



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA**

CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Padronização do teste de toxicidade com lentilhas d'água (*Lemna minor*) em
solução hidropônica e sua aplicação na avaliação de um córrego urbano.**

Giulia Cristina Andreoli de Souza

BURI-SP

Abril/2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA**

CURSO DE GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**Padronização do teste de toxicidade com lentilhas d'água (*Lemna minor*) em
solução hidropônica e sua aplicação na avaliação de um córrego urbano.**

Giulia Cristina Andreoli de Souza

Trabalho de Conclusão do Curso apresentado ao Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal de São Carlos, como exigência para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas e avaliação obrigatória da atividade curricular Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientador: Prof. Dr. José Augusto de Oliveira David

**BURI-SP
Abril/2021**

Andreoli de Souza, Giulia Cristina

Padronização do teste de toxicidade com lentilhas d'água (Lemna minor) em solução hidropônica e sua aplicação na avaliação de um córrego urbano. / Giulia Cristina Andreoli de Souza -- 2021.
50f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos, campus Lagoa do Sino, Buri

Orientador (a): José Augusto de Oliveira David

Banca Examinadora: José Augusto de Oliveira David, Cristiane dos Santos Vergilio, Diego Lacerda de Souza

Bibliografia

1. Ecotoxicologia. I. Andreoli de Souza, Giulia Cristina.
- II. Título.

Dedico o presente trabalho à Deus, a minha família e amigos. Em especial a minha mãe, meu pai e irmã, que sempre me deram todo o suporte e apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades que me concedeu, pela sua proteção e força que me permitiram superar as dificuldades e conseguir realizar meus sonhos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Luiz e Renata, que sempre me apoiaram e me acompanhavam com muito zelo e amor, cuidando de mim mesmo de longe. Sou muito grata por todo suporte e incentivo a realizar meus sonhos, em que nunca mediram esforços para me ajudar. Também gostaria de agradecer a minha irmã Giovanna, pela cumplicidade e apoio durante a minha graduação. Sem vocês eu nada seria, a vocês devo tudo.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Prof. Dr. José David pela confiança depositada, pela oportunidade, paciência e disponibilidade para me ajudar desde as primeiras conversas no dia da matrícula da faculdade até a realização do presente trabalho.

Aos meus amigos Ingrid, Vitória, Gabriel e João Guilherme sou muito grata por todos os momentos em que vivemos durante a graduação, pelo apoio e pelas melhores lembranças que levarei da faculdade. Agradeço a minha amiga e irmã de coração, Ingrid, que sempre se prontificou a me ajudar quando precisei e que me apoiou em cada passo, sou imensamente grata por sua companhia, suporte ao longo desses anos.

Ao Yuri, meu companheiro que sempre me apoiou, me auxiliou e motivou a dar o meu melhor, sou muito grata por tudo.

À minha madrinha Audrey, que me apoiou durante toda a minha graduação.

À universidade pelo suporte e pelas oportunidades.

Aos professores e servidores do *campus*, eu agradeço por todo apoio, dedicação, incentivo e acolhimento durante os quatro anos do curso.

RESUMO

Ensaio ecotoxicológico exigem para a sua validação, tanto a utilização de uma substância de referência como controle positivo, quanto uma substância inerte como controle negativo. As substâncias padronizadas são aquelas que possuem estudos previamente concluídos sobre a sua toxicidade e reações a um determinado organismo-teste. O presente trabalho foi subdividido em duas pesquisas, onde primeiramente buscou-se padronizar o uso da solução hidropônica comercial como meio de cultivo para ensaios com *Lemna minor* e posteriormente a solução foi aplicada como grupo controle na avaliação de um córrego urbano. As lentilhas foram expostas em repetições à solução hidropônica, juntamente com quatro diluições de NaCl, e a água de cinco pontos de coleta diferentes do Córrego Barnabé, localizado em Indaiatuba, SP. A exposição de cerca de 12 frondes por repetição ocorreu em um período de sete dias em estufa incubadora, com temperatura controlada e de fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escuro. Os parâmetros avaliados foram o cálculo da taxa de crescimento do número de frondes e da área foliar. Após as análises estatísticas, obteve-se como resultado que o crescimento em solução hidropônica foi muito superior do que o cloreto de sódio, demonstrando que a solução se apresenta como um meio de cultivo viável e adequado para estudos com *L. minor*, bem como, os parâmetros de número de frondes e área foliar demonstraram sensibilidade similar à solução. Já após a sua aplicação como controle no ensaio de toxicidade do córrego, pôde-se considerar que a água do córrego apresentou indícios de toxicidade para a macrófita, visualizado tanto nos valores das médias, quanto na presença do fenômeno de clorose nas frondes. Estatisticamente, um ponto de coleta não se diferenciou significativamente do outro, mas todos obtiveram taxas de crescimento baixas em comparação como grupo controle da solução. Além disso, para os pontos de coleta, o parâmetro de área foliar foi o mais sensível comparado ao número de frondes, demonstrando valores inferiores.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Sensibilidade. Substância de referência. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

Ecotoxicological tests require, for validation, both the use of a reference substance as a positive and an inert substance as a negative control. Standardized substances are those that have previously completed studies on their toxicity and reactions to a given test organism. The present work was subdivided into two studies: the first aiming to standardize the use of the commercial hydroponic solution as a culture medium for tests with *Lemna minor* and later the solution was applied as a control group in the evaluation of an urban stream. The duckweeds were repeatedly exposed to the hydroponic solution, along with four dilutions of NaCl, and water from five different collection points of the Barnabé Stream, located in Indaiatuba, SP. The exposure of about 12 fronds per repetition occurred over a period of seven days in an incubator, with controlled temperature and a photoperiod of 12 hours of light and 12 hours of darkness. The evaluated parameters were the calculation of the growth rate of the number of fronds and the leaf area. After statistical analysis, it was obtained as a result that the growth in hydroponic solution was much higher than that of sodium chloride, demonstrating that the solution presents itself as a viable and suitable culture medium for studies with *L. minor*, as well as, the parameters of number of fronds and leaf area showed sensitivity similar to the solution. After application as a control in the stream toxicity test, it could be considered that the stream water showed signs of toxicity to the macrophyte, seen both in the mean values and in the presence of the phenomenon of chlorosis in the fronds. Statistically, one collection point was not significantly different from the other, but all had low growth rates compared to the control group of the solution. In addition, for the collection points, the leaf area parameter was the most sensitive compared to the number of fronds, showing lower values.

Key words: Ecotoxicology. Sensitivity. Reference substance. Phytotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. Objetivo Geral.....	12
2.2. Objetivos Específicos.....	12
ARTIGO I.....	14
ARTIGO II.....	28
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO A.....	45

1. INTRODUÇÃO

A água, sendo presente em mais de dois terços da superfície terrestre, e um dos principais elementos essenciais para o desenvolvimento da população humana, sofre por consequência uma crescente pressão, contribuindo negativamente com danos em sua qualidade e na degradação de ecossistemas aquáticos (SILVA, POMPÊO & PAIVA, 2015). Com o aumento da quantidade de substâncias geradas e degradação ambiental pela atividade humana ao decorrer dos anos, os sistemas aquáticos inseridos em ambientes urbanos, como rios e córregos, refletem danos ocasionados pela constante influência do crescimento populacional e pela entrada de compostos indesejáveis (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013; ABREU & CUNHA, 2015).

Podendo atingir corpos hídricos em diversas concentrações, os componentes tóxicos são oriundos de diversas fontes de emissão, sejam industriais, domésticos, de atividades agropecuárias, mineração e entre outros (ARIAS *et al.*, 2007; SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013; ABREU & CUNHA, 2015). Podem ser destacadas grandes problemáticas como o uso abusivo de defensivos agrícolas, dos quais podem atingir corpos d'águas através da lixiviação da água da chuva, pela irrigação e percolação no solo, a inadequação de soluções para a destinação de resíduos industriais e domésticos, o derramamento indiscriminado de óleo e gasolina e os níveis de poluição e contaminação de recursos hídricos, do solo, subsolo e atmosférico (ARIAS *et al.*, 2007; SILVA, POMPÊO & PAIVA, 2015).

Devido à preocupação de pesquisadores em relação aos danos ocasionados aos sistemas biológicos pela contaminação ambiental crescente, foi proposta a junção dos estudos de ecologia com a toxicologia, originando uma ciência integrada, objetivando estudar os efeitos adversos das substâncias sobre os ecossistemas (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013). No ano de 1969, foi realizada uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU) em que o toxicologista René Truhaut apresentou pela primeira vez o termo ecotoxicologia. A partir deste momento, foi constituído um grupo de trabalho em estudos ecotoxicológicos, onde em uma reunião, em 1973 na Alemanha, foi produzida a seguinte definição (TRUHAUT, 1977):

Ecotoxicologia é o ramo da Toxicologia que se preocupa com o estudo dos efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, aos constituintes dos ecossistemas, animais (incluindo humanos), vegetal e microbiano, em um contexto integrado (TRUHAUT, 1977).

Em uma reunião posterior do grupo, foi evidenciado as 3 principais sequências nos estudos de ecotoxicologia. Em primeiro lugar está o estudo da emissão e entrada de poluentes no meio abiótico, bem como sua distribuição e destino, em segundo lugar o estudo da entrada e destino de poluentes na biosfera e nos ciclos biológicos, e suas formas de transferência via cadeia trófica, e em terceiro lugar o estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos de contaminantes químicos aos ecossistemas e impactos sobre o homem (TRUHAUT, 1977).

Já no Brasil, os primeiros indícios ocorreram em 1971, com um trabalho realizado cujo objetivo era averiguar o aumento da mortalidade de peixes próximo a uma indústria da região do rio Atibaia (SP), os pesquisadores utilizaram a tilápia como organismo teste para avaliar a toxicidade de um efluente industrial liberado (FESB-CETESB, 1971). As primeiras normas brasileiras referentes a testes ecotoxicológicos com organismos aquáticos se deram por ação da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, em 1987, a partir de estudos realizados pelo GT02 - Grupo de Toxicidade da Comissão Técnica de Qualidade das Águas (RUBINGER, 2009).

Dessa maneira, a ecotoxicologia pode ser definida com uma ferramenta de monitoramento ambiental de abordagem integrativa, com foco na intoxicação de organismos em todas as suas nuances e seus respectivos efeitos, estabelecendo limites seguros de uma determinada substância para um dado nível de organização ecológica (AMORIM, 2003; MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008), em que a partir desse estudo se tenha como propósito evitar e precaver contaminações, intervindo, revertendo e remediando de acordo com a necessidade (MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008).

Dentro da ecotoxicologia, existe uma ampla variedade de metodologias (NÓBREGA, 2019), uma vez que é capaz de abordar testes a nível celular, individual e até mesmo a níveis ecológicos superiores, como população, comunidade e ecossistema (MAFFAZZIOLI, 2011). Além disso, ela visa averiguar a capacidade do meio ambiente de metabolizar, transformar, degradar, eliminar e acumular poluentes químicos (MAFFAZZIOLI, 2011).

Os ensaios ecotoxicológicos são meios de adquirir conhecimentos sobre os efeitos dos agentes químicos, podendo ser realizados com diferentes organismos-teste como microorganismos, plantas, minhocas, invertebrados, peixes, aves e mamíferos (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013). Eles consistem na prática de ensaios biológicos, a partir da exposição de organismos vivos a diversas concentrações de xenobióticos em um dado período.

Eles podem ser aplicados tanto como teste a nível agudo, baseado no estudo da concentração de uma determinada substância e sua capacidade de ocasionar danos biológicos severos, ou até mesmo a morte em um curto tempo, como a nível crônico, baseado em um maior tempo de exposição e demonstram respostas à toxicidade cumulativa. Os efeitos crônicos podem corresponder a processos de mutagênese e carcinogênese (RUBINGER, 2009; SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013). Dentre os principais parâmetros avaliados em um ensaio estão as taxas de mortalidade, natalidade e crescimento, o tamanho corporal, máis formações, interferências no ciclo de vida, taxa de alimentação, entre outros (SILVA, POMPÊO & PAIVA, 2015).

No processo de padronização de um ensaio ecotoxicológico, mais especificamente em testes de toxicidade, é de suma importância a utilização de um controle positivo, composta por uma substância de referência para analisar a sensibilidade do organismo perante uma substância considerada tóxica, bem como, precisa-se de um controle negativo, composto por uma substância inerte que irá demonstrar se as alterações provocadas foram ou não ocasionadas por ação da substância estudada (MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008).

Sabe-se que grau de intoxicação de um organismo é dependente de fatores como a disponibilidade da substância no meio, a sua respectiva concentração, a duração e frequência da exposição (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013). As respostas dos organismos desencadeadas podem variar de acordo com a sensibilidade e tolerância de cada espécie, podendo variar entre alterações genéticas, bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas. Portanto, para a escolha de um organismo-teste ideal, devem ser levadas em consideração aspectos como ser abundante no local de estudo, deve ser de fácil coleta, possuir vasta distribuição, de fácil identificação, e seus dados fisiológicos e ecológicos devem ser abundantes na literatura (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013). Além de terem facilidade de se adaptar em condições laboratoriais, exibir certa resistência a contaminantes (RIBEIRO & AMÉRICO-PINHEIRO, 2018), bem como, autores abordam a importância de critérios como o nível trófico e seu respectivo impacto aos demais, ser de baixo custo e possuir importância comercial (RUBINGER, 2009).

As macrófitas aquáticas são espécies de grande importância ecológica, sendo elas representadas por indivíduos de tamanho pequeno, flutuantes e que possuem raízes e folhas reduzidas, elas são do grupo das angiospermas e se nutrem através da matéria orgânica dissolvida na água (FRANÇA *et al.*, 2013; ALKIMIN *et al.*, 2020). A *Lemna minor* (Lentilha

d'água) vêm sendo comumente utilizada em testes de toxicidade devido a sua alta sensibilidade a substâncias, sua função ecológica, seu fácil cultivo e por ser um dos primeiros organismos a ser impactado por efluentes tóxicos nos ambientes aquáticos, bem como, é recomendada pela OECD como espécie bioindicadora (SOUZA, 2008). Para seu cultivo, já foi relatada a utilização de diversas substâncias, como a solução hidropônica de Hoagland & Arnon em trabalhos desenvolvidos por Bassi & Sharma (1993), Proença, Oliveira & Rocha (2012), Liu, Dai & Sun (2016) e Liu *et al* (2018).

A necessidade de aplicação de uma padronização em relação ao meio de cultivo, bem como, para utilização como grupo de controle negativo, é importante para a validação de ensaios ecotoxicológicos. O presente trabalho busca avaliar o potencial da solução hidropônica comercial, padronizando-a como meio de cultivo para *L. minor*, bem como, busca avaliar a aplicação deste como grupo controle em um estudo de toxicidade da água de um córrego urbano. Os parâmetros aplicados para avaliação da taxa de crescimento das macrófitas neste estudo foram o número de novas frondes e a área foliar total.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Padronizar o desenvolvimento do teste com *Lemna minor* com solução hidropônica de baixo custo e aplicar o teste na avaliação do Córrego Barnabé em Indaiatuba-SP.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o uso de solução hidropônica como meio de cultura para ensaios com *L. minor*;
- Comparar o número de frondes e a área foliar entre tratamento com solução hidropônica e variações de diluição de NaCl.
- Averiguar a taxa de crescimento de *L. minor* a partir da exposição à água do córrego Barnabé utilizando parâmetros como o número de frondes e a área foliar total;
- Determinar qual parâmetro, entre o número de frondes e a área foliar, é mais sensível perante a exposição à água do córrego;
- Relacionar os dados das taxas de crescimento da *L. minor* com características dos diferentes pontos de coleta.

Artigo I

O presente artigo será submetido na Revista Brasileira de Biociências, as normas de formatação podem ser visualizadas no ANEXO I.

As figuras foram posicionadas no texto para facilitar a leitura do artigo, mas serão submetidas à parte no momento da publicação conforme normas da revista.

Padronização de solução hidropônica comercial como meio de cultivo para ensaios com Lentilha d'Água (*Lemna minor*)

ARTIGO I

Padronização de solução hidropônica comercial como meio de cultivo para ensaios com Lentilha d'Água (*Lemna minor*)

Giulia Cristina Andreoli de Souza^{1*} e José Augusto de Oliveira David^{1**}

Título resumido: Uso de solução hidropônica para cultivo de *Lemna minor*.

¹ Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Lauri Simões de Barros, Km 12 - SP-189 - Aracaçu, Buri - São Paulo, 18290-000, Brasil.

*giuliacandreoli@gmail.com

**josedavid@ufscar.br

Revista Brasileira de Biociências: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/diretrizes.pdf>

Padronização de solução hidropônica comercial como meio de cultivo para ensaios com Lentilha d'Água (*Lemna minor*)

Resumo

Para a validação de ensaios de toxicidade de contaminantes, há a necessidade de aplicação de um controle positivo, o qual será aplicado por meio de uma substância de referência, juntamente com o controle negativo, no qual será aplicada uma substância inerte. A utilização de solução hidropônica em ensaios com *Lemna minor* já foi relatada na bibliografia e se demonstrou eficaz. O presente trabalho busca avaliar padronização da solução hidropônica comercial como meio de cultivo para testes com lentilha d'água em tratamento de controle negativo. Para isso, foi realizada a exposição de lentilhas à solução, juntamente com quatro diluições de NaCl durante um período de sete dias. Os parâmetros de avaliação foram as taxas de crescimento do número de frondes e da área foliar. Foi constatado que as variações de cloreto de sódio ocasionaram um estresse salino, correspondendo a uma diminuição da taxa de crescimento mesmo em sua menor diluição, bem como, a solução hidropônica foi o tratamento que melhor ofertou as condições necessárias para as macrófitas, atingindo às recomendações da OECD (2002). Ademais, foi verificado que ambos os parâmetros analisados no tratamento da solução responderam da maneira similar, incluindo este, juntamente com o baixo custo, acessibilidade, fácil obtenção e manuseio em vantagens observadas com a sua aplicação. Portanto, conclui-se que a solução hidropônica pode ser considerada como uma substância padronizada adequada em ensaios com *L. minor*.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Fitotoxicidade. Macrófita.

Standardization of commercial hydroponic solution as a culture medium for tests with Duckweed (*Lemna minor*)

Abstract

To validate contaminant toxicity test, it is necessary to apply a positive control which will be applied a reference substance, together with the negative control, with the application of an inert substance. The use of hydroponic solution in tests with *Lemna minor* has already been reported in the bibliography and has proven to be effective. The present work intends to evaluate standardization of the commercial hydroponic solution as a culture medium for tests with duckweed under negative control treatment. For this, lentils were exposed to the solution, together with four dilutions of NaCl over a period of seven days. The evaluation parameters were the growth rates of the number of fronds and the leaf area. It was found that sodium chloride variations caused salt stress, corresponding to a decrease in the growth rate even at its lowest dilution, as well as, the hydroponic solution was the treatment that best offered the necessary conditions for macrophytes, reaching the recommendations of the OECD (2002). In addition, it was found that both parameters analyzed in the treatment of the solution responded in a similar manner, including this, together with the low cost, accessibility, easy obtaining and handling in advantages observed with its application. Therefore, it is concluded that the hydroponic solution can be considered as a suitable standardized substance in trials with *L. minor*.

Key words: Ecotoxicology. Phytotoxicity. Macrophyte.

INTRODUÇÃO

Uma metodologia abordada dentro da ecotoxicologia é a aplicação de testes de toxicidade, dos quais possibilitam averiguar tanto a toxicidade de substâncias químicas quanto a qualidade de amostras de água ou sedimento. São ensaios que exigem condições experimentais específicas e controladas (Costa *et al* 2008).

Os primeiros protocolos padronizados para ensaios de toxicidade foram realizados na década de 80, com enfoque em organismos aquáticos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Internacionalmente, organizações como a *International Organization for Standardization* (ISO), *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) e a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) são responsáveis pela validação dos métodos de padronização em estudos ecotoxicológicos (Gourmelon & Ahtiainen 2007, Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). Desde então, as metodologias tanto para ensaios agudos como crônicos foram sendo adaptadas para alguns organismos (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

As macrófitas aquáticas da espécie *Lemna minor* são angiospermas, monocotiledôneas e flutuantes de curto tempo de geração, são de fácil cultivo, de elevada taxa de crescimento e possuem alta sensibilidade a diferentes poluentes. São organismos recomendados pela OECD como bioindicadores e comumente utilizados em estudos de ecotoxicologia (Souza 2008), seu principal indicador de toxicidade é referente a sua taxa de crescimento (Kiss, Kováts & Szalay 2003), podendo ser aplicados parâmetros de cálculo como o número de frondes, área foliar, peso seco ou fresco (OECD 2002) e tamanho de raízes (Proença, Oliveira & Rocha 2012). O organismo em questão possui um protocolo intitulado como “*Guidelines for the Testing of Chemicals*” da OECD (2002), em que é atribuída diversas recomendações a fim de se obter uma padronização para a quantificação dos danos ocasionados no crescimento de *L. minor* (Almeida 2018).

Em ensaios ecotoxicológicos tem-se a aplicação de grupos controles, dos quais possuem a função de serem utilizados para comparação com os demais tratamentos, assegurando a resposta apropriada (Amatuzzi *et al* 2006, Magalhães & Ferrão-Filho, 2008). O controle positivo é aquele que recebe um componente tóxico que já se tem conhecimento sobre seus efeitos adversos, através de estudos de sensibilidade para organismos-teste específicos, esse componente é denominado de substância de referência (Römbke & Ahtiainen 2007, Amorim *et al* 2012). É de suma importância a definição de uma substância de referência para a apresentação de dados comparáveis e que sejam de fácil repetibilidade e reprodutibilidade, ou seja, que devem apresentar precisão e exatidão nos resultados após a aplicação da mesma metodologia (Pereira *et al* 2010).

A substância de referência recomendada para testes de inibição de crescimento utilizando *Lemna minor* no “*Guidelines for the Testing of Chemicals*” da OECD (2002) foi o 3,5-diclorofenol. Entretanto, há controvérsias em sua aplicação devido ao seu risco à saúde de pesquisadores durante o seu manuseio (Godoy *et al* 2017), assim, existem pesquisas que objetivam a identificação de substâncias menos tóxicas a serem usadas como referência. Para as lentilhas, já foram averiguadas substâncias alternativas como o cloreto de sódio (Godoy *et al* 2017), sulfato de níquel e cloreto de potássio (Canadá 2007).

O controle negativo, por sua vez é constituído por unidades experimentais em que não é aplicada a adição do contaminante, podendo receber uma substância inerte como placebo. Seu objetivo é descartar a possibilidade de danos por outros fatores durante o momento da exposição (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008; Padovani 2014).

O cultivo das lentilhas com solução hidropônica antes da realização de ensaios de toxicidade, bem como para tratamento controle já foi reportado em estudos como de Bassi & Sharma (1993), Proença, Oliveira & Rocha (2012), Liu, Dai & Sun (2016) e Liu *et al* (2018). A solução nutritiva, sendo definida como um sistema homogêneo onde estão dispersos os

elementos necessários, é um componente fundamental no cultivo de vegetais em hidroponia. É imprescindível que a sua formulação seja correspondente com o requerimento nutricional da espécie em foco, incluindo todos os nutrientes essenciais para o desenvolvimento desejado da planta (Luz, Guimarães & Korndörfer 2006).

Desse modo, o presente trabalho objetiva averiguar se a solução hidropônica comercial se apresenta como uma alternativa viável para a padronização de estudos com *L. minor* como um controle negativo, a partir da avaliação da taxa de crescimento com os parâmetros de número de frondes e área foliar.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo das macrófitas

As lentilhas foram cultivadas e mantidas em aclimatação em laboratório durante 3 meses em aquários com solução hidropônica para alface renovada a cada 20 dias. As condições de cultivo foram de temperatura ambiente e com período de claro e escuro variando a cada 12 horas.

Preparo das Soluções

No total foram aplicados cinco tratamentos, com cinco repetições cada, sendo um tratamento de controle com solução hidropônica comercial (Tabela 1), com seu preparo realizado de acordo com as especificações informadas pelo fabricante, onde deve ser prepara a partir da mistura da formulação A e B em água comum, juntamente com quatro concentrações de Cloreto de Sódio (NaCl) como controle positivo. As concentrações testadas foram de 2,5 g/L, 3,5 g/L, 4,5 g/L e 5,5 g/L, objetivando averiguar se a substância apresenta efeito ou não sobre o organismo-teste (Magalhães & Ferrão-Filho, 2008).

Tabela 1. Composição de macro e micronutrientes presentes na solução nutritiva Plantpar e suas respectivas porcentagens. A solução se baseia em duas formulações (A e B)

Composição formulação A			
Componente	Quantidade (%)	Componente	Quantidade (%)
Nitrogênio	9%	Manganês	0,048%
Pentóxido de fósforo	9%	Cobre	0,030%
Óxido de potássio	36%	Zinco	0,019%
Enxofre	3,0%	Molibdênio	0,009%
Magnésio	0,6%	Níquel	0,006%
Ferro	0,148%	Cobalto	0,002%
Boro	0,048%		
Composição formulação B			
Componente	Quantidade (%)	Componente	Quantidade (%)
Nitrogênio	13%	Cálcio	15,5%
Magnésio	2,85%		

Fonte: Plantpar (2021).

Teste de Exposição

A exposição ocorreu seguindo as normas e recomendações estabelecidas pela OECD (2002), onde foram inseridas cerca de 12 frondes por frasco, de maneira aleatória, priorizando indivíduos com quatro frondes. Durante o período de sete dias, os tratamentos foram mantidos em uma estufa incubadora BOD com temperatura máxima de 33,6 °C e mínima de 24,1 °C, com luz constante, cobertos com filme plástico e com pequenos furos em sua superfície a fim de permitir as trocas gasosas dos organismos com o meio. Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente na incubadora.

Análise de Dados

Os parâmetros avaliados no início e final do experimento foram o número de novas frondes geradas e a área foliar total, onde a área foi mensurada com o auxílio do software livre ImageJ. A partir desses valores, foi realizado o cálculo da taxa de crescimento através da equação apresentada pela OECD (2002), sendo:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$$

Onde:

i-j: taxa média de crescimento entre o tempo i e j

N_i: número de folhas/área observadas no tempo i (início)

N_j: número de folhas/área observadas no tempo j (final)

t_i: momento início da exposição

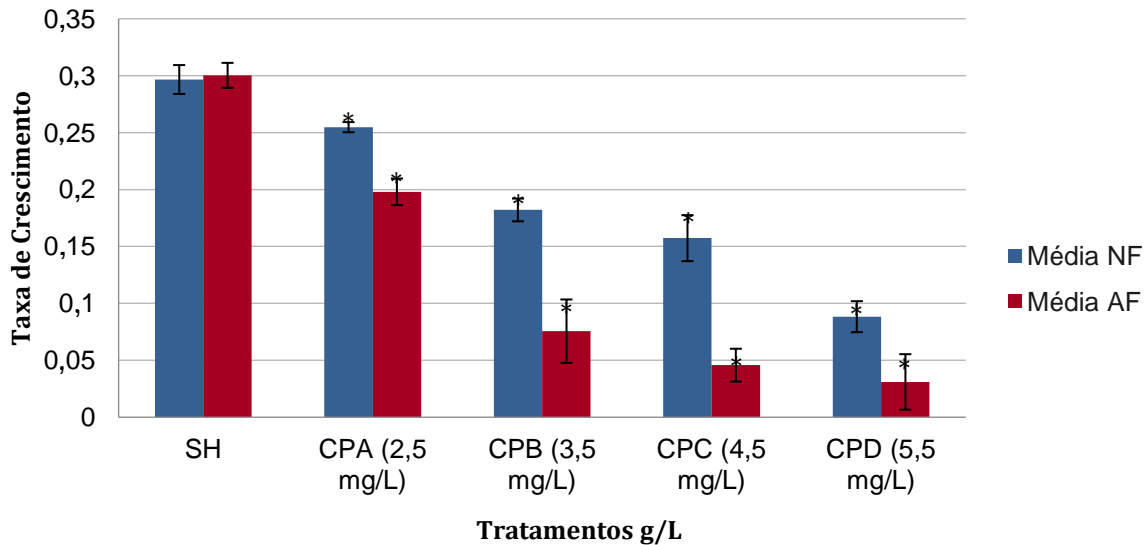
Com os valores da taxa, foi realizado o cálculo de média e desvio padrão, e para as análises estatísticas, incluíram-se a o teste de Shapiro-Wilk, a Análise de Variância e o Teste de Tukey no software Bioestat, com nível de significância estatística de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da Taxa de Crescimento

Após o cálculo da taxa de crescimento, foi realizado cálculo de média e desvio padrão, os resultados podem ser visualizados com a representação gráfica dos valores de média e desvio padrão na Figura 1.

Figura 1. Média da taxa de crescimento do número de frondes e da área foliar dos tratamentos. As colunas marcadas representam * = $p < 0,05$ quando comparados ao tratamento de solução hidropônica (0,0). A sigla de NF representa o número de frondes e AF a área foliar.



Fonte: Autoria própria.

Em relação às diferenças avaliadas estatisticamente, tem-se que tanto os valores do número de frondes quanto da área foliar apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$) após a análise de variância.

As médias apresentadas pelas diferentes concentrações de cloreto de sódio indicaram que a substância apresentou efeito direto perante a taxa de crescimento de *L. minor*, correspondendo a uma menor taxa de crescimento em maiores concentrações de cloreto de sódio. Por outro lado, a solução hidropônica obteve a média superior a todas as diluições de NaCl, evidenciando que a alteração do crescimento se deu por conta da substância de referência em si, e não por fatores externos, validando o ensaio reproduzido.

Todos os tratamentos apresentaram reações diferentes em relação aos parâmetros de AF e NF, onde todas as diluições de cloreto de sódio demonstraram que a área foliar foi o critério mais sensível, como relatado por Godoy *et al* (2017), e para a solução hidropônica, os dois

parâmetros obtiveram médias semelhantes, correspondendo a uma sensibilidade similar entre os critérios.

Efeitos ocasionados pelo NaCl como substância de referência

Nota-se que houve um decréscimo na taxa de crescimento conforme houve o aumento na dosagem de NaCl, demonstrando que os altos níveis de cloreto de sódio provocaram um estresse salino, que desencadeou a limitação de sua reprodutibilidade como uma resposta fisiológica das lentilhas d'água. Esse fenômeno foi reportado por Liu *et al* (2018), em seu estudo, onde conforme foi aumentada a concentração de NaCl, as lentilhas apresentaram uma inibição de seu crescimento e da síntese de clorofila.

Ademais, foi constatado que perante o estresse salino por NaCl, *L. minor* demonstrou danos oxidativos como mecanismo de defesa, apresentando uma maior sensibilidade no ápice de sua raiz (Panda & Upadhyay 2003), além de apresentar clorose, a qual ocorre devido a degradação dos cloroplastos em suas frondes e danos na membrana plasmática de suas células, ocasionando em estipes frágeis e frondes caídas (Liu *et al* 2018).

A aplicação do cloreto de sódio como substância de referência foi estudada por Godoy *et al* (2017), em que o composto se apresentou como uma alternativa adequada, viável e menos tóxica aos pesquisadores do que outras substâncias alternativas. Além disso, o parâmetro de área foliar se demonstrou como o mais sensível em comparação ao número de frondes, sugerindo a utilização da AF como parâmetro de escolha. Trabalhos realizados por Souza (2008) e Keppeler (2008) já haviam aplicado o NaCl como substância de referência.

No presente ensaio, todos os danos reportados para a *L. minor* também foram apresentados pelos estudos citados, demonstrando que a aplicação do cloreto de sódio como substância de referência é viável e de fácil reprodução.

Eficiência da Solução Hidropônica

No guia para testes de inibição de crescimento com *L. minor* fornecido pela OECD (2002), o controle negativo proposto foi o meio SIS (*Swedish Standard medium*), sendo que as lentilhas devem atingir um crescimento de aproximadamente sete vezes em sete dias de exposição para a validação do teste. Este parâmetro foi atingido pelo tratamento a solução hidropônica comercial utilizada no presente estudo, tanto no parâmetro de novas frondes formadas quanto de área foliar total.

Na literatura já foram constatadas a utilização de solução nutritiva para o cultivo de lentilhas d'água. Em um ensaio realizado por Proença, Oliveira & Rocha (2012), a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) foi utilizada tanto para o cultivo prévio, como para a aplicação no tratamento controle no estudo do efeito tóxico do cobre sobre o crescimento de *L. minor*. Liu, Dai & Sun (2016) também aplicaram a solução de Hoagland modificada para o cultivo e para os tratamentos, objetivando analisar o potencial de *L. minor* na remoção de nitrogênio e fósforo da água sob estresse salino. Bem como, Liu *et al* (2018) aplicou a solução de Hoagland como grupo controle para averiguar a acumulação de boro em *L. minor* sobre estresse salino. Ademais, Bassi & Sharma (1993) utilizaram a solução de Hoagland & Arnon (1938) diluída em água destilada como forma de cultivo prévio para a avaliação de mudanças no teor de prolina e a relação com a absorção de zinco e cobre por *L. minor*. A aplicação das diferentes soluções vem apresentando resultados adequados e satisfatórios como meio de comparação em agrupamento controle, da mesma maneira que o obtido pela solução hidropônica comercial estudada no presente trabalho.

A composição da solução hidropônica pode variar de acordo com o requerimento nutricional da espécie a ser cultivada. No presente trabalho, a solução em questão é destinada ao cultivo de hortaliças no geral, sendo uma solução comercial, de fácil obtenção, acessível, de fácil manuseio e prática que apresentou resultados adequados aos requeridos pela norma

OECD (2002). Além disso, os valores de AF e NF obtidos não apresentaram diferenças consideráveis na taxa de crescimento, portanto, ambos os parâmetros podem ser aplicados para ensaios de sensibilidade com a solução hidropônica padronizada, demonstrando mais uma vantagem em sua utilização.

CONCLUSÃO

A solução hidropônica se demonstrou ser uma alternativa viável e adequada para utilização como meio de cultivo em testes de toxicidade com *L. minor*. Onde segundo os parâmetros de número de frondes e área foliar, a taxa de crescimento da macrófita alcançou o esperado pela norma OECD (2002).

Vantagens como a acessibilidade, ser de fácil obtenção, manuseio e aplicação são apresentadas pela utilização da solução padronizada. Bem como, ao se comparar as médias de área foliar e número de frondes, ambas se apresentaram similares, não diferindo em questão de sensibilidade, atribuindo a escolha do melhor parâmetro para os pesquisadores de acordo com o objetivo do futuro ensaio.

REFERÊNCIAS

AMATUZZI, M.L.L., BARRETO, M.C.C., LITVOC, J. & LEME, L.E.G. 2006. Linguagem metodológica - Parte 1. *Acta Ortop Bras.* 14(1): 53-56.

AMORIM, M.J.B., NATAL-DA-LUZ, T., SOUSA, J.P., LOUREIRO, S., BECKER, L., RÖMBKE, J. & SOARES, A.M.V.M. 2012. Boric acid as reference substance: pros, cons and standardization. *Ecotoxicology.* 2:919-924.

ALMEIDA, A.C.R. 2018. *Avaliação do potencial de Lemna minor l. Como bioindicador de toxicidade em águas residuais.* 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2018.

BASSI, R. & SHARMA, S. 1993. Changes in proline content accompanying the uptake of Zinc and Copper by *Lemna minor*. *Annals of Botany.* 72:151-154.

CANADA. 2007. Environment And Climate Change. Biological test method: test for measuring the inhibition of growth using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor* - method development and applications section. Ottawa, Canada: Environmental Technology Centre. Disponível em: < <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/wildlife-research-landscape-science/biological-test-method-publications/inhibition-growth-freshwater-macrophyte/chapter-1.html>> Acesso em: 18 mar. 2021.

COSTA, C.R., OLIVI, P., BOTTA, C.M.R. & ESPINDOLA, E.L.G. 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*. 31(7): 1820-1930.

GODOY, A.A., CARVALHO, L.B., KUMMROW, F. & PAMPLIN, P.A.Z. 2017. Sodium chloride as a reference substance for the three growth endpoints used in the *Lemna minor* L. (1753) test. *Rer. Ambient. Água*. 12(1): 8-16.

GOURMELON, A. & AHTIAINEN, J. 2007. Developing Test Guidelines on invertebrate development and reproduction for the assessment of chemicals, including potential endocrine active substances—The OECD perspective. *Ecotoxicology*. 16:161-167.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D. I. 1938. *The water culture method for growing plants without soils*. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D. I. 1950. *The water culture method for growing plants without soils*. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p.

KEPPELER, E.C. 2009. Toxicity of sodium chloride and methyl parathion on the macrophyte *Lemna minor* (Linnaeus, 1753) with respect to frond number and chlorophyll. *Biotemas*. 22(3): 27-33.

KISS, I., KOVÁTS, N. & SZALAY, T. 2003. Evaluation of some alternative guidelines for risk assessment of various habitats. *Toxicology Letters*. 140: 411-417. <[https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00037-7)>

LIU, C. DAI, Z. & SUN, H. 2016. Potential of duckweed (*Lemna minor*) for removal of nitrogen and phosphorus from water under salt stress. *Journal of Environmental Management*. 1-7. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.11.006>>

LIU, C., GU, W., DAI, Z., LI, J, JIANG, H. & ZHANG, Q. 2018. Boron accumulation by *Lemna minor* L. under salt stress. *Sci Rep*. 8(8954): 1-6. <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27343-y>>

LUZ, J.M.Q., GUIMARÃES, S.T.M.R. & KORNDÖRFER, G.H. 2006. Produção hidropônica de alface em solução nutritiva com e sem silício. *Horticultura Brasileira*. 24:295-300.

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

OECD Organization for Economic Cooperation and Development 2002. *Lemna sp. Growth Inhibition Test*. In: Guideline for testing of chemicals.

PADOVANI, C.A. 2014. *Delineamento de experimentos*. São Paulo: Cultura Acadêmica : Universidade Estadual Paulista. 128 p.

PANDA, S.K. & UPADHYAY, R.K. 2003. Salt stress injury induces oxidative alterations and antioxidative defence in the roots of *Lemna minor*. *Biologia Plantarum*. 48(2): 249-253.

PEREIRA, S.A., NASCIMENTO, I.A., LEITE, M.B.N.L., CRUZ, A.C., BARROS, D.A., ARAÚJO, V.Q., SAMPAIO, L.M.A. & NASCIMENTO, N.C. 2010. Sensibilidade de quatro organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chuii*, *Crassostrea rhizophorae* e *Echinometra lucunter*) ao dodecil sulfato de sódio: elaboração das cartas-controle. *Diálogos & Ciência*. 8(24): 1-11.

PLANTPAR. 2021. Kit Hidropônico Alface - Flex Vermelho + Flex Azul. Disponível em: <<https://plantpar.com.br/hidroponia/kit-hidroponico-alface-flex-vermelho-flex-azul-25-kg>> Acesso em: 22 abr. 2021.

PROENÇA, M.A., OLIVEIRA, L.L.D. & ROCHA, O. 2012. Efeito tóxico do cobre sobre o crescimento da macrófita aquática *Lemna minor*. *VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista*. 8(12): 196-207.

RÖMBKE, J. & AHTIAINEN, J. 2007. The search for the “ideal” soil toxicity test reference substance. *Integr Environ Assess and Manag*. 3:464-466.

SOUZA, J. P. 2008. *Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na Ausência e Presença de Sedimento*. 69 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

Artigo II

O presente artigo será submetido na Revista Brasileira de Biociências, as normas de formatação podem ser visualizadas no ANEXO I.

As figuras foram posicionadas no texto para facilitar a leitura do artigo, mas serão submetidas à parte no momento da publicação conforme normas da revista.

Uso da Lentilha D'água (*Lemna minor*) como bioindicador para avaliação da toxicidade da água do Córrego Barnabé, Indaiatuba, São Paulo.

ARTIGO II

Uso da Lentilha D'água (*Lemna minor*) como bioindicador para avaliação da toxicidade da água do Córrego Barnabé, Indaiatuba, São Paulo.

Giulia Cristina Andreoli de Souza^{1*} e José Augusto de Oliveira David^{1**}

Título resumido: Análise da qualidade da água de um córrego urbano em ensaio ecotoxicológico.

¹ Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Lauri Simões de Barros, Km 12 - SP-189 - Aracaçu, Buri - São Paulo, 18290-000, Brasil.

*giuliacandreoli@gmail.com

**josedavid@ufscar.br

Revista Brasileira de Biociências: <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/diretrizes.pdf>

Uso da Lentilha D'água (*Lemna minor*) como bioindicador para avaliação da toxicidade da água do Córrego Barnabé, Indaiatuba, São Paulo.

Resumo

Localizado no município de Indaiatuba, o Córrego Barnabé é considerado como um manancial de alto risco devido a sua localização em meio urbano, onde o trecho hídrico está submetido a diversos meios de contaminação. Sendo ele afluente do rio Jundiá e utilizado para abastecimento doméstico, torna-se necessário o monitoramento constante de sua qualidade. As macrófitas aquáticas da espécie *Lemna minor* possuem um grande potencial como bioindicadores, devido a fatores como sua importância ecológica e seu alto grau de sensibilidade a substâncias orgânicas e inorgânicas, refletindo, portanto, em sua taxa de crescimento. Objetivando a análise da toxicidade da água e das condições ofertadas para o desenvolvimento de organismos, o presente trabalho foi executado a partir das normas propostas pela OECD (2002), onde foi realizada a exposição de indivíduos de *L. minor* a água de cinco pontos do Córrego Barnabé, juntamente com um controle negativo com solução hidropônica e um controle positivo com diluição de NaCl, durante o período de sete dias. Para a análise da taxa de crescimento, foram utilizados o número de novas frondes formadas e o cálculo da área foliar. As análises estatísticas indicaram que a taxa de crescimento dos pontos diferiu com os tratamentos controle significativamente, mas não entre si. Corroborando com o princípio de que um ponto não é significativamente mais afetado que outro, mas que todos demonstraram uma taxa de crescimento inferior ao esperado pela padronização da OECD e o alcançado pelo grupo controle.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Macrófitas. Monitoramento ambiental.

Use of Duckweed (*Lemna minor*) as a bioindicator to assess the toxicity of water in the Barnabé Stream, Indaiatuba, São Paulo.

Abstract

Located in Indaiatuba, the Barnabé Stream is considered as a source of high risk due to their location in an urban area, where the water section is subject to various means of contamination. As it is a tributary of the Jundiá River and used for domestic supply, it is therefor necessary to constantly monitor their quality. The aquatic macrophytes of the species *Lemna minor* have great potential as bioindicators, due to factors such as their ecological importance and their high degree of sensitivity to organic and inorganic substances, reflecting therefore in their growth rate. Aiming at the analysis of water toxicity and the conditions offered for the development of organisms, the present study was carried out based on the standards proposed by the OECD (2002), where individuals of *L. minor* were exposed to water from five points of the Barnabé Stream, together with a negative control with hydroponic solution and a positive control with NaCl dilution, during a period of seven days. To analyze the growth rate, the number of new fronds formed and the calculation of leaf area were used. The statistical analyses indicated that the growth rate of the points differed with the control treatments significantly, but not among themselves. Corroborating the principle that one spot is not significantly more affected than another, but that all showed a lower growth rate than expected by OECD standardization and reached by the control group.

Key words: Ecotoxicology. Macrophytes. Environmental monitoring.

INTRODUÇÃO

Inserida na região Metropolitana de Campinas, o município de Indaiatuba possui cerca de 245.366 habitantes em uma área total de 311,55 km² (SEADE 2021). A localidade é representada pela Bacia dos Rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí - PCJ que compõem a Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHI 5. Dispondo de aproximadamente 11 km de extensão e uma vazão média de 230L/s (Camacho 2012), o Córrego Barnabé é um afluente do rio Jundiaí e é classificado como Classe 2 pelo Decreto Estadual nº 10.755 de 22-11-1977, portanto há a viabilidade de abastecimento e consumo humano após devido tratamento, o que de fato ocorre na zona Sudoeste do município, na qual reside cerca de 40.000 pessoas (Camacho 2012; Engecorps Engenharia S.A. 2013).

Por estar presente em um perímetro urbano, o mesmo pode ser impactado de diferentes maneiras (Engecorps Engenharia S.A. 2013). Em 1972, o Córrego era caracterizado como uma planície aluvial, pouco extensa e pouco comprida, entretanto, no decorrer dos anos o trecho sofreu diversas alterações em suas formas, primeiramente devido a implantação de lagoas artificiais, em que foi alterado o estado de planície e ao longo do tempo, por consequência do uso indevido para atividades comerciais, de serviço e lazer. Como resultado, parte da área do córrego não foi devidamente preservada (Araújo 2015) e atualmente é classificado como um manancial de alto risco submetido a contaminações pelo descarte clandestino de substâncias químicas e por vazamento das redes coletoras de esgoto (Engecorps Engenharia S.A. 2013).

Além disso, segundo o Plano de Bacias PCJ 2010-2020 fornecido pela Companhia Brasileira de Projetos e Empreendimentos - COBRAPE (2010), Indaiatuba foi enquadrada como o décimo município que mais contribui com a poluição das Bacias PCJ com a geração de resíduos sólidos, bem como, dentre suas principais atividades industriais, são destaques a metalurgia e a indústria têxtil e de confecções, as quais consequentemente possuem um forte impacto no meio ambiente.

É notório que alterações nos ambientes terrestres possuem impactos em ambientes aquáticos, uma vez que ambos estão interconectados (Thushari & Serevirathna, 2020). Trechos hídricos inseridos em ambientes urbanos estão submetidos a impactos relacionados ao constante crescimento populacional ao decorrer dos anos, correspondendo a um maior despejo de resíduos e substâncias químicas, corroborando com a degradação ambiental (Abreu & Cunha 2015).

A partir da exposição de um organismo a um agente poluente, o mesmo pode ser metabolizado, transformado, degradado, eliminado e/ou acumulado, desenvolvendo até mesmo uma intoxicação (Sisinno & Oliveira-Filho 2013). A intoxicação em suas diferentes nuances originará um efeito adverso, podendo ser correspondente a alterações genéticas, bioquímicas, morfológicas ou fisiológicas. Todavia, cada sistema biológico irá apresentar diferentes respostas com relação a sua sensibilidade e tolerância característica, variando de indivíduo para indivíduo e entre espécies (Sisinno & Oliveira-filho 2013).

As macrófitas são espécies ecologicamente importantes devido ao seu posicionamento no primeiro nível da cadeia alimentar aquática e por servirem como abrigo para outros organismos. Além disso, o táxon tem atividade fundamental durante o processo de ciclagem de nutrientes, bem como, pode atuar na proteção das margens de corpos d'água e na remoção do excesso de elementos tóxicos e aqueles com potencial eutrofizante (Souza 2008, Alkimin *et al* 2020).

Dentre elas, as macrófitas aquáticas como *Lemna minor* são muito recomendadas e utilizadas em testes ecotoxicológicos devido a sua alta sensibilidade a substâncias orgânicas e inorgânicas como pesticidas, surfactantes, efluentes e metais pesados (Souza 2008), em decorrência disso, elas podem oferecer dados em relação à qualidade da água e a exposição a contaminantes, sendo eles principalmente referentes à sua taxa de crescimento (Kiss, Kováts & Szalay 2003, Ifayefunm, Mirsebasov & Synzynys 2020).

A recomendação de sua utilização como bioindicador é relativamente recente, sendo ela sugerida por especialistas da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), em 1996, e da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) (Kiss, Kováts & Szalay 2003). As normas propostas pela OECD são referentes à descrição da metodologia de testes de toxicidade com organismos do gênero *Lemna*, incluindo recomendações sobre condições de cultivo.

Os organismos do gênero *Lemna* (Lentilha d'água) são angiospermas e monocotiledôneas flutuantes, caracterizadas por não enraizar em sedimentos e com um curto tempo de geração (Alkimin *et al* 2020). Apresentam um fácil manejo e rápido crescimento em condições laboratoriais ótimas (Kiss, Kováts & Szalay 2003), sua reprodução ocorre através da formação de novas frondes brotadas a partir da borda de folhas mais velhas (Souza 2008). São plantas aquáticas de pequeno tamanho e que apresentam raízes e folhas reduzidas, apesar de serem comumente confundidas com algas, elas são macrófitas portadoras de sistema vascular, com o desenvolvimento de flores e frutos e com reprodução assexuada (Barbosa *et al* 2017).

A escassez de dados referentes à qualidade da água do Córrego Barnabé, acarretou no propósito do presente trabalho, o qual objetiva avaliar a qualidade da água do Córrego Barnabé através do desenvolvimento de um ensaio ecotoxicológico, mediante a exposição de indivíduos da espécie *L. minor*.

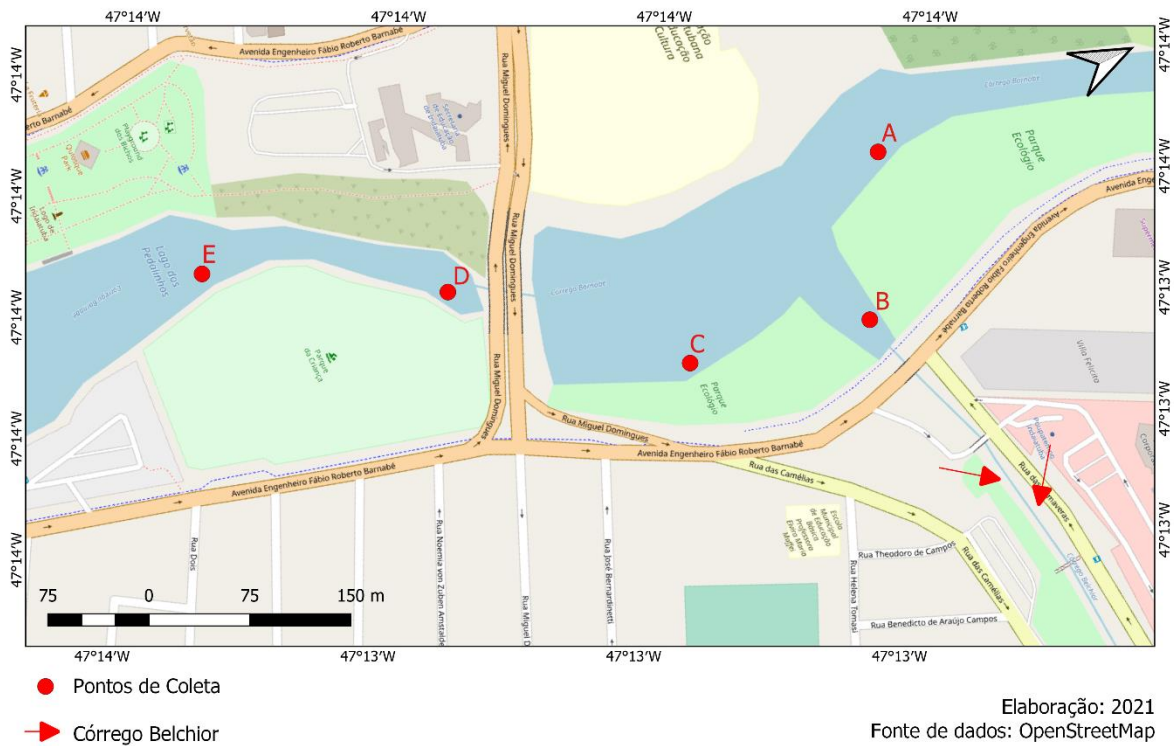
MATERIAL E MÉTODOS

Coleta da Água

Foram coletadas amostras de aproximadamente 500 mL de água de cada um dos 5 locais de coleta selecionados ao longo do Córrego Barnabé. O material foi transportado sob refrigeração e mantido vedado até a montagem do experimento.

Os pontos A, B e C (Figura 1) foram escolhidos devido ao contato do Córrego Belchior com o Córrego Barnabé, a fim de averiguar a influência do afluente em relação a um maior despejo de efluentes e conseqüentemente a uma diminuição da qualidade da água e seu respectivo impacto sobre o crescimento da macrófita. Já os pontos D e E (Figura 1) foram escolhidos em virtude da presença do Parque Aquático da Criança e do Parque Temático, que porventura atraem diariamente um grande volume de cidadãos, principalmente aos finais de semana, fato que pode corroborar com um maior descarte de resíduos e poluição.

Figura 1. Mapa de localização dos pontos de coleta no Córrego Barnabé, onde as setas indicam a localização do Córrego Belchior.



Fonte: Autoria própria.

Teste de Toxicidade

As lentilhas foram mantidas em laboratório por 3 meses para aclimação antes da montagem do experimento. Para isso, ficaram em aquários de vidro com solução hidropônica

para alface, temperatura ambiente e iluminação de 12h de claro e 12h de escuro. A solução hidropônica foi trocada a cada 20 dias.

A exposição ocorreu durante o período de 7 dias, seguindo as recomendações estabelecidas pela norma OECD (2002). Foram utilizados frascos de vidro de capacidade de 200 mL, esterilizados e cobertos com plástico filme, contendo pequenos furos a fim de possibilitar as trocas gasosas dos organismos com o meio. Cada frasco recebeu 50 mL de água dos pontos do Córrego Barnabé. Além dos tratamentos com a água do córrego, foram aplicados testes de controle, sendo um controle negativo com solução e um controle positivo com a diluição de Cloreto de Sódio a 5,5 mg/L. Foram realizadas 5 repetições para os tratamentos de água do córrego e 3 repetições dos tratamentos de controle negativo e positivo. Durante o experimento, os frascos foram mantidos em incubadora BOD com temperaturas mínima de 24,1 °C e máxima de 33,6 °C, sob iluminação constante. Em cada frasco foram depositadas 12 frondes de lentilha d'água, priorizando os indivíduos com 4 frondes cada.

Análise de Dados

No início e final do experimento foram mensurados, com o auxílio do programa ImageJ, o número de frondes e a área foliar total por tratamento. Para a análise do crescimento das macrófitas utilizando estes dois parâmetros foi aplicado o cálculo da taxa de crescimento seguindo a equação proposta pela norma OECD (2002), sendo:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i}$$

Onde:

μ_{i-j} : taxa média de crescimento entre o tempo i e j

N_i : número de folhas/área observadas no tempo i (início)

N_j : número de folhas/área observadas no tempo j (final)

t_i : momento início da exposição

t_j : momento final da exposição

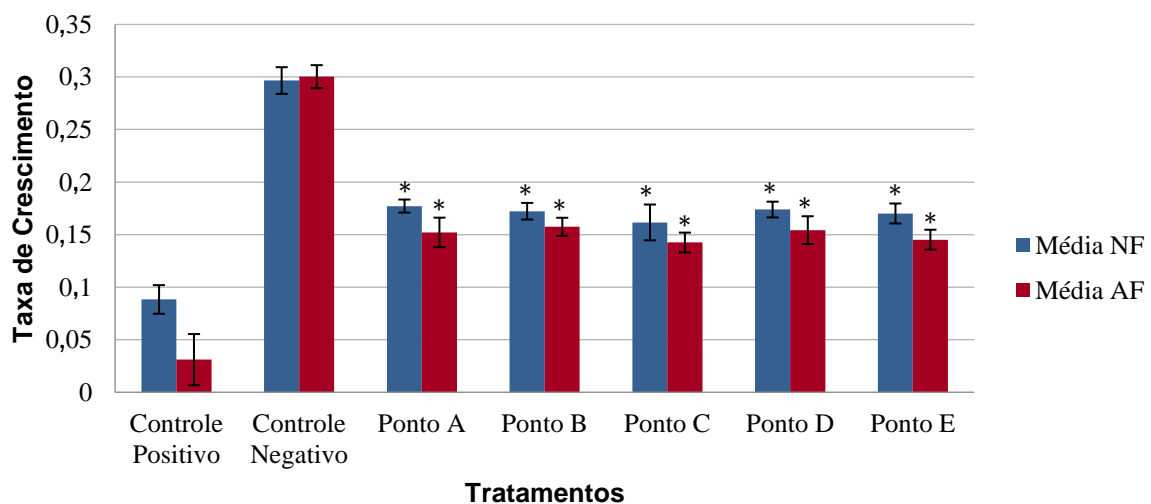
Foram aplicadas análises de média e desvio padrão, bem como, com o auxílio do software BioEstat 5.0 foi realizada o teste de normalidade Shapiro-Wilk, a Análise de Variância (ANOVA) e o Teste de Tukey a fim de averiguar se houve diferença significativa entre os tratamentos. O nível de significância aplicado foi de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise da Taxa de Crescimento

Os valores de média e desvio padrão sobre a taxa de crescimento podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2. Representação gráfica das médias dos tratamentos em relação as taxas de crescimento, tanto do número de frondes como da área foliar. Os tratamentos marcados representam $*$ = $p < 0,05$ quando comparados à controle positivo e controle negativo. Os valores de NF correspondem ao cálculo do número de frondes e o AF à área foliar.



Fonte: Autoria própria

Ao averiguar os dados, nota-se que a média do controle positivo foi a que obteve uma menor taxa de crescimento perante os pontos do córrego, e dentre eles, o ponto C apresentou uma média inferior aos demais, entretanto não houve diferença significativa. Fato este que pode ser relacionado a sua localização próxima à rua Miguel Domingues, que sobrepassa o córrego e conseqüentemente pode estar associado a um maior acesso a poluentes. Trechos hídricos inseridos em ambientes urbanizados estão sujeitos a sedimentos oriundos de superfícies onde há a passagem de automóveis, incluindo processos de erosão, precipitação, limpeza de ruas e até mesmo a deposição de metais pesados associados a partes de veículos automotores, essas condições de contaminação podem ocorrer em função do processo de fonte-transporte-deposição (Poletto & Martinez 2011).

Seguido do ponto C, o ponto E apresentou a segunda média inferior, sendo válido ressaltar que não houve diferença significativa estatisticamente para este ponto, porém este dado pode corresponder a um efeito adverso da presença das atrações presentes no Parque Temático, tornando-se necessária a aplicação de um monitoramento em ambos os pontos, a fim de averiguar se a resposta obtida no presente estudo deve refletir aos demais pontos e se deve agravar ao decorrer dos anos.

Em uma comparação entre as médias, nota-se que o controle negativo foi o tratamento que melhor proporcionou condições e recursos de nutrientes para o desenvolvimento da macrófita.

Sensibilidade e Reprodutibilidade das Lentilhas

A resposta dos indivíduos nas diferentes repetições do tratamento de controle positivo impõe a percepção de que as Lemnas são sensíveis à exposição a uma substância tóxica, visto que seu crescimento foi limitado como uma resposta fisiológica à concentração de NaCl em seu meio de cultivo (Souza 2008), onde foi relatado este fenômeno no trabalho desenvolvido por

Liu *et al* (2018), constatando que altas concentrações de NaCl podem desencadear na inibição do crescimento e da síntese de clorofila em *L. minor*.

Segundo a norma OECD (2002), o número de frondes em um tratamento controle deve ser duplicado em aproximadamente 60h após o início da exposição, resultando em um crescimento de cerca de 7 vezes em 7 dias de exposição. No presente estudo, o aumento do número de frondes do controle negativo atingiu a recomendação, validado o ensaio realizado, entretanto a taxa de crescimento dos pontos do córrego não foi alcançada como esperado, supondo a hipótese de que a *L. minor* teve seu crescimento limitado devido à presença de uma substância tóxica nos pontos de coleta do córrego ou se houve a restrição de nutrientes necessários para o seu desenvolvimento.

Além disso, em relação a aspectos macroscópicos, foram observados ao fim do experimento que as frondes apresentavam uma coloração mais clara, bem como, alguns indivíduos apresentaram frondes esbranquiçadas e quase transparentes (Figura 3), onde segundo Souza (2008) essas alterações podem ter relação com modificações na composição de clorofila nas macrófitas, desencadeando uma possível necrose ou clorose nas frondes.

A visualização da ocorrência da clorose em Lemnas se dá pela alteração da sua coloração, de verde para amarelo. O fenômeno é relatado em estudos de exposição à substâncias tóxicas em altas concentrações, sendo listado como um dos sintomas exibidos por Lemnas quando há uma intoxicação por metais pesados, como por exemplo o cádmio, no trabalho desenvolvido por Paczkowska, Kozłowska & Kozłowska (2007), e com metais como cobre, níquel, cádmio e zinco no trabalho de Khellaf & Zerdaoui (2009).

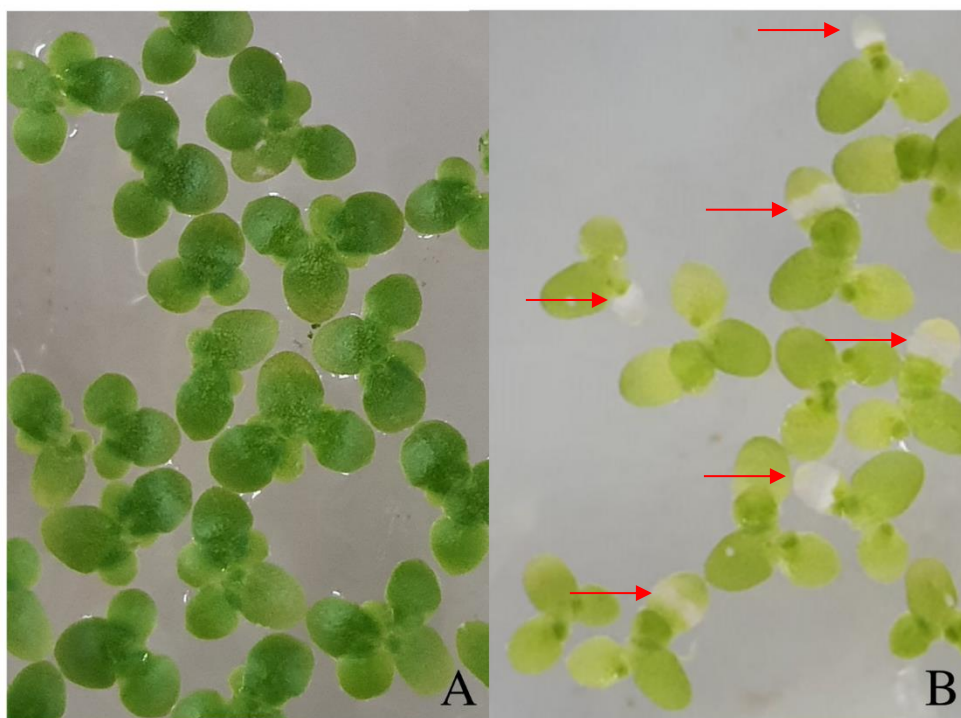
Em um estudo desenvolvido com *L. minor* como bioindicador de toxicidade de águas residuais, também foi observada a ocorrência de necrose e clorose nas frondes, juntamente com a inibição do crescimento dos organismos mesmo após exposição à água residual tratada. O trabalho demonstrou que esses fatores indicam que as macrófitas sofreram uma intoxicação

pela água (Almeida 2018). Dessa maneira, pode-se assumir que os indícios de clorose nas frondes expostas à água do Córrego Barnabé correspondem a uma toxicidade provocada às lentilhas.

O número de frondes é o parâmetro mais utilizado em testes com *L. minor* por ser simples, rápido e não invasivo, além da área foliar, que também é de fácil realização e permite medições ao longo do período de exposição (Godoy *et al* 2017). No presente estudo as médias do número de novas frondes formadas e da área foliar total dos tratamentos não obtiveram valores tão divergentes, somente no controle positivo. Entretanto, nota-se que a área foliar foi consideravelmente mais sensível em relação ao número de frondes. No estudo desenvolvido por Godoy *et al* (2017), foi constatado que a área foliar de *L. minor* foi a mais sensível perante a exposição a diversas concentrações de cloreto de sódio do que o número de frondes, bem como, em um ensaio de toxicidade do fármaco cloridato de propanol também demonstrou que a área foliar foi o parâmetro mais sensível (Godoy 2014).

Já no trabalho desenvolvido por Pereira (2021), tanto o número de frondes quanto a área foliar responderam similarmente em relação à diminuição da taxa de crescimento quando expostos à água residual, não demonstrando uma diferenciação entre os parâmetros. Dessa maneira, os dados apresentados anteriormente juntamente com o resultado do presente estudo reforçam a importância de aplicação de mais de um parâmetro, que pode se mostrar mais sensível ou não do que o cálculo do número de frondes.

Figura 3. Alterações na coloração de organismos de *L. minor* durante a exposição. As setas indicam pontos de necrose, a imagem A corresponde ao tratamento de controle negativo e a B corresponde ao ponto de coleta E, ambos ao final da exposição.



Fonte: Autoria própria

CONCLUSÃO

Os dados estatísticos apresentados sobre a taxa de crescimento, tanto do número de frondes quanto da área foliar, indicam que organismos de *L. minor* são sensíveis às alterações das propriedades da água em que são cultivadas, demonstrando uma resposta fisiológica como a limitação do seu crescimento.

A limitação do crescimento nos cinco pontos amostrados está correlacionada com as adversidades nas condições da água, em que não houve divergência significativa entre os diferentes pontos, mas que houve um impacto na média geral ao se comparar com o esperado estabelecido na norma OECD (2002) e atingido no tratamento de controle negativo. Demonstrando, portanto, que nos cinco pontos de coleta a qualidade da água do córrego foi

prejudicial para o desenvolvimento das macrófitas, refletindo em sua oferta de condições para o crescimento ideal dos organismos e apresentando fenômenos como a clorose, um indício de toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.H.M. & CUNHA, A.C. 2015. Qualidade da água em ecossistemas aquáticos tropicais sob impactos ambientais no baixo Rio Jari-AP: Revisão descritiva. *Biota Amazônia*, 5(2): 119-131. <<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v5n2p119-131>>
- ALKIMIN, G.D, SANTOS, J., SOARES, A.M.V.M. & NUNES, B.. 2020. Ecotoxicological effects of the azole antifungal agent clotrimazole on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 237: 1-8. <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108835>>
- ALMEIDA, A.C.R. 2018. *Avaliação do potencial de Lemna minor L. Como bioindicador de toxicidade em águas residuais*. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2018.
- ARAÚJO, L. S. 2015. *Análise da expansão urbana e implicações nas Áreas de Preservação Permanente (APP) e planícies aluviais com auxílio de geotecnologias no município de Indaiatuba (SP)*. 86 f. Dissertação (Trabalho de Conclusão de Curso em Geografia) - Instituto de Geociências da Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2015.
- BARBOSA, E.C.A., FIGUEIREDO, S.A., LOPES, R.M.B.P. & BARBOSA, G.S. 2017. Utilização de Macrófitas para o Tratamento da Água de Piscicultura. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL E SUSTENTABILIDADE, 5, 2017, João Pessoa. *Anais eletrônicos*. João Pessoa: Ecogestão Brasil, 2017, p.714-721.
- CAMACHO, L.R.N. 2012. *Avaliação da Qualidade de um Córrego Urbano com Relação com às Espécies Metálicas e Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA)*. 110 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- COBRAPE. 2010. Relatório final do Plano de Bacias PCJ 2010-2020. 2010. Disponível em: <https://www.comitespcj.org.br/images/Download/PB/PCJ_PB-2010-2020_RelatorioFinal.pdf> Acesso em 14 mai. 2021
- ENGEORPS ENGENHARIA S.A. 2013. Relatório Final do Plano Municipal de Saneamento Básico. Barueri, SP. Disponível em: <<http://www.indaiatuba.sp.gov.br/engenharia/pmsb/>>. Acesso em: 6 abr. 2021.
- GODOY, A.A. 2014. *Avaliação ecotoxicológica dos fármacos cloridrato de propranolol e losartana potássica, em ação individual e combinada, na macrófita Lemna minor L. (1753)*. 213 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) – Programa de Pós-

Graduação em Ciência e Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Alfenas, Poço de Caldas, 2014.

GODOY, A.A., CARVALHO, L.B., KUMMROW, F. & PAMPLIN, P.A.Z. 2017. Sodium chloride as a reference substance for the three growth endpoints used in the *Lemna minor* L. (1753) test. *Rer. Ambient. Água*. 12(1): 8-16.

IFAYEFUNM, O.S., MIRSEABASOV, O.A. & SYNZYNYYS, B.I. 2020. Indirect assessment of internal irradiation from tritium decay on Lemna Minor duckweed. *Nuclear Engineering and Technology*, 2-9. <<https://doi.org/10.1016/j.net.2020.12.011>>

KHELLAF, N. & ZERDAOUI, M. 2009. Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal pollution. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 6(3): 161-166.

KISS, I., KOVÁTS, N. & SZALAY, T. 2003. Evaluation of some alternative guidelines for risk assessment of various habitats. *Toxicology Letters*. 140: 411-417. <[https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(03\)00037-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(03)00037-7)>

LUI, C., GU, W., DAI, Z., LI, J, JIANG, H. & ZHANG, Q. 2018. Boron accumulation by *Lemna minor* L. under salt stress. *Sci Rep*. 8(8954): 1-6. <<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27343-y>>

OECD Organization for Economic Cooperation and Development 2002. *Lemna sp. Growth Inhibition Test*. In: Guideline for testing of chemicals.

PACZKOWSKA, M., KOZLOWSKA, M. & GOLINSKI, P. 2007. Oxidative Stress Enzyme Activity in *Lemna Minor* L. Exposed to Cadmium and Lead. *Acta biológica cracoviensia*. 49(2):33-37.

PEREIRA, G.R.T.P. 2021. *Avaliação do crescimento da macrófita Lemna minor L. e da microalga Chlorella vulgaris Beyerinck (Beijerinck), numa água residual proveniente da ETAR da Quinta do Conde*. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente) Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2021.

POLETO, C. & MARTINEZ, L.L.G. 2011. Sedimentos Urbanos: Ambiente e Água. *HOLOS Environment*. 11(1): 1-15.

SEADE Sistema Estadual de Análise de Dados. 2021. Perfil dos Municípios Paulistas - Indaiatuba. Disponível em:<<https://perfil.seade.gov.br/>> Acesso em 06 abr. 2021

SISINNO, C.L.S. & OLIVEIRA-FILHO, E.C.O. 2013. *Princípios de Toxicologia Ambiental: Conceitos e Aplicações*. Editora Interciência: Rio de Janeiro, 216 p.

SOUZA, J. P. 2008. *Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para Daphnia magna, Poecilia reticulata e Lemna minor na Ausência e Presença de Sedimento*. 69 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

THUSHARI, G.G.N.; SEREVIRATHNA, J.D.M. 2020. Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon*. 6 (8):16.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ensaio com a padronização da solução hidropônica apresentou valores tanto de número de frondes quanto de área foliar elevados similarmente, diferentemente do tratamento com cloreto de sódio, que demonstrou a parâmetro de área foliar mais sensível e consequentemente apresentou uma média da taxa de crescimento baixa, como esperado para uma solução de referência. Dessa maneira, diante do dados apresentados anteriormente, juntamente com as vantagens como a elevada taxa de crescimento, acessibilidade, custo baixo e ser de fácil aplicação garantem a solução nutritiva comercial a viabilidade de aplicação como um meio de cultivo padronizado em futuros ensaios com *Lemna minor*.

Já a aplicação da solução hidropônica como tratamento controle na avaliação da toxicidade do Córrego Barnabé permitiu a comparação dos efeitos ocasionados pela água, como a taxa de crescimento baixa, tanto em questão de número de frondes quanto de área foliar, com maior sensibilidade na área foliar, bem como, foram observados macroscopicamente a presença de clorose nas lentilhas após a exposição. Constatando, portanto, que a água dos diferentes pontos não apresentou diferenciação significativa entre si, mas que todos apresentaram indícios de intoxicação em *L. minor*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, C.H.M.; CUNHA, A.C. Qualidade da água em ecossistemas aquáticos tropicais sob impactos ambientais no baixo Rio Jari-AP: Revisão descritiva. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 5, n. 2, p. 119-131, 2015.
- ALKIMIN, G.D. *et al.* Ecotoxicological effects of the azole antifungal agent clotrimazole on the macrophyte species *Lemna minor* and *Lemna gibba*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 237, p. 1-8, 2020.
- AMORIM, L.C.A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologia**, Minas Gerais, v. 6, n. 2, p. 159-170, 2003.
- ARIAS, A.R.L. *et al.* Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 61-72, 2007.
- BASSI, R. & SHARMA, S.. Chances in proline content accompanying the uptake of Zinc and Copper by *Lemna minor*. **Annals of Botany**. v. 72, p.151-154, 1993.
- FESB – CETESB. **Estudos efetuados na represa de Americana e no trecho do Rio Atibaia, a montante do reservatório**. Relatório Técnico. São Paulo. p. 67,1971.
- FRANÇA, J.B.A. *et al.* A Utilização da Lentilha D'água (*Lemna Minor*) e do Peixe Guarú (*Phalloceros Caudimaculatus*) Como Bioindicadores na Ecotoxicologia. **7ª Jornada Acadêmica 2013**. Unidade Universitária de Santa Helena de Goiás, 2013.
- LIU, C., GU, W., DAI, Z., LI, J, JIANG, H. & ZHANG, Q. Boron accumulation by *Lemna minor* L. under salt stress. **Sci Rep**. v. 8, n.8954, p. 1-6, 2018.
- MAFFAZZIOLI, T.F. **Eficiência de Ensaios Ecotoxicológicos na Detecção de Toxicidade em Efluentes de Refinaria de Petróleo**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, 2011.
- MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas Aquáticos. **Oecol. Bras.** n. 3, v. 12, p. 355-381, 2008
- NÓBREGA, T.F. **Uso de espécies nativas em ensaios ecotoxicológicos para avaliar a qualidade de água e sedimento da Bacia Hidrográfica do Rio Doce, RN**. 2019. Dissertação (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.
- PROENÇA, M.A., OLIVEIRA, L.L.D. & ROCHA, O. Efeito tóxico do cobre sobre o crescimento da macrófita aquática *Lemna minor*. **VIII Fórum Ambiental da Alta Paulista**. n. 8, v.12, p.196-207, 2012.
- RIBEIRO, N.U.F.; AMÉRICO-PINHEIRO, J.H.P. Peixes como Bioindicadores de Agrotóxicos em Ambientes Aquáticos. **Anap Brasil**, v. 11, n. 22, p. 65-75, 2018.

RUBINGER, C.F. **Seleção de Métodos Biológicos para a Avaliação Toxicológica de Efluentes Industriais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

SILVA, D.C.V.R.; POMPEO, M. & PAIVA, T.C.B. A Ecotoxicologia no Contexto Atual no Brasil. **Ecotoxicologia**, São Paulo, Capítulo 22, p. 340-353, 2015.

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C.O. **Princípios de Toxicologia Ambiental: Conceitos e Aplicações**. Editora Interciência: Rio de Janeiro, 216 p., 2013.

SOUZA, J. P. **Toxicidade Aguda e Risco Ambiental do Diflubenzuron para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na Ausência e Presença de Sedimento**. 2008. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 1, p. 151-173, 1977.

ANEXO A: Diretrizes para Submissão



DIRETRIZES PARA OS AUTORES

Versão atual, deste documento, disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/public/diretrizes.pdf>

SUMÁRIO DO PROCESSO DE SUBMISSÃO

Manuscritos deverão ser submetidos por um dos autores, em português, inglês ou espanhol. Para facilitar a rápida publicação e minimizar os custos administrativos, **a Revista Brasileira de Biociências aceitará somente submissões on-line. Não envie documentos impressos pelo correio.** O processo é compatível com os navegadores Internet Explorer versão 3.0 ou superior, Netscape Navigator e Mozilla Firefox. Outros navegadores não foram testados.

O autor da submissão será o responsável pelo manuscrito no envio eletrônico e em todo o acompanhamento do processo de avaliação.

Figuras e tabelas deverão ser organizadas em arquivos submetidos separadamente, como documentos suplementares. Documentos suplementares de qualquer outro tipo, como filmes, animações, ou arquivos de dados originais, podem ser submetidos como parte da publicação. Se você estiver usando o sistema de submissão on-line pela primeira vez, vá para a página de Cadastro e registre-se, criando um 'login' e 'senha'.

Se você está realmente registrado, mas esqueceu seus dados e não tem como acessar o sistema, clique em 'Esqueceu sua senha'.

Você verá que o processo de submissão on-line é fácil e auto-explicativo. São apenas 5 (cinco) passos. Se você tiver problemas de acesso ao sistema, cadastro ou envio de trabalhos, por favor, entre em contato com o nosso Suporte Técnico.

CUSTOS DE PUBLICAÇÃO

Os autores não terão nenhuma despesa para a publicação dos seus trabalhos. Figuras e gráficos coloridos também são livres de despesas (ver adiante).

Seguindo a política do Open Access do Public Knowledge Project, assim que publicados, os autores receberão a URL que dará acesso ao arquivo em formato Adobe® PDF (Portable Document Format). Os autores não receberão cópias impressas do seu manuscrito publicado.

PUBLICAÇÃO E PROCESSO DE AVALIAÇÃO

Durante o processo de submissão, será solicitado que os autores enviem uma carta de submissão, explicando o porquê de publicar na Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo.

Os manuscritos serão enviados para avaliadores, a menos que não se enquadrem no escopo da Revista. Antes de serem submetidos para consultores especializados, os trabalhos são avaliados pelo Editor-Chefe, o qual decide se o trabalho recebido é de suficiente relevância para a Revista Brasileira de Biociências. Os trabalhos serão sempre avaliados por dois especialistas que terão a tarefa de fornecer um parecer, tão logo quanto possível. Um terceiro avaliador poderá ser consultado caso seja necessário. Os avaliadores não serão obrigados a assinar os seus relatórios de avaliação.

Uma "**Carta de submissão**", explicando o motivo de publicar em nossa Revista, a importância do seu trabalho para o contexto de sua área e a relevância científica do mesmo, deverá ser digitada no campo "**Comentários ao Editor**", durante o processo de submissão eletrônica. Caso os autores decidam enviar uma versão assinada (em formato DOC ou PDF, por exemplo), a Carta de submissão pode ser enviada na forma de documento suplementar, separadamente.

Os autores **deverão fornecer informações de contato detalhado (e-mail) de pelo menos**

quatro potenciais revisores para o seu trabalho. Estas informações deverão ser digitadas, também, no campo “Comentários ao Editor”, durante a submissão, logo após a “Carta de submissão”. Os potenciais revisores deverão ser especialistas na área de concentração do trabalho enviado. **Qualquer um dos revisores sugeridos não deverá ter publicado qualquer trabalho com os autores nos últimos cinco (5) anos, nem ser membro da mesma Instituição.** Revisores sugeridos serão considerados revisores em potencial de acordo com a análise e recomendação dos Editores.

Desde que um manuscrito é avaliado, aceito, revisado e editorado, ele é imediatamente publicado na edição corrente da Revista Brasileira de Biociências, em formato PDF. Todos os autores têm a capacidade de acompanhar o progresso de submissão do seu trabalho no sistema a qualquer tempo, desde que esteja logado no sistema da revista.

PREPARANDO OS ARQUIVOS

Os textos deverão ser formatados em **uma coluna, usando a fonte Times New Roman, tamanho 12, com espaçamento duplo e todas as margens com uma polegada (2,54 cm), em formato de papel A4.** Todas as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Não numere as linhas. O manuscrito deverá estar em formato Microsoft® Word DOC (versão 2 ou superior). Arquivos Revista Brasileira de Biociências em formato RTF também serão aceitos. Não submeta arquivos em formato Adobe® PDF.

O arquivo que contém o texto principal do manuscrito não deverá incluir qualquer tipo de figura ou tabela. **Estas deverão ser submetidas como documentos suplementares, separadamente.**

Ao submeter um manuscrito, o autor responsável pela submissão deverá optar por uma das seguintes seções: ‘Artigo completo’, ‘Revisão’ ou ‘Nota científica’.

Todos os trabalhos submetidos no envio on-line deverão subdivididos nas seguintes seções:

1. Documento Principal:

Primeira página. Deverá conter as seguintes informações:

a) Título do trabalho, conciso e informativo, com a primeira letra em maiúsculo, sem abreviações.

b) Nome completo e por extenso do(s) autor(es), com iniciais em maiúsculo.

c) Título resumido do trabalho, com até 75 caracteres (incluindo espaços).

d) afiliações e endereço completo de todos os autores (instituição financiadora (auxílio ou bolsas), deverá constar nos Agradecimentos).

e) Autor para contato e respectivo e-mail (apenas o autor para contato deverá fornecer um e-mail).

Segunda página. Deverá conter as seguintes informações:

a) Resumo: incluir o título do trabalho em português, quando o trabalho for escrito em inglês.

b) Abstract: incluir o título do trabalho em inglês, quando o texto for em português. Tanto Resumo como Abstract deverão conter, no máximo, 250 (duzentos e cinquenta) palavras, estruturados em apresentação, contendo o contexto e proposta do estudo, resultados e conclusões (por favor, omita os títulos).

c) Palavras-chave e key words para indexação: no máximo cinco, não devendo incluir palavras do título.

Páginas subsequentes. ‘Artigos completos’ e ‘Notas científicas’ deverão estar estruturados em **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (Resultados e Discussão podendo ser reunidos), Agradecimentos e Referências,** seguidos de uma **lista completa das legendas das figuras e tabelas** (se forem submetidas como documentos suplementares).

2. Documentos Suplementares:

Figuras e tabelas. Todas as imagens (ilustrações, fotografias, fotomicrografias, eletromicrografias e gráficos) são consideradas ‘figuras’. **Figuras e tabelas devem ser fornecidos como arquivos separados (documentos suplementares), nunca incluídos no texto do documento principal.** Figuras coloridas serão permitidas e os editores estimulam que os autores assim o façam. **Não haverá cobrança de custos adicionais para figuras a cores,** já que a impressão das mesmas (quando houver) será sempre feita em preto e branco

A Revista Brasileira de Biociências **não aceitará figuras submetidas no formato GIF ou comprimidas em arquivos do tipo RAR ou ZIP.**

Se as figuras no formato TIFF são um obstáculo para os autores, por seu tamanho muito elevado, os autores podem convertê-las para o formato JPEG, antes da sua submissão, resultando em uma significativa redução no tamanho. Entretanto, não se esqueça que a compressão no formato JPEG pode causar prejuízos na qualidade das imagens. Assim, é recomendado que os arquivos JPEG sejam salvos nas qualidades ‘Alta’ (High) ou ‘Máxima’ (Maximum).

Não forneça imagens em arquivos Microsoft® PowerPoint (geralmente geradas com baixa resolução), nem embebidas em arquivos do Microsoft Word (DOC). Arquivos contendo imagens em formato Adobe® PDF também não serão aceitas. **A submissão será arquivada se conter figuras em arquivos DOC, PDF ou PPT.**

Cada figura deverá ser editada para minimizar as áreas de espaços em branco, otimizando o tamanho final da ilustração. Se a figura consiste de diversas partes separadas, é importante que uma simples figura seja submetida, contendo todas as partes da figura.

Escalas das figuras deverão ser fornecidas com os valores apropriados e devem fazer parte da própria figura (inseridas com o uso de um editor de imagens, como o Adobe® Photoshop, por exemplo), sendo **posicionadas no canto inferior esquerdo de cada figura.**

Ilustrações em preto e branco deverão ser fornecidas com aproximadamente 300 dpi de resolução, em formato TIFF ou JPG. Para fotografias (em preto e branco ou coloridas), fotomicrografias ou eletromicrografias, forneça imagens em TIFF ou JPG, com pelo menos, 300 dpi. **ATENÇÃO!** Como na editoração final dos manuscritos o tamanho útil destinado a uma figura de largura de página (duas colunas) é de 170 mm, para uma resolução de 300 dpi, a largura mínima das figuras deve ser 2000 pixels. Para figuras de uma coluna (82 mm de largura), a largura mínima das figuras (para 300 dpi), deve ser pelo menos **1000 pixels. Submissões de figuras fora destas características (larguras mínimas em pixels) serão imediatamente arquivadas.**

As imagens que não contêm cor devem ser salvas como ‘grayscale’, sem qualquer tipo de camada (‘layer’), como as geradas no Adobe® Photoshop, por exemplo (estes arquivos ocupam até 10 vezes mais espaço que os arquivos TIFF e JPG).

Os tipos de fontes nos textos das figuras deverão ser Arial ou Helvetica. Textos deverão ser legíveis. Abreviaturas nas figuras (sempre em minúsculas) devem ser citadas nas legendas e fazer parte da própria figura, inseridas com o uso de um editor de imagens (Adobe® Photoshop, por exemplo). **Não use abreviaturas, escalas ou sinais (setas, asteriscos), sobre as figuras, como “caixas de texto” do Microsoft® Word.**

Recomenda-se a criação de uma única estampa, contendo várias figuras reunidas, numa largura máxima de 170 milímetros (duas colunas) e altura máxima de 257 Diretrizes para os autores mm (página inteira). **A letra indicadora de cada figura deve estar posicionada no canto inferior direito.** Inclua “A” e “B” (sempre em maiúsculas, não “a”, “b”) para distingui-las colocando, na legenda, Fig. 1A, Fig. 1B, e assim por diante.

Não envie figuras com legendas inseridas na base das mesmas. **As legendas das figuras deverão ser enviadas no final do documento principal,** imediatamente após as Referências.

Não use bordas de qualquer tipo ao redor das figuras. Se houver composição de figuras (Figs 1A, 1B, etc.), use cerca de 1 mm (12 pixels para uma figura com largura de 2000 pixels) de espaço em branco entre cada figura.

É responsabilidade dos autores obter a permissão para reproduzir figuras ou tabelas que tenham sido previamente publicadas.

Para cada figura, deverão ser fornecidas as seguintes informações: número da figura (em ordem numérica, usando algarismos arábicos (Figura 1, por exemplo; não abrevie) e a legenda detalhada, com até 300 caracteres (incluindo espaços).

Cada tabela deverá ser numerada sequencialmente, com números arábicos (Tabela 1, 2, 3, etc; não abrevie). O título das tabelas deverá estar acima das mesmas. **Tabelas deverão ser formatadas usando as ferramentas de criação de tabelas (‘Tabela’) do Microsoft® Word.** Colunas e linhas da tabela devem ser

visíveis, optando-se por usar linhas pretas que serão removidas no processo de edição final. Não utilize padrões, tons de cinza, nem qualquer tipo de cor nas tabelas.

Dados mais extensos podem ser enviados como arquivos suplementares, mas que não estarão disponíveis no próprio artigo, mas como links para consulta pelo público.

NORMAS GERAIS

Os nomes científicos, incluindo os gêneros e categorias infragenéricas, deverão estar em itálico. As siglas e abreviaturas, quando utilizadas pela primeira vez, deverão ser precedidas do seu significado por extenso. Ex.: Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Escrever os números até dez por extenso, a menos que sejam seguidos de unidade de medida, ou indiquem numeração de figuras e tabelas. **Utilize um espaço para separar as unidades de medidas dos valores (10 m, por exemplo).** A unidade de temperatura em graus Celsius deve ser escrito com um espaçamento entre o valor numérico (23 o C, por exemplo).

A posição preferencial de cada figura ou tabela **não deverá** ser indicada no texto. Isso ficará a critério do editor, durante a editoração. **Sempre verifique que as figuras e tabelas estejam citadas no texto.** No texto, use abreviaturas (Fig. 1 e Tab. 1, por exemplo). Evitar notas de rodapé. Se necessárias, utilizar numeração arábica em sequência.

As citações de autores no texto deverá seguir os seguintes exemplos: Baptista (1977), Souza & Barcelos (1990), Porto et al. (1979) e (Smith 1990, Santos *et al* 1995). Citar o(s) autor(es) das espécies só a primeira vez em que as mesmas forem referidas no texto. Citações de resumos de simpósios, encontros ou congressos deverão ser evitadas. Use-as somente se for absolutamente necessário. Comunicações pessoais não deverão ser incluídas na lista de Referências, mas poderão ser citadas no texto. A obtenção da permissão para citar comunicações pessoais e dados não publicados é de exclusiva responsabilidade dos autores. Abreviatura de periódicos científicos deverá seguir o Index Medicus/ MEDLINE.

Citações, nas Referências, deverão conter todos os nomes dos autores (não use et al.)

As referências deverão seguir **rigorosamente** os seguintes exemplos:

Artigos publicados em periódicos:

BONGERS, F., POPMA, J., MEAVE, J. & CARABIAS, J. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio*, 74: 55-80.

QUADRA, A. A. & AMÂNCIO, A. A. 1978. A formação de recursos humanos para a saúde. *Ciência e Cultura*, 30(12): 1422-1426.

ZANIN, A., MUJICA-SALLES, J. & LONGHIWAGNER, H. M. 1992. Gramineae: Tribo Stipeae. *Bol. Inst. Biocienc.* 51: 1-174. (Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul, 22).

Livros publicado por editoras:

CLEMENT, S. & SHELFORD, V. E. 1960. *Bioecology: an introduction*. 2nd ed. New York: J. Wiley. 425 p.

LOWE-MCCONNELL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge: Cambridge University Press. 382 p.

Capítulos de livro:

CEULEMANS, R. & SAUGIER, B. 1993. Photosynthesis. In: RAGHAVENDRA, A. S. (Ed.). *Physiology of Trees*. New York: John Wiley & Sons. p. 21-50.

N A K A T A N I, K . , B A U M G A R T N E R , G . & CAVICCHIOLI, M. 1997. Ecologia de ovos e larvas de peixes. In: VAZZOLER, A. E. A. M., AGOSTINHO A. A. & HAHN, N. S. (Eds.). *A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos*. Maringá: EDUEM. p. 281-306.

Anais de encontros, congressos, etc.:

CARNEIRO, F. G. 1997. Numerais em esferocristais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 49., 1997, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Ed. da UFMG. 1 CD-ROM.

SANTOS, R. P. & MARIATH, J. E. A. 2000. Embriologia de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: estudo da antera e grão de pólen e sua aplicação no melhoramento. In: WINGE, H. (Org.). CONGRESSO SUL-AMERICANO DA ERVA-MATE, 2., 2000, Encantado, RS e REUNIÃO

TÉCNICA DA ERVA-MATE, 3., 2000, Encantado, RS. *Anais...* Porto Alegre: UFRGS/FEPAGRO. p. 140-142. Revista Brasileira de Biociências

Dissertações de mestrado, doutorado.

DILLENBURG, L. R. 1986. *Estudo fitossociológico do estrato arbóreo da mata arenosa de restinga em Emboaba, RS*. 106 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1986.

Links de páginas disponíveis na Internet:

POLÍTICA. 1998. In: DICIONÁRIO da língua portuguesa. Lisboa: Priberam Informática. Disponível em: Acesso em: 8 mar. 1999.

THE INTERNATIONAL PLANT NAMES INDEX. 2012. Disponível em: Acesso em: 26 ago. 2012.

Para documentos com DOI® (Digital Object Identifier) conhecido, seguir o exemplo abaixo (não usar “Disponível em:Acesso em:....”): SANTOS, R.P., MARIATH, J.E.A. & HESSE, M. 2003. Pollenkit formation in *Ilex paraguariensis* A.St.Hil. (Aquifoliaceae). *Plant Syst. Evol.*, 237: 185-198.

Em trabalhos de taxonomia vegetal e florística, as seguintes normas específicas deverão ser observadas:

1. Chaves de identificação: dicotômicas, indentadas, utilizando alternativas 1-1'. Os táxons devem ser numerados em ordem alfabética, dentro de sua categoria taxonômica e na ordem em que aparecerão no texto.
2. As descrições devem ser sucintas e uniformes.
3. Autores de nomes científicos devem ser citados de forma abreviada, de acordo com Brummit & Powell (1992).
4. Citações e abreviaturas das Opus Princeps devem seguir Stafleu *et al.* (1976-1988). No caso de periódicos, seguir Bridson & Smith (1991). Como alternativa, seguir o International Plant Names Index (IPNI - <http://www.ipni.org/index.html>), onde as citações seguem as obras mencionadas acima.
5. Índice de nomes científicos citados no manuscrito: no caso de monografias, o índice deve relacionar, em ordem alfabética, os táxons abaixo do nível de gênero, sem os autores, colocando em

negrito a página onde inicia a descrição do táxon. Os nomes válidos devem ser citados em letra normal e os sinônimos em itálico.

6. Incluir a lista de exsicatas apresentadas no manuscrito: Schultz, A. : 12 (2.8-ICN), 25 (2.9-BLA, ICN)

12 e 25=números do coletor.

2.8=2 número do gênero e 8 número da espécie, no trabalho.

ICN=sigla do herbário onde está depositado o espécime citado.

Caso o trabalho trate apenas de um gênero:

Schultz, A. : 110 (3-ICN)

3=número da espécie.

No caso de dois ou mais coletores, citar apenas o primeiro. Se o coletor não tiver número de coleta: Barreto, I. L. : BLA 1325 (número do gênero e espécie, ou só o número da espécie).

7. Material examinado: deverá ser citado apenas material selecionado, um exemplar por município. Se a relação de material selecionado for muito extensa (ou se o autor não julgar necessário), citar todos os municípios. De modo a demonstrar a distribuição geográfica do táxon e não ultrapassar o número de páginas previstas, deverão ser citados apenas um ou poucos exemplares por região fisiográfica (Fortes 1959).

Quando forem dois coletores usar o &. Mais de dois coletores, citar o primeiro e usar o *et al.* Países, estados, municípios e localidades devem ser citados em ordem alfabética.

Exemplos:

BRASIL. RIO GRANDE DO SUL: **Torres**, 23 maio 1975, L.R. *Dillenburg* 17 (ICN);

Tupanciretã, 8 jul. 1977, L.R.M. *Baptista et al.* 911 (ICN); **Uruguaiana**, 25 mar. 1978;

M.L. *Porto s.n.* (ICN 2530); **Vacaria**, 1 abr. 1975, B. *Irgang & P. Oliveira* 45 (BLA, ICN).

Flora Ilustrada do Rio Grande do Sul:

1. *Lupinus albescens* Hook. & Arn., Bot. Misc. 3 : 201. 1833 (Fig. 1).

Sinonímia (citar o basônimo, quando for o caso. Citar outros sinônimos somente quando for estritamente necessário para o conhecimento do táxon na área estudada).

Descrição: baseada em material do Rio Grande do Sul, em dois parágrafos, vegetativo e reprodutivo.

Distribuição geográfica: geral e no Rio Grande do Sul, esta última utilizando as regiões fisiográficas de Fortes (1959). Não devem ser utilizados mapas com pontos de coleta no Rio Grande do Sul.

Habitat:

Observações:

Material selecionado: citar somente material do Rio Grande do Sul. Se necessário, por deficiência deste material, citar “material adicional examinado” de outras regiões.