



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CURSO DE CIÊNCIAS RURAIS**

LETÍCIA BALTAR

**POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DA RODAMINA B EM *TRADESCANTIA*
(CLONE BNL 4430)**

**CURITIBANOS
Junho/2015**

Potencial Citogenotóxico da Rodamina B em *Tradescantia* (clone BNL 4430)

Projeto apresentado como exigência da disciplina de Projetos em Ciências Rurais, do curso de Ciências Rurais, ministrado pelos professores Antônio Lunardi Neto e Joni Stolberg, sob orientação da professora Dr.^a Patrícia Maria Oliveira Pierre Castro

Curitiba

Junho/2015

RESUMO

O Estado de Santa Catarina apresenta um polo industrial diversificado com a presença de atividades têxteis, papel e celulose, agroindustrial e madeireira. Estas indústrias geram efluentes que podem prejudicar ambientalmente as áreas em seu entorno, a exemplo dos resíduos de uso de compostos xantênicos para tingimento, como a Rodamina B. Desta forma, poderia este corante causar efeitos mutagênicos e/ou citogenotóxicos para plantas? Para a avaliação de potencialidade tóxica de poluentes são utilizados bioensaios com plantas superiores, uma vez que são eficazes na detecção de substâncias tóxicas por serem extremamente sensíveis e de baixo custo. O efeito tóxico da Rodamina B em células vegetais, pode ser investigado através de testes de citogenotoxicidade em *Tradescantia* (clone BNL 4430), uma espécie modelo comumente empregada em estudos de biomonitoramento. O objetivo deste trabalho será a avaliação do efeito citogenotóxico do corante Rodamina B em células de planta modelo *Tradescantia* clone BNL 4430, através da aplicação de testes citogenéticos, como o bioensaio do pêlo estaminal (TRAD-TSH) e o teste de micronúcleo (TRAD-MCN). Para isto, hastes do clone serão submetidas a água destilada (controle negativo), a 10µg/mL de solução de formaldeído (controle positivo) e 3 concentrações diferentes de Rodamina B (2,5µg/mL; 5µg/mL; 10µg/mL). Para a obtenção de imagens será utilizado o microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73. Os dados serão avaliados através da análise de variância e as médias serão comparadas por meio do teste Scott-Knott, utilizando o programa estatístico (Sisvar 4.0) ao nível de significância de 5%. Espera-se contribuir com informações relevantes quanto aos efeitos citogenotóxicos para alertar usuários desse corante e para o tratamento correto desses efluentes.

Palavras-chave: *Tradescantia* clone BNL 4430, Rodamina B, Citotoxicidade, Genotoxicidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA.....	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1 Citotoxicidade e Genotoxicidade	2
3.2 Toxicidade da Rodamina B.....	4
3.3 Biomonitoramento com o uso de plantas modelo	5
3.4 Modelo Tradescantia BNL 4430.....	7
4 HIPÓTESE	9
5 OBJETIVOS.....	9
5.1 Geral.....	9
5.2 Específico	9
6 METODOLOGIA	9
6.1 Material vegetal.....	9
6.2 Bioensaio TRAD-MCN (Teste do micronúcleo).....	10
6.3 Bioensaio do Pêlo Estaminal (TRAD-SHM).....	11
6.4 Análise estatística	12
7 RESULTADOS ESPERADOS.....	12
8 CRONOGRAMA	12
9 ORÇAMENTO	13
10 REFERÊNCIAS	14

1 INTRODUÇÃO

O Estado de Santa Catarina abrange uma economia industrial diversificada, o que inclui a produção têxtil, papel e celulose (FIESC, 2010 apud FLOHR, 2011). Além das referidas atividades, os setores agropecuários e madeireiros são extremamente expressivos gerando significativos efluentes ao meio ambiente, contribuindo com poluição ambiental das áreas de influência na qual estão inseridos.

No ramo industrial independente da fonte primária, como produtos têxteis, madeira, polpa de papel, alimentícias, entre outros, o tingimento é um processo que demanda frequentemente cargas substanciais de poluentes. Um exemplo é o emprego de corantes orgânicos, em destaque compostos xantenos, como a Rodamina B (ZOLLINGER, 1987 apud DAMBROS, 2008).

Rodamina B é um corante solúvel em água, metanol e etanol, que pertence à classe de compostos orgânicos, chamados fluoronas e apresenta coloração variável entre vermelho e rosa, sendo considerado potencialmente carcinogênico em estudo com aplicação subcutânea em ratos (IARC, 1978 apud OSHA, 20--). Em relação a pesquisas referentes ao potencial citogenotóxico deste corante com bioindicadores vegetais, há um único registro de estudo de citotoxicidade em raiz da planta modelo *Allium cepa* (cebola) (TAN et al., 2013, tradução nossa).

Atualmente, há uma preocupação crescente na identificação de poluentes tanto ao nível atmosférico, terrestre quanto aquático. Uma vez identificados e estudados seus efeitos potenciais sobre o ecossistema e a saúde da população, pode-se estabelecer possíveis medidas mitigadoras para esses impactos ambientais.

A realização de bioensaios para a avaliação de toxicidade de substâncias com plantas superiores têm se tornado cada vez mais comum, por serem mais simples e sensíveis e de baixo custo, quando comparados aos bioensaios com animais, além da eficácia comprovada em diversos estudos de biomonitoramento de poluentes (RODRIGUES, 1997 apud MAZIVIERO, 2011).

Um recurso bastante utilizado, nesse sentido, é o emprego de testes citogenéticos em plantas superiores, que possibilita a verificação de danos causados em nível celular por substâncias tóxicas e mutagênicas, em diversas concentrações e distintos tempos de exposição. (AL-SABTI; KURELEC, 1985; ARRIGONI, 1994; DE SERRES, 1992 apud DAMBROS, 2008). Tais testes, ou bioensaios, nos quais podem ser utilizadas plantas-modelo

Tradescantia (clone *BNL 4430*), possibilitam a detecção de efeitos clastogênicos (que envolvem quebras cromossômicas) ou aneugênicos (alterações no fuso mitótico que podem ocasionar erros na segregação cromossômica e aneuploidias).

Estudos dessa grandeza podem enriquecer o conhecimento do potencial citotóxico e mutagênico de tais resíduos provenientes da indústria madeireira corroborando para a indicação ao uso de compostos menos agressivos ao ambiente e aos indivíduos.

A partir dos indícios relatados anteriormente, o corante Rodamina B seria também mutagênico e/ou citotóxico em outro modelo vegetal?

2 JUSTIFICATIVA

O corante Rodamina B já foi analisado em estudos anteriormente mencionados como potencialmente carcinogênico e mutagênico.

Considerando que o uso de Rodamina B como corante de alimentos foi interrompido por vários anos devido à suspeita de ser um carcinogênico natural e se atualmente ser empregado na indústria de laminados de madeira (PAULINO; SALGADO, 2013), sendo ainda utilizado como reagente analítico para a detecção e determinação de metais (KADIRVELU et al., 2005 apud DAMBROS, 2008), tingimento de pedras preciosas como ágata (PIZZOLATO et al., 2002 apud DAMBROS, 2008), traçador de solos (PEREIRA, 2009), corante fluorescente para estudos citológicos (PADOVINI, 2013), entre outros, a mesma, pode vir a ser um efluente contaminante de caráter nocivo dessas indústrias para águas e solos em áreas próximas a locais, nos quais essas atividades são exercidas.

Portanto, o estudo possui relevância, uma vez que o corante Rodamina B, considerado potencialmente mutagênico possui emprego em diversos ramos previamente mencionados, e apesar de estudos em animais, possui apenas único registro abordando uma espécie vegetal (*Allium cepa*). Desta forma, este projeto pode contribuir com informações citogenotóxicas adicionais a Rodamina B.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Citotoxicidade e Genotoxicidade

Devido a crescente preocupação com as condições sanitárias e qualitativas do meio ambiente, os testes referentes a toxicidade de compostos químicos se tornaram um ponto de

interesse dentro da pesquisa científica. Uma vez que os seres vivos estão constantemente expostos a poluentes de diversas fontes (atmosféricos, do solo e da água), cuja presença e acumulação destes compostos tóxicos podem ser prejudicial ao meio ambiente e aos seres neles inseridos, através de efeitos genotóxicos sobre os mesmos, o qual podem ser determinados por métodos biológicos. (SADOWSKA et al., 1994 apud PAGNUSSAT; BUNDCHEN, 2008).

O teste de toxicidade a nível celular proporciona embasamento sobre o nível de segurança das soluções testadas. Estes tipos de testes são indicados para as fases iniciais de desenvolvimento de um composto, pois pode-se identificar se há um potencial genotóxico e/ou carcinogênico, além de servir de incentivo para a obtenção de componentes químicos menos tóxicos. (GOLLAPUDI; KRISHNA, 2000; SNYDER; GREEN, 2001 apud FRÖHNER, 2003).

A citotoxicidade corresponde a alterações no equilíbrio celular que interferem na capacidade das células de se reproduzir e realizar funções específicas (NARDONE, 1977 apud BETTEGA, 2000). Essas alterações dependem de vários fatores, tais como a concentração do componente testado, o tempo de exposição e a capacidade deste em penetrar na célula (HU & HSIUNG, 1989 apud BETTEGA, 2000). A comparação de alteração no índice mitótico com controle negativo é um parâmetro de avaliação da presença de agentes citotóxicos (FERNANDES et al., 2009 apud BONOMO, 2014). Quando os índices mitóticos são menores que no controle negativo podem evidenciar alterações devido a uma ação química. Em casos que os índices estão acima do controle negativo há um aumento da divisão celular, que pode resultar em proliferação celular desordenada e à formação de tumores (HOSHINA, 2002 apud BONOMO, 2014).

Em relação à genotoxicidade pode se detectar efeitos clastogênicos (correspondente a quebras cromossômicas) ou aneugênicos (caracterizada por alterações no fuso mitótico que podem gerar erros na segregação cromossômica e aneuploidias). Para averiguação desses efeitos, são realizados testes de genotoxicidade que são instrumentos sensíveis para a verificação destes tipos de indução de aberrações cromossômicas, que servem como bioindicadores de exposição a agentes com potencial genotóxico (NATARAJAN, 2002; OBE et al., 2002 apud SOUZA, 2006).

Qualquer alteração genética não originada de uma segregação ou recombinação é denominada como mutação. Esta pode ser reparada pelo próprio mecanismo celular. Portanto,

quando não há ocorrência de reparação ou reparo errôneo, mutações de ponto e/ou cromossômicas são originadas (CONNOR E FERGUNSON, 1993 apud SOUZA, 2006).

As mutações podem ser de três tipos: cromossômicas, estruturais (como as deleções, duplicações, inversões e translocações) e numérica (como as aneuploidias e euploidias) (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002 apud SOUZA, 2006). Estas modificações servem como indícios de que há uma exposição a agentes mutagênicos ou carcinogênicos potenciais (SOUZA, 2006).

Para realização de testes de citogenotoxicidade podem ser aplicadas técnicas citogenéticas como o teste de micronúcleo que permite a verificação de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos sobre os organismos testados, caracterizando-se como um método eficiente utilizado em biomonitoramento.

3.2 Toxicidade da Rodamina B

Rodamina conforme relatado anteriormente, é um corante orgânico que pertence a uma família de compostos orgânicos, corantes chamados fluoronas, possui peso molecular 479, fórmula molecular: $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$ (Figura 1).

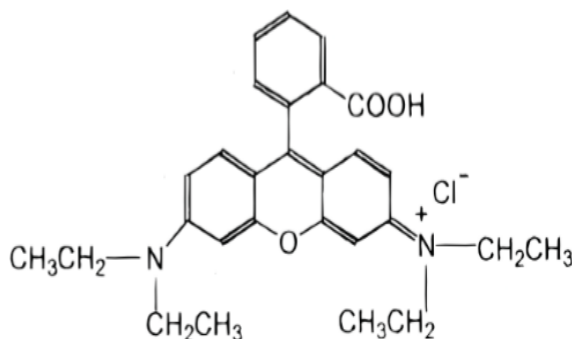


Figura 1: Estrutura da Rodamina B

Existem outros tipos de Rodamina como a 123 e 6G, no entanto, este trabalho será centralizado na Rodamina B devido aos diversos empregos da mesma como: reagente analítico para a detecção e determinação de metais (KADIRVELU et al., 2005 apud DAMBROS, 2008); como corante alimentar, contudo, o uso de Rodamina B como corante de alimentos foi interrompido devido indícios de suspeita de ser um carcinogênico natural (KADIRVELU et al., 2005 apud DAMBROS, 2008); como traçador de solos (PEREIRA, 2009); Entretanto, a Rodamina B deve ser evitada pois é um composto facilmente adsorvido no solo (SOUZA, 2006), como corante fluorescente e para tingimento de ágata, para colorir

de rosa as pedras (PIZZOLATO et al., 2002 apud DAMBROS, 2008), entretanto Pizzolato et al. (2002) apud Dambros (2008), descreveram impactos ambientais relacionado aos efluentes do tingimento de ágatas, especialmente com a utilização do corante Rodamina B; corante fluorescente para estudos citológicos (PADOVINI, 2013) e empregado na indústria de laminados de madeira (PAULINO; SALGADO, 2013).

De acordo com Oga, Camargo e Batistuzzo (2008, p.5) “Entende-se por agente tóxico ou toxicante a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição.” Portanto, a Rodamina B pode ser classificada como um possível agente tóxico residual dessas indústrias para solos e águas.

Muitos foram os estudos sobre Rodamina utilizando animais e microorganismos, sendo comprovada como prejudicial para seres humanos ou animais, causando irritação na pele em exposição de 26 minutos, entretanto o caso foi resolvido dentro de 24 horas (DIRE & WILKINSON, 1987 apud The EFSA Journal, 2005, tradução nossa) e pode induzir reações fototóxicas e fotoalérgicas (ROCHA et al, 1978 apud TAN et al., 2013, tradução nossa). Ainda, foi comprovada experimentalmente efeitos carcinogênicos em ratos, através da produção de sarcomas locais após injeções subcutâneas (TRIPATHY et al, 1995 apud TAN et al., 2013, tradução nossa) além de efeito no fígado quando incorporada em diferentes concentrações (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 ou 2,0%) na alimentação de 5 machos e 5 fêmeas de ratos durante dezoito semanas, resultando num crescimento retardado dos animais que receberam doses mais elevadas e posterior morte desses animais em seis semanas com lesão no fígado (IARC, 1978 apud The EFSA Journal, 2005, tradução nossa). Com relação a estudo em vegetais, há um único relato da aplicação da espécie modelo *Allium cepa*.

3.3 Biomonitoramento com o uso de plantas modelo

Com o aumento da poluição do meio ambiente, surgiu a necessidade de se utilizar métodos como biomonitoramento para a identificação não somente alterações físicas, mas as alterações biológicas sofridas pelos organismos testes quando expostos a produtos químicos. (FANG, 1981 apud SOUZA, 2006).

Bioindicadores são importantes instrumentos utilizados em biomonitoramento que irá expressar a interação entre um agente estressor e um organismo teste. Os bioindicadores sensíveis são importantes ferramentas, uma vez que altera seu comportamento normal quando na presença de componente tóxico (SOUZA, 2006).

O emprego como bioindicadores de seres altamente sensíveis (como plantas) em estudos genotóxicos têm sido crescente, uma vez que se não detectado nenhum poluente pelos seres mais sensíveis, é um indicativo de segurança para outras espécies, incluindo seres humanos (GUIMARÃES et al., 2000, tradução nossa).

Dentre as vantagens do uso de vegetais em biomonitoramento pode-se destacar: a similaridade a complexidade genética das plantas com o homem, a facilidade de manutenção das mesmas, quando comparada com animais, o curto ciclo de vida. Desta forma, é uma opção devido a sua grande sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio para avaliar o potencial genotóxico de agentes contaminantes ambientais (SOUZA, 2006).

Conseqüentemente, espécies vegetais padronizadas como plantas modelos, são utilizadas comumente para testes padrões de toxicidade a nível celular. Em destaque o teste de micronúcleo (TRAD-MCN) no clone híbrido *Tradescantia* BNL 4430 pela sua sensibilidade e eficiência comprovada (PAULA, 2010).

O teste de micronúcleo é baseado na detecção por coloração da presença de micronúcleos (massa de cromatina citoplasmática), nas células-mãe do grão de pólen das inflorescências de *Tradescantia ssp* (PAULA, 2010).

Vários são os vegetais superiores utilizados como plantas modelos para estudos de citogenotoxicidade, tal qual: como *Nicotiana tabacum* (tabaco), *Hordeum vulgare* (cevada), *Vicia faba* (fava), *Allium cepa* (cebola) e *Tradescantia* sp. para análise de solo, água e poluentes atmosféricos (COTELLE et al., 1999; GRANT, 1994; JORGE et al., 2007 apud MAZIVIERO, 2011). Conforme relatado anteriormente, a exemplo da utilização da planta modelo *Allium cepa* como bioindicador, pode-se citar o estudo realizado para avaliar a toxicidade citogenética da Rodamina B no sistema radicular desta planta modelo. Através do cultivo da mesma em água (controle negativo), 10 ppm de metano-sulfonato de metila (controle positivo), e três concentrações de Rodamina B (200, 100, e 50 ppm), durante um período de 7 dias, na qual constatou-se a inibição da atividade mitótica e um aumento das frequências de anomalias nucleares, tais como o surgimento de micronúcleos e de pontes nucleoplásmicas (TAN et al., 2013, tradução nossa).

3.4 Modelo *Tradescantia* BNL 4430

A *Tradescantia* é um gênero de plantas modelos comumente utilizadas em ensaios para avaliação de mutagenicidade por serem bastantes sensíveis aos agentes mutagênicos, bem como por apresentar seis pares de cromossomos grandes, facilitando as análises citogenéticas. (SANTOS, 2004 apud LEITE; ZANDONATO; FLUMINHAN, 2013).

O clone estéril *Tradescantia* BNL 4430, possui $2n=12$ cromossomos (todos metacêntricos), é oriundo do cruzamento entre um híbrido estéril (*Tradescantia hirsutiflora* × *Tradescantia subcaulis*). Esta esterilidade certifica a homogeneidade genética do clone na ausência de efeitos mutagênicos (WHITE; CLAXTON, 2004 apud MAZIVIERO, 2011) (Figura 2).



Figura 2: *Tradescantia* clone BNL 4430, utilizada para o ensaio TRAD-SHM (MAZIVIERO, 2011).

Dentre os bioensaios mais utilizados em toxicologia, destacam-se três estudos de toxicidade utilizando o gênero *Tradescantia*. Para análise de aberrações cromossômicas utiliza-se o teste de mitose em ponta de raiz (MA, 1981 apud PAULA, 2010), para avaliação de mutações gênicas somáticas, utiliza-se o teste do pêlo estaminal, caracterizado por uma mutação que altera a cor das células do pelo de roxo para cor-de-rosa (RODRIGUES, 1999 apud PAULA, 2010) e para avaliação de alterações meióticas, analisa-se a formação de micronúcleos em células mãe de grãos de pólen (MA, 1981 apud PAULA, 2010).

Ma e colaboradores (1978) descreveram e padronizaram o teste de micronúcleo para análise de células germinativas, com o Clone BNL 4430 (MIELLI; SALDIVA; UMBUZEIRO, 2009). O teste de micronúcleo (Trad-MCN), considerado como um dos

ensaios padrões de genotoxicidade mais sensíveis na identificação de alteração celular clastogênica dentre tantos outros testes, consiste na avaliação da frequência de micronúcleos formados em células mãe de grãos de pólen na fase de tétrades, caracterizando a presença de agentes mutagênicos. Os micronúcleos podem ser formados a partir de cromossomos inteiros ou fragmentados perdidos durante o processo de divisão celular. (MEIRELES et al., 2009 apud MAZIVIERO, 2011). Há registros de que esse teste pode ser até oito vezes mais sensível que o estudo com o vegetal superior *Allium cepa* e até 62 vezes mais sensível que em comparação com *Vicia faba* em amostras de solos contaminados com concentrações significativas de poluentes, já em relação a pequenas concentrações, a eficiência pode alcançar quase ao dobro. (COTELLE et al., 1999 apud MAZIVIERO, 2011).

O teste do pelo estaminal com *Tradescantia* BNL4430 para análise de células somáticas (TRAD-SHM), foi desenvolvido pelo Dr. Arnold H.Sparrow e colegas dentre os anos finais da década de 50 e 60 no Laboratório Nacional de Long Island, NY. O teste consiste na mudança de coloração do pelo estaminal do Clone 4430 um heterozigoto (Aa), com dominância pela cor azul, que em contato com um agente mutagênico, sofre uma mutação que altera a sua cor para rosa, cor correspondente ao genótipo recessivo (aa). Neste teste é possível ainda a observação de alterações como a expressão de células gigantes, células duplas ou triplas, bifurcação do pelo e anomalias do crescimento (MAZIVIERO, 2011). A exemplo da eficácia do emprego do modelo *Tradescantia* BNL 4430 em avaliação de efeitos genotóxicos, pode-se citar o uso do bioensaio do pêlo estaminal (TRAD-SHM) para monitoramento de indução de mutação devido a radiação ionizante no entorno de usinas nucleares no Japão (ICHIKAWA, 1981 apud MAZIVIERO, 2011). Um segundo exemplo, é o estudo utilizando o Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (TRAD-MCN) e *Vicia faba* para a verificação da capacidade de cinco metais (As, Pb, Cd, Cu e Zn), em aumentar a taxa de micronúcleos. Na qual, o Trad-MCN se mostrou mais sensível que o aplicado em *Vicia faba*, pois as células meióticas são mais suscetíveis a mutação do que as células meristemáticas. (STEINKELLNER et al., 1999 apud MAZIVIERO, 2011). Outro exemplo de emprego do bioensaio do pêlo estaminal de *Tradescantia* clone 4430 (Trad-SHM) foi a avaliação da genotoxicidade de um herbicida composto por triazinas (atrazina e simazina). A expressão da genotoxicidade foi dada em eventos mutantes pink (EMP), utilizando o teste t de *Student* para análise dos dados durante oito dias de avaliação, na qual, pode-se constatar que a exposição ao herbicida causou um número significativamente maior de EMP no grupo teste em relação

ao controle, ressaltando o potencial genotóxico associado ao uso das triazinas (PATUSSI; BÜNDCHEN, 2013).

4 HIPÓTESE

O efeito tóxico da Rodamina B em células vegetais, pode ser investigado através de testes de citogenotoxicidade em *Tradescantia* (clone *BNL 4430*), uma espécie modelo comumente empregada em estudos de biomonitoramento.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral

- Analisar o potencial citogenotóxico de diferentes concentrações do corante Rodamina B em planta-modelo *Tradescantia* (clone *BNL 4430*).

5.2 Específico

- Avaliar o potencial citogenotóxico da Rodamina B por meio da análise de danos ao ciclo celular e aos cromossomos em células meióticas de *Tradescantia* (clone *BNL4430*).
- Investigar o potencial mutagênico da Rodamina B em células somáticas por meio da aplicação do ensaio do pêlo estaminal em *Tradescantia* (clone *BNL 4430*).

6 METODOLOGIA

6.1 Material vegetal

Mudas do clone *Tradescantia* BNL4430 serão obtidas por doação do CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), Laboratório de Poços de Caldas (LAPOC) e cultivadas em vasos em casa de vegetação no Campus de Curitiba da Universidade Federal de Santa Catarina. Ao atingirem a fase de florescimento, hastes das plantas serão utilizadas para os bioensaios. Estes serão realizados no laboratório de Biologia Celular na UFSC- Campus Universitário de Curitiba.

6.2 Bioensaio TRAD-MCN (Teste do micronúcleo)

O teste do micronúcleo será realizado de acordo com o protocolo descrito por Ma (1981) com algumas modificações. Para a fase de adaptação, hastes do clone *Tradescantia* BNL4430 com 10 a 15 cm de comprimento e contendo botões florais jovens serão coletadas e colocadas em sistema de hidroponia contendo água destilada sob aeração constante por meio de uma bomba de aquário, por 24 horas. Após esse período, hastes serão submetidas a diferentes tratamentos (15 a 20 hastes/tratamento) por um período de 8 horas (Tabela 1).

Tabela 1. Condições dos diferentes tratamentos que serão empregados nos Bioensaios com *Tradescantia* BNL4430.

Tratamento	Características
CN	Controle negativo: água destilada
CP	Controle positivo: solução de formaldeído (10 µg/mL)
T1	Solução de Rodamina B (2,5 µg/mL)
T2	Solução de Rodamina B (5µg/mL)
T3	Solução de Rodamina B (10 µg/mL)

Após os tratamentos, as hastes serão lavadas e transferidas para a água destilada, sendo mantidas sob aeração constante durante 24 horas (fase de recuperação). Após esse tempo, inflorescências serão coletadas e fixadas em solução de etanol: ácido acético (3:1), permanecendo por, no mínimo, 24 horas. Posteriormente, as mesmas serão colocadas em solução de etanol 70%, ficando armazenadas até o preparo das lâminas.

Para o preparo das lâminas, inflorescências serão dissecadas sob microscópio estereoscópio Leica EZ para a separação das anteras. Em seguida, as anteras serão seccionadas com o auxílio de um estilete para a liberação das células-mãe do grão de pólen. O excesso de material será retirado com uma pinça e em seguida será adicionada uma gota do corante carmim acético 5% e o material será coberto por lamínula. Este procedimento de montagem está esquematizado abaixo (Figura 3). Serão preparadas 15 lâminas/tratamento e 300 tétrades/tratamento para o cálculo do percentual de células com micronúcleos. Serão ainda, analisados o percentual de morte celular. As imagens serão obtidas por meio do microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

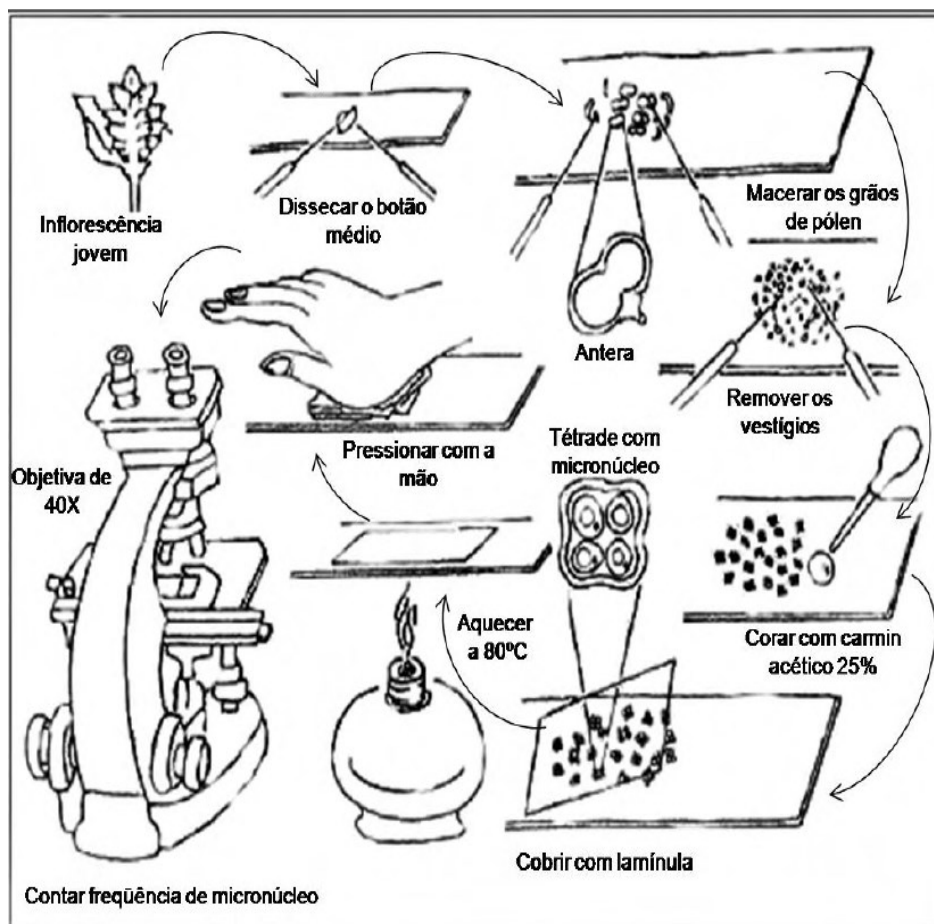


Figura 3: Representação esquemática da montagem da lâmina para o teste do micronúcleo em *Tradescantia*.
 Fonte: (MA, 1981 apud MAZIVIERO, 2011).

6.3 Bioensaio do Pêlo Estaminal (TRAD-SHM)

Para o ensaio do pêlo estaminal (TRAD-SHM) será utilizado o protocolo baseado em Rodrigues (1999). Desse modo, aproximadamente 20 a 30 hastes jovens de *Tradescantia* clone *BNL4430* serão coletadas e colocadas em sistema de hidroponia contendo água destilada sob aeração constante por meio de uma bomba de aquário, por 24 horas. Após esse período, hastes serão submetidas a diferentes tratamentos (10 a 20 hastes/tratamento) por um período de 24 horas. Serão empregados os mesmos tratamentos citados para o ensaio do micronúcleo (Tabela 1).

Após os tratamentos, as hastes serão lavadas e transferidas para a água destilada, sendo mantidas sob aeração constante durante 8 a 14 dias (fase de recuperação). Esse tempo é necessário para que os botões florais se desenvolvam expondo os pêlos para avaliação.

Para a observação dos pêlos estaminais, estames serão coletados e colocados sobre lâminas contendo uma gota de solução de etanol e glicerina (1:1), as quais serão avaliadas

quanto à proporção de células com coloração rosa. Serão avaliadas 10 flores/tratamento, totalizando 3000 pêlos/tratamento uma vez que cada flor possui seis estames dotados de 50 pêlos cada. A quantificação será realizada pelo cálculo da frequência de mutações/1000 pêlos. As imagens serão obtidas por meio do microscópio de epifluorescência Olympus BX-60 acoplado com câmera digital Olympus DP73.

6.4 Análise estatística

Para análise dos dados da avaliação de genotoxicidade e citotoxicidade serão submetidos à análise de variância e as médias comparadas por meio do teste Scott-Knott utilizando-se o programa estatístico (Sisvar versão 4.0) Todas as análises serão realizadas no nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que a Rodamina B exerça efeito citogenotóxico nas células da planta *Tradescantia* Clone BNL 4430 e que estes dados possam contribuir como fonte de informação e alerta para usuários deste corante, bem como, com os cuidados necessários para tratamento de efluentes contendo esse resíduo.

8 CRONOGRAMA

Atividades	2015 – 2016										
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M
Obtenção de mudas	X	X									
Multiplicação de mudas		X	X	X	X						
Realização do Bioensaio Teste do micronúcleo (TRAD- MCN)				X	X	X	X				
Realização do Bioensaio Teste do pelo estaminal (TRAD- SHM)				X	X	X	X				
Obtenção das imagens				X	X	X	X	X			
Análise das imagens					X	X	X	X	X	X	
Elaboração do relatório técnico final										X	X

9 ORÇAMENTO

Itens	Quantidade	Valor unitário	Valor total (R\$)
MATERIAL DE CONSUMO			
Bomba de aquário	1 un	30,00	30,00
Cuba de Vidro com capacidade de 5L	1 un	60,00	60,00
Formaldeído 100%	1L	50,00	50,00
Rodamina B	1 fr (500g)	133,43	133,43
Ácido Acético	5L	35,00	175,00
Ácido etílico absoluto P.A	15L	30,00	450,00
Glicerina PA (Glicerol)	1L	50,00	50,00
Estilete	2 un	6,90	13,80
Pinça	2 un	15,00	30,00
Pipeta de Pasteur plástica	1 pc	30,00	30,00
Proveta graduada de vidro 25mL	2 un	20,00	40,00
Óleo de imersão	2 fr (8mL)	20,00	40,00
Becker de vidro 25 mL	5 un	6,00	30,00
Corante Carmim Acético	1 fr (10gr)	280,00	280,00
Caixa porta lâminas (100 lugares)	5 un	15,00	75,00
Lâminas de vidro lapidadas	50 cx	5,00	250,00
Lamínulas de vidro 22x22	50 cx	5,00	250,00
Esmalte tipo base para unhas	1 um	3,00	3,00
Subtotal			1.990,23
MATERIAL PERMANENTE			
Microscópio estereoscópio Leica EZ	1un	6000	6000
Subtotal			6000
TOTAL GERAL	7.990,23		

10 REFERÊNCIAS

BETTEGA, Janine Maria Pereira Ramos. **Avaliação da atividade antiviral de extratos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam) DC. Astereceae - marcela**. 2000. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/112274/176766.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

BONOMO, Marina Marques. **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em carica papaya l**. 2014. 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Centro de Ciências Humanas e Naturais, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014. Disponível em: <

http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_7844_Disserta%E7%E3o%20Marina%20Marques%20Bonomo.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2015.

DAMBROS, Vagner de Sales. **Processo de Tingimento de Ágatas: Medidas de Produção mais limpa e Estudos de detoxificação do efluente**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) - Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2008. - Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp067230.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

FLOHR, Leticia. **Aplicação e validação do modelo wtox para avaliar risco ambiental toxicológico de misturas complexas: estudo de caso em amostras de resíduos industriais**. 2011. 255f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/96074/300019.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

FRÖHNER, Carla Regina Andrighetti. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *chromobacterium violaceum***. 2003. 135f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003. Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/86072/191935.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

GUIMARÃES, Eliane Tigre Sant'Anna; DOMINGOS, Marisa; ALVES, Edenise Segala; JUNIOR, Nelson Caldini; LOBO, Debora Já de Araujo; LICHTENFELS, Ana Julia de Faria Coimbra; SALDIVA, Paulo Hilário Nascimento. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. 2000. **Environmental and Experimental Botany**. São Paulo, v.44, p-1-8, dec.1999. Disponível em: <

<http://directory.umm.ac.id/Data%20Elmu/jurnal/E/Environmental%20and%20Experimental%20Botany/Vol44.Issue1.Aug2000/1220.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

LEITE, Kerle Aparecida da Silva; ZANDONATO, Vivian Vieira; FLUMINHAN, Antonio. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *tradescantia pallida* cv *purpurea* através do ensaio cometa. In: **IX Fórum Ambiental da Alta Paulista**. v.9, n.11, p. 399-417, 2013. [S.l.]. Disponível em: <http://www.amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/viewFile/686/710>. Acesso em: 12 abr. 2015.

MAZIVIERO, Guilherme Thiago. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *tradescantia pallida***. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Rio Claro - São Paulo, 2011. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87700/maziviero_gt_me_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 27 abr. 2015.

MIELLI, Ana Cristina; SALDIVA, Paulo Hilário Nascimento; UMBUZEIRO, Gisela de Aragão. Comparação entre as Respostas do Clone 4430 e *Tradescantia pallida* no Teste de Micronúcleos (Trad-MN). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, São Paulo, v.4, n.1-3, p.49-54, ago. 2009. Disponível em: <[http://www.researchgate.net/profile/Gisela_Umbuzeiro/publication/270015227_Comparao_entre_as_Respostas_do_Clone_4430_e_Tradescantia_pallida_no_Teste_de_Micronucleos_\(Trad-MN\)/links/549ff9f50cf267bdb8ff2fd2.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Gisela_Umbuzeiro/publication/270015227_Comparao_entre_as_Respostas_do_Clone_4430_e_Tradescantia_pallida_no_Teste_de_Micronucleos_(Trad-MN)/links/549ff9f50cf267bdb8ff2fd2.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2015

OGA, Seize; CAMARGO, Márcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira. **Fundamentos de Toxicologia: Introdução à toxicologia**.3. ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008. 677 p.

OSHA. **Rhodamine B**. [20--]. Disponível em: <<https://www.osha.gov/dts/sltc/methods/partial/pv2072/pv2072.html>>. Acesso em: 12 abr. 2015.

PADOVINI, David Santos Souza. **Síntese e caracterização de nanopartículas de ZrO₂ por rota hidrotérmica**. 2013. 82F. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia dos materiais) – Faculdade de Ciências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Bauru, 2013. Disponível em: <http://base.repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/99712/padovini_dss_me_bauru.pdf?sequence=1>. Acesso em: 12 abr. 2015.

PAGNUSSAT, Stela Maris; BÜNDCHEN, M. Avaliação do potencial clastogênico de efluentes de laticínio utilizando o bioensaio do micronúcleo de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. var. *purpurea* Boom (Commelinaceae) (TRAD-MCN). In: **VI Semana de Estudos da Engenharia Ambiental**, jun. 2008, PR: Irati.

PATUSSI, Carina; BUNDCHEN, Márcia. Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de *Tradescantia* clone 4430. **Ciência saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 4, p. 1173-1178, abr. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232013000400030&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 abr. 2015.

PAULA, Sabrina Nolasco Carvalho de. **Biomonitoramento como instrumento de detecção de contaminantes ambientais**. 2010. 38f. Monografia (Especialização) - Curso de Especialista em Planejamento e Gestão Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2010. Disponível em: <<http://br.monografias.com/trabalhos-pdf/biomonitoramento-instrumento-deteccao-contaminantes-ambientais/biomonitoramento-instrumento-deteccao-contaminantes-ambientais.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2015.

PAULINO, Thiago Romário Soares; SALGADO, Bruno César Barroso. Estudo da influência do peróxido de hidrogênio na degradação do Rodamina B via processos oxidativos avançados (UV, UV/H₂O₂, Fe²⁺/H₂O₂ e UV/Fe²⁺/H₂O₂). **Conexões Ciência e Tecnologia**, Fortaleza, v.7, n.2, p.49-60, jun. 2013. Disponível em: <<http://conexoes.ifce.edu.br/index.php/conexoes/article/view/602/371>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

PEREIRA, Catarina Luíza Mariani. **Avaliação de turfa em uma barreira reativa permeável para a remediação de meios porosos contaminados com naftaleno e tex**. 2009. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico Programa de pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2009. Disponível em: <http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_3109_DissertacaoCatarina.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2015.

SOUZA, Vitor Hugo Enumo de. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo de efluentes de uma indústria de papel e celulose de santa catarina em *Allium cepa***. 2006. 160f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) –Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88429/226342.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 28 abr. 2015.

TAN, Dehong; BAI, Bing; JIANG, Donghua; SHI, Lin; CHENG, Shunchang; TAO, Dongbing; JI, Shujuan. Rhodamine B induces long nucleoplasmic bridges and other nuclear anomalies in *Allium cepa* root tip cells. **Environmental Science and Pollution Research**. v.21, v.21, p. 33633370, nov.2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-2282-9>>. Acesso em: 25 abr. 2015.

The EFSA Journal. **Review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU.** v.263, p. 1-71, aug. 2005. Disponível em:
<<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2948/pdf/263.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2015