



OTIMIZAÇÃO DE ENSAIO DE TOXICIDADE UTILIZANDO O BIOINDICADOR *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE

Aliny Inocência Oliveira Melo e Arraes¹, Sandra Regina Longhin²

¹ Tecnóloga em Química Agroindustrial, Instituto Federal de Goiás, Goiânia - Brasil

² Professora Doutora do Instituto Federal de Goiás e da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Brasil – srls@pucgoias.edu.br

Recebido em: 04/05/2012 – Aprovado em: 15/06/2012 – Publicado em: 30/06/2012

RESUMO

O sistema teste com *Allium cepa* colabora na avaliação do cenário de poluição ambiental e contaminação por substâncias químicas em ecossistemas aquáticos. A indicação de toxicidade pode ser observada pela inibição do crescimento das raízes e pelos efeitos adversos causados aos cromossomos celulares no vegetal. Alterações técnicas no teste *Allium cepa* foram feitas, ao longo dos anos, com a finalidade de se permitir uma avaliação mais abrangente de produtos químicos, como por exemplo, a de misturas complexas, que são a maioria das amostras ambientais, e de substâncias puras. Assim, o monitoramento ambiental torna-se uma ferramenta fundamental através do qual se pode avaliar o estado de preservação e/ou grau de degradação dos ecossistemas, fornecendo subsídios para a proposição de estratégias de conservação de áreas naturais e planos de recuperação dos ecossistemas degradados. O método aqui proposto visa a otimização dos trabalhos experimentais com o uso de *Allium cepa* como organismo teste e a obtenção de resultados confiáveis. O mesmo mostrou-se satisfatório quanto ao objetivo de se buscar a eficiência nos resultados e eficácia na parte experimental.

PALAVRAS-CHAVE: *Allium cepa*, toxicidade, sistema teste, otimização.

OPTIMIZATION OF TOXICITY TEST USING *Allium cepa* AS TEST ORGANISM

ABSTRACT

The *Allium cepa* test system supports a scenario of environmental pollution and contamination by chemicals in aquatic ecosystems. The indication of toxicity is observed by the inhibition of root growth and the adverse effects caused to the plant cell chromosomes. Technical changes in the *Allium cepa* were made over the years, with the purpose of allowing a more comprehensive assessment of chemicals, for example, complex mixtures, which are the most environmental samples, and pure substances. Thus, environmental monitoring becomes an essential tool, through which one can evaluate the state of preservation and/or degree of degradation of ecosystems, supporting the proposal of strategies for the conservation of natural areas and recovery plans degraded ecosystems. The proposed method aims at optimizing the experimental studies on the use of *Allium cepa* and reliable results. The same was satisfactory as to its objective of seeking efficiency and efficacy results in experimental part.

KEYWORDS: *Allium cepa*, toxicity, test system, optimization.

1 INTRODUÇÃO

As consequências dos impactos ambientais promovidas por ações antrópicas podem ser verificadas pelas alterações na qualidade das águas naturais e na perda da biodiversidade aquática, assim, as avaliações de concentrações dos agentes químicos presentes em um meio que se dão normalmente via de análises físicas e químicas podem, na busca de respostas mais precisas e rápidas sobre o cenário dos ecossistemas, serem apoiadas pelo uso de bioindicadores de qualidade que se mostrem eficazes tendo-se observado seu uso cada vez mais frequente.

Os organismos vivos são capazes de produzir um conjunto de informações sobre biodisponibilidade de substâncias contaminantes assim como sobre sua transferência para a cadeia alimentar, o que faz dos biossensores ótimas referências para avaliação da toxicidade.

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2004) define que a toxicidade é uma propriedade inerente à substância que produz efeitos danosos aos organismos expostos durante um determinado tempo, a uma concentração específica; esses efeitos adversos podem ser imobilidade, mortalidade, inibição da reprodução e redução do crescimento dos organismos teste.

Os ensaios toxicológicos são realizados com o objetivo de se determinar o efeito nocivo de agentes físicos, químicos e biológicos a diversos organismos avaliando-se assim o potencial de risco à saúde humana e a vida aquática, possibilitando um melhor controle e monitoramento da qualidade dos ecossistemas. Os testes toxicológicos com organismos aquáticos usados em estudos de efluentes líquidos e corpos receptores tem sido um importante instrumento para os órgãos públicos e privados de controle ambiental identificarem problemas de lançamento de misturas de substâncias tóxicas, estabelecerem prioridades de controle em regiões críticas e viabilizar as ações corretivas apropriadas.

O *Allium cepa* é um vegetal superior muito utilizado por pesquisadores em ensaios toxicológicos por meio da avaliação de parâmetros macroscópicos como alteração de cor, formato, tamanho da raiz e deformidade e ainda microscópicos como aberrações cromossômicas, pois são testes práticos, rápidos e eficientes (LONGHIN, 2008).

O presente estudo propõe uma otimização do método de análise experimental de ensaios de toxicidade com o bioindicador *Allium cepa*, por meio de observação do aspecto visual do crescimento radicular utilizando-se de imagens e com a medição deste crescimento acompanhada por um método computacional obtendo-se assim resultados confiáveis e em curto espaço de tempo, garantindo a integridade do organismo teste.

2 QUESTÕES AMBIENTAIS E BIOENSAIOS

A realidade sócio-ambiental brasileira dentro do cenário do crescimento do setor produtivo possui características como devastação ambiental afetando a biodiversidade; consciência ambiental bastante limitada da sociedade como um todo; fiscalização ineficiente e muita abertura nos parâmetros das leis ambientais; pouca eficiência nas medidas mitigadoras de degradação ambiental; distribuição de renda desigual agravando a miséria de alguns e gerando graves problemas ambientais (GOULART & CALLISTO, 2003).

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido modificados em escalas diferenciadas devido a consequência negativa de atividades antrópicas como construções de represas, mineração, eutrofização artificial, introdução de espécies exóticas, dentre outros (CALLISTO et al., 2005). A contaminação a partir destas

atividades que produzem metais pesados é preocupante, pois muitos são considerados poluentes, e alguns, mesmo em pequenas quantidades são importantes para a manutenção da vida; o que os torna ainda mais perigosos à saúde humana e dos animais aquáticos devido ao processo de bioacumulação que ocorre ao longo da cadeia alimentar, o que pode levar a, por exemplo, efeitos bioquímicos ou patológicos em peixes como redução do crescimento, fecundidade e sobrevivência, declínio na reprodução e abundância em nível populacional (SOUZA, 2010). Segundo MATSUMOTO & MARIN-MORALES (2004) apud AMARAL et al. (2007) certos metais em solução aquosa, podem atravessar a membrana celular ou entrar por processos de fagocitose ou pinocitose podendo causar danos à estrutura da molécula de DNA.

A cadeia produtiva da indústria petroquímica ligada a produção de derivados, em expansão a cada dia, deve considerar a segurança do meio ambiente já que estas atividades são altamente impactantes desde a extração até o refino dos produtos. Neste contexto, o meio aquático é o que causa maior preocupação pelos impactos de grande escala causados por vazamentos de óleos e efluentes das refinarias. Os organismos expostos aos derivados de petróleo podem ter seu material genético comprometido, além dos riscos a saúde humana e do meio biótico (LEME & MARIN-MORALES, 2007).

Os efluentes tratados ineficientemente e descartados no ambiente com alta carga poluidora mostram que ainda hoje não se têm um método adequado de tratamento estabelecido para resíduos líquidos ou efluentes industriais. Algumas substâncias tóxicas e persistentes tiveram seu uso proibido e foram substituídas por outras menos poluentes. Na indústria têxtil, por exemplo, aproximadamente 3.000 corantes azos comerciais foram considerados cancerígenos e não mais são fabricados, contudo alguns países ainda fazem uso de alguns destes corantes devido ao seu valor comercial (DELLAMATRICE, 2005).

O estudo das comunidades biológicas é importante pelo fato de que permite que se constate a saúde dos ecossistemas aquáticos e dimensão dos impactos bem como seus agentes impactantes (GOULART & CALLISTO, 2003).

Por tradição a avaliação de impactos ambientais de ecossistemas aquáticos é medida através das concentrações físicas e químicas podendo-se avaliar também os coliformes totais e fecais (microbiológicos) sendo essas ferramentas instrumentos importantes para a classificação da qualidade das águas. As vantagens destes tipos de monitoramento são a identificação de alterações das propriedades; detecção da variável modificada e determinação das concentrações alteradas. O problema está na descontinuidade temporal e espacial das amostragens. Os efluentes sólidos podem ser transferidos para dentro do ecossistema de forma diluída devido a capacidade de autodepuração e do fluxo unidirecional das águas lóxicas. Uma desvantagem deste monitoramento é a dificuldade da detecção das alterações da diversidade de habitats e micro-habitats e nas consequentes alterações da qualidade das águas sobre as comunidades biológicas entre si (GOULART & CALLISTO, 2003).

Os problemas ambientais se intensificaram com o desenvolvimento industrial ocorrido nas últimas décadas concomitantemente com o crescimento da demanda de produtos químicos, que estão presentes em elevadas quantidades nos efluentes domésticos e principalmente industriais. Essa variedade de substâncias químicas existentes e a composição indefinida presentes nos efluentes dificultam a avaliação dos seus possíveis efeitos tóxicos somente pelos métodos físico-químicos, o que deu início ao desenvolvimento de métodos mais eficientes para caracterizar essa mistura de complexos químicos (REGINATTO, 1998).

Pesquisas com sementes da espécie de *Allium cepa* (variedade baia periforme) são usadas como organismo-teste pelo fato de ser um material de análise homogêneo (genética e fisiologicamente) e acessível o ano inteiro, proporcionando maior confiabilidade para os ensaios realizados (LEME & MARIN-MORALES, 2007). Segundo CÉSAR *et al.* (1997) pode-se determinar o tempo e as concentrações em que o agente químico ou poluente é potencialmente prejudicial através dos testes toxicológicos com organismos vivos. Se a concentração do produto for baixa ou o tempo de contato for insuficiente o efeito pode não ser adverso, sendo que altas concentrações poderão ter efeitos prejudiciais em tempos de exposição extremamente curtos (CARNIATO *et al.*, 2007) ao passo que pequenas concentrações geralmente produzem efeitos crônicos sub-letais e, até mesmo, letais durante longos períodos de exposição.

As desvantagens do uso somente das análises físicas e químicas em relação às respostas biológicas do bioindicadores de degradação ambiental, são que os resultados mostram somente o registro momentâneo da biota aquática, necessitando de grande quantidade de análises; as medições químicas não conseguem detectar perturbações sutis no ecossistema quando realizadas distante da fonte poluidora (BUSS *et al.*, 2003). Sendo que as metodologias biológicas são eficazes na avaliação de poluição não pontual, trazendo benefícios para avaliações em escala regional.

CALLISTO *et al.* (2001) afirmam que desde o início do século XX, têm-se intensificado a difusão do uso de organismos aquáticos em avaliações de qualidade da água devido a sua capacidade em acumular poluentes, mostrando a longo prazo valores reais da concentração dos mesmos, diferentemente das aferições físico-químicas. A primeira abordagem com o objetivo de determinar indicadores biológicos da qualidade das águas com base científica foi realizada na Alemanha. Os primeiros experimentos foram feitos com bactérias, fungos e protozoários por Kolkwitz e Marsson (BUSS *et al.*, 2003). Segundo esses autores os bioindicadores são espécies escolhidas por sua sensibilidade ou tolerância a vários parâmetros, como poluição orgânica ou outros tipos de poluentes.

Para JOHSON *et al.* (1993) apud BUSS *et al.* (2003), um indicador biológico ideal deve possuir diversas características dentre elas: ser taxonomicamente bem definido e facilmente reconhecível pela sociedade comum; possuir distribuição geográfica ampla; ser abundante ou de fácil coleta; ter baixa variabilidade genética e ecológica; primar por tamanho grande; ter baixa mobilidade e longo ciclo de vida; dispor de características ecológicas bem conhecidas e poder ser usado em estudos laboratoriais. O uso de macrófitas aquáticas, peixes e macroinvertebrados são partes de metodologias desenvolvidas no uso de programas de monitoramento, porém, vários autores afirmam que o grupo de macroinvertebrados bentônicos é o mais testado e utilizado (BARBOUR *et al.*, 1999), mesmo podendo se usar vários organismos diferentes.

O monitoramento biológico é uma importante ferramenta na avaliação da relação das comunidades biológicas com as modificações originais do meio. A realização do mesmo deve ser por meio de aplicação de protocolos de avaliação, índices biológicos e multimétricos, usando os bioindicadores de qualidade de água e habitat. BARBOUR *et al.* (1999) indicam os métodos de levantamento e avaliação de alterações das espécies e índices de diversidade; abundância de organismos resistentes; perda de espécies sensíveis; medidas de produtividade primária e secundária e sensibilidade às concentrações de substâncias tóxicas como os mais utilizados.

2.1 ORGANISMOS BIOINDICADORES

Na Europa, a pouco mais de um século, surgiu a ideia de utilizar os organismos existentes nos ecossistemas aquáticos como bioindicadores de qualidade de água, associando-se a poluição do meio. Segundo PASQUALETTO (2004) as normas técnicas no Brasil que regem o uso de bioindicadores foram baseadas nos países europeus, porém aqui é pouco difundida. O mesmo autor cita os organismos vivos indicadores de qualidade de águas conforme o quadro 1.

Quadro 1: Organismos bioindicadores de qualidade de águas.

| Intolerantes a poluição | Tolerantes a poluição |
|---|---|
| Besouros (Coleoptera) | Fitoplânctons e zooplânctons: <i>Pompholux sulcata</i> , <i>Filinia logiseta</i> e <i>Anabaena circinalis</i> |
| Libélulas (Odonata) | Moscas |
| Algas microscópicas (<i>Microcystis aeruginosa</i>) | Mosquitos (Diptera) |
| Grupo: Ephemeroptera, Plecoptera e Tricoptera | Minhocas d'água (Oligochaeta) |

Fonte: PASQUALETTO (2004).

A elevada sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente e o ciclo de vida relativamente curto (observação de efeitos tóxicos em várias gerações) são algumas das vantagens em se utilizar algas em testes de toxicidade. As algas, produtores primários, situam-se na base da cadeia alimentar, sendo que qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades afeta os níveis tróficos superiores do ecossistema fazendo com que seja um importante indicador biológico. Como exemplos de algas utilizadas em testes toxicológicos destacam-se: as algas verdes e as uni-celulares de água doce *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* e *Pseudokirchneriella subcapitata* (COSTA et al., 2008).

O uso de crustáceos de água doce também é bastante difundido nos testes ecotoxicológicos isso se deve ao fato do uso desses organismos apresentarem inúmeras vantagens, como: a) importância em várias cadeias alimentares; b) fonte de alimento para peixes; c) ciclo de vida relativamente curto; d) facilidade para cultivos em laboratório; e) sensibilidade a vários contaminantes do ambiente aquático; f) reprodução assexuada garantindo a produção de organismos geneticamente idênticos, permitindo assim, a obtenção de organismos-teste com sensibilidade constante e g) serem organismos de tamanho pequeno, com necessidade de menores volumes de amostras-teste e água de diluição do que os testes realizados com algas e peixes (COSTA et al., 2008).

Outros animais que têm sido considerados promissores como bioindicadores, por serem abundantes em muitos ecossistemas terrestres e aquáticos, sendo facilmente disponíveis para coleta, são os moluscos, que, além disso, são altamente tolerantes a diferentes poluentes e exibem altas taxas de acumulação destes, particularmente de metais pesados. Da mesma forma, as aves têm sido largamente utilizadas como bioindicadores, por estarem no topo da cadeia alimentar, serem sensíveis a produtos tóxicos, por responderem a mudanças sutis no ambiente, e também por causa da sua alta taxa metabólica (SOUZA, 2010).

Os principais bioindicadores utilizados na avaliação de impactos ambientais de ecossistemas aquáticos são macroinvertebrados bentônicos (organismos com corpo de tamanho superior a 0,25 mm que vivem em sedimentos de ecossistemas aquáticos) peixes e comunidades perifítica (OLIVEIRA et al., 2005).

Em se tratando dos peixes, para POWERS (1989) apud FERNANDES (2005), esses animais reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, onde são utilizáveis, para indicarem o perigo de substâncias químicas em potencial ou a possível poluição ambiental. Esses organismos aquáticos acumulam substâncias químicas por exposição direta ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta como afirma ATEEQ et al. (2002) apud FERNANDES (2005).

Os peixes são os principais representantes dos consumidores secundários nas cadeias alimentares. Diversas espécies são utilizadas como bioindicadores. No Brasil a espécie mais utilizada é o *Danio rerio* (peixe paulistinha ou peixe zebra). O *Danio rerio* é um peixe pertencente a família Ciprinidae; também utilizado na avaliação da qualidade de sedimentos, pode ser empregado tanto no estágio larval quanto no adulto (PASQUALETTO, 2004).

Para se avaliar a presença de substâncias com potencial causador de efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos, permitir-se utilizar peixes mantidos em laboratório e que são facilmente expostos à substâncias tóxicas, é o que relata HARSHBARGER & CLARK (1990) apud FERNANDES (2005).

2.1.1 *Allium cepa* COMO ORGANISMO TESTE

As plantas superiores são excelentes modelos genéticos para detectar mutagênicos ambientais e são usados em estudos de monitoramento (FERNANDES, 2005). Dentre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando como um eficiente modelo genético de monitoramento ambiental. A espécie é indicada pela sua elevada sensibilidade e excelente correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Estes fatores são relevantes para avaliação mais minuciosa de riscos ambientais, bem como para análise de outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem (FISKESJÖ, 1985). Para FISKESJÖ (1985), o sistema teste com *Allium* é bastante recomendado como um teste padrão para a toxicidade pelo fato de o mesmo ser de fácil execução e os resultados obtidos serem rapidamente reprodutíveis.

O teste com *Allium cepa* evidencia um cenário de poluição ambiental e contaminação por substâncias químicas em ecossistemas aquáticos. A indicação de toxicidade é observada pela inibição do crescimento das raízes e pelos efeitos adversos causados aos cromossomos (FISKESJÖ, 1995).

O *Allium cepa* vem sendo usado para avaliar danos no DNA (aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico) para determinados tipos de bioensaios. O vegetal é usado para este tipo de análise desde a década de 40 até os dias atuais, avaliando agentes químicos, contribuindo para a sua aplicação crescente no monitoramento ambiental. Os testes com essa espécie têm mostrado uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores devido a sua alta sensibilidade (LEME & MARIN-MORALES, 2007). Além disso, estudos de sensibilidades entre vegetais superiores têm mostrado maior sensibilidade da espécie *Allium cepa* em relação a outros organismos teste.

Segundo MATSUMOTO & MARIN-MORALES (2004) apud AMARAL (2007) o uso de *Allium cepa* se dá pelo fato de que são fáceis de serem armazenadas, manuseadas e as células da raiz constituem um sistema conveniente tanto para

parâmetros macroscópicos (crescimento, deformidade), quanto para parâmetros microscópicos (aberrações cromossômicas).

Segundo FISKESJÖ (1995), a raiz é comumente a parte da planta que entra em contato com os poluentes do solo ou da água. A observação do sistema teste do crescimento radicular tem mostrado que essa planta é bastante sensível quando da presença de contaminantes ambientais (substâncias solúveis em água).

Para LEME & MARIN-MORALES (2009), dois conceitos são necessários ao entendimento dos estudos de monitoramento com *Allium cepa*, a) aberrações cromossômicas (AC) são alterações cromossômicas em qualquer estrutura ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer tanto espontaneamente, como resultado da exposição física ou de agentes químicos; b) índice mitótico (IM) é o número total de divisões de células no ciclo celular. Tanto a redução como o aumento do IM são indicadores importantes no monitoramento da poluição ambiental, especialmente para a avaliação de contaminantes tóxicos que apresentam potencial citotóxico. De acordo com estudos epidemiológicos, pessoas com elevadas frequências de AC apresentam maiores riscos de desenvolvimento de câncer. Assim, para que se garanta um ambiente seguro e saudável, testes biológicos para avaliação de AC como *endpoint* de agentes químicos têm sido aperfeiçoados. Dentre estes sistemas-teste, o teste de *Allium cepa* tem se caracterizado como um modelo rápido e eficiente na avaliação da genotoxicidade causada por poluentes ambientais, como para a avaliação de qualidades de águas (LEME & MARIN-MORALES, 2007).

Os testes ecotoxicológicos com *Allium cepa* são de baixo custo, facilmente manipulados e tem vantagens sobre outros testes de curto prazo, que exigem preparação prévia das amostras testadas. Além disso, esse sistema fornece informações importantes para avaliar os mecanismos de ação de um agente em relação aos efeitos sobre a genética material (efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos) (FERNANDES, 2005). Outra vantagem do teste de *Allium cepa* é a possibilidade de expor o organismo teste diretamente para misturas complexas sem tratamento prévio da amostra (LEME & MARIN-MORALES, 2009).

Ao longo dos anos, alterações técnicas no teste *Allium cepa* foram feitas a fim de permitir uma avaliação mais abrangente de produtos químicos, como a de misturas complexas, que compreendem a maioria das amostras ambientais, e as de substâncias puras. Segundo LEME & MARIN-MORALES (2009) as adaptações do teste de *Allium cepa* foram feitas por FISKESJÖ (1985) visando torná-lo um organismo teste para sistema de monitoramento. As modificações propostas permitem a avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água e dos efeitos do complexo de misturas.

2.2 DESENVOLVIMENTO DO BIOMONITORAMENTO E PERSPECTIVAS DE APLICAÇÃO

Apesar de o Brasil possuir uma das legislações mais rígidas do mundo, não possui em seu quadro de leis sobre os recursos hídricos que menciona o uso de biomonitoramento para avaliação da qualidade das águas. Alguns trabalhos vêm sendo desenvolvidos nas regiões sudeste e sul, nessa linha de uso de bioindicadores para avaliar a qualidade dos recursos hídricos, porém estão restritos a ecossistemas lênticos. Os trabalhos desenvolvidos em ecossistemas lóticos na maioria das vezes não recebem infraestrutura adequada para análise ambiental, levando a programas de biomonitoramento incompletos. O que por vezes funciona

de forma mais eficaz são as parcerias entre agências ambientais com universidades através das pesquisas acadêmicas (BUSS et al., 2003).

A aplicação do biomonitoramento no Brasil contribui para a redução de custos, o aumento da eficiência de análise e a simplificação dos resultados, e consequentemente colabora com os gestores de bacias hidrográficas, permitindo a participação comunitária por intermédio de grupos de voluntários (BUSS et al., 2003).

No Brasil ainda não é muito difundido a utilização de macroinvertebrados bentônicos em estudos de impacto ambiental, porém no Estado de Minas Gerais essa realidade é um pouco diferenciada. A consciência em relação a estes métodos de avaliação de impactos existentes é maior. Apesar de recente no país (menos de 20 anos), o estudo ecológico destes organismos como bioindicadores de qualidade de água, é amplamente utilizado em países da Europa (Inglaterra e Espanha), Austrália, Estados Unidos e Canadá. Os Estados Unidos apresentam-se em um estágio mais avançado no que concerne à utilização dos macroinvertebrados e outros grupos de organismos na avaliação de impactos ambientais. Essa realidade é notada pelo fato de que 42 dos 50 estados que constituem o país, utilizam índices biológicos multimétricos (GOULART & CALLISTO, 2003).

Um aspecto fundamental a ser considerado em um programa de monitoramento é a habilidade em traduzir a informação tanto para os gestores ambientais quanto para o público em geral. Assim, torna-se estritamente necessário o uso das ferramentas originadas por programas de biomonitoramento que permitem a formação de grupos de monitores ambientais voluntários nas comunidades, pois por vezes são estes que realizam o levantamento de dados com qualidade (BUSS et al., 2003).

As agências ambientais têm apresentado algumas sugestões para o uso de biomonitoramento, mas a falta de estudos que estabeleçam padrões de coleta, identificação, avaliação e classificação reduz a aplicabilidade dessas metodologias. Para BUSS et al., (2003), o desafio primordial para os países em desenvolvimento encontra-se na necessidade urgente de instalação de programas de biomonitoramento, tanto a etapa 'básica' quanto a 'aplicada' devem ser realizadas simultaneamente, o que pode acarretar alguns problemas em sua fase inicial, sem no entanto impedir sua aplicação.

A saúde dos ecossistemas aquáticos está intimamente ligada a preservação dos mesmos. Assim, um estudo realizado em determinado momento num rio deve ser uma base para se levar adiante a criação de um programa de monitoramento a longo prazo do ecossistema (CALLISTO et al., 2001).

3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Os experimentos foram realizados no período de agosto a novembro de 2010, em dois momentos diferentes, sendo um de observação e o outro de registro fotográfico do crescimento radicular de *Allium cepa*. O método de análise do crescimento das raízes foi realizado por meio de registro fotográfico e posterior medição em programa de computador (Adobe Photoshop versão CS2).

No primeiro experimento foram utilizadas dez réplicas do organismo *Allium cepa* de tamanhos médios adquiridas em comércio local. As réplicas foram descascadas e a parte da raiz cortada superficialmente. Em seguida foram colocadas em recipientes com água de abastecimento público, onde uma parte da raiz ficou em imersão nesse líquido para garantir o crescimento de novas raízes. Após quatro dias, com a utilização de um suporte, foi realizado um registro

fotográfico para todas *Allium cepa* de duas formas distintas, frontal e lateral (Figura 1).

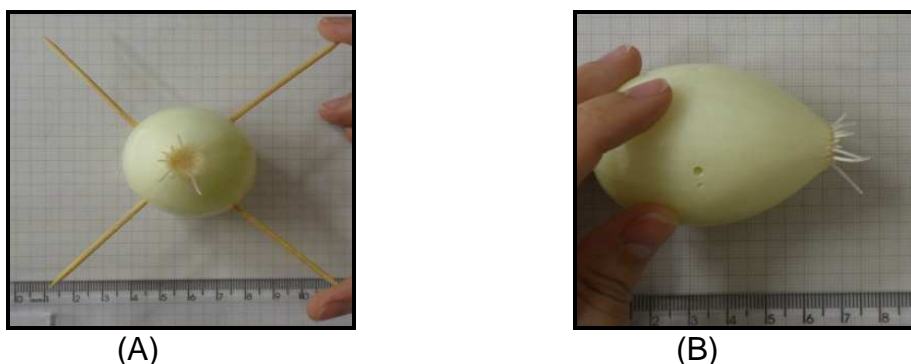


Figura 1: Aspecto visual frontal (A) e lateral (B).

Foto: A.I.O.M. Arraes, 2010

A partir da definição da melhor técnica para a realização das imagens, um segundo sistema foi montado o que permitiu a realização das observações do crescimento radicular. A avaliação transcorreu por um período de cinco dias em água tratada de abastecimento público. A metodologia baseou-se no método padrão proposto por FISKEJÖ (1985) o qual enfatiza que o parâmetro macroscópico mais importante a ser analisado é o crescimento das raízes, mas que outros parâmetros podem ser considerados no processo de análise, como a mudança de cor da cebola, a turgescência, o formato da raiz e a medição da raiz. O autor ainda recomenda a montagem do sistema com o mínimo de 20 (vinte) % maior de unidades, pois se ocorrer necrose ou o não desenvolvimento, poderão ser descartadas no primeiro ou segundo dia as unidades problemáticas e ainda se trabalhar com quantidade suficiente para a obtenção dos resultados.

O experimento consistiu de dez unidades de *Allium cepa*, colocadas em recipientes plásticos de 200 mL com a parte da raiz em contato com água, sendo que todas foram estacadas. O equipamento fotográfico foi encaixado de forma que a altura se mantivesse constante, um papel milimetrado foi colocado na base, munido de uma régua permitindo uma melhor visualização das medidas. A partir do segundo dia acrescentou-se água permitindo a manutenção do volume nos recipientes. O equipamento fotográfico utilizado foi de marca Samsung modelo CB 550, as fotos foram realizadas em intervalos de vinte e quatro horas. Ao final do processo, as unidades do vegetal foram destruídas e descartadas em lixo comum.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um modelo padrão de testes de toxicidade deve apresentar boa performance, resultados rápidos e reprodutíveis. O bioindicador *Allium cepa*, como sistema teste para medição de ensaios ecotoxicológicos propicia esta performance além da vantagem de poder se evitar o uso de animais mamíferos e posteriormente sacrificá-los.

O quadro 2 descreve os aspectos visuais das unidades de *Allium cepa* após 48h de realização do primeiro experimento. Nesta etapa não foram realizadas observações quanto ao comprimento radicular máximo atingido pelos 10 diferentes organismos e aspecto fisiológico.

Quadro 2: Aspectos observados para o primeiro conjunto experimental

| Unidade | Aspectos visuais observados |
|---------|---|
| 1 | Pouco crescimento e quantidade significativa de raízes |
| 2 | Baixo crescimento e disforme |
| 3 | Bulbo necrosado |
| 4 | Crescimento disforme e quantidade significativa de raízes |
| 5 | Crescimento disforme e pequena quantidade de raízes |
| 6 | Crescimento disforme e quantidade significativa de raízes |
| 7 | Crescimento mediano e disforme |
| 8 | Pouquíssimo desenvolvimento e de forma irregular |
| 9 | Crescimento mediano e disforme |
| 10 | Pouquíssimo desenvolvimento e de forma irregular |

A partir dos resultados discrepantes no crescimento radicular do primeiro experimento, observou-se a necessidade de uma homogeneização de tamanho e massa dos organismos testes para melhor eficiência no contato com a água. No segundo experimento as amostras foram selecionadas e observou-se um crescimento radicular homogêneo após 24 horas de experimentação. Nesta etapa os organismos não apresentaram necrose nos bulbos sendo então o crescimento radicular acompanhado por meio de imagens (fotos) coletadas a cada 24 h e tempo máximo de 120 h.

Para a determinação do comprimento radicular foi utilizado o programa de computador Adobe Photoshop versão CS2 no tratamento das imagens obtidas, pois este programa permite o registro das medidas de linha reta em pixels sendo que um pixel é o menor ponto que forma uma imagem digital.

A observação da imagem no programa permitiu a constatação de que um pixel equivale a 12,56 mm (milímetros), esta medida foi realizada utilizando-se uma régua como base (Figura 2). Para 10 cm (100 mm) encontrou-se 1.256,00 pixels; portanto 1 pixel equivale a 12,56 mm.

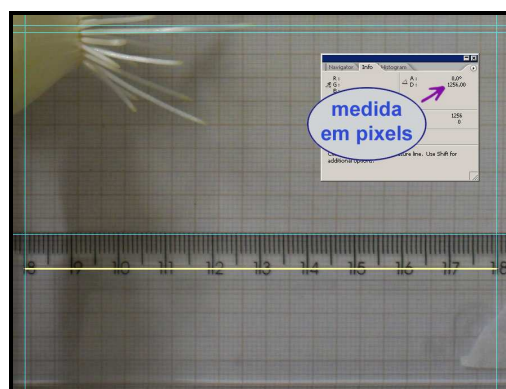


Figura 2: Determinação da relação unidade métrica (cm)/pixel.

Foto: A.I.O.M. Arraes, 2010

Para o cálculo do comprimento das raízes procedeu-se da mesma maneira. Após traçada a linha reta na raiz, encontra-se o número em pixel e então se faz a divisão por 12,56 mm para encontrar a medida da raiz em milímetro (Figura 3). As etapas executadas são:

Etapa 1: Após a abertura do programa acessa-se a ferramenta de medição localizada na lateral esquerda da tela;

Etapa 2: A seguir faz-se o tracejamento da linha de medição na raiz de um ponto a outro;

Etapa 3: Posteriormente acessa-se a opção "info" pela barra de ferramenta window;

Etapa 4: Para concluir, a janela do painel de informações é aberta trazendo a medida da raiz em pixel.

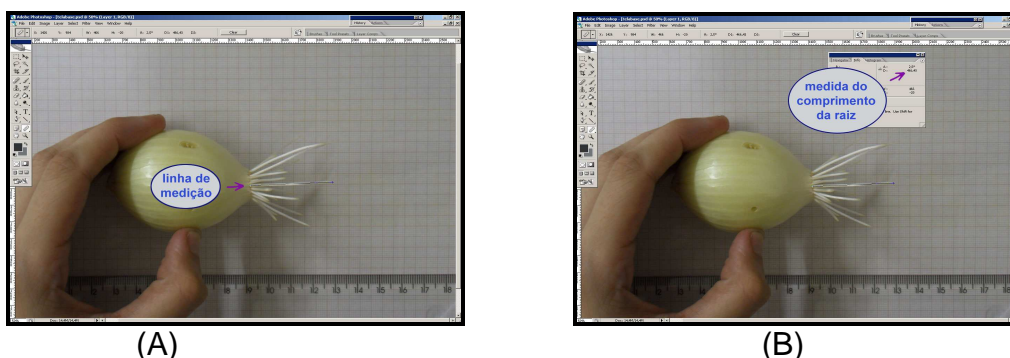


Figura 3: (A) e Tracejamento da linha de medição na raiz (B) janela do painel de informações com a medida da raiz em pixel.

Foto: A.I.O.M. Arraes, 2010

As medidas do comprimento radicular das dez unidades de *Allium cepa*, foram registradas por meio de imagem fotográfica (Figura 4) do primeiro ao quinto dia perfazendo um total de 120 horas e registradas na (Tabela 1).

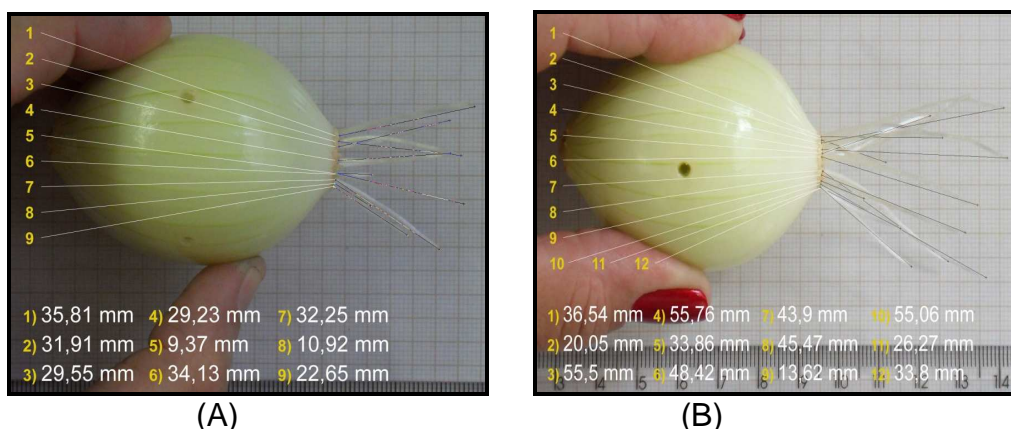


Figura 4: *Allium cepa* após 96 h (A) e 120 h de ensaio (B).

Foto: A.I.O.M. Arraes, 2010

Para efeito de comparação e comprovação da validade da metodologia proposta, foram realizadas também medidas dos mesmos organismos teste com o equipamento tradicional, paquímetro ou régua, sobre papel milimetrado. O estudo mostrou que as medidas obtidas pelo método proposto não difere da medida referência (régua), pois as médias obtidas para ambos não apresentaram variação significativa.

Após a montagem e treinamento da técnica para coleta da imagem, observou-se que o tempo gasto era em média de um minuto para cada posição (frontal e lateral). Na realização da medição com a régua o tempo mínimo é de cinco minutos, o que é considerável tendo em vista a exposição do organismo ao ar, o que traz riscos para as raízes que além de se desidratarem devido estarem sem contato

direto com o meio nutriente de crescimento, ficam expostas aos intemperes do clima comprometendo os resultados subsequentes.

Outra dificuldade observada é com relação ao ângulo em que se fez o registro fotográfico. Focou-se somente em um lado do organismo, dificultando a visualização das raízes na parte inferior. Para melhor rastreamento da quantidade e tamanhos de cada raiz é necessário que seja feito o registro em mais de um ângulo e com atenção para não se registrar raízes em duplicidade.

A amplitude do uso de *Allium cepa* combina análise de toxicidade e mutagenicidade, aspectos macroscópicos e microscópicos; sendo mais um motivo pela grande aceitação desse sistema teste. Caso os resultados da substância química testada forem positivos são considerados como ótima indicação de que existe um risco biológico aos organismos expostos.

TABELA 1: Comprimentos das raízes dos organismos teste *Allium cepa* após 120 horas de ensaio.

| Comprimento (mm) | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Unidade / Tempo (h) | 1 n=8 | 2 n=22 | 3 n=14 | 4 n=3 | 5 n=23 | 6 n=16 | 7 n=15 | 8 n=22 | 9 n=12 | 10 n=23 |
| 120 | 12,87 | 51,02 | 44,98 | 52,12 | 37,16 | 51,94 | 19,53 | 43,12 | 36,54 | 46,35 |
| | 13,30 | 56,17 | 55,14 | 38,89 | 49,18 | 39,96 | 52,51 | 54,42 | 20,05 | 27,63 |
| | 3,75 | 44,19 | 24,46 | 23,77 | 39,45 | 31,82 | 66,59 | 28,11 | 55,5 | 25,74 |
| | 48,75 | 49,20 | 56,67 | 47,00 | 43,54 | 37,55 | 61,95 | 16,45 | 55,76 | 39,49 |
| | 6,57 | 56,09 | 56,58 | 7,99 | 37,29 | 39,90 | 52,79 | 54,19 | 33,86 | 15,36 |
| | 1,54 | 5,31 | 16,61 | 48,44 | 48,37 | 37,36 | 59,25 | 54,86 | 48,42 | 45,15 |
| | 7,88 | 6,27 | 22,89 | 55,23 | 40,64 | 48,98 | 58,80 | 18,84 | 43,9 | 54,39 |
| | 1,14 | 45,82 | 50,71 | 25,80 | 16,96 | 55,22 | 58,59 | 50,54 | 45,47 | 6,31 |
| | | 38,00 | 55,41 | 12,49 | 25,41 | 56,08 | 10,88 | 23,77 | 13,62 | 53,79 |
| | | 59,05 | 15,29 | 51,69 | 35,36 | 6,01 | 34,00 | 47,96 | 55,06 | 45,46 |
| | | 32,81 | 15,76 | 11,30 | 14,31 | 43,50 | 58,92 | 20,12 | 26,27 | 2,57 |
| | | 8,54 | 11,70 | 32,50 | 35,67 | 18,83 | 32,19 | 54,56 | 33,8 | 56,05 |
| | | 60,29 | 46,08 | 40,29 | 30,61 | 57,78 | 48,67 | 53,84 | | 11,46 |
| | | 26,47 | 9,47 | | 38,31 | 59,48 | 54,34 | 6,94 | | 19,03 |
| | | 16,09 | | | 27,86 | 44,96 | 34,43 | 50,13 | | 42,96 |
| | | 53,18 | | | 36,04 | 59,45 | | 69,18 | | 21,40 |
| | | 16,09 | | | 41,78 | | | 60,98 | | 69,27 |
| | | 58,82 | | | 47,47 | | | 41,75 | | 62,16 |
| | | 53,12 | | | 49,49 | | | 30,09 | | 51,77 |
| | | 24,03 | | | 47,97 | | | 61,01 | | 39,36 |
| | 26,59 | | | 46,06 | | | 35,02 | | 43,07 | |
| | 62,86 | | | 27,81 | | | 29,98 | | 61,25 | |
| | | | | 36,33 | | | | | 54,04 | |
| Média | 11,97 | 38,64 | 34,41 | 34,42 | 37,09 | 43,05 | 46,90 | 41,17 | 39,02 | 38,87 |
| Desvio Padrão | 15,56 | 19,37 | 19,16 | 16,73 | 9,764 | 14,96 | 16,69 | 17,11 | 14,11 | 19,04 |

5 CONCLUSÃO

O modelo proposto de otimização de ensaios de toxicidade de ecossistemas aquáticos com o bioindicador *Allium cepa*, como objeto de estudo desta pesquisa, mostrou-se recomendável, aceitável e de fácil operação. Os estudos para avaliação de toxicidade de efluentes ou resíduos em vegetais superiores medindo-se o desenvolvimento de raízes ou a inibição do crescimento através de um nutriente por determinado tempo tem sido de grande utilidade e valia no meio acadêmico e de pesquisadores.

A observação visual das raízes de *Allium cepa* com o método otimizado mostrou que a medição do comprimento radicular não difere com relação a medição tradicional. O método de observação e medição do aspecto macro, crescimento radicular tradicional pode gerar consequências negativas ao vegetal pois expõe a planta às variações do clima. Este aspecto compromete seu desenvolvimento (necrose do bulbo) podendo ser agravado em ambientes de clima seco e de umidade baixa como acontece na cidade de Goiânia em alguns períodos do ano.

Durante o período de estudo pode-se comparar o tempo do trabalho prático em relação aos registros visuais com a medição pela régua das raízes e pelo método otimizado. Ficou evidente que a prática experimental proposta reduziu o tempo de análise devido a técnica de imagem utilizada para a determinação do comprimento radicular ser simples e extremamente rápida. A metodologia levou a resultados confiáveis em um menor tempo. Assim, o método de medição do comprimento das raízes por meio de imagens vem ao encontro de minimização de erros e eficiência no processo experimental.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda – Método de Ensaio com daphnia spp (Cladocera, Crustácea)**. Rio de Janeiro. 2004, 17 p.

AMARAL, A. de M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**. v. 20, n.1 e 2, p. 65-72. 2007.

ATEEQ, B.; FARAH, M. A.; ALI, M. N.; AHMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**. Amsterdam. V. 518, p.135-144. 2002, *apud* FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como Sistemas - Testes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rio Claro. 2005. 211 p.

BARBOUR, M. T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J. B. **Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish**. Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C. 1999.

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

CALLISTO, M.; GONÇALVES Jr., J. F.; MORENO, P. **Invertebrados Aquáticos como Bioindicadores**. In: Goulart, E.M.A. (Eds). Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais. p. 555-567. 2005.

CALLISTO, M.; MORETTI, M.; GOULART, M. Macroinvertebrados Bentônicos como Ferramenta para Avaliar a Saúde de Riachos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**. V. 6, n.1, p. 71-82. 2001.

CARNIATO, J.G.; GERALDO, S. M.; *et al.* Avaliação da Toxicidade de Percolado de Resíduos Sólidos Pós Tratamento Biológico e Fotocatalítico. **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**. v. 4, n. 2, p. 92-101. 2007.

CESAR, A.; SILVA, S. L. da S.; SANTOS, A. R. **Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição**. 4º ed. Universidade Santa Cecília – UNISANTA. Santos/SP, Brasil. 1997.

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

DELLAMATRICE, P. M. **Biodegradação e toxicidade de corantes têxteis e efluentes da Estação de Tratamento de Águas Residuárias de Americana, SP**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba/SP. 2005. 137 p.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como Sistemas - Testes**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rio Claro. 2005. 211p.

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

FISKEJÖ, G. *Allium* test. **Methodological and Molecular Biology**. v.43, p.119-127. 1995.

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

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of northamerica. **Science of the Total Environment**. Amsterdam. v.4, n. 1-2, p. 1-32. 1990.

JOHNSON, R. K.; WIEDERHOLM, T.; ROSENBERG, D. M. Freshwater biomonitoring using individual organisms, populations, and species assemblages of benthic macroinvertebrates. In: **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates** (D. M. Rosenberg & V. H. Resh, ed.), New York: Chapman & Hall. p. 40-158. 1993.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso.** Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4º PDPETRO, Campinas, SP, p. 21-24. 2007.

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

LONGHIN, S. R. **Estudo da degradação dos antibióticos beta-lactâmicos amoxicilina e ampicilina e avaliação da toxicidade e biodegradabilidade dos seus produtos.** Tese de Doutorado submetida ao Programa de Doutorado em Química, do Instituto de Química da Universidade de Brasília. 2008.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**. 69: 399-408. 2004, *apud* AMARAL, A. de M.; BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J.C.; BARROS, L. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**. V. 20, n.1 e 2, p. 65-72. 2007.

OLIVEIRA, A.; MORGAN, F. L.; MORENO, P.; CALLISTO, M. Inventário da Fauna de Insetos Aquáticos na Estação Ambiental de Peti (CEMIG). **Anais da ANEEL – Projeto Peti/UFMG**. 1 ed. Belo Horizonte: Editora CEMIG. V. 1, p. 25-30. 2005, *apud* FERNANDES, T. C. C. **Insetos Bentônicos e sua Relação com a Qualidade da Água no Rio Mãe Luzia, Treviso, SC.** Dissertação de Mestrado. Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Crisciúma, 2006.

PASQUALETTO, A.; SANTOS, A. P. dos; LINO, L. C. B. **Bioindicadores de Qualidade Ambiental.** Goiânia: Ed. da UCG. 2004.

POWERS, D. A. Fish as model systems. **Science**, Washington. V. 246, n. 4928, p.352-358. 1989, *apud* FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como Sistemas - Testes.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rio Claro. 2005.211 p.

REGINATTO, V. **Avaliação do Ensaio de Toxicidade com a Alga *Scenedesmus subspicatus* para o Estudo de Efluentes Industriais.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas/SP. 105 p. 1998.

SOUZA, V. M. de. **Bioindicadores animais de metais poluentes.** Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia/GO. 2010. 67 p.