



## TRADESCANTIA PALLIDA: MAIS DO QUE UMA LINDA FLOR, UM IMPORTANTE BIOINDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL.

Sisenando, H. A.<sup>1\*</sup>; Batistuzzo de Medeiros, S. R.<sup>2</sup>; Hacon, S. S.<sup>1</sup>

1- Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

2- Departamento de Biologia Celular e Genética/Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.

\* Correspondência do Autor: Avenida Leopoldo Bulhões nº 1480, Mangueiras, ENSP, Sala 620, CEP: 21041-210, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.

E-mail: [herbertsisenando@yahoo.com.br](mailto:herbertsisenando@yahoo.com.br)

**Palavras-chave:** Biomonitoramento, genotoxicidade, micronúcleo, poluição, Trad-MCN

### Introdução

O desenvolvimento industrial e urbano, observado a partir do século XIX, desencadeou uma elevada tendência de emissão de agentes tóxicos na atmosfera (Machado, 2008). Entre as diversas fontes de emissão, podemos destacar: o aumento da frota de veículos nas cidades, a exploração industrial desordenada, as extensas áreas de queimadas no cerrado e nas florestas e o avanço do homem sobre áreas nativas de florestas. Os principais agentes tóxicos envolvidos nos processos de deterioração ambiental são: dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Benzopireno), material particulado (MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub>), monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO<sub>2</sub> e SO<sub>3</sub>), óxidos de nitrogênio (NO e NO<sub>2</sub>) e o ozônio (O<sub>3</sub>) (Bernstein et al., 2004; Passarelli, 2003).

Estudos realizados no estado de São Paulo mostraram que a poluição gerada pela ação do homem promove um aumento significativo nas concentrações de diversos compostos tóxicos, entre eles o material particulado grosso e fino, refletindo em um expressivo aumento do número de casos de internações hospitalares associados a problemas respiratórios (Cançado et al., 2006; Carmos et al., in press). Em ambientes onde as concentrações dos poluentes são elevadas, dependendo da toxicidade do mesmo, estes podem induzir efeitos genotóxicos não apenas em humanos, mas também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a saúde dos ecossistemas (Isidori et al., 2003).

O teste de micronúcleo em Tradescantia (Trad-MCN) é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores devido à simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta à exposição aos agentes genotóxicos (Guimarães et al., 2000; Batalha et al., 1999).

O teste foi desenvolvido, no Brookhaver National Laboratory - EUA, por Ma e colaboradores em 1976, e, inicialmente, utilizava como planta teste a Tradescantia clone 4430 que, posteriormente, foi sendo adaptado para a *Tradescantia pallida* (Ma et al., 1994; Batalha et al., 1999). A espécie *Tradescantia pallida cv. purpurea* é originária do leste do golfo do México e se caracteriza pela fácil adaptabilidade às condições climáticas (Chimpan e Sipos, 2009). A visualização de micronúcleo (MCN) a partir do teste Trad-MCN, após exposição a 140 tipos de substâncias, mostrou concordância de resultado em 67% quando comparado aos obtidos a partir do teste de Ames, nas mesmas condições experimentais (Ma et al., 1984). Os micronúcleos são pequenos fragmentos do núcleo que se formam a partir da quebra cromossômica (processo clastogênico) ou perda de um cromossomo inteiro do fuso celular (processo aneugênico) durante a mitose (divisão celular) refletindo, portanto, a ocorrência de danos de caráter genotóxico (Rodrigues et al., 1997).

### Material e Métodos

O protocolo seguiu os procedimentos descritos por Ma (1981), Ma e colaboradores (1994), Rodrigues e colaboradores (1997), Alves e colaboradores (2001), Savoia e colaboradores (2009).

#### 1. MODELO EXPERIMENTAL

Para desenvolver um experimento com base científica, é fundamental a adoção de alguns cuidados para que o experimento tenha reprodutibilidade e que os resultados sejam confiáveis. No estudo com *T. pallida in situ* como bioindicador da qualidade do ar se faz necessária a adoção de um ponto referência, também denominado de ponto de comparação negativo; este ponto será adotado como padrão para comparação dos resultados do ponto teste. As plantas expostas nos pontos testes e controle deveram ter sido cultivadas, cuidadas e regadas da mesma forma. É de fundamental importância que a

coleta de todos os pontos seja realizada na mesma época, para evitar viés no estudo. Dependendo do tipo do estudo, é aconselhável que as coletas sejam realizadas seguindo alguns parâmetros, que podem ser do período de distribuição de chuva (coleta no período seco e chuvoso) até correlacionado às estações do ano (coleta no inverno, primavera, verão e outono). Caso seja possível, o experimento pode adotar um ponto, sabidamente afetado pela poluição que se deseja avaliar, e usar como ponto de comparação positivo (controle positivo).

## 2. PREPARO DOS VASOS

Em uma floreira de plástico (com dimensões: 50 cm x 17 cm x 17 cm), mistura-se de forma homogênea os seguintes componentes: 2 partes de terra vegetal + 1 parte de substrato (ex.: Plantmax) + 1 parte de vermiculita fina + 1 parte de húmus de minhoca. Cada vaso deve receber no máximo 05 talos de *T. pallida*. Para melhorar o desenvolvimento das plantas, deve-se aplicar um fertilizante à base de NPK 10:10:10 na forma líquida, mensalmente, obedecendo a diluição do fabricante. Geralmente, processa-se a diluição de 1 colher de sopa (15 ml) do produto na sua forma concentrada em um litro de água. Cada vaso deve receber um volume aproximado de 350 ml de solução diluída, que deve ser aplicado diretamente sobre o solo e, preferencialmente, num horário com pouca incidência de raios solares.

## 3. SOLUÇÕES

### 3.1 SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO (Solução de Carnoy)

Proporção de 3:1 de álcool etílico absoluto e ácido acético 45%. Para 1 litro de solução: 750 ml de álcool etílico absoluto + 250 ml de ácido acético 45%. Misturar e conservar em temperatura ambiente.

### 3.2 SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO (Carmim acético 2%)

2 g de Carmim + 100 ml de ácido acético 45%. Misturar os componentes num condensador de refluxo com o auxílio de “bolinhas” de vidro durante 3 horas, espera esfriar e filtra a solução em papel filtro (21 mm). Armazenar em vidro âmbar sob refrigeração de 2-5°C.

## 4. FIXAÇÃO

Retirar a inflorescência no formato de “barquinha” sem flor (Fig.1-B) com auxílio de uma pinça (Fig.2- G ou I) e armazenar em um recipiente com ótima vedação (Ex.: tubo do tipo Falcon ou coletor universal) com solução de Carnoy por 24 horas. Após o período de fixação, substituir a solução de fixação por álcool 70% e deixar armazenado por um período máximo de 6 meses.

## 5. CONFECÇÃO DAS LÂMINAS

Inicialmente, deve-se montar a bancada de trabalho de acordo com o exposto pela figura 2. Com o auxílio das pinças (Fig.2-G e I) e do explorador (Fig.2-F) é re-

alizado o procedimento de dissecação da inflorescência, tendo como meta a retirada do botão que apresente células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrades. A escolha do estágio de tétrade para pesquisa de micronúcleo se dá pelo fato de que neste estágio a célula encontra-se em interfase (não divisão), o que facilita a visualização do núcleo e do possível MCN existente. Outra vantagem desse estágio celular é o tempo de duração (36-48 h), facilitando os procedimentos de análises.

As inflorescências jovens são as mais indicadas para a análise, por apresentar células em estágio de tétrade em botões de estágio intermediário. O botão escolhido deve ser dissecado e posteriormente macerado com o auxílio do estereomicroscópio, estilete histológico, do explorador e de uma gota de carmim acético 2%, devendo ser retirado todos os “debris” (fragmentos celulares resultantes da maceração do botão) antes de colocar a lamínula. Observar a presença de tétrades com auxílio da objetiva 4 X do microscópio óptico (Fig.4-T), caso seja positivo, deixar a lâmina em chapa aquecedora (70°C) ou espiriteira por 8-15 segundos a fim de que permita a evaporação do excesso de corante e com isso melhore a visualização dos componentes celulares na lâmina. O processo de aquecimento das lâminas deve ser acompanhado com muita atenção, porque um excesso de aquecimento pode promover a abertura das tétrades, formação de micrósporos (Fig.4-S), o que inviabilizaria o teste. Ocorrendo sobreposição de células na tétrade ou excesso de corante, a lâmina com lamínula pode ser levemente pressionado com um papel absorvente, tomando o máximo cuidado para não quebrar a mesma.

## 6. ANÁLISE

As lâminas devem ser analisadas em microscopia óptica com objetiva de 40 X. Por lâmina, deve-se contar um total de 300 tétrades e a ocorrência de micronúcleo (Fig.4-P, Q e R) deve ser discriminada de acordo com o número total de MCN por tétrade (Fig.3). Para cada ponto de amostragem, deve ser analisado de 5-10 lâminas e o resultado expresso conforme a fórmula abaixo: onde “M” é o número de micronúcleos contados por lâmina do ponto e “n” é o número total de lâminas analisadas por ponto. O valor deve ser expresso como o número de micronúcleo por 100 tétrades contadas.

A grande maioria dos artigos científicos publica-

$$MCN_{Total} = \frac{\Sigma (M/3)}{n}$$

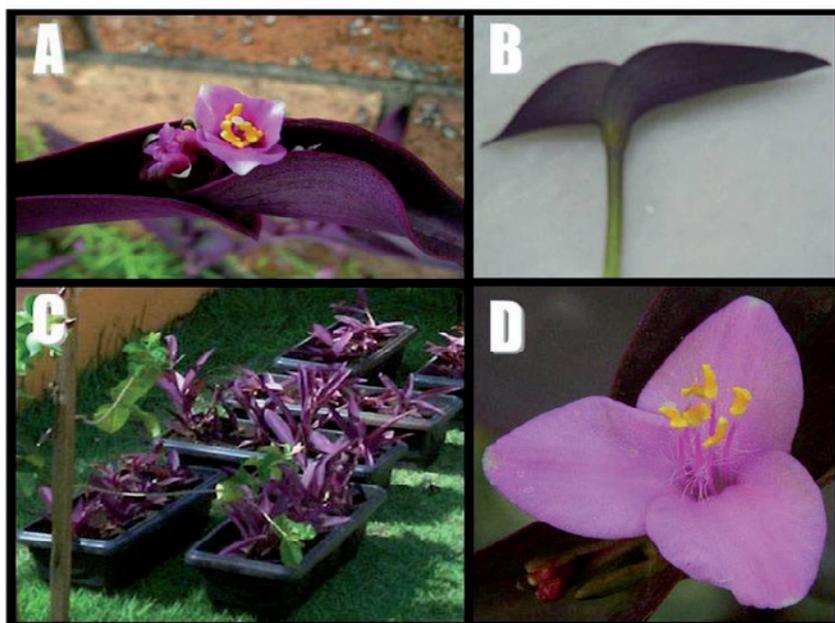
dos com tradescantia preconiza a utilização da análise de variância (ANOVA) associada a um teste não-paramétrico (Mann-Whitney, Tunkey ou Dunnet), estando a sua escolha vinculada ao número de pontos e a forma como esses dados serão avaliados. Alguns artigos fazem uso da

análise de regressão linear com o propósito de associar a frequência de micronúcleos à quantificação de determinados compostos presentes no ar (MP, CO, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, outros) ou de determinadas condições ambientais (temperatura, umidade, outras) do local de estudo.

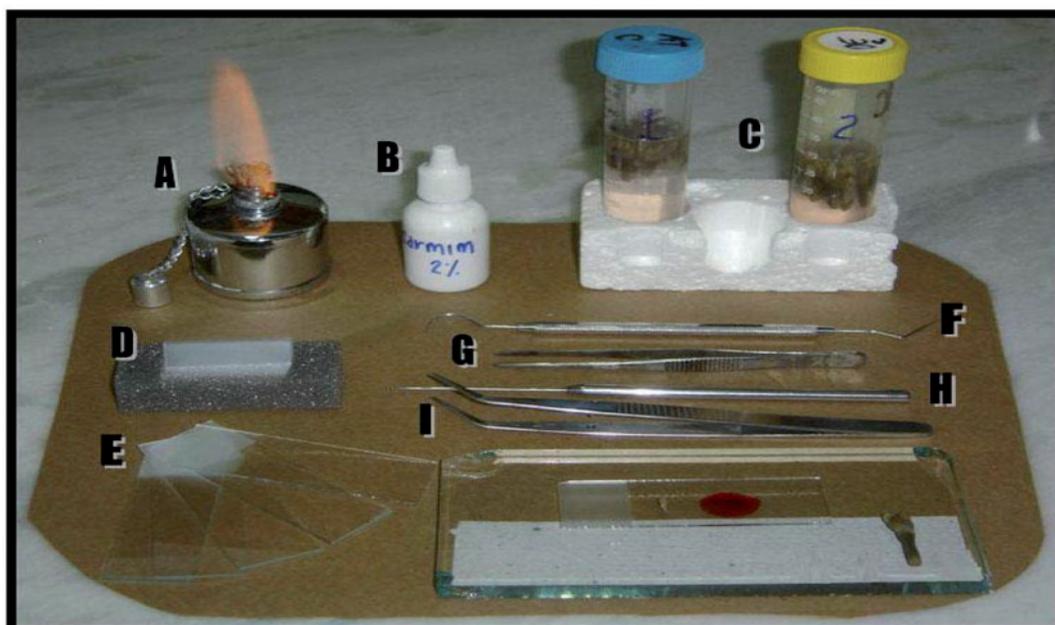
### Considerações Finais

A ótima adaptação da planta ao clima brasileiro,

a pouca complexidade do experimento e o baixo custo financeiro demonstram que este ensaio tem todo um potencial para se transformar numa valiosa ferramenta para fomentar o conhecimento científico, na área da genética, nas salas de aula de todo o Brasil. Também fortalece a ferramenta do biomonitoramento participativo, onde as comunidades locais podem ter acesso aos resultados de forma simples.



**Figura 1.** *Tradescantia pallida Purpurea*: Inflorescência com flores (A), Inflorescência sem flor (B), vasos de *T. pallida* em ponto de exposição (C) e Flor (D).



**Figura 2.** Bancada de trabalho: Espiriteira (A), carmim acético 2% (B), Tubos com inflorescências fixadas e conservadas em álcool 70% (C), Lamínulas (D), Lâminas (E), Explorador dental (F), Pinça anatômica reta (G), Estilete histológico (H) e Pinça clínica (I).



## Referências

- Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJ (2001) Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Rev Bras Bot* 24: 597-576.
- Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PHN (1999) Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat Res* 426: 229-232.
- Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB (2004) Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 114:1116-1123.
- Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos UP (2006) Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. *J Bras Pneumol* 32 (2): S5-S11.
- Carmo CN, Hacon SS, Longo K, Freitas S, Ignotti E, Leon AP, Artaxo P (in press) Associação entre material particulado de queimadas e doenças respiratórias na região sul da Amazônia Brasileira. *Rev Panam Salud Publica*.
- Chimpan C, Sipos M (2009). Anatomy of the vegetative organs of *Tradescantia pallida* Purpurea. *Biharean Biologist* 3: 1-4.
- Guimaraes ET, Domingos M, Alves ES, Caldini N, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Saldiva PHN (2000) Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Exp Bot* 44: 1-8.
- Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A (2003) In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Chemosphere* 52: 121-126.
- Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone, MF (1994) *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat Res* 310: 221-230.
- Ma TH, Harris MM, Anderson VA, Ahmed I, Mohammad K, Bare JL, Lin G (1984) *Tradescantia*-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat Res* 138: 157-167.
- Ma TH (1981) *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ Health Perspect* 37: 85-90.
- Machado ACFE (2008) Avaliação da viabilidade de utilização de *Tradescantia pallida* cv. Purpurea no biomonitoramento de fontes estacionárias de contaminação atmosférica. Instituto de Botânica. [http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses\\_dissert/teses\\_dissert.htm](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses_dissert/teses_dissert.htm).
- Passarelli MM (2003) Toxicologia Ambiental. IN Oga S (ed.) Fundamentos de Toxicologia. 3rd edição. Editora Atheneu, São Paulo, capítulo 2.
- Rodrigues GS, Ma TH, Pimentel D, Weinstein LH (1997) *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review. *Crit Rev Plant Sci* 16: 325-359.
- Savoia EJ, Domingos M, Guimaraes ET, Brumati F, Saldiva PH (2009) Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 255-260.