



Metodología de evaluación ecotoxicológica empleando germinación de semillas en gel nutriente como medio de cultura

doi: 10.4136/ambi-agua.1337

Received: 09 Mar. 2014; Accepted: 27 May 2014

Ronaldo Teixeira Pelegrini*; **Ângela Fracon Medina**; **Flávia Mendes**; **Juliane Cristina Molena**; **Larissa Franciane Greve**; **Luis Gustavo Silva Salmazo**; **Priscila Aparecida Milani**; **Priscilla Gaia de Andrade**; **Renan Brufatto Tognoli**

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), (CCA), Araras, SP, Brasil
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação (DCNME)

*Autor correspondiente: e-mail: ronaldopelegrini@gmail.com,
angelaframedinagel@gmail.com, flavinha_max@hotmail.com,
juliane_molena@hotmail.com, larissa_geoquimica@yahoo.com.br,
luisgustavo11@hotmail.com, priii_milani@hotmail.com,
pri.gaia@hotmail.com, renantog@gmail.com

RESUMEN

Los estudios dirigidos al desarrollo de evaluaciones ecotoxicológicas deben llevar a cabo los testes necesariamente en el mismo valor de pH. Ensayos para ser confiable deben ser realizado en medio de cultivo con valores de pH iguales, incluso después de la adición de los agentes estresores. Este trabajo tuvo como objetivo desarrollar una técnica de ensayos ecotoxicológicos utilizando semillas como organismos testes en medio de cultivo usando gel como camada soporte. La preparación del gel fue desarrollado por una Agua de Dilución que contenía concentraciones optimizadas de nutrientes cuyo valor de pH se ha preseleccionado y fijado por una solución tampón que contenía parte de los nutrientes deseados. Para las evaluaciones ecotoxicológicas fueran añadidas concentraciones del agente estresor en la preparación de la Agua de Dilución (una para cada concentración del agente estresor), se añadieron AGAR (17 g L^{-1}) calentándose a 85°C para la disolución completa. Volúmenes de la solución, todavía caliente (20 mL), se colocaron en recipientes de vidrio (250 mL) dejándola enfriar hasta temperatura ambiente para formar una camada de gel firme. Cerca de 50 semillas se añadieron en la camada de gel cerrando herméticamente el recipiente y colocándolo en un lugar con luz ambiente (sin incidencia directa de la luz solar). La metodología se presentó como una técnica de operación sencilla que no requiere manipulaciones durante el desarrollo de los embriones, lo que permite a costo analítico muy bajo (0,04 dólares EE.UU.), evaluaciones eficaces de los ensayos ecotoxicológicos con análisis seguras de la germinación de semillas y desarrollo de las estructuras esenciales de las plántulas con los valores de pH idénticos.

Palabras clave: testes, toxicidad, semillas, agar.

Metodologia de avaliação ecotoxicológica usando germinação de sementes em gel nutriente como meio de cultura

RESUMO

Os estudos que visam desenvolver avaliações ecotoxicológicas devem realizar os ensaios, necessariamente, em um mesmo valor de pH. Ensaios para serem confiáveis devem ser realizados em meio de cultura com valores de pH idênticos, mesmo após adição do agente estressor. Este trabalho visou desenvolver uma técnica de ensaios ecotoxicológicos usando sementes como organismos teste, em meio de cultura empregando um gel como camada suporte. A preparação do gel desenvolveu-se por meio de uma Água de Diluição contendo concentrações otimizadas de nutrientes cujo valor de pH foi predefinido e fixado por solução tampão contendo parte dos nutrientes desejados. Para avaliações ecotoxicológicas foram adicionadas concentrações de agente estressor na preparação das Águas de Diluição (uma para cada concentração de estressor), acrescentando-se AGAR (17 g L^{-1}) e aquecendo-se a 85°C para completa dissolução. Volumes da solução, ainda quente (20 mL), foram colocados em recipientes de vidro (250 mL) deixando esfriar até temperatura ambiente para formar uma camada de gel firme. Sobre o gel foram adicionadas 50 sementes lacrando-se o recipiente e colocando-o em local com luz ambiente (sem incidência direta da luz solar). A metodologia apresentou-se de simples operação, não requerendo manipulações no período de desenvolvimento dos embriões. Apresentou custo muito baixo (US\$ 0,04), permitindo realizar avaliações eficazes dos ensaios ecotoxicológicos com análises seguras da germinação das sementes e estruturas essenciais das plântulas em valores de pH idênticos.

Palavras-chave: testes, toxicidade, sementes, agar.

Ecotoxicological evaluation methodology using seeds germination in nutrient gel as culture medium

ABSTRACT

Tests in studies aimed at developing ecotoxicological assessments should necessarily be conducted at the same pH value. In order for trials to be trusted, they should be performed in culture medium with identical pH values, even after addition of the stressors. This work aimed to develop a technique of ecotoxicological tests using seeds as test organisms in culture medium using gel as a support layer. The gel preparation was developed by a Dilution Water containing optimal concentrations of nutrients whose pH value had been preset and fixed by a buffer solution containing part of the desired nutrients. For ecotoxicological assessments, we added stressor concentrations in the preparation of dilution water (one for each concentration of the stressor) and we added also Agar (17 g L^{-1}) and heated at 85°C for complete dissolution. Volumes of solution (20 mL), still hot, were placed in glass containers (250 mL) and allowed to cool to room temperature to form a firm gel layer. About 50 seeds were placed on the top of the gel layer and the container was sealed and placed in a location with ambient light (no direct sunlight). The methodology involves simple techniques and does not require manipulation during embryo development, allowing for effective assessment of ecotoxicological tests with secure analysis of seed germination and development of the essential structures of seedlings with equal pH values, and has very low analytical cost (US \$ 0.04).

Keywords: tests, toxicity, seeds, agar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Uso de vegetal como organismos testes en evaluación ecotoxicológica

Los ensayos ecotoxicológicos utilizando semillas representan una herramienta importante para evaluar las características de los compuestos químicos agresivos presentes en el medio ambiente. Este análisis es muy importante porque la activación de pro-mutágenos en las plantas hay alta relevancia para los seres humanos que consumen las plantas tratadas con productos químicos, y además, existen similitudes entre las etapas de la división celular entre las plantas y los animales, a pesar de la diferencia metabólica (Fiskesjo, 1985).

Las respuestas fisiológicas de las plantas al estrés ambiental son múltiplo facetadas: diferentes tipos de estrés pueden invocar respuestas sensibles y por lo tanto, la exposición al estrés confiere respuestas aumentadas e inmediatas. Las funciones metabólicas y bioquímicas de los elementos químicos se unen a la nutrición de las plantas en los aspectos nutricionales de la fisiología vegetal, de la bioquímica vegetal y de la biología molecular. Las funciones metabólicas y bioquímicas de los elementos químicos se unen en los aspectos nutricionales en favor de la fisiología de la planta, de la bioquímica y de la biología molecular favoreciendo su crecimiento (Epstein y Bloom, 2006).

Un elemento es esencial se cumplir uno o ambos criterios: (1) el elemento es parte de una molécula que es un compuesto intrínseco de la estructura o del metabolismo de la planta; (2) la planta puede ser tan severamente privada del elemento, que exhibe alteraciones en su crecimiento, desarrollo y reproducción - es decir, su "performance" - en comparación con las plantas menos desfavorecidas (Epstein y Bloom, 2006).

Si la concentración en el tejido de la planta de un elemento nutriente esencial cae abajo del nivel requerido para un crecimiento óptimo, la planta es dicha deficiente del elemento. Cuando el tejido es deficiente en algún elemento esencial, se producen alteraciones en grandes proporciones en el metabolismo y crecimiento. Primeramente los procesos metabólicos en lo que el elemento normalmente participa son retardados. Como cada reacción metabólica es parte de un todo complejo, una red interconectada de metabolismo, otros procesos distintos de los implicados, inmediatamente se ven afectados sucesivamente hasta que en condiciones de discapacidad prolongada o severa deficiencia, el estándar de todo el metabolismo se vuelve trastornado (Epstein y Bloom, 2006).

Así, mediante el uso de las plantas como organismos teste en los ensayos ecotoxicológicos es necesario desarrollar un medio de cultivo con condiciones nutricionales optimizado para el desarrollo óptimo de las plántulas. La falta de cualquier nutriente puede proporcionar respuestas que pueden ser confundidas con estrés por contaminante y/o la especie puede utilizar del contaminante como alimento y esto no presentar la respuesta real del efecto causado al medio ambiente.

Todavía, varios estudios que utilizan las plantas como organismo testes no lo hacen correctamente. Muchos no utilizan un medio de cultivo y emplean agua destilada en lo control y se comparan las respuestas a una solución con agentes estresores. Otros estudios utilizan papel como medio soporte y añaden agua de dilución con medio cultivo en valores de pH fijos con tampón (Rebessi et al., 2011), sin embargo, no puede garantizar que no hay cambios en el pH, ya que la agua se evapora y hay concentraciones de reactivos químicos, consecuentemente variaciones del pH. El pH es un parámetro de control muy importante. Hay especies químicas que son tóxicas para los mismos organismos de prueba a un pH y en otro pH no hay ninguna toxicidad.

1.2. Ensayos Ecotoxicológicos con Semillas

La germinación de las semillas en los testes de laboratorio es el surgimiento y desarrollo de las estructuras esenciales del embrión, lo que demuestra su capacidad para producir una

plántula normal en condiciones favorable de campo. Para que esto ocurra, una planta debe tener las siguientes estructuras fundamentales: el sistema radicular (raíz principal y raíces seminales en ciertos casos), lanzamiento (hipocotíleo, epicotíleo en ciertas hierbas, mesocotíleo y brotes terminales), cotiledones (uno o más) y coleotíleo (todas las gramíneas), (Brasil, 1992).

En el caso de ensayos ecotoxicológicos con semillas será necesario estandarizar una solución nutriente que contiene compuestos esenciales para el correcto desarrollo de las estructuras del embrión y que esta solución nutriente también participen de los ensayos con los agentes estresores. Especialmente, será necesaria una evaluación de los impactos químicos en comparación con los ensayos que no contienen cualquier de las especies agresivas.

1.3. La solución de nutrientes

Tres macronutrientes deben estar presentes en la forma de cationes en solución de nutrientes: potasio, calcio y magnesio. Dos aniones macronutrientes deben estar presentes: fosfato y sulfato. Soluciones de nutrientes proporcionan nitrógeno como catión y en la forma de amonio, como aniones en la forma de nitrato, o ambos, pero el nitrato es la principal fuente en la mayoría. En consecuencia, tres sales: nitrato de potasio, fosfato de calcio y sulfato de magnesio pueden proporcionar todos los macronutrientes necesarios, pero se prefiere tener cuatro sales porque eso proporciona una mayor flexibilidad para variar las concentraciones y proporciones de iones. Además, la solución nutriente debe proporcionar micronutrientes en niveles bajos, pero adecuado y debe presentar valores de pH dentro de un nivel apropiado para el embrión desarrollarse (Epstein y Bloom, 2006).

Esta tecnología de uso de nutrientes se emplea mucho en la propagación de plantas en testes in vitro (Tambosi y Rogge-Renner, 2010; Barreto Cid, 2001). Se utiliza un medio de cultivo con Agar para formar una camada firme donde los nutrientes permanecen biodisponible facilitando la adsorción por las plántulas. Además, lo Agar crear una camada gelatinosa que sirve de soporte para la germinación y establecimiento de semillas.

El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología de ensayos ecotoxicológicos utilizando semillas como organismos de prueba, en medio de cultivo con concentraciones de macro y micro nutrientes esenciales para el desarrollo de la plántula, fijando los valores de pH a través de sustancias tampones presentes en el medio de cultivo y el uso de un gel a base de Agar para formar una camada destinada a apoyar el crecimiento de las plantas.

Este estudio parte de los principios de que: los ensayos de toxicidad sin medio de cultivo y en diferentes valores de pH no hay validez analítica.

2. METODOLOGÍA

Esta metodología consiste en la preparación del medio de cultivo a partir de la elaboración de una Agua de Dilución en concentraciones optimizadas de nutrientes esenciales a los desarrollo de las semillas en un valor de pH predefinidos y fijado por una solución Tampón contiendo, preferiblemente, partes de los nutrientes deseados, conforme método propuesto por Pelegrini et al. (2012).

2.1. Elaboración de la solución de nutrientes

La elaboración de una solución de nutriente (en esto trabajo llamada de Agua de Dilución) se debe iniciar a partir de una solución Tampón de concentración $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, por ejemplo, en uno valor de pH en que hay intención de desarrollar los experimentos.

Otras sustancias nutrientes deben ser añadidas a partir de soluciones de concentración 1000 mg L^{-1} en volúmenes equivalentes las concentraciones pretendidas para el mejor desarrollo de los embriones. Después de las adiciones de todos los compuestos nutrientes en

las concentraciones optimizadas, el volumen es llevado hasta 1000 mL con agua destilada para completar la preparación de la Agua de Dilución utilizada como controle (Figura 1).

Para las evaluaciones ecotoxicológicas se añaden concentraciones del agente estresor durante la preparación de otras Aguas de Dilución (una Agua de Dilución para cada concentración del agente estresor). En el caso de éste estudio todos los cálculos fueran realizados para el valores de pH 7,0 (Figura 1).

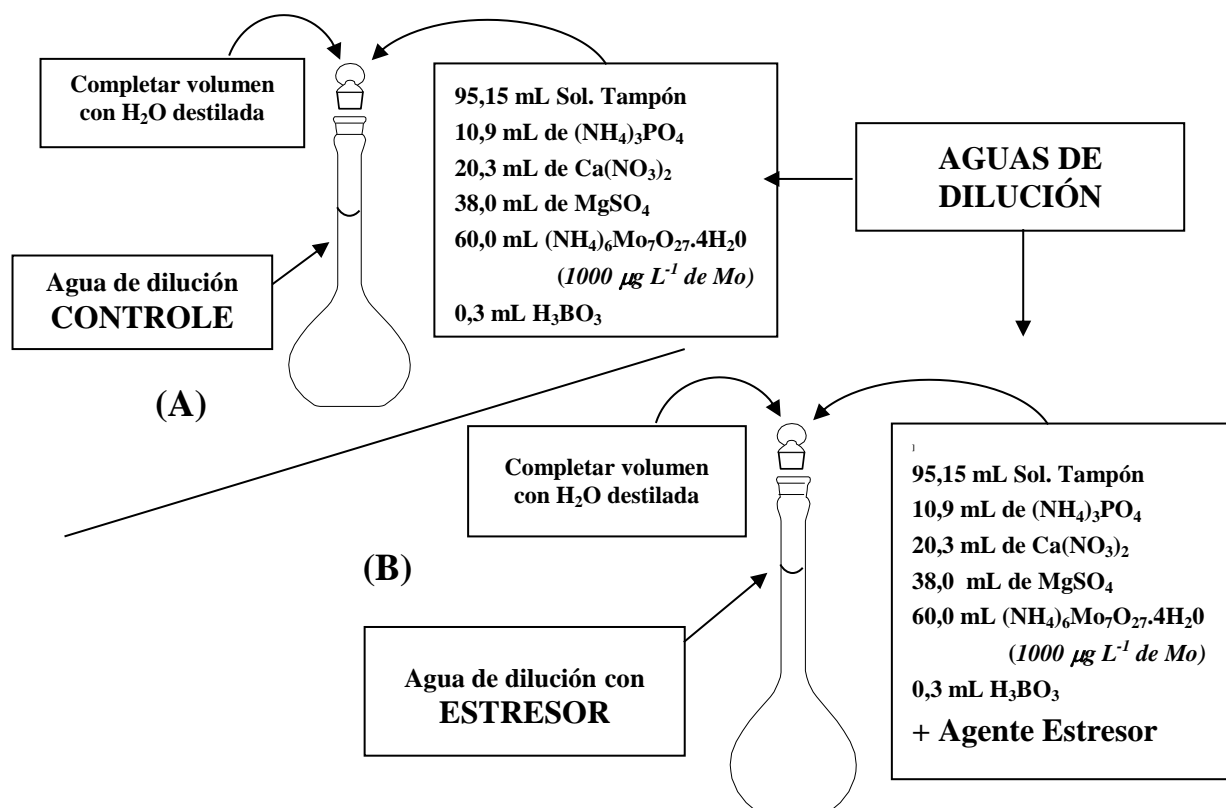


Figura 1. Indica la preparación de 1000 mL de las Aguas de Diluciones: (A) controle con las concentraciones nutricionales exigidas; (B) controle más agente estresor.

2.2. Elaboración del medio de cultivo

Después de la preparación de las Aguas de Dilución se separa un volumen de interés para añadir el AGAR a concentración de 17 g L^{-1} calentando a 85°C para disolución y formación de una camada soporte de gel nutriente. Volumen en torno de 20 mL de las soluciones con AGAR, aún caliente, son colocados en recipientes de vidrio transparente (250 mL) previamente lavados y secos, hasta enfriar a temperatura ambiente para formación de un gel firme (medio de cultivo). Sobre la camada soporte son añadidas 50 semillas de forma espaciada cerrando herméticamente y colocando los recipientes en lugar con luz ambiente (sin incidencia directa de la luz solar).

Las camadas soportes con gel deben contener los macro y micro nutrientes en las concentraciones optimizadas. Un medio de cultivo con valores de concentraciones medias para los desarrollos de las semillas fuera presentado por Pelegrini et al. (2012), en la Tabla 1, presentase las concentraciones de los principales nutrientes esenciales a los desarrollos de la mayoría de las plántulas principalmente las hortalizas y leguminosas.

Tabla 1. Medias de las concentraciones optimizadas de macro y micro nutrientes para la germinación de las semillas.

Nutrientes	K	P	N	Ca	Mg	B	Mo
(mg L ⁻¹)	61,00	41,00	35,00	30,00	38,00	0,30	0,06

Para preparar las concentraciones de los compuestos estresores en el medio de cultivo se elabora soluciones estoque de 1000 mg L⁻¹. Así, la adición de los volúmenes coincide con las concentraciones deseadas (cada 1,0 mL contiene 1,0 mg del compuesto estresor). Para los estudios de las concentraciones de las sustancias estresoras se prepara Agua de Dilución en las mismas concentraciones de los nutrientes del control y añadiendo las sustancias estresoras (parte B del Figura 1).

Los ensayos ecotoxicológicos utilizando semillas constituyó un recurso práctico, asequible y de razonable sensibilidad de indicación cualitativa y cuantitativa de la presencia de sustancias tóxicas en el medio ambiente (Greve et al., 2012; Medina et al., 2012; Molena et al., 2012; Pelegrini et al., 2012). Para llevar a cabo una supervisión segura debe hacer al menos ensayos por triplicados para cada muestra y diversas diluciones del agente estresor para evaluar adecuadamente su interferencia en la tasa de germinación de las semillas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Los estudios que hay como objetivo desarrollar una evaluación ecotoxicológica en cualquier medio de cultivo se deben llevar a cabo los testes, obligatoriamente, en el mismo valor de pH. Comparaciones ecotoxicológicas entre el control y las muestras con diferentes valores de pH no tendrá validez analítica. Por lo tanto, para las comparaciones ser fiable los experimentos deben ser desarrollado en valores de pH idénticos.

Así, un medio de cultivo debe utilizar una solución tampón para fijar el pH incluso cuando se añaden las concentraciones de las especies estresoras el valor de pH no puede cambiar.

La solución tampón debe contener preferiblemente especies nutrientes del medio de cultivo para evitar cualquier toxicidad causada por el exceso de electrolitos.

3.1. Elaboración de las posibilidades de preparo de la solución tampón

En una forma muy práctica se debe preparar las soluciones estoques de las especies precursoras del Tampón (soluciones ácidas y básicas) de concentraciones 0,01 mols L⁻¹. En seguida separar un volumen de la solución ácida y titular con la solución básica para establecer las proporciones y respectivos valores de pH do tampón.

En este estudio se preparó una tabla con diferentes proporciones de las soluciones ácidas y básicas con sus respectivos valores de pH (Tabla 2). Se utilizó un medidor de pH para realizar las valoraciones potenciométricas.

En suma, se debe establecer primero una tabla del valores de pH para abrir las posibilidades de trabajos e iniciar la preparación del medio de cultivo a partir de la solución tampón en lo valor de pH deseado.

Tabla 2. Volúmenes para preparación de 1000 mL de solución Tampón de Fosfato monobásico y bibásico de Potasio y sus respectivos valores de pH.

A (mL)	B (mL)	Valor de pH	A (mL)	B (mL)	Valor de pH
935	65	5,7	450	550	6,9
920	80	5,8	390	610	7,0
900	100	5,9	330	670	7,1
877	123	6,0	280	720	7,2
850	150	6,1	230	770	7,3
815	185	6,2	190	810	7,4
775	225	6,3	160	840	7,5
735	265	6,4	130	870	7,6
685	315	6,5	105	895	7,7
625	375	6,6	85	915	7,8
565	435	6,7	70	930	7,9
510	490	6,8	53	947	8,0

Nota: Soluciones precursoras: A: Solución 0,01 mols L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄); B: Solución 0,01 mols L⁻¹ de fosfato de potasio bibásico (K₂HPO₄).

3.2. Calculo de las masas de los nutrientes en la solución tampón

Después de elegir el valor de pH se debe calcular las concentraciones de los nutrientes. Se trabajar con tampón fosfatado de potasio se debe calcular las masas de potasio y fósforo presente para obtener los volúmenes correspondientes a las concentraciones que se indican en el tampón preferido.

Por lo tanto, para calcular la masa total de potasio en el tampón se debe cuantificar las cantidades de potasio presente en las soluciones A y B, de acuerdo con los volúmenes añadidos para preparar el tampón en el valor de pH elegido. Así, para un tampón de KH₂PO₄ y K₂HPO₄ como de éste trabajo, se puede calcular las masas de potasio de acuerdo con la Ecuación 1, donde M_{KT} corresponde la masa de potasio total en el tampón y V_A el volumen de la solución A (solución ácida) y V_B el volumen de la solución B (solución básica) que fueran utilizadas para preparar el tampón. La Ecuación 1, proporcionará la cantidad de masa en miligramos (mg).

$$M_{KT} = 0,39V_A + 0,78V_B \text{ (mg)} \quad (1)$$

De manera similar se puede calcular la masa total del fósforo en el tampón. También se debe añadir las cantidades de fósforo presentes en las soluciones precursoras A y B. Como las soluciones son de fosfato y existe solamente la presencia de un mol de fósforo en cada anión. Esto hecho facilita los cálculos pudiendo hacer la multiplicación del valor de un mol de fósforo por la molaridad y el resultado se multiplica por la suma de los volúmenes de las soluciones ácidas y básicas (Ecuación 2).

$$M_{PT} = 0,31(V_A + V_B)(\text{mg}) \quad (2)$$

Utilizando las Ecuaciones 1 y 2 se puede elaborar los datos de las masas de Potasio y Fosforo presentes en 1000 mL de tampón fosfatado en los valores de pH deseado (Tabla 3). Esto facilitará los estudios futuros cuyos los datos son disponibles.

Tabla 3. Cantidad de masas de Potasio y Fosforo en 1000 mL de Solución Tampón de Fosfato monobásico y bibásico de Potasio en sus respectivos valores de pH.

K (mg)	P (mg)	Valor de pH	K (mg)	P (mg)	Valor de pH
415,3	310	5,7	604,5	310	6,9
412,2	310	5,8	627,9	310	7,0
429,0	310	5,9	651,3	310	7,1
437,9	310	6,0	670,8	310	7,2
448,5	310	6,1	690,3	310	7,3
462,1	310	6,2	705,9	310	7,4
477,7	310	6,3	717,6	310	7,5
493,3	310	6,4	729,3	310	7,6
512,8	310	6,5	739,0	310	7,7
536,2	310	6,6	746,8	310	7,8
559,6	310	6,7	752,7	310	7,9
581,1	310	6,8	759,3	310	8,0

Nota: Soluciones precursoras: **A:** Solución 0,01 mols L⁻¹ de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄); **B:** Solución 0,01 mols L⁻¹ de fosfato de potasio bibásico (K₂HPO₄).

Así, para calcular las concentraciones de los nutrientes presentados en la Tabla 1, sólo hacer una simple operación aritmética para determinar el volumen del tampón que corresponde la masa del potasio necesaria para preparar el Agua de Dilución. Se, se optó por trabajar con valor de pH 6,8 por ejemplo, que volumen del tampón se debe utilizar?

Se en 1000 mL de solución tampón fosfatada (KH₂PO₄ y K₂HPO₄) contiene 581,1 mg de potasio y se necesita de 61 mg (Tabla 1), basta medir 105 mL de la solución tampón para contener la masa de potasio necesaria. En esto caso se tomó también una cantidad de fosforo presente en 105 mL (se en 1000 mL de tampón hay 310 mg de fosforo, en 105 mL hay 32,55 mg).

Como los datos de la Tabla 1 indica que se necesita de 41 mg de fosforo como nutriente, la masa restante debe provenir de otra solución. Se indica que la masa de fosforo que aún falta (8,45 mg) debe provenir de una solución diferente de las utilizadas en el tampón. Se debe preparar, por ejemplo, una solución de (NH₄)₃PO₄ en concentración de 1000 mg L⁻¹ de fosforo. De ésta forma a lo medir 8,45 mL de la solución estoque de P estará cuantificando 8,45 mg de P.

Se propone que todos los demás macronutrientes se deben provenir de soluciones estoque de concentración 1000 mg L^{-1} del elemento necesario. Utilizando esta concentración la preparación del Agua de Dilución se verá facilitada.

3.3. Elaboración de una tabla de solución Tampón - volúmenes x valores pH

Este trabajo propone que las preparaciones de los ensayos ecotoxicológicos con plantas deben iniciar con la elaboración de una tabla con los datos de las cantidades de volúmenes de las soluciones ácidas y básicas de una solución tampón que mejor se adapte a los estudios.

Se propone que la construcción de una tabla se lleva a cabo de una manera práctica a partir de la preparación de soluciones ácidas y básicas a concentraciones $0,01 \text{ mols L}^{-1}$ que es más adecuada a los estudios ecotoxicológicos, debido la demanda nutricionales requeridas por las semillas. Para construcción de la tabla de solución tampón si debe iniciar, por ejemplo, a partir de 50 mL de la solución ácida e ir realizando una titulación potenciométrica fijando los valores de pH deseado y haciendo la medición de los volúmenes de la solución básica. De esta manera se obtendrá una tabla con resultados propios y diferentes de los valores teóricos por que los cálculos se realizan a partir de los valores ideales.

En la Tabla 4, presenta los datos construidos a partir de una titulación potenciométrica para elaboración de una solución tampón de ácido cítrico y fosfato bibásico de potasio.

Tabla 4. Volúmenes y valores de pH obtenido mediante titulación de 50 mL de ácido cítrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ por K_2HPO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Solución A (mL)	Solución B (mL)	Valores de pH
50,0	20,2	3,0
50,0	42,2	3,5
50,0	60,8	4,0
50,0	79,8	4,5
50,0	99,5	5,0
50,0	119,9	5,5
50,0	150,3	6,0
50,0	209,0	6,5
50,0	363,5	7,0

Nota: Soluciones precursoras: A: $0,01 \text{ mols L}^{-1}$ Solución Ácido Cítrico; B: $0,01 \text{ mols L}^{-1}$ Fosfato Bibásico de Potasio.

A partir de los datos presentados en la Tabla 4, se puede convertir los resultados a volumen total de 1000 mL por medio de una simple operación aritmética. Por ejemplo, a un valor de pH 7,0 (Tabla 4), donde era necesario un volumen de 363,5 mL de solución de K_2HPO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ para titular 50,0 mL de solución de ácido cítrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ el volumen total de la solución tampón es la suma de los volúmenes de las soluciones ácidas y básicas, siendo equivalente a 413,5 mL. Convirtiendo este volumen total (413,5 mL) para 1000 mL se puede calcular las proporciones de cada solución ácida y básica (Tabla 5).

En lo caso de esto tampón las masas de potasio y fosforo refieren solamente a la especie básica K_2HPO_4 (Tabla 5). Para realización de los cálculos de las masas de éstos macronutrientes basta tomar o volumen de la solución básica en lo valor de pH de interese. Las Ecuaciones 3 y 4 facilitan los cálculos.

$$M_{KT} = 0,78(V_B) \text{ (mg)} \quad (3)$$

$$M_{PT} = 0,31(V_B) \text{ (mg)} \quad (4)$$

Tabla 5. Valores convertidos para volumen total de 1000 mL de la solución Tampón de Ácido Cítrico y Fosfato Bibásico de Potasio.

A (mL)	B (mL)	Valores de pH
712	288	3,0
542	458	3,5
451	549	4,0
385	615	4,5
334	666	5,0
294	706	5,5
250	750	6,0
193	807	6,5
121	879	7,0

Nota: Soluciones precursoras: A: 0,01 mols L⁻¹ Solución Ácido Cítrico; B: 0,01 mols L⁻¹ Fosfato Bibásico de Potasio.

3.4. Eficiencia para fijar los valores pH

Para comprobación de ésta técnica se preparó un medio de cultivo de acuerdo con las concentraciones nutricionales presentadas en la Tabla 1. A partir de los datos de la Tabla 2, se elaboró una solución tampón en valor de pH 7,0. El propósito del experimento era demostrar la resistencia a los cambios de los valores de pH del medio de cultivo durante los ensayos en tiempos de prueba prologados (200 horas).

En este experimento el valor del pH en el medio de cultivo se permaneció prácticamente constante durante 125 días (3.000 horas) sin mostrar cambios significativos y no se observaron cambios de pH en el período de 7 días que se llevan a cabo los ensayos ecotoxicológicos (Figura 2).

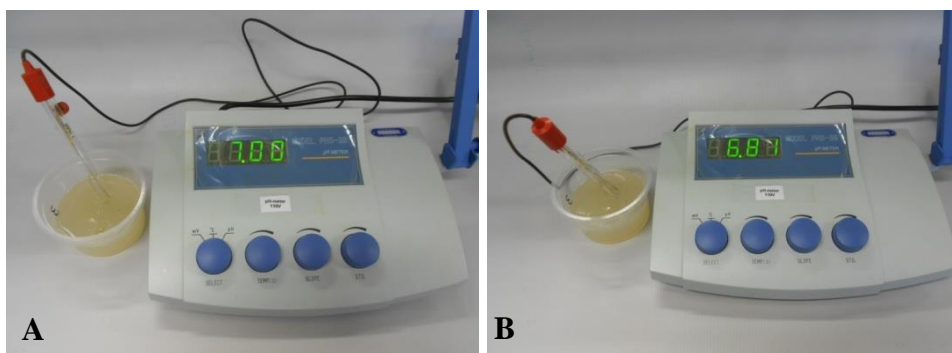


Figura 2. Estudio del valor de pH del medio de cultivo en Gel nutriente: (A) gel recién preparado (pH 7,00); (B) gel después de 3000 horas de la preparación (pH 6,81).

3.5. Ejemplificación de los estudios ecotoxicológicos

Diversos estudios de ensayos ecotoxicológicos fueron realizados para lo desarrollado de esta metodología. Los testes se realizaron en triplicados para las evaluaciones y se observó la germinación de las semillas con su capacidad para presentar los desarrollos de las estructuras para convertirse en plántula normal. La camada en gel nutritivo se mostró eficiente para la identificación del sistemas de raíces (raíces principales y raíces secundarias), dispara (yemas terminales), cotiledones (uno o más) y la toxicidad del compuesto estresor fueran observados cuando se presentó cierto efecto significativo sobre las plántulas que modificó su sistema completo de formación, o anomalías en su desarrollo.

Dos estudios son presentados como ejemplo de la aplicación de esta metodología. En los ensayos fue usado como agente estresor el herbicida Glifosato que es conocido como un compuesto químico muy tóxico (Bralbante y Zappe 2012; Amarante Jr. et al., 2002). Como organismos testes fueran utilizadas la especie *Crambe abyssinica* (Crambe), una leguminosa nativa de África y *Salvia hispana* comercializada en Brasil con nombre de Chia.

Lo medio de cultivo fue preparado con Agar a 17 g L^{-1} y elaborado en las concentraciones nutrientes de acuerdo con la Tabla 1. Los compuestos químicos utilizados fueran los presentados en la Figura 1, y los ensayos se llevaron a cabo en valor de pH 7,0 fijados por lo tampón elaborado en la Tabla 2.

La especie *Crambe abyssinica* mostró un crecimiento muy rápido alcanzando 20 cm de tamaño (el control) en 15 días de ensayos (Figura 3), siendo que en 7 días la Crambe mostró contrastes visuales muy significativos para evaluación de los estudios.



Figura 3. Organismo teste: *Crambe abyssinica* – Control y medio de cultivo con agente estresor (herbicida Glifosato $5,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Los ensayos realizados con la especie *Salvia hispana* (Chia), como organismo teste, mostraron una excelente sensibilidad toxicológica pudiendo detectar la toxicidad del glifosato (agente toxico) en concentraciones de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 4).



Figura 4. Organismo teste: *Salvia hispânica* (Chia) – Control y medio de cultivo con agente estresor (herbicida Glifosato 1,0 mg L⁻¹).

Todavía, se espera que esta especie planta (*Salvia hispânica*) pueda detectar efecto tóxico de las concentraciones del Glifosato en el nivel de ppb. Esta metodología de ensayos ecotoxicológicos en gel nutritivo y en valores de pH fijo se mostró muy eficaz en la identificación de los impactos ambientales en testes realizados con herbicida Glifosato cuando utilizadas las plantas Crambe y Chia.

4. CONCLUSIONES

Este trabajo propone una nueva tecnología para ensayos ecotoxicológicos con plantas a partir de la germinación de las semillas en un medio de cultivo utilizando un gel como camada soporte para los desarrollos de los embriones.

Los estudios que visaren emplear esta técnica deban establecer primero el valor de pH que se desea trabajar e iniciar la preparación del medio de cultivo a partir de la solución tampón en lo valor de pH deseado. Preferentemente, el tampón debe contener parte de los nutrientes para evitar la presencia excesiva de electrolitos no nutrientes. Hay que sumar todas las concentraciones de la sustancia de formación del Agua de Dilución y por último el AGAR para construir una camada soporte de gel nutritivo para el desarrollo de los embriones.

La realización de los ensayos ecotoxicológicos en el medio de cultivo en Gel favorece el enraizamiento de las plántulas que hacen con más firmeza mejorando la adsorción de los nutrientes y el crecimiento se acelera, además, proporciona una análisis segura del sistema radicular. Para los estudios ecotoxicológicos este es un factor importante debido al corto tiempo de análisis que es deseable. Los beneficios del crecimiento rápido de las plántulas favorece la comparación entre el control y las muestras que están siendo investigadas. Sin embargo, el medio de cultivo no debe variar el pH con la adición del agente estresor. Las comparaciones entre el control y las muestras con diferentes valores de pH no tendrán validez analítica.

Esta metodología se presenta muy versátil y se puede preparar medios de cultivo empleando diversas sustancias químicas como nutrientes y se puede elegir los valores de pH que se desea para desarrollar los estudios. Puede reproducir las condiciones nutricionales idénticas de campo para ser estudiados en laboratorio y los ensayos pueden ser manejados con seguridad el que permite una mejor observación de los resultados.

La técnica de operación de los ensayos es muy simple, sólo hay que poner el gel con los nutrientes en un recipiente limpio y seco, añadir las semillas, tapar el frasco, poner en un local con luz natural y esperar el tiempo necesario para las respuestas de los estudios.

Los resultados del análisis pueden proporcionar datos muy eficientes. Algunas especies de plántulas pueden presentar sensibilidad en nivel de ppb para muchas sustancias contaminantes.

Esta tecnología es de muy bajo costo, cada ensayo hay un costo calculado alrededor de U\$ 0,04 significando que con U\$ 1.00 se puede realizar hasta 25 pruebas.

Dada la versatilidad de preparación del medio de cultivo, lo método permite las investigaciones ecotoxicológicas con matrices de sólidos y líquidos y también hacer variaciones de los estudios como: ensayos de germinación de semillas, estudios de las capacidades cultivares de los suelos, clonación de especies de intereses (con la adición del hormona del enraizamiento en la elaboración del medio de cultivo).

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo técnico cedido por el Programa de Educación Tutorial (PET 2010 - MEC / SESu / DIFES) del Curso de Licenciatura en Química - Centro de Ciências Agrárias (CCA) - Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

6. REFERENCIAS

- AMARANTE JR., O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400014>
- BARRETO CID, L. P. A propagação in vitro de planta. O que isso? **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 19, p. 16-21, 2001.
- BRALBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 1992. p. 365.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2006.
- GREVE, L. F.; MENDES, F.; MEDINA, A. F.; PELEGRINI, R. T. Desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos empregando as espécies de hortaliças *Brassica oleracea* var. *acephala*; *Eruca Sativa*; *Achicoria Amarilla*; *Brassica juncea*; *Lactuca Sativa* var. *Vanda*; *Brassica oleracea* var. *Capitata*; *Capsicum Annuum*; *Cucumis Anguria* L.; *Lycopersicum* sp. Mill.; *Beta vulgaris* L, em meio de cultura com nutrientes em AGAR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., 2012, Porto de Galinhas. **Trabalhos...** [S.l.]: ECOTOX, 2012.
- FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, n. 102, p. 99-112, 1985.

- MEDINA, A. F.; MENDES, F.; GREVE, L. F.; PELEGRINI, R. T. Avaliações ecotoxicológicas empregando as espécies de flôres *Celosia argentea* (*Crista-plumosa*); *Petunia x hybrida* (*Pétunia*); *Dhalia pinnata* (*Dália*); *Helianthus annuus* (*Girassol*), meio de cultura com nutrientes em AGAR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., 2012, Porto de Galinhas. **Trabalhos...** [S.l.]: ECOTOX, 2012.
- MOLENA, J. C.; SALMAZO, L. G.; AVELAR, M.; MILANI, P. A.; ANDRADE, P. G.; TOGNOLI, R. B. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliação de Toxicidade Crônica usando as espécies *Crambe abyssinica*; *Lactuca sativa*; *Salvia hispanica*, meio de cultura com nutrientes em AGAR. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., 2012, Porto de Galinhas. **Trabalhos...** [S.l.]: ECOTOX, 2012.
- PELEGRINI, R. T.; MEDINA, A. F.; BALADORE, F. J.; MENDES, F.; MOLINA, J. C.; GREVE, L. F. et al. Desenvolvimento de metodologia para avaliação de Toxicidade Crônica e Aguda usando sementes e meio de cultura com nutrientes em Agar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 12., 2012, Porto de Galinhas. **Trabalhos...** [S.l.]: ECOTOX, 2012.
- REBESSI, A. C.; MEDINA, A. F.; PEREIRA, B.; FRANÇA, D.; SANTOS, D. F.; MENDES, F. et al. Estudo da Toxicidade Crônica do herbicida glifosato em sementes de milho, de quiabo e rúcula. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 2, p. 03-16, 2011.
- TAMBOSI, G.; ROGGE-RENNER, G. D. Avaliação de métodos de esterilização, concentração de Agar e composição de meio de cultura para propagação *in vitro* de *Pimpinella anisum* (Linn.) – Apiaceae. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 31, n. 2, p. 189-194, 2010.