

Toxicidade de Metais em Soluções Aquosas: Um Bioensaio para Sala de Aula

Soraya Moreno Palácio, Marcia Borin da Cunha, Fernando Rodolfo Espinoza-Quiñones e Daniele Alves Nogueira

Este artigo tem como objetivo propor a utilização de um bioensaio simples e de baixo custo para abordar os efeitos de metais em soluções aquosas em diferentes concentrações. O bioensaio é realizado utilizando-se bulbos de cebola (*Allium cepa*) para monitorar os efeitos do cobre, expondo-os diretamente em água contaminada com íons Cu^{2+} . O procedimento consiste em observar o crescimento das raízes da cebola por um determinado período e analisar a inibição desse crescimento em função da presença de concentrações crescentes de um metal. Os resultados obtidos no laboratório escolar possibilitam verificar o efeito fito-tóxico do aumento da concentração do metal ao organismo-teste e correlacionar com a contaminação ambiental e suas consequências à saúde humana.

► metais, toxicidade, bioensaio ◀

Recebido em 22/06/2011, aceito em 25/01/2013

79

As questões ambientais e suas análises, muitas vezes, são deixadas em segundo plano no desenvolvimento da química nas escolas de ensino médio, mesmo com todo apelo que se tem feito em relação à necessidade da formação de jovens mais conscientes e por uma química integrada ao meio em que vivemos. Um dos possíveis motivos para a falta de tratamento de temas ambientais nas aulas de química pode estar atrelado ao escasso material nessa área para o desenvolvimento de atividades relevantes e criativas. Muitas vezes, as discussões em química ambiental resumem-se à leitura de textos sobre o assunto que, embora sejam importantes, podem levar o estudante a achar o assunto maçante e desestimulante.

Atividades experimentais, de modo geral, desempenham um papel importante para despertar a curiosidade e estimular questionamentos acerca do tema trabalhado. Dessa forma, apresentamos, neste artigo, uma atividade experimental de fácil execução e baixo custo, que tem como objetivo principal propor a discussão da interferência de metais potencialmente tóxicos sobre

Um dos possíveis motivos para a falta de tratamento de temas ambientais nas aulas de química pode estar atrelado ao escasso material nessa área para o desenvolvimento de atividades relevantes e criativas. Muitas vezes, as discussões em química ambiental resumem-se à leitura de textos sobre o assunto que, embora sejam importantes, podem levar o estudante a achar o assunto maçante e desestimulante.

determinados organismos, quando estes estão presentes em soluções aquosas. O experimento proposto é um bioensaio, utilizando a cebola como organismo-teste, e a proposta consiste em monitorar os efeitos no crescimento das raízes, cultivando-se os bulbos de cebola diretamente em soluções aquosas “contaminadas” por metais.

As possibilidades didáticas desse experimento não se esgotam na sua realização, pois a partir dele podem ser propostas outras atividades como: pesquisa bibliográfica sobre a presença de metais em águas de abastecimento público, pesquisa de campo em ambientes próximos à escola, atividades integradas com outras disciplinas como a biologia, física, matemática, história, entre outras.

No ensino médio, esse experimento pode ser utilizado na disciplina de química no estudo de soluções e suas concentrações ou em projetos relacionados ao tratamento de temas ambientais, tendo em vista que as questões ambientais são importantes temas transversais e desencadeiam propostas interdisciplinares.

Para compreensão da proposta experimental, é importante

lembrar que a toxicidade dos metais depende da dose a que o organismo foi exposto e da forma química em que ele se apresenta. Muitos metais são essenciais para o crescimento de todos os tipos de organismos, desde as bactérias até mesmo o ser humano, mas eles são requeridos em baixas concentrações e podem danificar sistemas biológicos quando presentes em concentrações maiores. Outros metais, no entanto, não são essenciais, isto é, não são requeridos pelos organismos e pequenas concentrações podem causar danos aos organismos. Dessa forma, os metais são classificados em: elementos essenciais: sódio, potássio, cálcio, ferro, zinco, cobre, níquel e magnésio; e elementos não essenciais: arsênico, chumbo, cádmio, mercúrio, alumínio, titânio, estanho e tungstênio.

A utilização da cebola como organismo-teste não é recente, esta vem sendo estudada e utilizada desde 1938, quando Levan introduziu o uso da espécie *Allium cepa* (cebola comum) como sistema de bioensaio para avaliar os efeitos citogenéticos da colchicina em células vivas (Fiskesjö, 1985). Desde então, a cebola tornou-se um material de larga utilização em testes de laboratório, devido ao rápido crescimento de suas raízes e à facilidade com que são observados seus cromossomas em fases de divisão celular. O teste com a cebola tem sido aplicado em diversas áreas de conhecimento para avaliar a toxicidade de compostos químicos de interesse ecológico e sanitário. Por exemplo, Fiskesjö (1975) cultivou, em série, bulbos de cebola em amostras coletadas ao longo do rio Bräan ao sul da Suécia. Os resultados desse experimento demonstraram que o crescimento das raízes de cebola é inibido pela presença de substâncias tóxicas quando estas se encontram dissolvidas na água.

Testes com a utilização de cebolas têm sido recomendados por agências internacionais de proteção ambiental para verificação do nível de toxicidade de misturas complexas como resíduos de uma indústria (Fiskesjö, 1985), pois a cebola é sensível mesmo em concentrações consideradas aceitáveis aos padrões da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Um estudo realizado por Palácio et al. (2005), em água de rio, mostrou que uma concentração de $0,03 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu dissolvido provoca uma inibição de 40% no crescimento das raízes de cebola. A mesma redução foi observada na presença de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn dissolvido.

Outro estudo realizado por Espinoza-Quñones et al. (2009) utilizou a cebola como organismo-teste para avaliar os efeitos do cromo (VI) em água de rio. Neste, águas consideradas poluída e não poluída tiveram adição de cromo (VI) e testada a inibição do crescimento das raízes da cebola. Os resultados mostraram que, tanto na água poluída quanto na não poluída, concentrações de cromo (VI) acima

de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ provocaram inibição do crescimento das raízes, concluindo-se que não houve interferência de outros poluentes ou da matéria orgânica quando a concentração do metal é elevada.

A utilização da cebola como organismo-teste não é recente, esta vem sendo estudada e utilizada desde 1938, quando Levan introduziu o uso da espécie *Allium cepa* (cebola comum) como sistema de bioensaio para avaliar os efeitos citogenéticos da colchicina em células vivas (Fiskesjö, 1985). Desde então, a cebola tornou-se um material de larga utilização em testes de laboratório, devido ao rápido crescimento de suas raízes e à facilidade com que são observados seus cromossomas em fases de divisão celular.

Assim, neste trabalho, propomos um experimento didático que pode ser realizado sem custos elevados ou procedimentos complexos. Nesse experimento, utiliza-se um bioensaio com a cebola comum (*Allium cepa*), para avaliar o efeito de soluções aquosas contendo concentrações crescentes de íons metálicos, inserindo, desse modo, a discussão do efeito de metais em organismos e no ambiente. Essa proposta está direcionada para estudantes do ensino médio e tem como foco

principal as aulas de química.

Soluções aquosas contendo íons Cu^{2+} serão utilizadas e a avaliação ocorrerá pela observação da inibição do crescimento das raízes da cebola. Pretende-se, dessa forma, estabelecer condições para a inserção do bioensaio no ensino de química ou em projetos interdisciplinares para discussão dos efeitos de metais no ambiente e na saúde humana.

Metodologia

Materiais utilizados: sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) obtido em lojas de produtos para tratamento de piscinas; cinco litros de água mineral; bulbos de cebola com diâmetro de 3,5 a 4,0 cm, secos e sem formação de folhas e/ou raízes; 16 copos plásticos descartáveis de 80 mL (reutilizar material) ou 16 copos de requeijão com tampa; palitos de dente; 1 recipiente de medida com volume de 1 L; balança com uma casa decimal; colheres plásticas (café) descartáveis; seringa de 10 mL sem agulha; uma régua escolar.

Montagem do experimento: preparar uma solução de aproximadamente 100 mg L^{-1} de Cu pesando 0,4 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e dissolvida em 1 L de água mineral. A partir dessa solução, preparar oito soluções com concentrações de aproximadamente 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,20; 0,40; $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ e uma solução de controle negativo constituída de água mineral pura. Para medir os volumes necessários para o preparo dessas soluções, sugere-se seguir o esquema apresentado na Tabela 1. Com o auxílio de uma seringa, transferir o volume indicado para um copo medidor e completar o volume até 100 mL com a água mineral. Misturar bem com o auxílio de uma colher de plástico descartável.

Numerar oito copos plásticos descartáveis ou reutilizar recipientes de alimentos (tipo copos de requeijão ou similares) de 1 a 8. Encher os copos até a borda com as soluções 1 a 8, respectivamente. Colocar em cada copo uma cebola, de modo que somente a região radicular fique em contato com as soluções. No caso da utilização de copos descartáveis,

Tabela 1: Relação da diluição das soluções.

Solução	Concentração de Cu (mg L ⁻¹)	Volume de solução (100 mg L ⁻¹ de Cu)
1	0	0
2	0,04	0,4
3	0,06	0,6
4	0,08	0,8
5	0,10	1,0
6	0,20	2,0
7	0,40	4,0
8	1,00	10,0

utilizar palitos de dentes como suporte para os bulbos da cebola (Figuras 1a e 1b) e, em caso de copos de requeijão, colocar o bulbo da cebola sobre um orifício feito na tampa (Figura 1c).

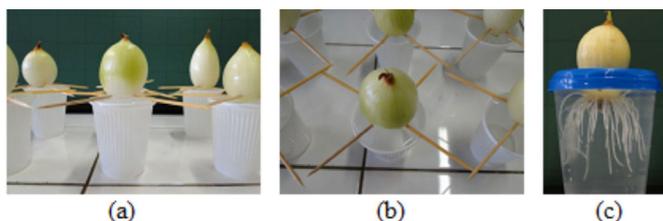


Figura 1: Montagem do experimento: a) vista geral utilizando copos plásticos descartáveis; b) detalhe do suporte; e c) vista geral utilizando copos de requeijão.

Esse bioensaio é realizado normalmente com cinco dias de exposição dos bulbos à solução contaminada, mas para adaptá-lo ao calendário de aulas, sugere-se que os bulbos sejam deixados em contato por sete dias para aguardar o crescimento das raízes. O local de montagem do experimento deve ter iluminação natural e ficar longe de áreas com calor excessivo. Caso seja necessário, utilizar água mineral para repor o volume perdido por evaporação ou absorção de água pela cebola. Após os sete dias, retirar as cebolas das soluções e, com uma régua, medir o comprimento médio das raízes. A inibição do crescimento da raiz mostra o efeito da toxicidade do metal. Com os valores medidos, construir uma tabela relacionando a concentração da solução com o crescimento da raiz, conforme Tabela 2.

Sugerimos que esse experimento seja realizado com pelo menos uma réplica, de modo que se minimize a possibilidade de interferência ou erro em alguma solução ou má formação no crescimento das raízes da cebola.

Resultados e discussão

Após o período de sete dias, foram medidos os comprimentos das raízes. Os resultados mostraram uma inibição no crescimento da raiz a partir de uma concentração aproximada de 0,04 mg L⁻¹ de Cu na solução, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Comprimento das raízes (em cm) e inibição do crescimento (%) após cinco dias.

Solução	Concentração de Cu (mg L ⁻¹)	Comprimento da raiz (cm)	Inibição do crescimento (%)
1	0	5,0	0
2	0,04	3,2	36
3	0,06	2,8	44
4	0,08	2,0	60
5	0,10	1,5	70
6	0,20	1,3	74
7	0,40	0,5	90
8	1,00	0,3	94

A inibição no crescimento das raízes aumenta conforme aumenta a concentração de cobre na solução. Houve uma inibição de 36% com a menor concentração utilizada (0,04 mg L⁻¹) e de 94% com a maior concentração (1,00 mg L⁻¹). A inibição em baixas concentrações demonstra a alta sensibilidade do organismo-teste (cebola) frente ao efeito tóxico desse elemento. O decréscimo no comprimento médio das raízes pode ser mais bem visualizado na forma de gráfico como apresentado na Figura 2, e a aparência dos bulbos após a exposição ao Cu pode ser vista na Figura 3.

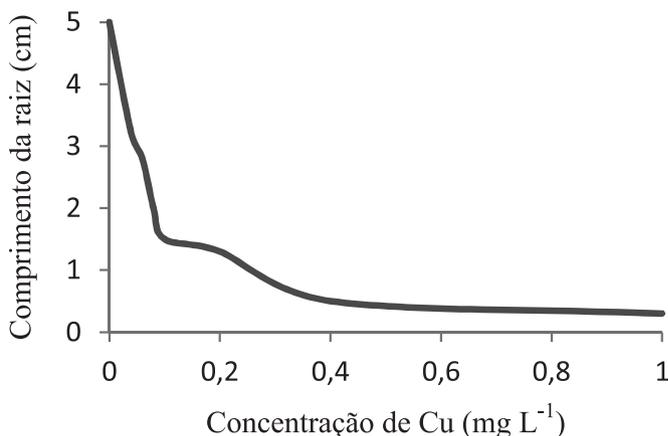


Figura 2: Decaimento do comprimento das raízes em função da exposição às diferentes concentrações de Cu.

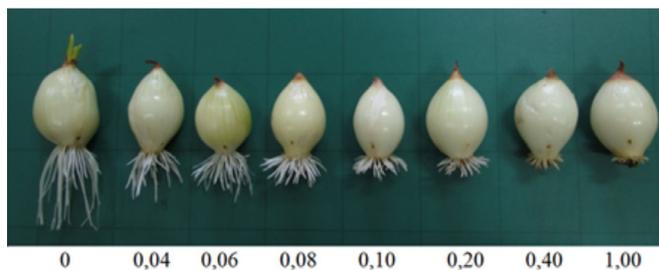


Figura 3. Aparência das raízes após a exposição às diferentes concentrações de Cu.

A partir da observação da inibição do crescimento das raízes da cebola, sugerimos que o professor conduza discussões com os estudantes relativas aos fatores que influenciam

na concentração de substâncias em solução. No caso desse experimento, o fator será um metal (Cu) que se encontra dissolvido em água e que inibe gradativamente o crescimento vegetal em função do aumento da sua concentração. A proposta envolve questionar os estudantes sobre o efeito da concentração em determinados sistemas, como é o caso do observado no experimento, enfatizando a importância da relação dose/resposta, pois mesmo o cobre sendo um elemento essencial, o aumento da dose provoca efeitos deletérios no organismo-teste.

No caso do experimento proposto, as concentrações totais de metais podem ser diretamente correlacionadas com os efeitos tóxicos obtidos, porém em ambientes aquáticos, como rios e lagos, a toxicidade dos metais depende da forma química que assumem. Há evidências de que reações de complexação reduzem a concentração dos íons metálicos livres e podem diminuir significativamente sua toxicidade. No ambiente aquático, os metais podem se complexar com as substâncias húmicas que representam 80% da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais e influenciam numerosos processos biogeoquímicos (Corami et al., 2007; Lamelas e Slaveykova, 2007). Esse fato pode gerar desdobramentos no experimento sugerido, no qual o professor pode adicionar metais à água de rio com diversas concentrações de matéria orgânica como, por exemplo, águas coletadas em nascentes e pontos onde haja despejos de esgoto, dejetos de animais ou despejos de indústrias alimentícias como frigoríficos e laticínios. Dessa forma, pode-se observar a diminuição da toxicidade quando comparada à solução preparada com água mineral e discutir as reações químicas que podem levar a essa diminuição.

Outra discussão que pode ser levantada com a realização desse experimento é a comparação dos resultados obtidos com os valores permitidos pela legislação vigente para águas de abastecimento público. A OMS considera 1,5 mg L⁻¹ como a concentração máxima aceitável para o cobre (Cu²⁺) em águas para o consumo humano (WHO, 1971). Para a legislação brasileira, de acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011), o limite estabelecido para o Cu²⁺ é de 2 mg L⁻¹. No entanto, esses valores são bem superiores à concentração que pode ser considerada tóxica, obtida pelo bioensaio com raízes de cebola, pois a inibição no crescimento das raízes aparece numa concentração de 0,04 mg L⁻¹. Esses resultados podem levar erroneamente a dúvidas sobre a confiabilidade acerca da legislação pertinente, devendo-se deixar claro que a cebola não é mais uma espécie considerada adequada nas pesquisas científicas por sua sensibilidade extrema aos metais. De acordo com Gherardi-Goldstein et al., (1990 *apud*

A OMS considera 1,5 mg L⁻¹ como a concentração máxima aceitável para o cobre (Cu²⁺) em águas para o consumo humano (WHO, 1971). Para a legislação brasileira, de acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 (Brasil, 2011), o limite estabelecido para o Cu²⁺ é de 2 mg L⁻¹. No entanto, esses valores são bem superiores à concentração que pode ser considerada tóxica, obtida pelo bioensaio com raízes de cebola, pois a inibição no crescimento das raízes aparece numa concentração de 0,04 mg L⁻¹.

Costa et al., 2008), é recomendável que o efeito tóxico de uma amostra seja avaliado para mais de uma espécie representativa da biota aquática, de preferência pertencentes a diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar (produtores, consumidores primários e secundários) como, por exemplo, algas, crustáceos, peixes e bactérias, isso devido às diferenças de sensibilidade apresentadas por organismos de diferentes espécies frente às substâncias químicas (Costa et al., 2008).

Apesar de não ser a espécie mais adequada para avaliar a toxicidade de metais em águas, o bioensaio com cebola justifica-se pela simplicidade, facilidade na aquisição dos materiais, baixo custo de execução e principalmente por fornecer resultados satisfatórios do ponto de vista didático, evidenciando o efeito deletério de íons metálicos, à espécie estudada, quando presentes em concentrações altas. Além

disso, o efeito fito-tóxico do cobre torna-se bastante importante quanto esse elemento encontra-se presente em águas de irrigação ou quando o solo encontra-se contaminado por ele.

Outra sugestão de abordagem para o assunto é a realização de um novo experimento para estabelecer uma comparação do cobre (verificado nesse experimento) com outros metais como o chumbo e o zinco, usando o mesmo organismo-teste ou, ainda, sugerir pesquisa bibliográfica para conhecer os efeitos desses elementos nos seres humanos,

quando ingeridos diretamente ou por meio da cadeia alimentar.

Descarte e tratamento de resíduos

O resíduo gerado no experimento é a própria solução de sulfato de cobre utilizada que foi preparada em diferentes concentrações. Sugerimos que, após sua utilização, as soluções geradas sejam filtradas para retirar possíveis resíduos que surgiram durante a formação das raízes da cebola para que possam ser utilizadas novamente. Uma alternativa é a realização do processo de evaporação da solução para recuperação do sulfato de cobre que, recuperado, poderá ser utilizado posteriormente em outras atividades. As cebolas, após o experimento, não devem ser utilizadas para fins alimentícios. Entretanto, a concentração de cobre presente na cebola é baixa e sendo este um micronutriente para plantas, estas podem ser cortadas e enterradas no jardim.

Considerações finais

O bioensaio com a cebola proporciona um bom exercício para construção da consciência ambiental em relação ao cuidado e à preservação dos ambientes aquáticos e dos riscos

da contaminação ambiental à saúde humana. Além disso, o experimento proposto é adequado ao tratamento de propostas interdisciplinares e no desenvolvimento de projetos com cunho ambiental que sejam desenvolvidos na escola.

Quanto ao tempo de realização do experimento, é importante ressaltar que o bioensaio é um experimento de observação que demanda dispor de um tempo para o preparo de soluções e montagem do experimento, em geral dois períodos de aula. Posteriormente, o experimento fica em repouso durante sete dias, sendo relevante nesse período que o professor organize visitas com os estudantes no laboratório ou local onde se encontra o experimento para que estes possam observar as etapas do processo, fazer anotações, fotografar etc. Lembramos que essas observações devem ser feitas mantendo o experimento em repouso, evitando interferências, a fim de obter um melhor resultado final. Todas as etapas de registro dos dados podem ser exploradas

pelo professor como elementos para formação de habilidades dos estudantes.

Soraya Moreno Palácio (soraya_palacio@yahoo.com.br), mestre em Química e doutora em Ciências pela UEM, pesquisadora CNPq, é professora adjunta do curso de Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste). Toledo, PR – BR. **Marcia Borin da Cunha** (marciaborin@uol.com.br), mestre em Educação pela UFSM, doutora em Educação pela FEUSP, coordenadora do Núcleo de Ensino de Ciências na Unioeste (NECTO), coordenadora PIBID-Química da Unioeste, é professora adjunta do curso de Química e do Programa de Pós-Graduação em Educação da Unioeste. Toledo, PR – BR. **Fernando Rodolfo Espinoza-Quiñones** (f.espinoza@terra.com.br), doutor em Física pela USP, pós-doutor em Física Nuclear Aplicada pela UEL, pesquisador CNPq, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unioeste, é professor associado do curso de Engenharia Química e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unioeste. Toledo, PR – BR. **Daniele Alves Nogueira** (d_a_nogueira@hotmail.com) é mestranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Unioeste. Toledo, PR – BR.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, n. 518, p. 266, 25 mar. 2004, seção 1.

CORAMI, F.; CAPODAGLIO, G.; TURETTA, C.; BRAGADIN, M.; CALACE, N. e PETRONIO, B.M. Complexation of cadmium and copper by fluvial humic matter and effects on their toxicity. *Annali di Chimica*, v. 97, p. 25-37, 2007.

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

ESPINOZA-QUIÑONES, F.R.; SZYMANSKI, N.; PALÁCIO, S.M.; MÓDENES, A.N.; RIZZUTO, M.A.; SILVA JR., F.G.; OLIVEIRA, A.P.; ORO, A.P. e MARTIN, E.N. Inhibition effect on the *Allium cepa* L. Root Growth When Using Hexavalent Chromium-Doped River Waters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 82, p. 767-771, 2009.

FISKESJÖ, G. Chromosomal relationship between three species of *Allium* as revealed by C-banding. *Hereditas*, v. 81, p. 23-31, 1975.

_____. Allium test on river water from Braän and Saxän before and after closure of a chemical factory. *Ambio* v. 14, p. 99-103, 1985.

LAMELAS, C. e SLAVEYKOVA, V. I.; Comparison of Cd(II), Cu(II), and Pb(II) biouptake by green algae in the presence of humic acid. *Environmental Science and Technology*, v. 41, p. 4172-4178, 2007.

PALÁCIO, S.M.; ESPINOZA-QUIÑONES, F.R.; GALANTES, R.M.; ZENATTI, D.C.; SEOLATTO, A.A.; LORENZ, E.K.; ZACARKIM, C.E.; ROSSI, N.; RIZZUTO, M.A. e TABACNIKS, M.H. Correlation between Heavy Metal Ions (Copper, Zinc, Lead) Concentrations and Root Length of *Allium cepa* L. in Polluted River Water. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 48, p. 191-196, 2005.

WHO. *International Standard for Drinking Water*, Third edition, World Health Organization, Geneva, 1971.

Para saber mais

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

Abstract: *Toxicity of Metals in Aqueous Solutions: A Bioassay for the Classroom.* The present article aims to propose the use of a bioassay simple and inexpensive to address the effects of metals in aqueous solutions at different concentrations. The bioassay is performed using bulbs of onion (*Allium cepa*) to monitor the effects of copper, exposing the bulbs directly in water contaminated with Cu^{2+} . The procedure consists in observing the growth of the roots of the onions in a specific period and analyzing this growth inhibition due to the presence of increasing concentrations of a metal. The results obtained in laboratory school makes possible to verify the phyto-toxic metal effect of increasing the concentration of the test organism and its correlation with the environmental contamination and its effects on human health.

Keywords: Metals, toxicity, bioassay.



Encontro sobre Educação em Ciências através a Aprendizagem Baseada na Resolução de Problemas

Universidade do Minho, Braga, Portugal, sábado, 12-10-2013

Realizar-se-á se no próximo dia 12 de outubro, na Universidade do Minho (Braga, Portugal), o Encontro sobre Educação em Ciências através da Aprendizagem das Ciências Baseada na Resolução de Problemas (ABRP).

Os seus destinatários são: investigadores da área da Educação em Ciências; futuros professores e professores de Ciências Físicas e Naturais, de todos os níveis de ensino; professores de outras disci-

plinas que fazem interface com as Ciências; outros interessados na temática do Encontro.

O Encontro prevê conferências orais, convidadas, e apresentação de comunicações em poster. Os textos das propostas de comunicação em poster deverão ser submetidos entre 01 e 30 de junho, segundo as normas disponíveis no website do Encontro.

Mais informações: <http://webs.ie.uminho.pt/encontro-abrp>