

BOSCOLLI BARBOSA PEREIRA  
SANDRA MORELLI

# **T**ESTE DE MICRONÚCLEOS COM *Tradescantia*

*Fundamentos, Aplicações e  
Orientações Técnicas para  
Ensaio de Biomonitoramento  
da Qualidade Ambiental*

**Editora FUCAMP**

2013

# **T**ESTE DE MICRONÚCLEOS COM *Tradescantia*

*Fundamentos, Aplicações e Orientações Técnicas para Ensaio de Biomonitoramento da Qualidade Ambiental*

BOSCOLLI BARBOSA PEREIRA  
SANDRA MORELLI

# **T**ESTE DE MICRONÚCLEOS COM *Tradescantia*

*Fundamentos, Aplicações e  
Orientações Técnicas para  
Ensaio de Biomonitoramento  
da Qualidade Ambiental*

Editora FUCAMP

2013

© 2013 Boscolli Barbosa Pereira, Sandra Morelli

Todos os direitos reservados aos autores. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

Elaboração, distribuição e informações:

**EDITORA FUCAMP**

Av. Brasil Oeste, s/n – Jardim Zenith

38500-000 – Monte Carmelo – MG

Tel.: (34) 3842-5272

fucamp@fucamp.edu.br

www.fucamp.edu.br/instituicao/editora

Edição, Revisão e Capa: Boscolli Barbosa Pereira

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

---

**Pereira, Boscolli Barbosa**

Teste de micronúcleos com *Tradescantia* [livro eletrônico]: fundamentos, aplicações e orientações técnicas para ensaios de biomonitoramento da qualidade ambiental /

Boscolli Barbosa Pereira, Sandra Morelli. - -

Monte Carmelo, MG : Editora FUCAMP, 2013.

5,1 MB ; PDF

Bibliografia

**ISBN 978 – 85 – 99252 – 06- 2**

1. Ar – Poluição 2. Bioensaios 3. Citogenética 4. Genética 5. Monitoramento ambiental 6. Qualidade do ar – Monitoramento 7. Tradescantia I. Morelli, Sandra.

II. Título.

13 – 05845

CDD - 575

**Índices para catálogo sistemático:**

---

Teste de micronúcleos com *Tradescantia*:

Biomonitoramento da qualidade ambiental com utilização de plantas bioindicadores: Ciências Biológicas 575

Neste trabalho ressalta-se a dualidade exposição/efeito como objeto específico de estudos de (bio) monitoramento da qualidade ambiental. Destacamos que o maior desafio para a efetividade das ações de Vigilância em Saúde Ambiental consiste em planejar e estruturar estudos que forneçam parâmetros capazes de subsidiar políticas, planos, programas, processos de planejamento e tomadas de decisões com informações acerca da situação da qualidade ambiental. Para tanto, é necessário coordenar, padronizar e integrar dados químicos, físicos e biológicos provenientes dos ambientes estudados.

# Apresentação |

O teste de micronúcleos com *Tradescantia* (TMN-TRAD) é um dos ensaios mais comumente utilizados para a detecção de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em organismos superiores. Mais de 160 agentes químicos já foram testados isoladamente ou em misturas complexas presentes no ambiente por meio do TMN-TRAD. Fundamentalmente, o teste de micronúcleos com o gênero *Tradescantia* consiste em uma série de procedimentos para exposição (no laboratório ou *in situ*) das plantas a agentes contaminantes, seguida da análise e estimativa da frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrades. Este tipo de ensaio apresenta vantagens que o torna ideal para ser utilizado em países em desenvolvimento, pois é um sistema pouco dispendioso e versátil, podendo servir como teste para uma grande variedade de pesquisas. Em especial, a resposta a baixos níveis de contaminação e mutágenos químicos raramente é obtida com outros ensaios biológicos. No entanto, para que os resultados obtidos em experimentos utilizando o TMN-TRAD sejam consistentes, precisos e confiáveis é necessário que exista padronização de todos os procedimentos realizados (desde o cultivo e exposição, até as análises citogenéticas). É nesse sentido que a presente obra pretende ser referência para pesquisadores, professores e estudantes que utilizam o teste, na medida em que aborda os fundamentos, elenca as aplicações e orienta sobre os procedimentos técnicos que caracterizam o bioensaio TMN-TRAD.

# Sumário

<b>Apresentação.....</b>	<b>06</b>
--------------------------	-----------

## PARTE I

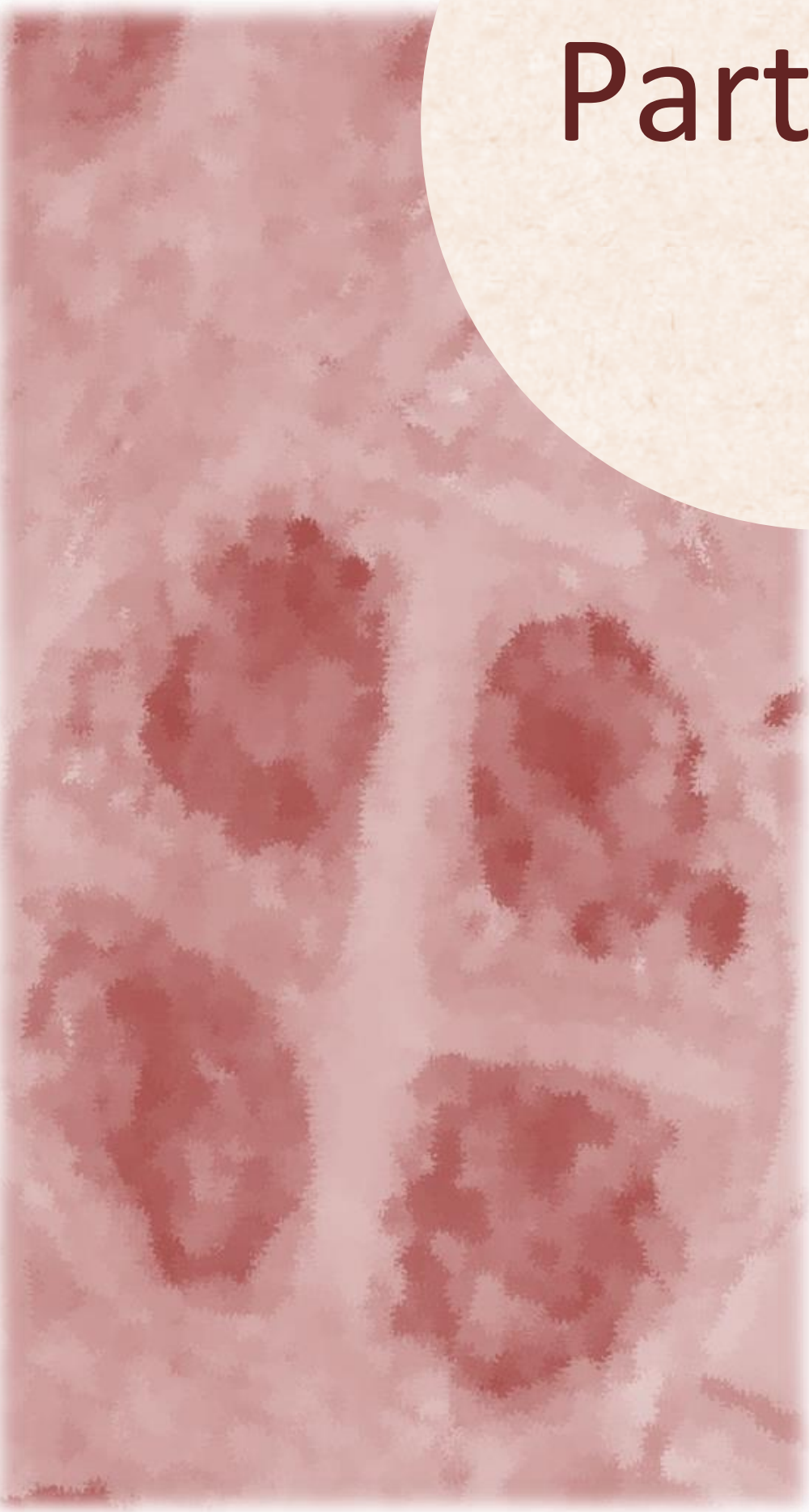
<b>Capítulo 1</b>	
<b>(Bio)monitoramento da qualidade ambiental</b>	
.....	<b>09</b>
<b>Capítulo 2</b>	
<b>Plantas como bioindicadores e o monitoramento da qualidade ambiental</b>	
.....	<b>12</b>
<b>Capítulo 3</b>	
<b>Genêro <i>Tradescantia</i> como biomonitor ambiental</b>	
.....	<b>14</b>

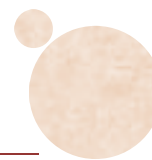
## PARTE II

<b>Capítulo 4</b>	
<b>Fundamentos do Teste de micronúcleos com <i>Tradescantia</i></b>	
.....	<b>19</b>
<b>Capítulo 5</b>	
<b>Cultivo e exposição das plantas</b>	
.....	<b>23</b>
<b>Capítulo 6</b>	
<b>Análises citogenéticas para observação de micronúcleos</b>	
.....	<b>27</b>
<b>Capítulo 7</b>	
<b>Considerações sobre o teste de micronúcleos com <i>Tradescantia</i> aplicado ao monitoramento da poluição atmosférica</b>	
.....	<b>30</b>
<b>Referências .....</b>	<b>33</b>
<b>Sobre os autores .....</b>	<b>41</b>



# Parte I |





## CAPÍTULO I

### (Bio)monitoramento da qualidade ambiental

Embora tenha sido alcançado considerável progresso nas tecnologias de redução de emissão de poluentes durante os últimos anos, a poluição ambiental nos centros urbanos ainda representa um grande problema ambiental e de saúde (Molina e Molina, 2004).

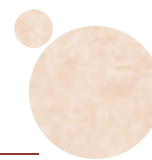
Com o aumento das populações em áreas urbanas, a atmosfera, o solo e os ambientes aquáticos passaram a conter doses maiores de complexas misturas de poluentes provenientes da atividade doméstica, industrial, mineradora, agrícola e da queima de combustíveis fósseis por veículos automotores, incluindo substâncias mutagênicas e carcinogênicas, o que requer métodos de avaliação regulares para monitorar a qualidade ambiental (EEA, 2003; WHO, 2006).

Métodos físico-químicos, associados a modelos matemáticos, permitem medir as concentrações ambientais dos principais

*[A necessidade de aplicação de bioensaios na complementação dos parâmetros físico-químicos, utilizados no monitoramento da qualidade ambiental pode ser compreendida do ponto de vista do tratamento da água.*

*Embora existam parâmetros que regulamentam a qualidade de água, as variáveis analisadas consistem, geralmente, apenas na avaliação dos níveis de nitrato, nitrogênio amoniacal, amônia, fósforo total, condutividade elétrica, pH, turbidez, sólidos suspensos e microbiologia.*

*Contudo, dados da qualidade da água, gerados através de medidas físico-químicas dos níveis de poluição, apesar de importantes, não podem ser usados diretamente para prever riscos aos quais a população está sujeita, já que os organismos vivos reagem aos poluentes aquáticos e a outros fatores ambientais de maneira integrada.]*



poluentes. Essas medidas servem para verificar se valores limites, estabelecidos pelas leis ambientais locais ou recomendados por organizações mundiais, estão sendo respeitados (Klumpp et *al.*, 2006).

Contudo, ainda que a qualidade ambiental possa ser avaliada por meio de estimativas físico-químicas, que estimam com precisão a

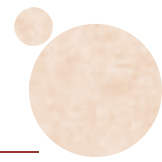
• • •  
(...) um “alarme natural” precisa ser empregado para detectar e alertar sobre os riscos ambientais que ameaçam o equilíbrio e a saúde dos organismos que vivem em um ecossistema.

concentração dos poluentes, na verdade, os resultados dessas medidas não garantem conclusões a respeito do impacto desses contaminantes sobre seres vivos.

De fato, os efeitos simultâneos da associação de outros poluentes - que caracterizam a mistura complexa que constitui o biótopo das grandes cidades - sobre a biota não podem ser conhecidos a partir de informações baseadas somente na concentração de cada um desses poluentes.

• • •  
De acordo com Ma et *al.* (1994) e Ma et *al.* (1996), um “alarme natural” precisa ser empregado para detectar e alertar sobre os riscos ambientais que ameaçam o equilíbrio e a saúde dos organismos que vivem em um ecossistema.

Em uma analogia direta, os ensaios de biomonitoramento servem a esse fim, na medida em que caracterizam-se geralmente por permitirem

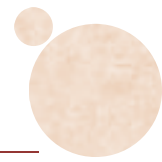


o estabelecimento de bases de dados sobre condições ambientais de várias regiões do mundo (Gopalan et *al.*, 1999). Esse inventário de dados coletados sistematicamente por meio de programas de biomonitoramento dos efeitos da poluição atmosférica sobre organismos representa um modelo experimental adicional aos métodos convencionalmente utilizados.

Klumpp et *al.* (2001) e Carvalho-Oliveira et *al.* (2005) enfatizam que o emprego de programas de biomonitoramento não pretende (e nem consegue) substituir as informações obtidas pelos parâmetros e modelos físico-químicos, mas consiste em fornecer informações adicionais referentes a efeitos dos poluentes sobre organismos.

Idealmente, deveriam ser utilizados mamíferos para a realização de estudos que buscam avaliar os efeitos de poluentes de forma que os resultados poderiam ser extrapolados para os seres humanos. Contudo, monitoramentos desse tipo são de difícil execução, pois requerem amostras populacionais grandes e não garantem isonomia dos resultados por haver inevitável variabilidade entre os indivíduos testados.

[O BIOMONITORAMENTO É UMA METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE AMBIENTAL BASEADA NA ANÁLISE DA RESPOSTA DE ORGANISMOS À DIFERENTES GRADIENTES DE CONTAMINAÇÃO OU POLUIÇÃO. OS ENSAIOS DE TOXICIDADE E ECOTOXICIDADE, ALIADOS À EXPOSIÇÃO *IN SITU* DE ORGANISMOS BIOINDICADORES, CONSITUEM AS PRINCIPAIS TÉCNICAS DESSE TIPO DE ESTUDO.]

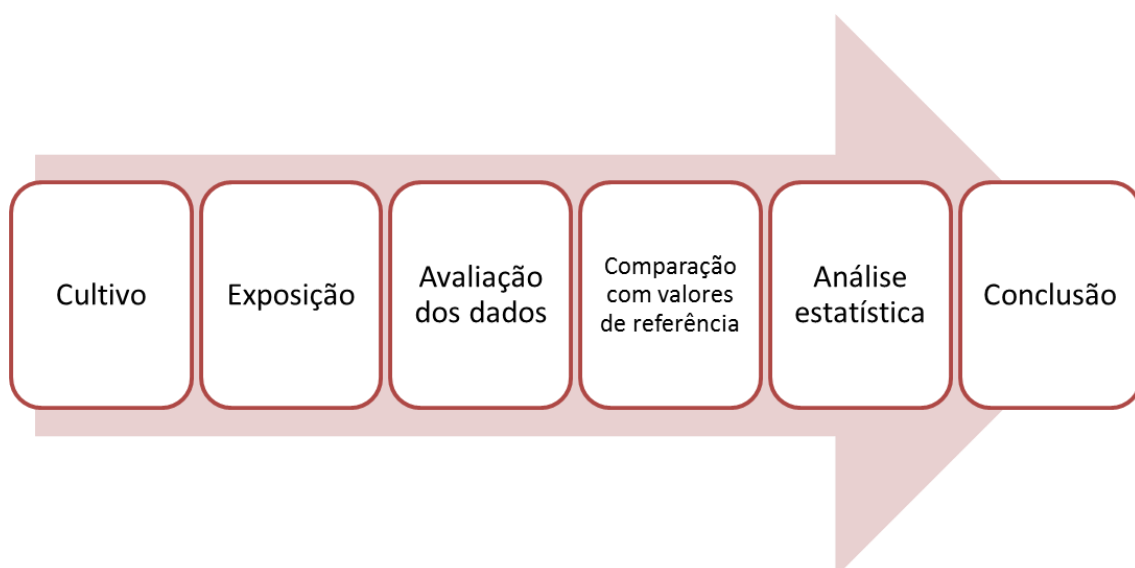


## CAPÍTULO II

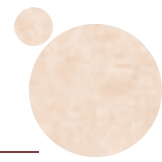
### Plantas como bioindicadores e o monitoramento da qualidade ambiental

A partir da década de 1960, vários testes que utilizavam plantas para detecção de agentes com potencial genotóxico começaram a ser aplicados em estudos de biomonitoramento (Grant, 1982; Ma, 1981; Schairer, 1978).

Fatores como baixo custo operacional, alta eficiência e sensibilidade fazem das plantas bioindicadores ideais para monitoramento e investigações realizadas em laboratório ou *in situ* (Alves et al., 2001; Guimarães et al., 2000). Contudo, para que os ensaios sejam válidos e seus resultados confiáveis, a utilização de plantas bioindicadoras no monitoramento da qualidade ambiental deve seguir etapas definidas, conforme pode ser visto na Figura 1, adaptada de Klumpp et al. 2001.



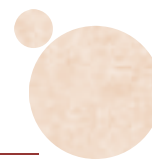
**Figura. 1.** Etapas do biomonitoramento da qualidade ambiental com utilização de plantas bioindicadores.



Ensaio para detecção de efeitos genotóxicos utilizando plantas baseiam-se na alteração fenotípica de uma variedade de espécies sensíveis à ação de mutágenos. Biomonitoramentos utilizando espécies como *Zea mays*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare* e *Arabidopsis thaliana* (Plewa, 1982; Gichner et al., 2004; Vig, 1982) foram realizados em diversos estudos, mas são atualmente considerados modelos inviáveis devido o longo tempo consumido para o cultivo e reprodução dessas plantas.

Diante da necessidade da proposição de testes rápidos e pouco dispendiosos, outros modelos de bioensaios utilizando plantas de desenvolvimento rápido e fácil propagação, como das espécies *Vicia faba*, *Allium cepa* e do gênero *Tradescantia* foram propostos e se basearam na detecção de aberrações cromossômicas que podem ser visualizadas em análises citológicas (Cotelle et al., 1999; Ma et al., 1995; Minouflet et al., 2005; Monarca et al., 2003).

[MONITORAR A QUALIDADE DO AMBIENTE É ESSENCIAL E, DIANTE DO EXPOSTO, O USO DE ENSAIOS BIOLÓGICOS CAPAZES DE DETECTAR DANOS CAUSADOS POR POLUENTES EM ORGANISMOS BIOINDICADORES CONTRIBUI PARA A CONSTRUÇÃO DE PARÂMETROS QUE AVALIAM OS EFEITOS ADITIVOS E SINERGISTAS DOS POLUENTES ATMOSFÉRICOS (COHEN ET AL., 2002; WADA ET AL., 2001)]



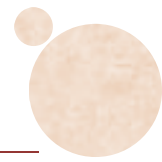
## CAPÍTULO III

### Genêro *Tradescantia* como biomonitor ambiental

Pertencente à família Commelinaceae, o gênero *Tradescantia* compreende aproximadamente 500 espécies que são encontradas principalmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta (Watson e Dallwitz, 1992).

Em 1960 Sparrow produziu o clone mais frequentemente utilizado para estudos de genotoxicidade. Trata-se do clone #4430, obtido pela hibridação entre *Tradescantia hirsutiflora*, que possui flores azuis e *Tradescantia subacaulis*, com flor rosa (Sparrow e Sparrow, 1976). Graças à sua versatilidade e sensibilidade, o clone #4430 foi empregado em biomonitoramentos da qualidade do ar em diversas cidades europeias (Isidori et al., 2003; Klumpp et al., 2006; Ma et al., 1996).

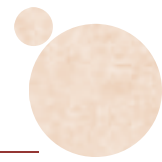
[Bioensaios que utilizam plantas do gênero *Tradescantia* são considerados indicadores importantes para detecção e monitoramento dos efeitos da exposição a contaminantes ambientais]



O fato de ser um híbrido estéril, garante aos ensaios que utilizam #4430 isogenicidade, uma vez que essas plantas só podem ser propagadas vegetativamente em condições peculiares de cultivo, especialmente, em relação às condições climáticas, visto que são plantas adaptadas ao clima temperado, típico dos países europeus.

O clone #03 de *Tradescantia paludosa* foi produzido ainda na década de 1940 por K. Sax e utilizado em estudos de aberrações cromossômicas (Ma, 1981). Recentemente, grupos de pesquisa brasileiros têm empregado a espécie *Tradescantia pallida* em ensaios de biomonitoramento ambiental (Alves et al., 2008; Batalha et al., 1999; De Souza Lima et al., 2009; Suyama et al., 2002).

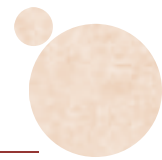
*Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt (Figura 2) tem em média de 15 a 25cm de comprimento, é herbácea e possui características anatômicas que lhe permitem ser facilmente distinguida, como suas folhas suculentas e epiderme rica em pigmentos do tipo antocianina, que confere coloração púrpura à planta (Joly, 2005; Lorenzi e Souza, 2008). Além disso, a espécie floresce ao longo de todo ano, é facilmente cultivada e pode ser propagada vegetativamente.



**Figura.2.** Inflorescência de *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt

Estudos compararam e confirmaram que a espécie *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt utilizada para biomonitoramento dos efeitos de mutágenos de origem ambiental é tão sensível quanto os clones #4430 e #03 (Andrade Junior et al., 2008; Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000; Meireles et al., 2009; Suyama et al., 2002).

A ampla utilização de *T. pallida* em estudos conduzidos no Brasil e em outros países da América do Sul em substituição aos clones produzidos e empregados nos ensaios europeus se deve às diferenças climáticas entre os dois continentes. Clones #4430 e #03 são difíceis de

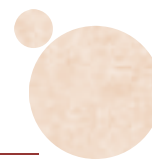


serem cultivados no clima tropical enquanto, *T. pallida*, de acordo com Rodrigues et al (1997), se desenvolve com facilidade nas condições climáticas tropicais, dado que essa espécie é naturalmente adaptada ao ambiente encontrado nos países latino-americanos.

Os dados e achados obtidos em experimentos com a *Tradescantia* são, em geral, consistentes, precisos e confiáveis. Em especial, a resposta a baixos níveis de contaminação e mutágenos químicos raramente é obtida com outros ensaios biológicos. Sobretudo, este tipo de estudo apresenta uma série de vantagens que o torna ideal para ser utilizado em países em desenvolvimento, pois é um sistema pouco dispendioso e versátil, podendo servir como teste para uma grande variedade de pesquisas (GRANT, 1994).



# Parte II |



## CAPÍTULO IV

### Fundamentos do Teste de micronúcleos com *Tradescantia*

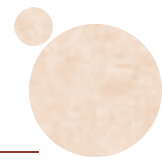
O teste de micronúcleos com *Tradescantia* é um dos ensaios mais comumente utilizados para a detecção de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em organismos superiores. Um estudo proposto por Misík et al (2011) revisou 100 artigos que foram publicados desde 1995, revelando que cerca de 160 agentes químicos já foram testados isoladamente ou em misturas complexas presentes no ambiente por meio do teste de micronúcleos com *Tradescantia*.

O teste de micronúcleos com *Tradescantia* foi primeiramente proposto por Ma et al (1978). Esse estudo comparou a frequência de micronúcleos nas tétrades com a frequência de células mutantes nos filamentos de estames em clones #4430 após a exposição das plantas a 1,2-dibromoetano (DBE). Os resultados do estudo de Ma e seus colegas revelaram que o teste de



**(...) cerca de 160  
agentes químicos  
já foram testados  
isoladamente ou  
em misturas  
complexas  
presentes no  
ambiente por meio  
do teste de  
micronúcleos com  
*Tradescantia*.**

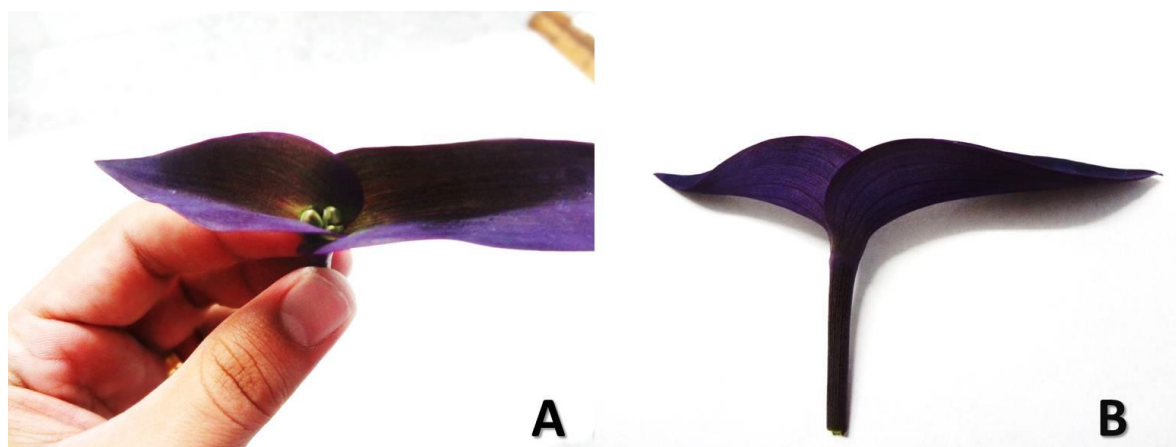




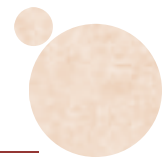
micronúcleos foi 30 vezes mais sensível que o teste utilizando os estames de *Tradescantia*. Posteriormente, outros estudos compararam e confirmaram a maior sensibilidade do teste de micronúcleos em relação ao teste do filamento de estame no clone #4430 (Minouflet et al., 2005).

Fundamentalmente, o teste de micronúcleos com o gênero *Tradescantia* consiste em uma série de procedimentos e padronizações para exposição (no laboratório ou *in situ*) das plantas a agentes contaminantes, seguida da análise e estimativa da frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrades.

O estágio de tétrades das células-mãe de grãos de pólen é ideal para a observação dos micronúcleos, pois, nesse período, as células encontram-se em interfase, que no gênero *Tradescantia* tem duração de 36 a 48 horas. Células em estágio de tétrade são obtidas em inflorescências jovens, que podem ser identificadas por apresentarem botões florais em estágio intermediário (Figura 3A), protegidos por folhas modificadas em brácteas com formato de barca (Figura 3B).



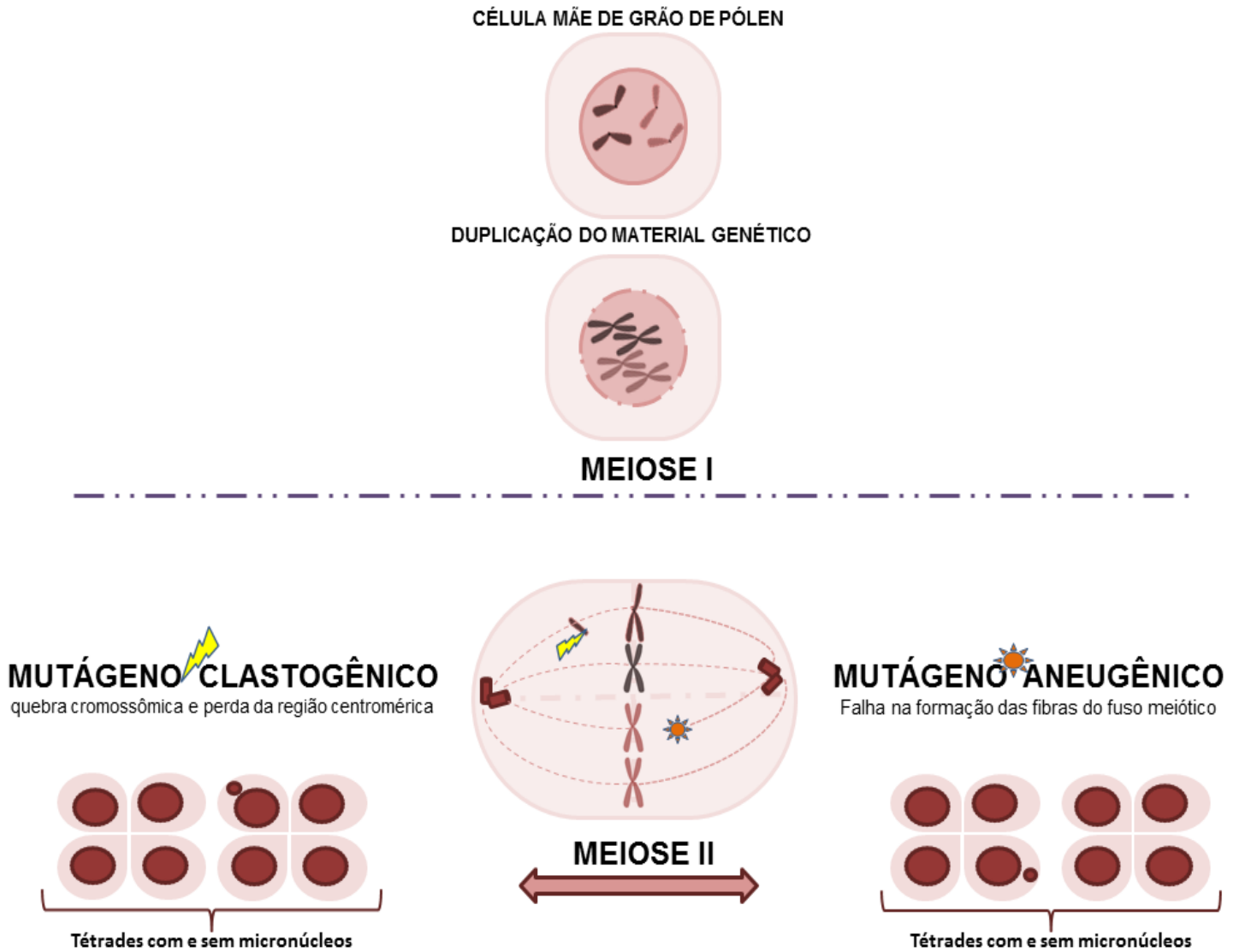
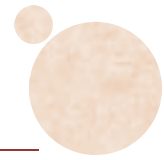
**Figura. 3.** Botões florais em estágio intermediário (Fig. 3A). Folhas modificadas em brácteas com formato de barca (Fig. 3B).



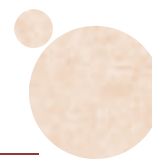
## Micrônúcleos

são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos (efeito clastogênico que pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular) ou cromossomos inteiros (efeito aneugênico que pode ocorrer na meiose I e/ou meiose II) que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos no núcleo das células filhas, conforme pode ser visto no diagrama proposto na Figura 4.

**No citoplasma interfásico, as estruturas que não se incorporaram ao núcleo podem ser visualizadas como corpúsculos não aderidos a ele, com diâmetro que pode variar de 1/5 a 1/3 do tamanho do núcleo e com mesma coloração dele, sendo classificadas como micrônúcleos, refletindo, portanto, a ocorrência de efeitos genotóxicos causados por mutágenos que têm ação clastogênica ou aneugênica (Holland et al., 2008).**



**Figura. 4.** Diagrama da formação de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia*.



## CAPÍTULO V

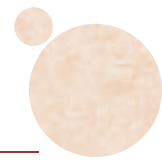
### Cultivo e exposição das plantas

Para o cultivo e manutenção adequados de *Tradescantia*, primeiramente deve-se levar em consideração as condições climáticas sob as quais o estudo será desenvolvido. O cultivo em casas de vegetação é opcional em países de clima temperado e obrigatório em regiões de invernos rigorosos. Na América do Sul, é comum encontrarmos a espécie *Tradescantia pallida* ornamentando jardins e canteiros urbanos.

Uma pesquisa realizada por Klumpp et al (2004) investigou a influência das condições climáticas sobre a frequência de micronúcleos e avaliou implicações para o Teste de Micronúcleos com *Tradescantia*, especialmente em relação ao cultivo e exposição das espécies da planta.

De acordo com o estudo, o controle da ventilação, umidade relativa e temperatura do ar são essenciais para garantir a viabilidade dos ensaios feitos com *Tradescantia*.

Conforme indicado por Klumpp et al (2004; 2006), à temperatura de 11°C, a frequência de mutações espontâneas que formam micronúcleos aumenta 100 vezes. No outro extremo, temperaturas de 42°C são incompatíveis com o desenvolvimento das células mãe de grãos de pólen, inviabilizando o teste de micronúcleos. Variações na umidade relativa também exercem influência na frequência espontânea de micronúcleos e podem alterar os resultados de ensaios que testem o potencial genotóxico de substâncias ou do ambiente. Baixa umidade do ar e temperaturas elevadas estimulam a abertura dos estômatos,

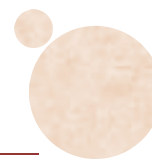


umentando a absorção e o transporte de substâncias com potencial mutagênico às células alvo.

Desse modo, o cultivo ideal consiste em condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade relativa. Rodrigues (1999) indica que as condições ideais para o cultivo de *T. pallida* consiste em temperaturas de dia/noite de 21/19 °C, fotoperíodo de 17 horas e umidade relativa entre 65 e 70%.

A influência climática deve ser minimizada durante a exposição das plantas em ensaios de biomonitoramento *in situ* da atmosfera.

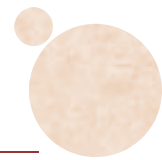
Klumpp et al., (2006) sugeriram que a exposição à atmosfera seguisse um padrão. De acordo com esses pesquisadores, um tipo especial de caixa deve ser construído para abrigar as plantas durante o período de exposição. As caixas devem ser construídas seguindo dimensões predeterminadas (25cm X 25cm X 35cm) e devem ser cobertas (na parte superior) com tela de sombreamento (50% de permeabilidade luminosa), conforme mostrado na Figura 5. Além disso, no momento da exposição, as caixas devem ser fixadas em suportes, de modo que fiquem a 2,0m de altura para evitar contato com contaminantes presentes no solo.



**Figura. 5.** Sistema para exposição de *Tradescantia* em biomonitoramento *in situ*.

Embora exista a possibilidade de realizar um biomonitoramento passivo, ou seja, utilizando plantas que cresceram naturalmente em jardins ou canteiros urbanos, a maioria dos ensaios realizados consiste no cultivo das plantas bioindicadoras sob as condições previamente descritas para que, em seguida, seja realizado o transporte e exposição ao ambiente a ser monitorado.

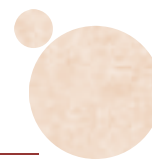
Geralmente, 15 a 20 plantas são expostas por ponto monitorado. Além disso, é recomendável que um local de referência (com ausência ou nível baixo de poluição) seja adotado para estabelecimento de um padrão de comparação e realização de testes estatísticos de hipóteses. O tempo de exposição das plantas durante os ensaios de biomonitoramento deve ser considerado atentamente, pois, segundo Fomim e Hafner (1998),



exposições realizadas por um período de seis horas foram insuficientes para detectar efeitos genotóxicos. Desse modo, é recomendado que as exposições tenham duração média de 24 horas (Ma et *al.*, 1996).

Em estudos que biomonitoram a atmosfera, os testes devem ocorrer ao longo de pelo menos 12 meses para garantir que as variações nos índices de poluentes durante as mudanças climáticas das diferentes estações possam ser consideradas, aumentando a confiabilidade dos ensaios (Klumpp et *al.*, 2004).

Ainda que, diante do exposto, seja possível verificar a existência de uma série de procedimentos que buscam padronizar os métodos de cultivo e exposição de *Tradescantia*, os objetivos e características peculiares de cada investigação podem modificar esses protocolos sem comprometer a validade do teste (Misík et *al.*, 2011).



## CAPÍTULO VI

### Análises citogenéticas para observação de micronúcleos

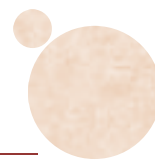
A seleção, fixação e conservação das inflorescências utilizadas no teste de micronúcleos com *Tradescantia* é realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Ma (1981). Em estudos de biomonitoramento atmosférico, esse protocolo propõe que as inflorescências jovens das plantas expostas sejam coletadas e fixadas em solução de ácido acético e etanol na proporção 1:3 por 24 horas. Após a fixação, as inflorescências devem ser transferidas para etanol 70% e mantidas refrigeradas (6°C) até o momento das análises citogenéticas.

As etapas da preparação das lâminas para análise citogenética são apresentadas segundo o esquema a seguir, baseado na proposta de Misík et al. (2011), com adaptações nossas.

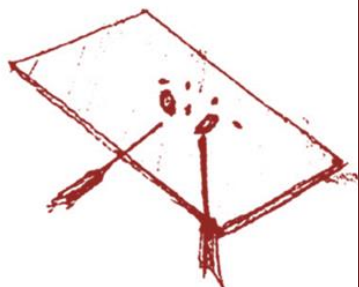
#### Seleção de inflorescência

O primeiro passo para o preparo das lâminas consiste na seleção e dissecação das inflorescências para isolamento dos botões florais. Para aumentar as chances de visualização de botões florais com células-mãe de grãos de pólen no estágio de tétrade, deve-se utilizar primeiramente os botões de tamanho intermediário em cada inflorescência dissecada.





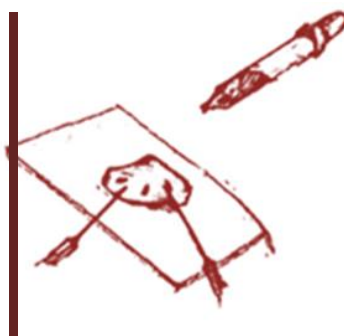
## Dissecação das anteras



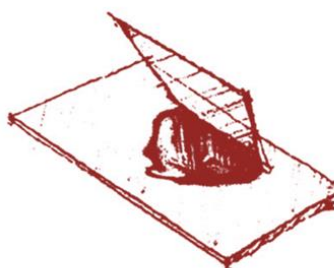
O botão floral selecionado é transferido para uma lâmina e dissecado com um estilete histológico para exposição das anteras. Após os fragmentos celulares resultantes da dissecação do botão floral serem retirados e descartados, as anteras podem ser maceradas.

## Gotejamento com carmin

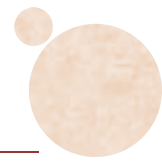
A maceração das anteras é realizada pela adição de uma gota de carmin acético 2% e cobertura da lâmina com lamínula, pressionando suavemente as anteras para liberação das células.



## Fixação do corante

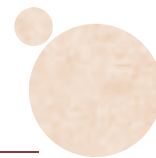


A fixação do corante nas células é garantida pelo aquecimento rápido (5 segundos) da lâmina à temperatura média de 60°C, utilizando lamparina com álcool.



Antes de analisar a lâmina, é sugerido que o pesquisador verifique a existência de células-mãe de grãos de pólen no estágio de tétrades em quantidade suficiente. De acordo com o protocolo padronizado por Ma (1981), pelo menos 300 tétrades devem ser avaliadas por inflorescência analisada. O número de micronúcleos presentes nas tétrades precisa ser estimado em cinco inflorescências, no mínimo, por local ou situação monitorada. As lâminas são observadas em microscópio óptico com magnificação de 400 vezes.

É importante que as lâminas sejam codificadas e que as análises sejam realizadas em um estudo cego. São considerados micronúcleos as estruturas que medem cerca de  $1/3$  a  $1/5$  do núcleo principal, que apresentam coloração e distribuição de cromatina semelhante ao núcleo e estão desconectadas deste.



## CAPÍTULO VII

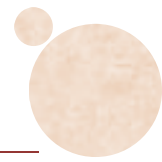
### **Considerações sobre o teste de micronúcleos com *Tradescantia* aplicado ao monitoramento da poluição atmosférica**

Espécies e clones de *Tradescantia* são sensíveis aos efeitos de mutágenos presentes na atmosfera e, por essa razão, biomonitoramentos que avaliam a ocorrência de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia* foram conduzidos em várias localidades que apresentam tráfego intenso de veículos.

Um estudo proposto por Klumpp et al. (2006) utilizou o teste de micronúcleos com *Tradescantia* para monitorar 65 locais com diferentes níveis de tráfego veicular em 10 cidades europeias. Os resultados deste estudo revelaram o elevado potencial genotóxico das localidades com intenso tráfego de veículos em que as plantas foram expostas.

A cidade de Caserta, localizada no sul da Itália, teve 17 localidades monitoradas em um estudo proposto por Isidori et al. (2003). Os autores monitoraram os efeitos genotóxicos da atmosfera da cidade ao longo do verão e inverno do mesmo ano, comparando os resultados entre localidades com diferentes níveis de tráfego de veículos. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que as plantas expostas durante o inverno em locais com tráfego mais intenso apresentaram frequências de micronúcleos significativamente maiores que as demais localidades.

Villarini et al. (2009) monitorou os efeitos genotóxicos de poluentes atmosféricos na cidade de Perugia, localizada na região central da Itália.



Considerando a inexistência de informações oficiais sobre a qualidade do ar na cidade de Uberlândia, nosso grupo de trabalho (Pereira et al., 2013) avaliou por cinco anos os riscos genotóxicos de áreas com diferentes intensidades de tráfego veicular por meio do Teste de micronúcleos com *Tradescantia*.

Para tanto, do inverno de 2006 ao verão de 2010, vinte inflorescências foram expostas, duas vezes ao ano, em locais com diferentes índices de fluxo veicular, e avaliadas quanto à frequência de micronúcleos.

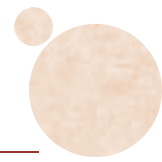
Adicionalmente, procuramos determinar a influência de fatores associados ao clima da cidade nas frequências de micronúcleos encontradas em cada local monitorado.

Os resultados obtidos revelaram que, embora a baixa umidade relativa do ar tenha exercido influência positiva na formação de micronúcleos nas tétrades de *T. pallida*, o principal fator determinante para os efeitos genotóxicos observados foi a elevação do fluxo de veículos nos locais monitorados ao longo de cinco anos de estudo.

Coadunando com os ensaios já descritos, conduzidos na Europa, esses autores confirmaram que as plantas expostas em áreas com altos índices de poluição apresentaram as maiores frequências de micronúcleos.

Estudos realizados na América do Sul e, inclusive no Brasil, empregaram o teste de micronúcleos com *Tradescantia pallida* na avaliação da qualidade do ar de grandes centros urbanos. Os trabalhos de Batalha et al. (1999); Guimarães et al. (2000) e Carvalho-Oliveira et al. (2005) avaliaram os efeitos da poluição atmosférica da cidade de São Paulo, que possui uma das maiores frotas veiculares do mundo. Todos esses autores confirmaram a sensibilidade de *T. pallida* aos efeitos genotóxicos dos contaminantes produzidos pelo intenso tráfego de veículos.

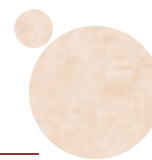
Outras cidades no Brasil, com tráfego de veículos menor que São Paulo, mas com intensa urbanização também foram monitoradas em relação aos efeitos da contaminação atmosférica derivada da utilização de automóveis. Recentes estudos de monitoramento da qualidade do ar, utilizando o teste de micronúcleo com *T. pallida* foram



conduzidos nas cidades baianas de Senhor do Bonfim (Andrade Júnior et al., 2008) e Feira de Santana (Meireles et al., 2009) e na cidade mato-grossense de Dourados (Crispim et al., 2011). Em todos esses estudos, a ocorrência de micronúcleos foi proporcional ao fluxo de veículos nos locais monitorados.

Embora esse referencial teórico tenha exposto informações sobre as aplicações dos ensaios de biomonitoramento, algumas das vantagens da utilização do teste de micronúcleo com *Tradescantia* merecem serem ressaltadas. Trata-se de um ensaio rápido, simples e de baixo custo, que apresenta resultados que podem ser observados diretamente em microscópio óptico. A espécie *T. pallida* pode ser propagada vegetativamente, garantindo a uniformidade genética e, além disso, floresce o ano todo, possibilitando ensaios em longo prazo.

Contudo, o teste de micronúcleos com *Tradescantia* apresenta algumas limitações. Como o teste é altamente sensível, fatores como as variações climáticas podem influenciar a taxa de mutações espontâneas. Além disso, algumas mutações estruturais cromossômicas, como translocações e inversões, não podem ser detectadas pelo teste. Ainda que esse bioensaio apresente certas restrições, é consenso entre os vários estudos aqui apresentados que a combinação entre parâmetros físico-químicos e dados obtidos com o teste de micronúcleos com *Tradescantia* contribuem para a qualidade dos estudos que monitoram os impactos da poluição atmosférica.



## REFERÊNCIAS

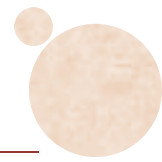
Alves, E., Giusti, P., Domingos, M., Saldiva, P., Guimarães, E., Lobo D. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Rev. Bras. Bot.* 24 (2001) 567-576.

Alves, E. S., de Souza, S. R., Pedroso, A. N. V. and Domingos, M. Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'Purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 71 (2008) 717–721.

Andrade Júnior, S., Santos Júnior, J., Oliveira, J., Cerqueira, E., Meireles, J. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana, *Acta Scientiarum: Biological Sciences.* 30 (2008) 295-30.

Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S., Saldiva, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay, *Mutat. Res.* 426 (1999) 229-232.

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva,



P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil, Environ. Res. 98 (2005) 1-7.

Cotelle, S., Masfaraud, J. F. and Ferard, J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays, Mutat. Res. 426 (1999) 167–171.

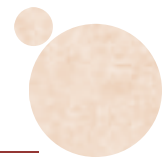
Crispim, B.A., Vaini, J.O., Grisolia, A.B., Teixeira, T.Z., Mussury, R.M., Seno, L.O. Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 718-723.

De Souza Lima, E., De Souza, S. R., Domingos, M. Sensitivity of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. 'Purpurea' Boom to genotoxicity induced by ozone, Mutat. Res. 675 (2009) 41–45.

EEA – European Environmental Agency. Environment and human health. State of the environment report. 2003. Disponível em: [http://www.eea.europa.eu/publications/environmental\\_assessment\\_report\\_2003\\_10](http://www.eea.europa.eu/publications/environmental_assessment_report_2003_10). Acesso em: 10/06/2012.

Fomin, A., Hafner, C. Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN), Mutat. Res. 414 (1998) 139-148.

Gichner, T., Velemínský, J. Monitoring the genotoxicity of soil extracts



from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays, Mutat. Res. 426 (1999) 163-166.

Gopalan, H.N. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays, Mut. Res. 426 (1999) 99-102.

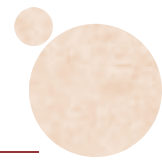
Grant, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat. Res. 99 (1982) 273–291.

Grant, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, Mutat. Res. 310 (1994) 175-185.

Guimarães, E., Domingos, M., Alves, E., Caldini, N., Lobo, D., Lichtenfels, A., Saldiva, P. 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 (2000) 1-8.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmueller, S., Fenech, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, Mutat. Res. 659 (2008) 93-108.

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. *In situ* monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia*



micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs), *Chemosphere* 52 (2003) 121-126.

Joly, A.B. Botânica : introdução à taxonomia vegetal. 13.ed. Companhia Editora Nacional. 2005. 777p.

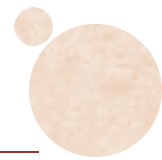
Klumpp, A., Ansel, W., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol, *Hereditas* 141 (2004) 142-148.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomin, A. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadores (EuroBionet), *Rev. Bras. Bot.* 24 (2001) 511-518.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J.P., He, S., Peñuelas, J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M.J., Vergne, P. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities, *Environ. Pollut.* 139 (2006) 515-22.

Lorenzi, H., Souza, HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4 ed. Instituto Plantarum. 2008. 1130p.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay, *Mutat. Res.* 310 (1994) 221-230.



Ma, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening, *Environ. Health Perspect.*, 37 (1981) 85–90.

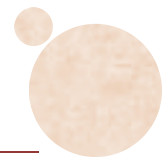
Ma, T., Sparrow, A., Schairer, L., Nauman, A. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutat. Res.* 58 (1978) 251-258.

Ma, T., Xu, C., Liao, S., McConnell, H., Jeong, B., Won, C. In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator, *Mutat. Res.* 359 (1996) 39-52.

Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A., Zhang, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334 (1995) 185–195.

Meireles, J., Rocha, R., Neto, A.C., Cerqueira, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN), *Mutat. Res.* 675 (2009) 46-50.

Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P. M., Cotellet, S. and Ferard, J. F. Assessment of the genotoxicity of <sup>137</sup>Cs radiation using *Vicia* micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays, *J. Environ. Radioact.*, 81 (2005) 143–153.



Misik, M., Ma, T.H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J.K., Knasmueller, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update, *Mutagenesis* 26 (2011) 215–221.

Molina, M. J., Molina, L. T. Megacities and Atmospheric Pollution, *Air & Waste Management Association* 54 (2004) 644-680.

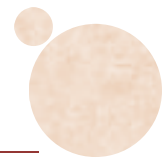
Monarca, S., Rizzoni, M., Gustavino, B., Zani, C., Alberti, A., Feretti, D. and Zerbini, I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests, *Environ. Mol. Mutagen.*, 41(2003) 353–359.

Pereira, B.B., Campos Júnior, E.O., Morelli, S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2013) 87, 17-22.

Plewa, M. J. Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 99 (1982) 317–337.

Rodrigues, G., Ma, T., Pimentel, D., Weinstein, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review, *Crit. Rev. Plant Sciences*, 16 (1997) 325-359.

Rodrigues, G.S. Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia*. 1ed.



Embrapa Meio Ambiente. 1999. 56p.

Schairer, L. A., Van't Hof, J., Hayes, C. G., Burton, R. M., de Serres, F. J. Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the *Tradescantia* stamen hair system, *Environ. Health Perspect.*, 27 (1978) 51–60.

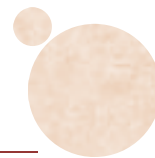
Sparrow, A.H., Sparrow, R.C. Spontaneous somatic mutation frequencies for flower in several *Tradescantia* species and hybrids, *Env. Exp. Botany*. 16 (1976) 23-43.

Suyama, F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.S., Domingos, M., Alves, E.S., Carvalho, H.A., Saldiva, P.H.N. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35 (2002) 127-129.

Vig, B. K. Soybean (*Glycine max* [L.] merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutat. Res.* 99 (1982) 339–347.

Villarini, M., Fatigoni, C., Dominici, L., Maestri, S., Ederli, L., Pasqualini, S., Monarca, S., Moretti, M. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two *in situ* plant bioassays, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3354-3356.

Watson, L., Dallwitz, M. J. The families of flowering plants: descriptions,



illustrations, identification, and information retrieval. (1992). Disponível em: <<http://delta-intkey.com>> Acesso em 10/08/2010.

WHO-World Health Organization. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide Global updated 2005. 2006. Disponível em:  
<[http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_SDE\\_PHE\\_OEH\\_06.02\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf)  
> Acesso em 01/09/2011.

## Sobre os **Autores** |

### **Boscolli Barbosa Pereira**

Bacharel (2007) e Licenciado (2008) em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Mestre (2008) e Doutor em Genética e Bioquímica (2012) pelo programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica | UFU. Tem experiência (ensino e pesquisa) nas áreas de Educação Ambiental, Ecotoxicologia, Saúde Ambiental e Biomonitoramento Ambiental. É Professor Adjunto nos Cursos de Bacharelado em Gestão em Saúde Ambiental e Bacharelado em Biotecnologia | UFU. É docente colaborador na linha 'Análise, Planejamento e Gestão Ambiental' do Programa de Pós Graduação em Geografia | UFU.

### **Sandra Morelli**

Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura (1975) e Bacharelado (1976), pela Universidade Federal de São Carlos, Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais pela Universidade Federal de São Carlos (1981) e Doutorado em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos (1998). Atualmente é Professora Associada 3 da Universidade Federal de Uberlândia. Atua na área de Genética, com ênfase em Citogenética, principalmente nos seguintes temas: Citogenética, Evolução Cariotípica e Mutagênese Ambiental.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-99252-09-3



9 788599 252093