frequência de micronúcleos entre os pontos, já na coleta do mês de Junho o ponto 2 apresentou significativamente maior número de micronúcleos que o ponto 1, sendo este estatisticamente igual ao ponto 3, que não diferiu do ponto 4.

Percebe-se que, o ponto 2 foi o mais genotóxico no mês de Junho, possivelmente devido à presença do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto e seus componentes, o que resultou em uma maior taxa de danos permanentes. Os resultados obtidos, apoiados pela análise química, sugerem que os micronúcleos em *Astyanax* sp. podem ter sido induzidos pelas elevadas concentrações de cádmio e níquel, que segundo Dias et al. (2003), estes estão presentes em efluentes domésticos em elevadas concentrações e podem se acumular e causar danos em plantas e animais.

Costa et al. (2008) apontam que não é possível identificar e determinar a toxicidade de determinadas substâncias presentes no meio, uma vez que seus efeitos podem ser influenciados por outras substâncias ou componentes, como propriedades químicas e físicas do ambiente, pluviosidade, temperatura, entre outros. Segundo Bollmann e Marques (2006), os danos celulares ocasionados podem ainda estar relacionados a outros fatores como, por exemplo, a contaminação do meio por agrotóxicos, poluentes atmosféricos, e materiais orgânicos e inorgânicos, provenientes basicamente do escoamento das águas da chuva.

Provavelmente os pontos 1 e 3 se apresentaram estatisticamente igual ao ponto 2, considerando-se a elevada pluviosidade (263,2 mm) do mês de Junho no município de Rio Brilhante, MS (Embrapa, 2013), visto que tanto o ponto 1 quanto o ponto 3 apresentam resquícios de poluição decorrente da ação humana, seja por meio de resíduos (orgânicos ou inorgânicos) ou através do uso indiscriminado de defensivos agrícolas.

Tabela 1. Médias do teste de micronúcleo em *Astyanax* sp. e do teste de *Allium cepa*, observados nos dois períodos de coleta.

			Allium cepa			
	MCN		IM		IAC	
	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho
Ponto 1	3,10 ^{a}	3,70 ^{ab}	4,68 ^{b}	6,70 ^{a}	0,20 ^{b}	0,30 ^{a}
Ponto 2	2,70 ^{a}	4,50 ^{a}	8,74 ^{ab}	4,90 ^{a}	1,86 ^{a}	0,72 ^{a}
Ponto 3	1,50 ^{a}	3,00 ^{ab}	11,64 ^{a}	4,28 ^{a}	0,68 ^{b}	0,88 ^{a}
Ponto 4	2,30 ^{a}	2,30 ^{b}	8,94 ^{ab}	6,20 ^{a}	0,64 ^{b}	0,60 ^{a}

MCN: Micronúcleo; IM: Índice Mitótico; IAC: Índice de Anormalidades Cromossômicas. Média de micronúcleos, índice mitótico e índice de anormalidades cromossômicas no período de coleta seguida pela mesma letra minúscula em determina linha não difere estatisticamente pelo teste Tukey ($p<0,05$).

Tabela 2. Interação entre os meses de coleta observadas no teste de micronúcleo em *Astyanax* sp. e do teste de *Allium cepa*.

	MCN	IM	IAC
Abril	2,30 [b]	2,33 [a]	1,29 [a]
Junho	1,98 [a]	2,83 [b]	1,25 [a]
CV (%)*	15,41	14,05	21,53
R^2	0,48	0,55	0,55

CV: Coeficiente de Variação, *considerando a interação das duas coletas realizadas. Média de micronúcleos, índice mitótico e índice de anormalidades cromossômicas no período de coleta seguida pela mesma letra minúscula em determina coluna não difere estatisticamente pelo teste Tukey ($p<0,05$).

A citotoxicidade, avaliada por meio do índice mitótico no teste de *Allium cepa*, apresentou diferença significativa entre as coletas, sendo a de Abril diferente estatisticamente da coleta de Junho. A genotoxicidade, avaliada por meio do índice de anormalidades cromossômicas, não apresentou diferença estatística entre os meses de coleta.

Na coleta realizada no mês Abril, o índice mitótico foi significativamente maior no ponto 3, que foi igual ao ponto 4, sendo este igual ao ponto 2 e ao ponto 1, ou seja existe diferença estatística apenas entre os pontos 3 e 1. Já a coleta do mês de Junho não apresentou diferença significativa entre os pontos. Na coleta do mês de Abril o índice de anormalidades foi significativamente maior no ponto 2, diferenciando estatisticamente dos demais pontos. Já a coleta realizada em Junho não apresentou diferença significativa entre os pontos.

Semelhante ao resultado do teste de micronúcleo, o maior número de anormalidades cromossômicas em *Allium cepa* foram constatas no ponto 2 (Tabela 3). Entretanto, a coleta realizada no mês de Abril demonstrou-se significativamente diferente da coleta de Junho no teste de *Allium cepa*, diferenciando-se dos dados obtidos para micronúcleo. Segundo Silva (2002), testes toxicológicos utilizando diferentes organismos vivos, como o teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo, podem apresentar respostas diferentes a um mesmo composto químico ou mistura, podendo este ser um fator para a divergência obtida entre os meses de coleta.

Tabela 3. Análise de anormalidades cromossômicas do teste de *Allium cepa* nos dois períodos de coleta.

	Anormalidades Cromossômicas									
	Anáfase com ponte cromossômica		Anáfase com quebra cromossômica		C-metáfase		Intérfase com micronúcleo		Telófase com ponte cromossômica	
	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho
Ponto 1	0,2	2,8	0,2	-	0,2	-	-	-	-	0,2
Ponto 2	2,0	4,0	1,2	0,2	3,2	1,8	5,8	-	2,0	1,2
Ponto 3	3,6	1,0	0,4	-	1,8	2,4	-	3,4	0,2	2,0
Ponto 4	0,4	2,6	-	-	0,8	0,8	1,4	2,2	1,6	0,4

Na Tabela 3 estão apresentados os tipos de anormalidades cromossômicas encontradas nas células meristemáticas das raízes de *Allium cepa*. Foram observadas anáfases com pontes cromossômicas e com quebras cromossômicas, c-metáfases, intérfases com micronúcleos e telófases com pontes cromossômicas (Figura 3). Para Grant (1982) e Leme e Marin-Morales (2009), as anormalidades das células de *Allium cepa* é uma maneira eficiente de investigar

possíveis efeitos citotóxicos e genotóxicos causados por substâncias químicas em ambientes aquáticos contaminados, seja com efluentes industriais ou domésticos.

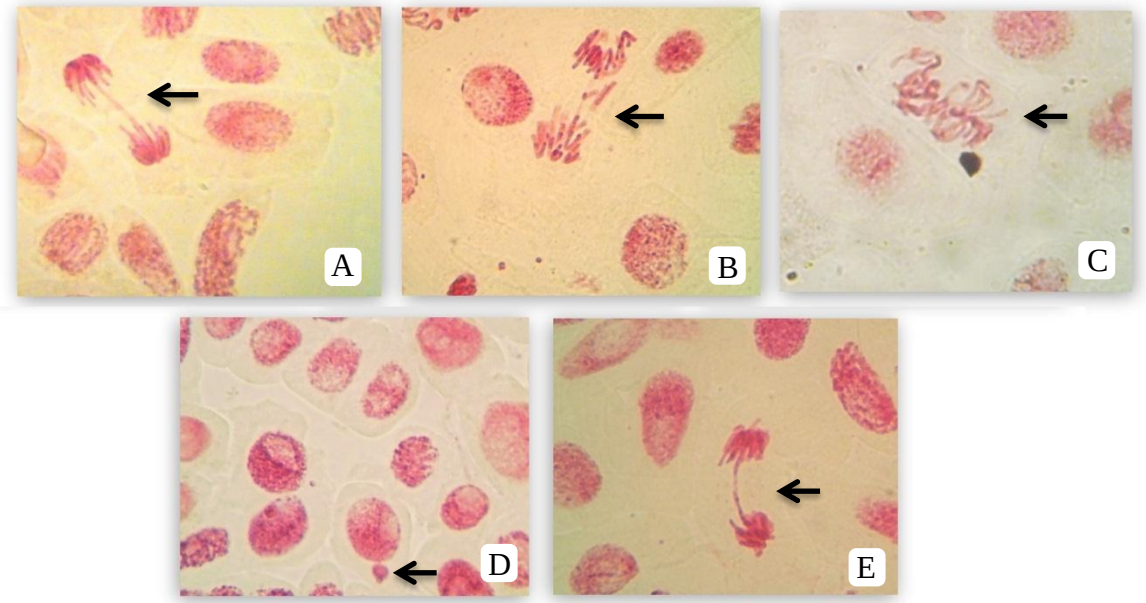

Figura 3. Alterações cromossômicas observadas em raízes de *Allium cepa*. A) Anáfase com ponte cromossômica; B) Anáfase com quebra cromossômica; C) C-metáfase; D) Intérfase com micronúcleo; E) Telófase com ponte cromossômica.

Na coleta do mês de Abril o maior número de anormalidades encontradas situam-se no ponto 2 (Tabela 3), com exceção das células que apresentaram anáfase com ponte cromossômica, sendo maior no mês de Junho. A quantidade de cromo observada no mês de Abril, encontra-se superior no ponto 2, quando comparada aos demais pontos, explicando assim, a presença de células com c-metáfase. Matsumoto (2006) obteve resultado semelhante a esse trabalho, onde relatou a ação do cromo sobre o fuso mitótico, apresentando células com esta anormalidade cromossômica. Segundo Sahi et al. (1998) o cromo tem potencial genotóxico, podendo induzir quebras e perdas cromossômicas, e resultar em anormalidades nas células dos organismos teste.

Os resultados do ensaio cometa estão representados na Tabela 4. Os danos observados foram estatisticamente significativos para o ponto 1, quando comparado ao ponto 4, em ambos períodos de coleta. Diferentemente dos demais testes, no ensaio cometa, a maior frequência de danos no mês de Abril ocorreu no ponto 1, assim como no mês de Junho, ocorreu nos pontos 2 e 4. Isso ocorreu possivelmente devido às diferenças apresentadas na natureza dos testes utilizados. Segundo Hartmann et al. (2001), o ensaio cometa apresenta-se mais sensível, quando comparado ao teste de micronúcleo, por detectar danos reversíveis no DNA.

Deve-se considerar ainda que a água proveniente do Tanque de irrigação da UFGD (ponto 4) possui origem subterrânea e sua classificação é diferenciada dos demais pontos. A elevada quantidade de elementos químicos acima do permitido pode explicar o alto número de danos neste ponto, apresentados pelo ensaio cometa. Segundo Salvadori et al. (2003), os danos avaliados por este teste aparecem antes que no teste de micronúcleo, pois é possível visualizar o micronúcleo somente após um ou mais ciclos de divisão celular.

O total de células com danos no ponto 3, no mês de Abril, quando comparado aos demais pontos, foram significativamente diferentes em relação ao ponto 1, o qual apresentou maior frequência de danos. No mês de Abril o ponto 1, foi significativamente diferente em relação ao ponto 2.

De acordo com Belpaeme et al (1998) os danos apresentados através do ensaio cometa dependem não somente da amostra a ser analisada, mas também dos agentes genotóxicos presentes na mesma, do período de exposição, da espécie de peixe a ser utilizada e das condições experimentais.

As diferenças apresentadas entre os pontos e meses de coleta podem estar relacionadas a diversos fatores a qual as águas estão expostas. Segundo Handy et al. (2003) as diferentes respostas apresentadas no biomarcador podem ser influenciadas por fatores abióticos como temperatura, pH e oxigênio, e fatores bióticos como microrganismos, animais e vegetais presentes naquele ambiente.

Os resultados positivos apresentados nos dois períodos de coleta sugerem a provável presença de agentes genotóxicos nas amostras analisadas, podendo estes influenciarem na boa qualidade das águas. Porém, estes agentes não necessariamente são representados por compostos químicos. Segundo Rojas et al. (1999), os danos analisados através do ensaio cometa podem ser formados por diversos mecanismos, entre eles Mitchelmore e Chipman (1998) citam além dos compostos químicos, a digestão do DNA durante o processo de apoptose.

Tabela 4. Médias das classes de dano obtidas através do ensaio cometa em *Astyanax* sp. nos dois períodos de coleta.

		Classes de dano[1]						
		Classe 0	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	TCA	CS
Abril	Ponto 1	91,2	4,2	0,4	2,4	1,8	44,0[*; **; ***]	19,4
	Ponto 2	82,8	8,0	6,4	2,0	0,8	17,2	30,0
	Ponto 3	90,2	6,0	1,6	1,2	1,0	9,8[*]	16,8
	Ponto 4	77,4	17,2	4,0	0,0	1,4	22,6	30,8
Junho	Ponto 1	82,6	11,2	2,4	0,8	3,0	17,4[*]	30,4
	Ponto 2	76,4	4,0	5,2	8,2	6,2	23,6	63,8
	Ponto 3	85,4	7,0	5,4	0,8	1,4	14,6[*]	25,8
	Ponto 4	67,0	5,2	5,4	10,0	12,4	33,0	95,6

TCA: Total de Células Analisadas com dano. CS: Pontuação do Cometa. [1]Classe 0 = sem danos; Classe 1 = danos mínimos; Classe 2 = danos médios; Classe 3 = danos intensos; Classe 4 = danos máximos. *Significativamente diferente em relação ao Tanque de irrigação da UFGD, através dos valores obtidos pelo teste χ^2 com $p<0,05$. [a] Significativamente diferente em relação ao ponto 3, através dos valores obtidos pelo teste χ^2 com $p<0,05$. [b] Significativamente diferente em relação ao ponto 2, através dos valores obtidos pelo teste χ^2 com $p<0,05$.

Entre os elementos químicos analisados, as concentrações de cádmio, cromo, cobre, chumbo e níquel, apresentaram-se acima da concentração máxima (0,01 mg L^{-1}, 0,05 mg L^{-1}, 0,013 mg L^{-1}, 0,033 mg L^{-1} e 0,025 mg L^{-1}, respectivamente) permitida para classe 3 de água superficial, que são destinadas para abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; à pesca amadora; à recreação de contato secundário; e à dessedentação de animais, de acordo com a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do CONAMA, em todas as amostras analisadas do Córrego Arara, das coletas realizadas em Abril e Junho (Tabela 5).

Tabela 5. Análise química da água do Córrego Arara e do Tanque de Irrigação da UFGD pelo método FAAS. Média ± desvio padrão e %Rsd (n=3)

	Elementos(mg L^{-1})									
	Cobre (Cu)		Ferro (Fe)		Manganês (Mn)		Zinco (Zn)		Cálcio (Ca)	
	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho
Ponto 1	0,139 ± 0,003 Rsd =1,89%	0,160 ± 0,004 Rsd= 2,46%	0,745 ± 0,016 Rsd= 2,17%	0,449 ± 0,033 Rsd= 7,40%	0,183 ± 0,004 Rsd= 2,29%	0,170 ± 0,015 Rsd= 8,56%	0,713 ± 0,030 Rsd= 4,14%	0,720 ± 0,031 Rsd= 4,24%	12,641 ±0,440 Rsd= 3,48%	13,877 ±0,395 Rsd=2,85%
Ponto 2	0,220 ±0,017 Rsd = 7,77%	0,210 ± 0,008 Rsd= 3,76%	0,907 ± 0,056 Rsd= 6,12%	0,692 ± 0,007 Rsd= 0,98%	0,209 ± 0,001 Rsd= 0,50%	0,242 ± 0,012 Rsd= 5,00%	0,748 ± 0,015 Rsd= 1,96%	0,767 ± 0,032 Rsd= 4,13%	12,115 ±0,323 Rsd=2,67%	13,824 ±0,091 Rsd=0,659%
Ponto 3	0,2415 ± 0,003 Rsd=1,09%	0,242 ± 0,004 Rsd= 1,63%	0,707 ± 0,065 Rsd= 9,24%	0,354 ± 0,037 Rsd= 10,46%	0,224 ± 0,016 Rsd= 7,08%	0,154 ± 0,009 Rsd= 6,13%	0,775 ± 0,029 Rsd= 3,76%	0,832 ± 0,033 Rsd= 4,02%	13,785 ±0,414 Rsd=3,01%	14,915 ±0,223 Rsd=1,50%
Ponto 4	0,199 ± 0,003 Rsd=1,32%	0,255± 0,024 Rsd=9,29%	0,169 ± 0,005 Rsd= 2,95%	0,236 ± 0,032 Rsd= 13,72%	0,223± 0,012 Rsd= 5,45%	0,252 ± 0,020 Rsd= 7,95%	0,735± 0,006 Rsd= 0,78%	0,745 ± 0,029 Rsd= 3,93%	12,095 ±0,195 Rsd= 1,61%	14,784 ±0,139 Rsd=0,94%

RSD: Desvio-Padrão Relativo. LQ: Limite de Quantificação - 0,027 mg L^{-1} (Cu); 0,015 mg L^{-1} (Fe); 0,026 mg L^{-1} (Mn); 0,033 mg L^{-1} (Zn); 0,018 mg L^{-1} (Ca)

Tabela 4. (Cont.)

	Elementos(mg L^{-1})											
	Magnésio (Mg)		Cádmio (Cd)		Cobalto (Co)		Crome (Cr)		Chumbo (Pb)		Níquel (Ni)	
	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho	Abril	Junho
Ponto 1	3,010 ± 0,261 Rsd=8,7%	3,404± 0,226 Rsd= 6,64%	0,058 ± 0,006 Rsd= 10,79%	0,058 ± 0,004 Rsd= 7,23%	0,0801 ± 0,002 Rsd= 2,61%	0,145 ± 0,004 Rsd= 2,91%	0,332 ± 0,009 Rsd= 2,74%	0,277 ± 0,025 Rsd= 9,03%	0,250 ± 0,010 Rsd= 4,04%	0,221 ± 0,020 Rsd= 9,11%	0,406 ± 0,013 Rsd= 3,15%	0,493 ± 0,008 Rsd= 1,72%
Ponto 2	2,960 ± 0,085 Rsd= 2,88%	3,343 ± 0,261 Rsd= 7,82%	0,081 ± 0,007 Rsd= 8,61%	0,087 ± 0,002 Rsd= 2,57%	0,184 ± 0,021 Rsd= 11,49%	0,276± 0,010 Rsd= 3,84%	0,474 ± 0,037 Rsd= 7,75%	0,274 ± 0,018 Rsd= 6,68%	0,303 ± 0,028 Rsd= 9,6%	0,253 ± 0,021 Rsd= 8,31%	0,538 ± 0,060 Rsd= 11,15%	0,600 ± 0,023 Rsd= 3,90%
Ponto 3	3,601 ± 0,222 Rsd= 6,16%	3,527 ± 0,256 Rsd= 7,26%	0,068 ± 0,001 Rsd= 1,46%	0,048 ±0,005 Rsd= 10,30%	0,217 ± 0,015 Rsd= 6,90%	0,093 ± 0,006 Rsd= 6,83%	0,419 ± 0,004 Rsd= 1,08%	0,342± 0,023 Rsd= 6,66%	0,232 ± 0,005 Rsd= 2,17%	0,335 ± 0,025 Rsd= 7,51%	0,576 ± 0,019 Rsd= 3,33%	0,464 ± 0,031 Rsd=7,65%
Ponto 4	1,864 ± 0,052 Rsd= 2,80%	2,751 ± 0,178 Rsd= 6,65%	0,092 ± 0,002 Rsd= 2,21%	0,089 ± 0,005 Rsd= 6,11%	0,183 ± 0,006 Rsd= 3,47%	0,242 ± 0,014 Rsd= 5,78%	0,442 ± 0,023 Rsd= 5,26%	0,512 ± 0,029 Rsd=5,76%	0,353 ± 0,015 Rsd= 4,28%	0,428 ± 0,030 Rsd= 7,06%	0,585 ± 0,028 Rsd= 4,78%	0,568 ± 0,004 Rsd= 0,75%

RSD: Desvio-Padrão Relativo. LQ: Limite de Quantificação - 0,012 mg L^{-1} (Mg); 0,073 mg L^{-1} (Co); 0,062 mg L^{-1} (Ni); 0,029 mg L^{-1} (Cd); 0,203 mg L^{-1} (Pb); 0,110 mg L^{-1} (Cr).

Os resultados obtidos no presente trabalho concordam com os dados obtidos por Cavas et al. (2005), em que observaram a formação de micronúcleos em peixes quando expostos a cádmio e cobre, indicando sua ação genotóxica para estes organismos. Tagliari et al. (2006) verificaram um aumento de danos no material genético em bioindicadores expostos a elevadas concentrações de cromo, como demonstrado em estudo através do teste de *Allium cepa*.

A maior concentração de chumbo foi verificada nos ponto 4, para ambos períodos de coleta (Tabela 4). Duffus (2002) propôs a capacidade deste metal se acumular no interior das células e consequentemente apresentar toxicidade às mesmas. Porém, sua toxicidade pode ser alterada em função do pH e dos teores de carbono presente no meio, formando complexos ou sendo adsorvidos (Baird, 2011).

Em relação ao níquel, Marques e Chierice (1993) demonstram que seu potencial genotóxico no ambiente aquático o qual depende de fatores como pH e oxigênio dissolvido. Sua elevada concentração é ocasionada principalmente por efluentes domésticos, assim como pela erosão do solo e de rochas (Sawasdee e Köhler, 2009), concordando com os resultados apresentados pelo teste de micronúcleo.

Entre as amostras analisadas do ponto 4, nos meses de Abril e Junho, todos os elementos químicos analisados, com exceção do cálcio, magnésio e manganês (Tabela 4), apresentaram-se acima da concentração máxima permitida pela Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008, do CONAMA, para as águas subterrâneas utilizadas para irrigação (Brasil, 2008).

Por se manter armazenada a céu aberto antes da sua distribuição às lavouras, as águas do ponto 4 estão expostas a diversos fatores externos. Estes podem estar associados à presença dos elementos químicos apresentados em elevada quantidade nas amostras. Chaim (1995) apresenta a deriva dos agrotóxicos, durante sua aplicação, uma das formas de contaminação e diminuição da qualidade das águas, considerando-se a presença de pequenas plantações em suas proximidades. Funari et al. (1995) e Walls et al. (1996) demonstram a presença de resíduos de agrotóxicos nas águas, onde estes podem gerar um elevado grau de toxicidade aos organismos expostos.

Os valores máximos permitido de cálcio e magnésio não se encontram nos padrões de qualidade de água superficial e subterrânea, estabelecidos pelo CONAMA através da Resolução 357/2005 e Resolução 396/2008, respectivamente. Sendo assim, não foi possível compará-los aos demais elementos químicos analisados.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se perceber a importância da utilização de múltiplos biomarcadores para avaliação a toxicidade em ambientes aquáticos. Pesquisas realizadas com estes organismos indicadores da qualidade da água podem servir de parâmetros aos demais estudos relacionados à preservação e conservação do ambiente.

Verificou-se a presença de compostos químicos em elevadas quantidades no Tanque de irrigação da UFGD. Através deste estudo não foi possível verificar a origem desses poluentes, para tanto há necessidade de um estudo com metodologias diferenciadas, a fim de se aumentar a qualidade destas águas.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que todas as amostras de água analisadas do Córrego Arara apresentaram possível potencial mutagênico, genotóxico e citotóxico à animais e vegetais, que estão em contato com a mesma, devido à presença de substâncias e materiais poluentes derivados ou não de ações antrópicas.

Considerando-se a utilização e importância das águas deste córrego para o município de Rio Brilhante, MS, esse trabalho servirá como ferramenta de suporte ao controle da qualidade da água a fim de auxiliar ações e medidas para recuperação do Córrego Arara.

5. REFERÊNCIAS

AL-SABTI, K; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, United States, v. 343, n. 2-3, p. 121-35, 1995. http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(95)90078-0

AMES, B. N.; LEE, F. D.; DURSTON, W. E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 70, n. 3, p. 782–786, 1973.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S. **BioEstat 4.0 Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas.**Belém: ONG Mamirauá, 2005.

BASSOI, L. J.; GUAZELLI, M. R. Controle Ambiental da água. In: PHILIPPI Jr, A. (Org.); ROMÉRO, M. A. (Org.); BRUNA, G. C (Org.). **Curso de Gestão Ambiental**. 2 ed. Barueri: Manole, 2004. p. 53-99.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. 4 ed. Porto Alegre: Bookman, 2011. p. 844.

BALDWIN, D. H.; SANDAHL, J. F.; LABENIA, J. S.; SCHOLZ, N. L. Sublethal effects of copper on coho salmon: impacts on non-overlapping receptor pathways in the peripheral olfactory nervous system. **Environmental Toxicology and Chemistry**, United States, v. 22, n. 10, p. 2266-2274, 2003.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; ZHU, L.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline Comet assay for detecting genomic damage in marine flat fish. **Mutation Research**, United States, v. 415, p. 167-184, 1998. http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(98)00062-X

BOLLMANN, H. A.; MARQUES, D. M. L. M. Influência da densidade populacional nas relações entre matéria orgânica carbonácea, nitrogênio e fósforo em rios urbanos situados em áreas com baixa cobertura sanitária. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**. v. 11, p. 343-352, 2006.

BRASIL. Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação e dá outras providências. Brasília, DF, 1981.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 396, de 03 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2008.

CALAMARI, D.; GAGGINO, G. F.; PACCHETTI, G. Toxicokinetics of low levels of Cd, Cr, Ni and their mixture in long-term treatment on Salmo gairdneri rich. **Chemosphere**, United States, v. 11, p. 59-70, 1982.

CAVAS, T.; GARANKO N. N.; ARKHIPCHUK, V. V. Induction of micronuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 569-574, 2005. http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2004.12.014

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo: Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem.** 2009. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/media/files/Agua/relatorios/rios/rel_aguas_int_2009/relatorio_2009.zip>. Acesso em: 15 de dez de 2013.

CHAIM, A. Impacto ambiental de agrotóxicos e biopesticidas. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 8, n. 1, p. 9-10, 1995.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. I. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DIAS, N. M. P.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C.; CAMARGO, O. A. Energia livre da reação de adsorção de cádmio em latossolos ácricos. **Revista Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 829-834, 2003.

DUFFUS, J. H. "Heavy metals" - A meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Guia Clima**: Estação da Embrapa Agropecuária Oeste. 2013. Disponível em: < http://www.cpao.embrapa.br/clima/?lc=site/estatisticas/estatisticas>. Acesso em: 11 de fev de 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, United States, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000. http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8

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

FUNARI, E.; DONATI, L.; SANDRONI, D.; VIGHI, M. Pesticide levels in groundwater: value and limitations of monitoring. In: **6 Pesticide Risk in Groundwater**. Boca Raton: CRC Press; 1995. p. 3-44.

GLYNN A. W. Cadmium and zinc kinetics in fish: studies on water-borne 109 Cd and 65 Zn turnover and intracellular distribution in minnows Phoxinus phoxinus. **Pharmacology & Toxicology**, v. 69, p. 485-491, 1991.

GOCHFELD, M. Setting the research agenda for chromium risk assessment. **Environmental Health Perspectives**, v. 92, p. 3-5, 1991.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p. 173-200.

GRANT, W. F. Chromosome Aberration Assays in *Allium*. **Mutation Research**, Orlando, v. 99, n.3, p. 273 -29, 1982. http://dx.doi.org/10.1016/0165-1110(82)90046-X

GRANT, W. F. Higher Plant Assays for the Detection of Chromosomal Aberations and Gene Mutations – a Brief Historical Background on Their Use for Screening and Monitoring Environmental Chemicals. **Mutation Research**, Orlando, v. 426, n. 6, p. 107 -112, 1999. http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00050-0

HANDY, R. D. Intermittent exposure to aquatic pollutants: assessment, toxicity and sub lethal responses in fish and invertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, p. 171-184, 1994. http://dx.doi.org/10.1016/1367-8280(94)90039-6

HANDY, R. D.; GALLOWAY, T. S.; DEPLEDGE, M. H. A proposal for the use f biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. **Ecotoxicology,** v. 12, p. 331-343, 2003.

HARTMANN, A.; PLAPPERT, U.; RADDATZ, K.; GRÜNERT-FUCHS, M.; SPEIT, G. Does physical activity induced DNA damage? **Mutagenesis**, v. 9, p. 269-272, 2001.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, P. H.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environment Molecular Mutagenicity**, v. 18, p. 277 – 291, 1991.

HUDSON, R. J. M. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Obeservations and predictions of non-eguilibrium effects. **Science of the Total Environment**, v. 219, n. 2–3, p. 95–115, 1998. http://dx.doi.org/10.1016/S0048-9697(98)00230-7

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Rio Brilhante, Mato Grosso do Sul – MS**. 2013. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/dtbs/matogrossodosul/riobrilhante.pdf>. Acesso em: 16 de abr de 2013.

IMAP MS - Instituto do Meio Ambiente do Pantanal de Mato Grosso do Sul. **Bacia do Rio Ivinhema**: Diagnóstico hidroambiental e socioeconômico. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Recursos Hídricos/Instituto de Meio Ambiente Pantanal. Gerência de Recursos Hídricos. Campo Grande, 2006.

LANDRIGAN, P. J.; TODD, A. C. Lead poisoning. **Western Journal of Medicine**,v. 161, n. 2, p. 153-159, 1994.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71-81, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002

LEMOS, C. T.; TERRA, N. R. Poluição: Causas, Efeitos e Controle; IN: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. (Org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance. 2003, p. 424.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n.1, p. 46–53, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993.

MARQUES, A. L. B.; CHIERICE, G. O. Trace nickel determination with phenyl dithiocarbamate in sea water, by adsorptive stripping voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 4, n.1, p.17-19, 1993.

MATSUMOTO, F. E.; COLUS, I. M. S. Micronucleus frequencies in Astyanax bimaculatus (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. **Genetics and Molecular Biology**, v.23, n.2, p. 489-492, 2000. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000200041

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish Oreochromisniloticus and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158, 2006. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALLAGUTI, M. I.; MARIN-MORALES, M. A. Investigation of the genotoxic potential of the waters of a river receiving tannery effluents by means of the in vitro comet assay. **Cytologia**, v. 68, p. 395-401, 2003. http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572006000100028

MITCHELMORE, C. L.; CHIPMAN, J. K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potencial value of the comet assay in environmental monitoring. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 399, p. 135-147, 1998. http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2

MOFFETT, J. **Sensitivity Enhancement for Flame Atomic Absorption Spectrometry Using an Atom Concentrator Tube, the ACT 80**. 2010. Disponível em: < http://www.chem.agilent.com/Library/applications/aa091.pdf>. Acesso em: 12 de fev de 2014.

MORAES, D. S. L; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 370-374, 2002.

NEAL, A. P.; GUILARTE, T. R. Review Article: Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. **Toxicology Research**, v. 2, p. 99-114, 2013. doi: 10.1039/C2TX20064C

PHILIPPI JR. A; MARTINS, G. Águas de Abastecimento. In: PHILIPPI JR. A. **Saneamento, saúde e ambiente**: fundamentos para um desenvolvimento sustentável. Barueri: Manole. 2005, p. 117-180.

RABELLO-GAY, M. N; RODRIGUES, M. A. R; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese**: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1991, p. 246.

RADIĆ, S.; STIPANICER, D.; VUJCIĆ, V.; RAJCIĆ, M. M.; SIRAC, S.; PEVALEK-KOZLINA, B. The evaluation of surface and wastewater genotoxicity using the *Allium cepa* test.**Science ofthe Total Environment**, v.408, p. 1228–1233, 2010.http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.055

RIBEIRO, L. R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, p.173-200.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B**, v. 722, p. 25-254, 1999. http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00313-2

RUSSO, C.; ROCCO, L.; MORESCALCHI, M. A.; STINGO, V. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 2, p. 168–174, 2004. http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00027-7

SAHI, A. N.; SINGH, S. K.; SEM, P. K.; SINGH, R. N. Cytogenetic response of hexavalent chromium-induced somatic cell abnormalities in *Allium cepa*. **Cytobios**, v. 96, p. 71-79, 1998.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste de micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 201-220.

SÁNCHEZ-GALÁN, S.; LINDE, A. R.; IZQUIERDO, J. I.;GARCÍA-VÁSQUEZ, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (Salmo trutta): complementary methods to biomonitor freshwater ecosystems. **Mutation Research**, v. 412, p. 219-225, 1998. http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00186-1

SASAKI, Y. F.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, F.; ISHIBASHI, S.; TSUDA, S.; MATSUSAKA, N.; ASANO, N.; SAOTOME, K.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M. Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. **Mutation Research**, v. 393, p. 133-139, 1997. http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(97)00098-3

SAWASDEE B.; KÖHLER, H. R. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, Marisa cornuarietis (Prosobranchia). **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1539-1547, 2009. http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.08

SCALON, M. C. S.; RECHENMACHER, C.; SIEBEL, A. M.; KAYSER, M. L.; RODRIGUES, M. T.; MALUF, S. W.; RODRIGUES, M. A. S.; SILVA, L. B. Evaluation of Sinos River water genotoxicity using the comet assay in fish. **Brazilian Journal of Biology**,v.70, n.4, p.1217-1222, 2010. http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842010000600011

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v. 31, p. 9–15, 1975. http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8

SILVA, A. C. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e Avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2002.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test), a Sensitive Genotoxicity Test for detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D. S. **Methods in Molecular Biology**: DNA Repair in Protocols – Eukaryotic Systems. Totowa: Humana Press, 1999. v. 113, p.203-211.

SPERLING, E. V. Considerações sobre a saúde de ambientes aquáticos. **Bio Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 3, p.53-56, 1993.

TAGLIARI, K. C.; CECCHINI, R.; VAZ ROCHA, J. A.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicidade do Sedimento e Estresse Oxidativo Hepático em Peixes sob a Influência de Curtumes. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v.1, p. 57-61, 2006.

THOMANN, R.V.; SHKRELI, F.; HARRISON, S. A pharmokinetic model of cadmium in rainbow trout. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 2268-2274, 1997.

TICE, R. R; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

VENTURA, C. B. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos do herbicida atrazina, utilizando *Allium cepa* e Oreochromis niloticus como sistemas-teste.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Departamento de mutagênese ambiental. Rio Claro: Universidade Estadual de São Paulo, 2004.

VON BURG, R.; LIU, D. Chromium and hexavalent chromium.**Journal of Applied Toxicology**, v. 13, p. 225-230, 1993.

WALLS, D.; SMITH, P. G.; MANSELL, M. G. Pesticides in groundwater in Britain. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 6, p. 55-62, 1996

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, v. 410, p. 223-236, 1998. http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00002-7

ANEXO I – Normas da Revista a qual o artigo será submetido

REVISTA AMBIENTE & ÁGUA

Instruções aos autores

O periódico publica artigos inéditos em Inglês, Português ou Espanhol na área interdisciplinar, com inserção nas áreas de Ciências Ambientais, Recursos Hídricos, Hidrologia, Hidrogeologia, Engenharia Ambiental e Saneamento, Engenharia Florestal e Recursos Florestais, Ecologia, Aquicultura, Oceanologia e Recursos Pesqueiros, Agronomia, Agrometeorologia e Engenharia Agrícola, Mudanças Globais, Engenharia de Pesca e Zootecnia, Geografia, Geologia. Assim como, nas áreas de Sensoriamento Remoto, Geotecnologias e Análise Espacial, voltadas para o estudo da água ou das Ciências Ambientais.

Artigos de revisão inéditos também poderão ser aceitos desde que apresentem análise crítica de assuntos da temática da revista, baseados em literatura atual de revistas científicas de grande impacto.

O manuscrito deverá ser original, destinado exclusivamente à AMBIAGUA (Revista Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science).

Acesso em: http://www.scielo.br/revistas/ambiagua/pinstruc.htm

Processo de revisão por pares da AMBIAGUA

A cada edição, o Comitê Editorial selecionará, dentre os artigos considerados favoráveis para a publicação, aqueles que serão publicados por atenderem aos critérios acima. Não há nenhum comprometimento para seguir a ordem de submissão. A ordem depende do tempo de resposta dos revisores *ad hoc*, dos autores e da administração da revista. Todos os manuscritos submetidos serão examinados pelo editor para verificar se o conteúdo do manuscrito é apropriado para a revista e se o manuscrito foi preparado de acordo com as instruções para os autores. O editor poderá rejeitar o manuscrito se detectar: erros relativos às instruções; redação inadequada; ou se, o trabalho não contiver suficiente mérito científico ou tecnológico. Uma vez superada essa fase, o editor enviará o manuscrito a um ou dois membros do Comitê Editorial, para que sejam sugeridos pelo menos dois avaliadores *ad hoc* especialistas no tema do manuscrito proposto. Os avaliadores devem ser especialistas científicos, de reconhecida formação, que trabalhem em áreas relacionadas com o tema do manuscrito e, portanto, devem estar plenamente capacitados para avaliar o manuscrito e recomendar a sua aceitação ou rejeição. Os avaliadores receberão o manuscrito, sem nenhuma identificação dos autores, e o formulário de avaliação para manifestarem seus comentários e recomendações sobre a aceitação, correção ou rejeição do manuscrito.

Em nenhuma etapa do processo, os avaliadores conhecerão a identidade dos autores, assim como, os autores não saberão a identidade dos avaliadores.

Depois de examinar as recomendações dos avaliadores, o editor tomará uma das seguintes decisões:

1. Aceitar o manuscrito com pequenas mudanças e, neste caso, o editor devolverá o trabalho aos autores com uma lista de pequenas correções a serem implementadas.

2. Caso contrário, optará por enviar a nova versão corrigida do manuscrito aos avaliadores. Os avaliadores *ad hoc* podem também indicar o desejo de rever o manuscrito após correções.

Quando receber a versão final do manuscrito, o editor se certificará de forma interativa de que as correções foram devidamente implementadas. Finalizadas as correções, ele informará aos autores sua aceitação, indicando em que número da revista o artigo deverá ser publicado e

após revisão de linguagem, referências, preparação do *layout* para publicação, os autores receberão as provas e o autor correspondente indicará as correções finais antes da publicação juntamente com uma autorização para publicação atestando o ineditismo do artigo.

Erros tipográficos, artigos citados no texto que não aparecem nas referências e vice-versa, pequenas discrepâncias entre o resumo e o abstract, pequenas mudanças na redação são exemplos de pequenas mudanças. Quando houver modificações maiores, o editor devolverá o artigo com uma lista de sugestões que o autor responsável deverá atender para que o trabalho seja novamente considerado. Exemplos de modificações maiores incluem a análise de dados usando provas estatísticas, revisão de tabelas e figuras, repetição de experimentos, revisão da redação da conclusão e mudanças substanciais na redação.

No caso de rejeição após análise dos avaliadores *ad hoc*, o editor informará aos autores as razões para não publicá-lo. Em geral, os motivos para rejeição envolvem o conteúdo do manuscrito não apropriado para a revista, violações graves da forma de publicação, manuscrito sem mérito científico e ou tecnológico.

Submissões de manuscritos que tenham sido publicados em anais de simpósios, congressos, etc., assim como artigos traduzidos de periódicos científicos estrangeiros não devem ser submetidos. Apresentações em eventos científicos e publicações de resumos apenas, não impedem a submissão.

A revista tem caráter científico. Seu público alvo inclui a comunidade acadêmica dos cursos de pós-graduação, assim como de instituições de pesquisa, especialmente da área Interdisciplinar, Ambiental e dos Recursos Hídricos.

Forma e preparação de manuscritos

O artigo deverá ser submetido em formato texto (MS Office), não restringido por *password* para permitir edição. A publicação final será em PDF e HTML. O artigo deve ser submetido com as seguintes características:

- **Tamanho da página:** equivalente ao tamanho do papel A4 (210 x 297 mm);

- **Margens (superior, inferior, esquerda e direita):** 2,5cm;

- **Fonte**: Times New Roman, 12, espaço entrelinhas simples, em uma única coluna, com parágrafos alinhados à esquerda e à direita;

- **Tamanho**: Normalmente deverão ter no máximo de 10 páginas incluindo tabelas e figuras, que não devem ultrapassar cinco (número de figuras mais tabelas). Entretanto, os artigos serão analisados com base na qualidade e contribuição científica e não pelo tamanho.

Nos artigos em português ou espanhol, o título, o resumo e as palavras-chave deverão ser escritos também em inglês; e artigos em espanhol e em inglês, o título, resumo e palavras-chave deverão ser escritos também em português.

- **Primeira página:**

Deverá conter apenas o título do trabalho, o resumo e as palavras-chave, separadas por "vírgula" e um ponto final após a última palavra-chave; sem o nome dos autores, afiliação ou e-mail. Palavras-chave não devem conter palavras do título e do resumo.

- **Tabelas e Figuras:**

Deverão ser numeradas com algarismos arábicos consecutivos, indicados no texto e anexados no local do artigo mais próximo e depois da chamada. Os títulos das figuras deverão aparecer na sua parte inferior, antecedidos da palavra **Figura** (notar a primeira letra maiúscula e em negrito), um espaço, mais o seu número de ordem em negrito, um ponto e espaço de um

caractere, fonte 11, justificado, tabulado nos limites da figura, observando que o título da figura não é em negrito. Os títulos das tabelas deverão aparecer na parte superior e antecedidos pela palavra **Tabela** (notar a primeira letra maiúscula e em negrito), um espaço, mais o seu número de ordem (**em negrito**), um ponto e espaço de um caractere, fonte 11, justificado. Nas Figuras e Tabelas, quando houver uma fonte de referência, a palavra "Fonte:" vem na parte inferior, seguida da referência, fonte 10, justificado. Títulos de tabelas, figuras e a fonte terminam sempre com ponto final. As figuras poderão ser coloridas, se necessário, porém, atentar para que o tamanho do arquivo não fique grande; tamanho ideal de arquivo para submissão é de ~500 KB, caso o arquivo esteja maior, verificado em propriedades do arquivo, recomenda-se o uso de técnicas de redução de imagens, por meio de reamostragem, número de bits por pixel, etc. Arquivos até 2 MB poderão ser aceitos.

As tabelas devem ser inseridas **como texto**, jamais como figuras/imagens e não usar espaços ou "tabs" para formatar e sim tamanho das células/colunas/linhas. Figuras devem ser inseridas **como objeto** quando se tratar de gráficos, e devem permitir edição.Para inserir imagens em documentos sem que os arquivos aumentem demasiadamente, recomenda-se:

Utilizar arquivos de imagem em formato JPG, PNG ou GIF. Estes arquivos costumam ter bons padrões de qualidade e não consomem muito espaço em disco e memória;

Para inserir as figuras, não usar Copiar/Colar (ou Ctrl+C/Ctrl+V). Deve-se salvar as imagens que se deseja inserir no documento;

Em seguida, acessar a opção de menu disponível para inserção de imagem do seu editor de texto (Ex: no MSWord selecionar a opção Inserir/Figura/do arquivo), localizar a imagem que se deseja inserir no documento. Para finalizar, insira a imagem selecionada no texto.

Gráficos e figuras originadas no MS Excel devem ser inseridas como objeto para que possam ser editadas. O mesmo para as equações (usar o editor de equações e inserir como objetos e não imagens) que devem ser numeradas e entre parênteses ( ). Usar o MS Word 2010 para a edição das equações. Os textos das figuras devem ser legíveis, com alta resolução e tamanho adequado.

- **Estrutura do artigo:**

O artigo em PORTUGUÊS deverá seguir a seguinte sequência: TÍTULO em português, 15, negrito, centralizado, primeira letra maiúscula, demais minúsculas (salvo nomes próprios), RESUMO, seguido de Palavras-chave, TÍTULO DO ARTIGO em inglês, ABSTRACT (seguido de Keywords); 1. INTRODUÇÃO (incluindo revisão de literatura); 2. MATERIAL E MÉTODOS; 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO (note o singular); 4. CONCLUSÃO; 5. AGRADECIMENTOS (desejável, porém, só na versão para publicação após o manuscrito ter sido aceito); e 6. REFERÊNCIAS, usar referências de alto impacto, não citar artigos de anais ou teses / dissertações, a menos que sejam absolutamente essenciais e em número limitado. Verifique artigos já publicados na revista para verificar quais textos devam ser negritados e se há algum artigo relevante, publicado na revista que mereça ser citado no manuscrito.

- **O artigo em INGLÊS deverá seguir a seguinte sequência:**

TÍTULO em inglês; ABSTRACT (seguido de Keywords); TÍTULO DO ARTIGO em português; RESUMO (seguido de Palavras-chave); 1. INTRODUCTION (incluindo revisão de literatura); 2. MATERIAL AND METHODS; 3. RESULTS AND DISCUSSION; 4. CONCLUSIONS; 5. ACKNOWLEDGEMENTS (desejável, porém, só na versão para publicação após o manuscrito ter sido aceito); e 6. REFERENCES.

- **O artigo em ESPANHOL deverá seguir a seguinte sequência:**

TÍTULO em espanhol; RESUMEN (seguido de Palabras-llave), TÍTULO do artigo em português, RESUMO em português (seguido de Palavras-chave); TÍTULO em inglês; ABSTRACT (seguido de Keywords); 1. INTRODUCCIÓN (incluindo revisão de literatura);

2. MATERIALES Y METODOS; 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN; 4. CONCLUSIONES; 5. RECONOCIMIENTO (desejável, porém, só na versão para publicação após o manuscrito ter sido aceito); e 6. REFERÊNCIAS.

Unidades

- **Unidades de medida:** deverão ter espaço após o número, e.g. 10 m ou, por exemplo, 10 km h^{-1}, e não 10km/h. Observe a consistência toda vez que usar a mesma unidade. Use o Sistema Internacional de Unidades.

Verifique todos os símbolos Gregos e todas as figuras cuidadosamente.

Escreva os números de um a nove por extenso, exceto se forem usados como unidades.

Use um espaço entre unidades: g L^{-1}, e não g.L^{-1}, ou gL^{-1}.

Use o formato 24-h para tempo, com quatro dígitos para horas e minutos: 08h00; 15h30.

- **Subtítulos:** quando se fizerem necessários, serão escritos com letras iniciais maiúsculas, antecedidos de dois números arábicos separados e seguidos por ponto, fonte 12, negrito, alinhados à esquerda.

- **Resumo:** deverá conter os objetivos, a metodologia, os resultados e as conclusões, devendo ser compostos de uma sequência corrente de frases em um único parágrafo e conter, **no máximo, 250 palavras**.

- **Citações**: no texto, as citações deverão seguir as recomendações da ABNT-NBR 10520 com as seguintes especificidades**:**

Colocar o sobrenome do autor citado com apenas a primeira letra maiúscula, seguido do ano entre parênteses, quando o autor fizer parte do texto. Quando o autor não fizer parte do texto, colocar, entre parênteses, o sobrenome, seguido do ano separado por vírgula. Dois autores separam-se os sobrenomes pela conjunção "e". Mais de dois autores, a expressão et al. é colocada após o primeiro nome. As referências utilizadas deverão ser preferencialmente de periódicos nacionais ou internacionais de alto impacto (níveis A/B do Qualis CAPES), cerca de 15 referências, em revista científicas são esperadas.

- **Exemplos de como citar:**

Jones (1979), Jones e Smith (1979) ou (Jones, 1979; Jones e Smith, 1979), dependendo da construção da sentença. Mais de dois autores: Jones et al. (1979) ou (Jones et al., 1979). Comunicações pessoais ou dados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências e sim no texto, entre parênteses (Jones, comunicação pessoal, 1979), mas de preferência sempre se basear em citações de revistas científicas.

- **Referências:**

Seguirão as recomendações da ABNT-NBR 6023, com especificidades da revista.

- **Exemplos de como escrever as referências bibliográficas:**
- **Livros:**

FALKNER, E. **Aerial Mapping**: methods and applications. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 322 p.

Quando uma referência tiver **doi** (Digital Object Identifier), adicionar no final dela, o link para localização rápida. Observe que há um espaço entre as iniciais dos sobrenomes dos autores.

Exemplo:

FIGUEIREDO, R. O.; BÖRNER, J.; DAVIDSON, E. A. Watershed services payments to smallholders in the Brazilian Amazon: challenges and perspectives **Rev. ambient. água**, Taubaté, v. 8, n. 2, p. 6-17, 2013.http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.1056

- **Capítulos de livros:**

WEBB, H. Creation of digital terrain models using analytical photogrammetry and their use in civil engineering. In: **Terrain Modelling in Surveying and Civil Engineering.** New York: McGraw-Hill, 1991. p. 73-84.

- **Artigos em Periódicos Científicos:**

HADDAD, E.; SANTOS, C. L. dos; FRANCO JR., R. S. Novas perspectivas sobre o Instituto da desapropriação: a proteção ambiental e sua valoração. **Fórum de direito urbano e ambiental**, Belo Horizonte, ano 6, n. 31, p. 17-25, jan./fev. 2007.

MEYER, M. P. Place of small-format aerial photography in resource surveys. **Journal of Forestry**, Washington, v. 80, n. 1, p. 15-17, 1982.

Quando o artigo consultado possuir **doi** (Digital Object Identifier) acrescentar ao final da referência como link de localização rápida. Observar que há um espaço entre as iniciais dos nomes (veja abaixo DAVISON, J. M.).

- **Trabalhos apresentados em eventos (Impresso)** (devem ser evitados, se essenciais)**:**

DAVIDSON, J. M.; RIZZO, D. M.; GARBELOTTO, M.; TJOSVOLD, S.; SLAUGHTER, G. W. *Phytophthora ramorum* and sudden oak death in California: II Transmission and survival. In: SYMPOSIUM ON OAK WOODLANDS: OAKS IN CALIFORNIA'S CHANGING LANDSCAPE, 5. 23-25 oct. 2001, San Diego, **Proceedings…** Berkeley: USDA Forest Service, 2002. p. 741-749.

- **Trabalhosapresentados em eventos (meio eletrônico) (devem ser evitados, se essenciais):**

COOK, J. D.; FERDINAND, L. D. 2001. Geometric fidelity of Ikonos imagery. In: Annual Convention of American Society for Photogrammetry and Remote Sensing, 23-27 apr., St. Louis. **Proceedings…** St. Louis: ASPRS, 2001. 1 CD-ROM.

- **Teses e Dissertações:** Procurar citar os artigos derivados de teses e dissertações em revistas científicas, se não foram ainda publicados e essenciais, use a forma:

AFFONSO, A. G. **Caracterização de fisionomias vegetais na Amazônia oriental através de videografia aerotransportada e imagens LANDSAT 7 ETM+**, 2003, 120f. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2003.

- **Referências de sites na Internet** (devem ser evitadas, usar apenas seabsolutamente essenciais)**:**

DIAZ, H. F. Precipitation trends and water consumption in the southwestern United States. In: United States Geological Survey, 1997, Reston. **Web Conference…** Disponível em: <http://geochange.er.usgs.gov/sw/changes/natural/diaz/>. Acesso em: 15 maio 2002.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. Tratados e organizações ambientais em matéria de meio ambiente. In:_____. **Entendendo o meio ambiente**. São Paulo, 1999, v. 1. Disponível em: <http://www.bdt.org.br/sma/entendendo/atual.htm>. Acesso em: 8 mar. 1999.

Importante:

O arquivo submetido (*uploaded*) não deve conter **nenhuma identificação.** Assim, os autores devem submeter como arquivo suplementar, uma **Carta de Apresentação**.

As propriedades do arquivo de submissão que identificam a origem devem ser retiradas seguindo as instruções:

Word 2010:

Em Arquivo, clicar em **Informações, Verificando Problemas, Inspecionar Documento** e desmarcar a janela de **Propriedades do Documento e Informações Pessoais**, **Fechar, e Salvar**.

Word 2003:

Ir à aba **Opções**, **Segurança** e eliminar a propriedade de **Autoria** do arquivo.

Todo o conteúdo dos artigos é de exclusiva responsabilidade dos autores.

Carta de apresentação

Toda submissão deve incluir como arquivo suplementar uma carta que deverá conter:

1) O título do artigo em sua língua (Português, Inglês ou Espanhol), seguido por nomes do autor completo, afiliação (instituição, unidade ou departamento, cidade, estado, país). Títulos, bolsas de estudo, etc. devem estar na seção Agradecimentos e não em dados dos autores.

2) Após todos os nomes e a afiliação (item 1), colocar os sobrenomes em maiúsculas, seguidos de vírgula e as iniciais seguidas de pontos e separadas por espaço. Manter a ordem correta dos autores de acordo com a sua contribuição e responsabilidade no artigo e na mesma ordem dos metadados no sistema de submissão da revista (OJS/SEER). Não deverá haver mudanças de autoria até a publicação. Identificar o endereço temporário, se diferente do endereço de afiliação.

3) Identificar o autor correspondente.

4) Fornecer o endereço de e-mail atual de todos os autores, separados por vírgula na mesma ordem dos nomes dos autores. Verifique que eles estejam atualizados e corretos.

5) Incluir na carta de apresentação, a seguinte **declaração**:

Como autor correspondente, li todas as instruções para submissão e declaro que sou responsável pelas informações inseridas no sistema editorial da revista. Asseguro que a contribuição é original e inédita e que não está sendo avaliada para publicação por outra revista e que não será retirada do processo editorial até a decisão final da administração da Revista Ambiente & Água.

6) O autor correspondente deve também justificar na carta a importância da sua submissão e descrever como ela contribui para o avanço da ciência no que se refere à temática da revista. Isso em um pequeno parágrafo.

7) A carta deve indicar se os autores não têm quaisquer interesses financeiros na publicação que possam comprometer a integridade da publicação. Os fundos de apoio recebidos para a pesquisa devem ser indicados na seção de agradecimentos, após aceite para publicação.

8) Fazer sugestão de **quatro possíveis avaliadores** que tenham alta produtividade científica, sem conflito de interesse, fornecendo o nome completo, email, título, resumo, link para o Lattes e indicação do porque ele seria um avaliador indicado para o artigo. A revista pratica a avaliação "cega" em que os autores e avaliadores não devem conhecer as suas identidades. O Comitê Editorial poderá selecionar outros avaliadores não sugeridos. Conflitos de interesse envolvem relações de parentesco, orientação, trabalho, ou mesma instituição.

O autor correspondente se responsabiliza pela declaração em nome de todos os autores.

Instruções Finais

Cada edição publicada pela AMBIAGUA apresenta uma imagem representativa de um artigo publicado naquela edição que vai ser capa do número. Autores são convidados a destacar na carta que eles gostariam de ter a figura X considerada como capa por ser cientificamente interessante e visualmente atraente para a revista. As imagens devem ser de alta resolução (300 dpi) e devem ter aproximadamente 17 por 17 cm. As imagens devem ser originais, e os autores conceder para a AMBIAGUA licença para sua publicação. Caso se deseje, a imagem deve ser submetida como um arquivo adicional suplementar. Os autores devem deter os direitos autorais das imagens apresentadas, sendo os únicos responsáveis pela permissão de uso delas.

Em qualquer caso, os autores concedem à AMBIAGUA a licença para usar qualquer imagem do manuscrito publicado para ser usada como imagem de capa da edição, mesmo que não tenha sido expresso na Carta de Apresentação, a menos que expressamente informem o contrário.

Envio de manuscritos

Antes de iniciar a submissão, é necessário revisar a versão final do manuscrito, o arquivo da Carta de Apresentação e *log in*:http://www.ambi-agua.net/seer/index.php/ambi-agua/about/submissions#onlineSubmissions como autor, e iniciar uma nova submissão, seguindo as instruções. Sempre será possível mudar a língua de interface com o sistema, utilizando-se o menu à direita.