



ESTUDO DA TOXICIDADE DA UREIA NA GERMINAÇÃO DE RABANETE E COUVE

D. S. S. Souza^{*}, J. L. Ramos, A. B. Dias, A. L. R. Portela, F. B. Villa, G. B. Godoy, G. A. Cristiano, I. R. G. Godoi, J. O. F. Monteiro, L. Gabriel, M. C. Volpe, V. D. D. Neves, R. Sebastiani, R. T. Pelegrini

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Campus Araras, SP, Brasil

Article history: Received 18 September 2019; Received in revised form 20 September 2019; Accepted 24 September 2019; Available online 30 September 2019.

RESUMO

A ureia é amplamente utilizada como fertilizante no meio agrícola. Contudo, em determinadas concentrações ela pode apresentar significativa toxicidade. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento da ureia como agente estressor na germinação de sementes de *Raphanus sativus* L. (rabanete) e *Brassica oleracea* L. (couve), encontrando o CENO (Concentração de Efeito Não Observável), CEO (Concentração de Efeito Observável) e CE₅₀ (Concentração Efetiva) para cada uma das espécies. Os experimentos foram realizados através da preparação de um meio de cultivo constituído de soluções contendo macro e micronutrientes em concentrações otimizadas e ágar dissolvido, além de diferentes concentrações de ureia adicionadas. Para controlar os valores de pH do meio de cultivo, foram utilizados dois tipos de soluções tampão: pH 7,0 para estudos com o rabanete e pH 7,5 para a couve. Em relação ao rabanete, observou-se que o CENO aparecia em 20 mg.L⁻¹ de agente estressor, o CEO em 30,0 mg.L⁻¹ e o CE₅₀ em 183,0 mg.L⁻¹. Para a couve, observou-se o aparecimento do CENO em 1,0 mg.L⁻¹, o CEO em 2,0 mg.L⁻¹ e o CE₅₀ em, aproximadamente, 418,0 mg.L⁻¹. Com esses dados, pode-se notar que a couve apresentou maior sensibilidade nas avaliações de toxicidade crônica (CENO/CEO) e o rabanete, maior sensibilidade nas avaliações de toxicidade aguda (CE₅₀).

Palavras-chave: agente estressor, CENO, CEO, CE₅₀

UREA TOXICITY STUDY IN RADISH AND CABBAGE GERMINATION

ABSTRACT

Urea is widely used as a fertilizer in agriculture. However, at certain concentrations, it may present significant toxicity. This work aimed to evaluate the behavior of urea as a stressor in seed germination of *Raphanus sativus* L. (radish) and *Brassica oleracea* L. (cabbage), finding the NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Lowest Observable Effect Concentration) and EC₅₀ (Effective Concentration) for each species. The experiments were performed by preparing a culture medium with a solution containing macro and micro nutrients in optimized concentrations and dissolved agar, besides concentrations of urea were also added. To the pH values control of the culture medium, two types of buffer solutions were used: pH 7.0 for radish studies, and 7.5 for cabbage. In relation to radish, was observed that NOEC appeared in 20.0 mg L⁻¹ of stressor, LOEC in 30.0 mg L⁻¹ and EC₅₀ in 183.0 mg L⁻¹. For cabbage, NOEC appeared in 1.0 mg L⁻¹ of stressor, LOEC in 2.0 mg L⁻¹ and EC₅₀ in approximately 418.0 mg L⁻¹. With these data, it can be noted that cabbage had higher

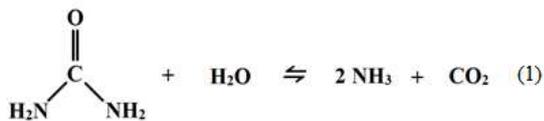
^{*}davissouza@hotmail.com

sensitivity in chronic toxicity assessments (NOEC/LOEC) and radish, higher sensitivity in acute toxicity assessments (EC₅₀).

Keywords: stressor, NOEC, LOEC, EC₅₀

INTRODUÇÃO

A ureia (CH₄N₂O) é uma fonte de nitrogênio orgânico liberado continuamente no ambiente por meio de processos biológicos. Em ruminantes, por exemplo, a ureia representa cerca de 50 a 75% do nitrogênio total excretado. Este composto também surge no solo como produto da degradação do aminoácido arginina e do ácido úrico, que é excretado por pássaros, répteis e a maioria dos insetos terrestres. A ureia pode ser também adicionada ao solo onde ela é hidrolisada para amônia (NH₃) e gás carbônico (CO₂) pela enzima urease, conforme o equilíbrio químico indicado por (1). Esta enzima pode ser originária de microrganismos e de plantas, tendo ampla distribuição nos solos (VIEIRA, 2017).



A amônia está sob intensa fiscalização dos órgãos de controle ambiental devido ao seu potencial toxicológico, sendo permitida a presença de 5,0 mg de amônia por litro de efluente (Resolução CONAMA N° 357/2005). Quando dissolvida em água, esta torna-se imprópria à vida animal e vegetal, especialmente para as formas jovens (larvas, esporos ou cistos) e sementes em

MATERIAL E MÉTODO

O desenvolvimento desta metodologia baseou-se nos procedimentos de análise toxicológica desenvolvidos por Pelegrini *et al.*, 2014, com algumas modificações, e na produção de meio de cultivo descrita por Contieri *et al.*, 2018. A escolha destas técnicas deu-se pelo uso de sementes como organismos testes,

germinação. A remoção da amônia obedece a um ciclo de transformações bioquímicas denominado “Ciclo do Nitrogênio”. Neste, os microrganismos, especialmente as bactérias, participam ativamente na conversão de dinitrogênio (N₂) em amônia (amonificação) e conversão de amônia em dinitrogênio (nitrificação e posterior desnitrificação) (CONEGLIAN *et al.*, 2002).

O estudo de toxicidade é uma das mais significativas avaliações para analisar impactos provocados em sistemas ambientais. A toxicologia clássica é a ciência que estuda os efeitos das interações químicas de certas substâncias que atuam no organismo de acordo com a dosagem e a exposição. É um dos estudos mais importantes por apresentar uma avaliação quantitativa de agentes químicos e seus impactos aos organismos vivos (SEIZI, 1996).

A conversão da ureia em amônia, dependendo da concentração do composto, pode ser bastante prejudicial para algumas espécies de seres vivos. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as toxicidades aguda e crônica provocadas pela ureia na germinação de sementes de rabanete e couve, já que esta substância é frequentemente utilizada na agricultura como fonte de nitrogênio.

produção de meio de cultura de forma simplificada, elevada sensibilidade e baixo custo. Os estudos foram realizados em triplicatas para melhor verificação das estatísticas.

Preparo da solução de nutrientes

A solução de nutrientes contém concentrações otimizadas de macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento de plântulas. Pode ser preparada em diversos valores de pH de acordo com a variação das soluções tampão que são empregadas no preparo. Os tampões são preparados nos valores de pH desejados aos ensaios e empregam, em suas estruturas moleculares, os nutrientes que farão parte do meio de cultivo. As concentrações e os nutrientes utilizados disponibilizam-se na Tabela 1.

Na Tabela 2 encontram-se as concentrações e os volumes utilizados de soluções estoque para o preparo da solução de nutrientes de pH 7,0 para estudos com as sementes de rabanete. Já na Tabela 3, encontram-se os valores para o preparo da solução de nutrientes de pH 7,5 para os estudos com as sementes de couve. Estes valores de pH foram definidos através de testes realizados previamente com diversos outros valores pré-estabelecidos. Os valores então definidos foram os quais as plântulas, de cada espécie, apresentaram melhor germinação para efeito do estudo.

Tabela 1. Concentrações dos nutrientes presentes no meio de cultivo.

Nutrientes	K	P	N	Ca	Mg	B	Mo
mg.L ⁻¹	61,00	41,00	35,00	20,00	38,00	0,30	0,06

Tabela 2. Concentrações e volumes das soluções estoque para elaboração da solução de nutrientes, a fim de estudos com o rabanete. Solução tampão no valor de pH 7,0.

Concentrações das soluções estoque	Tampão I (KH ₂ PO ₄)/(K ₂ HPO ₄) (0,01 mol.L ⁻¹)	Tampão II (NH ₄)H ₂ PO ₄ / (NH ₄) ₂ HPO ₄ (0,01 mol.L ⁻¹)	(NH ₃) ₂ SO ₄ (1000 mg.N.L ⁻¹)	CaCO ₃ (1000 mg.Ca.L ⁻¹)	MgSO ₄ .7 H ₂ O (1000 mg.Mg.L ⁻¹)	H ₃ BO ₃ (1000 µg.B.L ⁻¹)	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O (1000 µg.Mo.L ⁻¹)
Volumes utilizados (mL)	100,6	31,9	28,7	20,0	38,0	300,0	60,0

Preparo do meio de cultivo

Para preparar o meio de cultivo, empregou-se 0,8g de ágar dissolvido em 100 mL de solução de nutrientes. Utilizou-se um béquer de 250 mL para aquecimento da mistura em chama de bico de Bunsen, com o auxílio de um tripé com tela de amianto, até a fervura para total dissolução do ágar.

Após a fervura, aguardou-se a temperatura atingir aproximadamente 45 °C e adicionou-se 1,0 mL de solução de agente estressor (em diversas concentrações para avaliação

ecotoxicológica) e duas gotas de água sanitária (a fim de minimizar espécies patogênicas e desenvolvimento de fungos). Com auxílio de uma bagueta de vidro, homogeneizou-se a mistura ainda líquida.

As soluções de ureia foram preparadas por meio de soluções estoques em concentrações de 500, 1000, 2000 e 5000 mg.L⁻¹, para posterior diluições nas concentrações desejadas. A fim de comparar o desenvolvimento das plântulas, foi empregada “amostra controle” sem adição de agente estressor.

Para o preparo dos ensaios, dividiu-

se o conteúdo do meio de cultivo ainda líquido (temperatura aproximada de 40 °C), em volumes iguais (em torno de 30 mL) em três recipientes de polipropileno transparente (250 mL). Após o enrijecimento do meio de cultivo, foram acondicionadas 30 sementes, homogeneamente, em cada frasco.

Os recipientes foram, por fim, fechados e submetidos à luz natural (em ambiente fresco, sem exposição direta do sol) até serem avaliadas ao final do quarto

dia de exposição (análise de toxicidade aguda) e do sétimo dia de exposição (análise de toxicidade crônica) utilizando a Regra para Uso de Sementes em Ensaio Toxicológicos (RUSSET), definida pelo grupo para a realização deste estudo e trabalhos futuros. A RUSSET foi baseada nas Regras para Análise de Sementes (RAS), propostas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009).

Tabela 3. Concentrações e volumes das soluções estoque para elaboração da solução de nutrientes, a fim de estudos com a couve. Solução tampão no valor de pH 7,5.

Concentrações das soluções estoque	Tampão I (KH_2PO_4)/(K_2HPO_4) (0,01 mol.L ⁻¹)	Tampão II (NH_4) H_2PO_4 / (NH_4) $_2\text{HPO}_4$ (0,01 mol.L ⁻¹)	(NH_3) $_2\text{SO}_4$ (1000 mg.N.L ⁻¹)	CaCO_3 (1000 mg.Ca.L ⁻¹)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1000 mg.Mg.L ⁻¹)	H_3BO_3 (1000 µg.B.L ⁻¹)	(NH_4) $_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1000 µg.Mo.L ⁻¹)
Volumes utilizados (mL)	86,7	45,8	23,8	20,0	38,0	300,0	60,0

Regra para Uso de Sementes em Ensaio Toxicológicos

Este teste de toxicidade tem por objetivo avaliar o efeito subletal em sementes através do CE₅₀ e CENO/CEO, no que diz respeito a maior e menor concentração do agente tóxico para que de fato haja toxicidade. Os testes de germinação devem ser realizados sobre um meio de cultivo com macro e micronutrientes em concentrações otimizadas e em valores de pH fixos. Nestas condições, os testes geralmente são satisfatórios, visto que o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião é visível e as respostas são coerentes devido à padronização das condições de ensaios.

A toxicidade de certo composto, quando em concentrações não toleradas pela planta, implica em anomalias em seu desenvolvimento.

Alguns elementos e compostos aplicados para os testes controlam a disponibilidade de nutrientes para a planta de acordo com o pH especificado. A não germinação de algumas sementes presentes no meio de cultivo é considerada normal, podendo ser sementes duras ou dormentes, acarretando diretamente na porcentagem de germinação que corresponde à proporção do número de sementes, produzindo plântulas classificadas como normais numa determinada faixa de pH e concentração de agente estressor.

O desenvolvimento das sementes deve ser observado em tempos curtos e longos, definidos como toxicidade aguda e crônica, respectivamente, dependendo do tempo de exposição. Após o período considerado efetivo para a toxicidade, deve-se fazer uma média aritmética simples do crescimento do caule da plântula, já que as raízes podem apresentar

desenvolvimento disforme. É necessário avaliar amostragens significativas das plântulas nas diferentes concentrações de agente estressor aplicado. Espera-se que cada espécie reaja diferentemente, havendo a necessidade de elaborar um gráfico para comparação, a fim de tomar conclusões definitivas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos estudos de toxicidade crônica provocada pela ureia ao rabanete, em valor de pH 7,0, observou-se CENO em torno de $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ureia e CEO em $30,0 \text{ mg.L}^{-1}$, de acordo com a Figura 1. No estudo de toxicidade aguda do rabanete, pode-se observar que a concentração efetiva (CE_{50}) apareceu em valores próximos a $183,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ureia, de acordo com cálculo de regra de três simples indireta (Figura 2).

Na análise das sementes de couve, em valor de pH 7,5, observou-se que a toxicidade crônica para CENO ocorreu em $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e para CEO em $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (Figura 3). A toxicidade aguda da ureia apresentou CE_{50} em, aproximadamente, $418,0 \text{ mg.L}^{-1}$, de acordo com cálculo de regra de três simples indireta (Figura 4).

Comparando os ensaios, pôde-se observar que a couve apresentou maior sensibilidade frente à concentração da ureia, podendo ser verificada por meio do estudo de toxicidade crônica, a qual apresentou efeito tóxico em $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto o rabanete mostrou uma resistência mais significativa frente à concentrações elevadas, apresentando efeito tóxico em 30 mg.L^{-1} .

Os ensaios toxicológicos apresentam avaliações quantitativas de agentes químicos de duas maneiras distintas que se diferenciam pelo tempo de exposição. É denominada toxicidade aguda a que avalia a concentração efetiva capaz de apresentar toxicidade a 50% dos organismos testes (CE_{50}) realizada em no máximo 96 horas de exposição, e toxicidade crônica é a qual avalia os efeitos provocados por um agente estressor em tempo superior a 96 horas de

Este estudo avaliou os efeitos da toxicidade aguda por um período de 96 horas e toxicidade crônica em 168 horas de exposição. Foram avaliados os efeitos de redução do crescimento do caule das plântulas em relação à concentração de ureia empregada no meio de cultivo.

exposição (CENO/CEO) (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Os impactos provocados aos organismos vivos também são diferentes. Enquanto a toxicidade aguda refere-se a dose letal, geralmente uma concentração elevada, a toxicidade crônica é de concentração inferior e avalia os efeitos que podem estar relacionados à mutagenicidade, carcinogenicidade ou simplesmente à inibição do desenvolvimento do organismo teste. (GUARATINI & ZANONI, 2000).

Para cada cultura haverá sempre uma demanda de nutrientes própria da espécie que está sendo cultivada. Neste estudo, em que se verificou o desenvolvimento de duas hortaliças, foi observado que o CENO aparece em concentrações bastante distintas. Isto implica que em cada cultura deve ser utilizadas quantidades apropriadas de fertilizantes principalmente os que empregam ureia em sua formulação. A falta deste nutriente pode acarretar no baixo desenvolvimento da plântula e o excesso pode provocar impactos ambientais gravíssimos.

A decomposição da ureia leva à produção da amônia não ionizada (NH_3) que é a forma mais tóxica. Como a ureia é muito solúvel em água, pode ser lixiviada para o solo ou conduzida para reservatórios aquáticos deixando a água imprópria para o consumo, além de afetar toda biota aquática. A amônia pode interagir com o sistema nervoso de organismos vertebrados, como os peixes e contaminar os sedimentos representando um risco aos organismos bentônicos responsáveis pelas transformações de diversos compostos que passam pela coluna d'água (WUR, 2003; BACHMANN, 2004; KÄLLQVIST &

SVENSOM, 2003; BURGESS *et al.*, 2003).

Além disto, quando a ureia é descartada inadequadamente pode tornar as águas dos reservatórios excessivamente rica em nutrientes minerais e orgânicos eutrofizando o meio, provocando o crescimento desequilibrado de espécies vegetais aquáticas, com efeitos muito negativos para o ecossistema e para a qualidade da água, provocando a diminuição dos níveis de oxigênio e alterando os valores de pH podendo causar a morte da fauna e flora.

Por outro lado, quando em excesso no solo o nitrogênio orgânico é oxidado a NH_3 ou dióxido de nitrogênio pelas bactérias nitrificantes que são aeróbicas, gram-negativas e autotróficas (PELCZAR *et al.*, 1996). Os microrganismos responsáveis pela nitrificação são sensíveis aos pH baixos requerendo do meio valores entre 7,0 e 7,6 para atingirem crescimento ideal. Em solos ácidos, a população de Nitrossomonas e Nitrobacter é baixa e como a maioria do solo cultivável no Brasil apresenta acidez considerável a decomposição do nitrogênio orgânico pode ficar comprometida (CONEGLIAN, 2001).

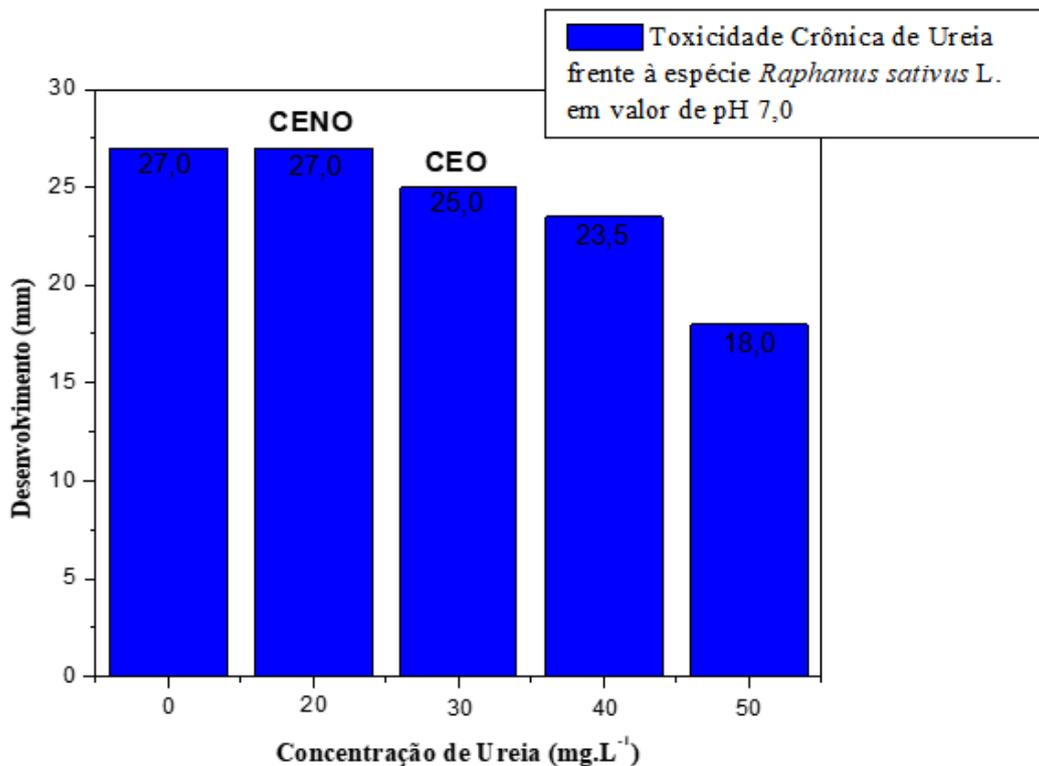


Figura 1 - Toxicidade Crônica de ureia frente ao rabanete em valor de pH 7,0. O CENO apresenta-se em 20,0 mg.L⁻¹ de agente estressor e o CEO em 30,0 mg.L⁻¹.

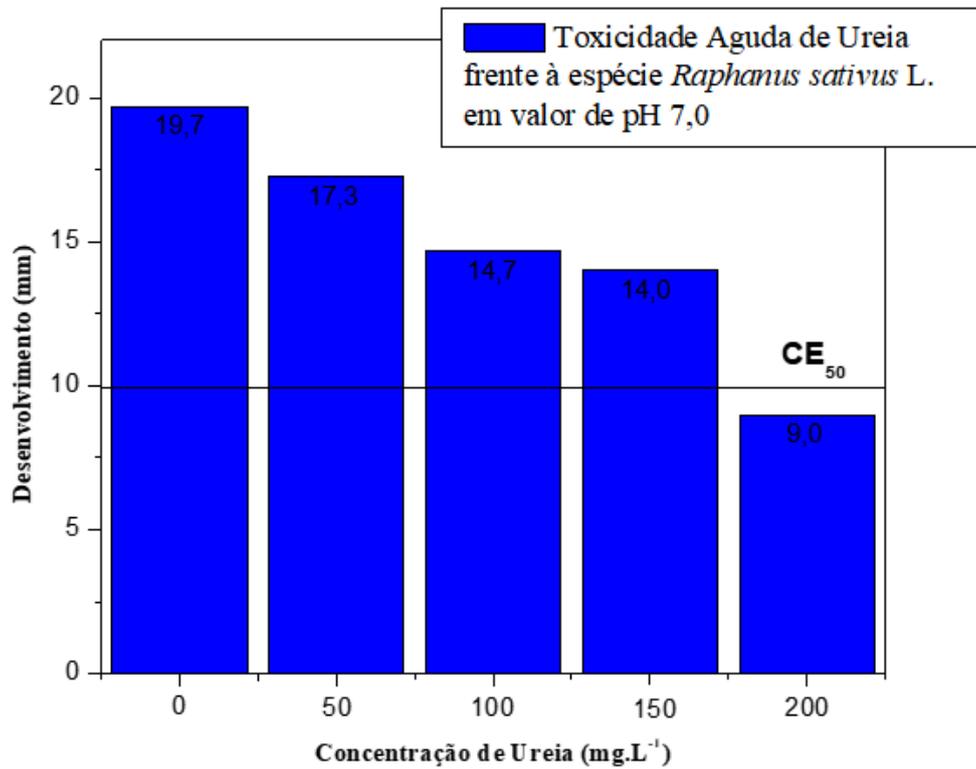


Figura 2 - Toxicidade Aguda de ureia frente ao rabanete em valor de pH 7,0. O CE₅₀ apresenta valor de aproximadamente 183,0 mg.L⁻¹, para um desenvolvimento de 9,8 mm.

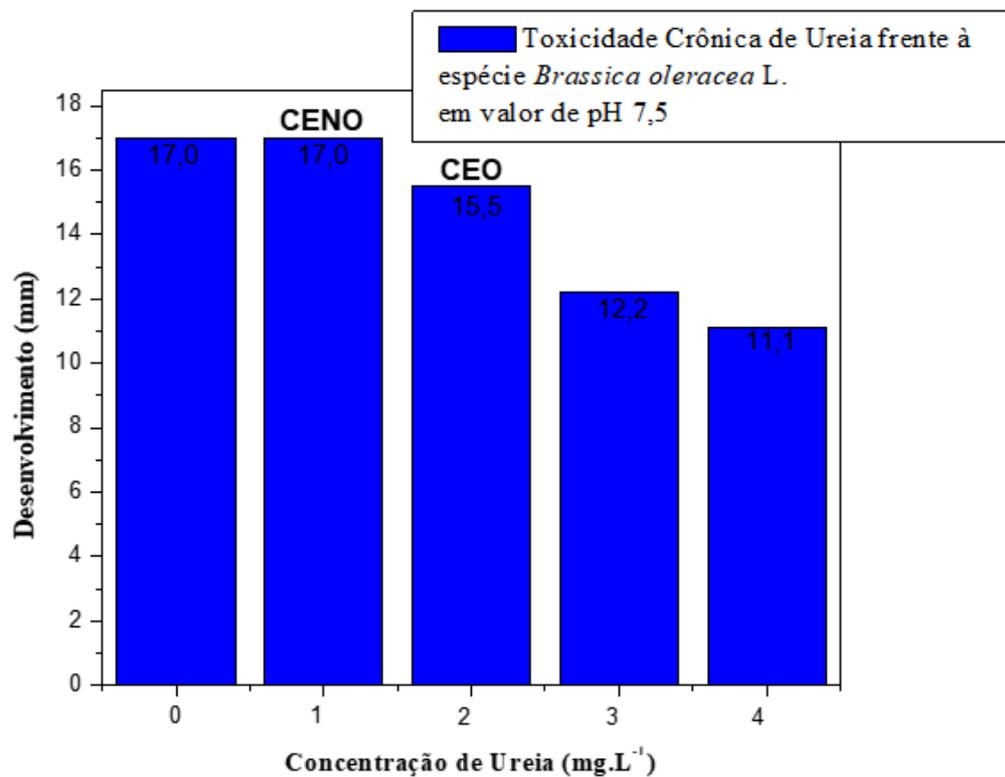


Figura 3 - Toxicidade Crônica de ureia frente à couve em valor de pH 7,5. O CENO apresenta-se em 1,0 mg.L⁻¹ de agente estressor e o CEO em 2,0 mg.L⁻¹.

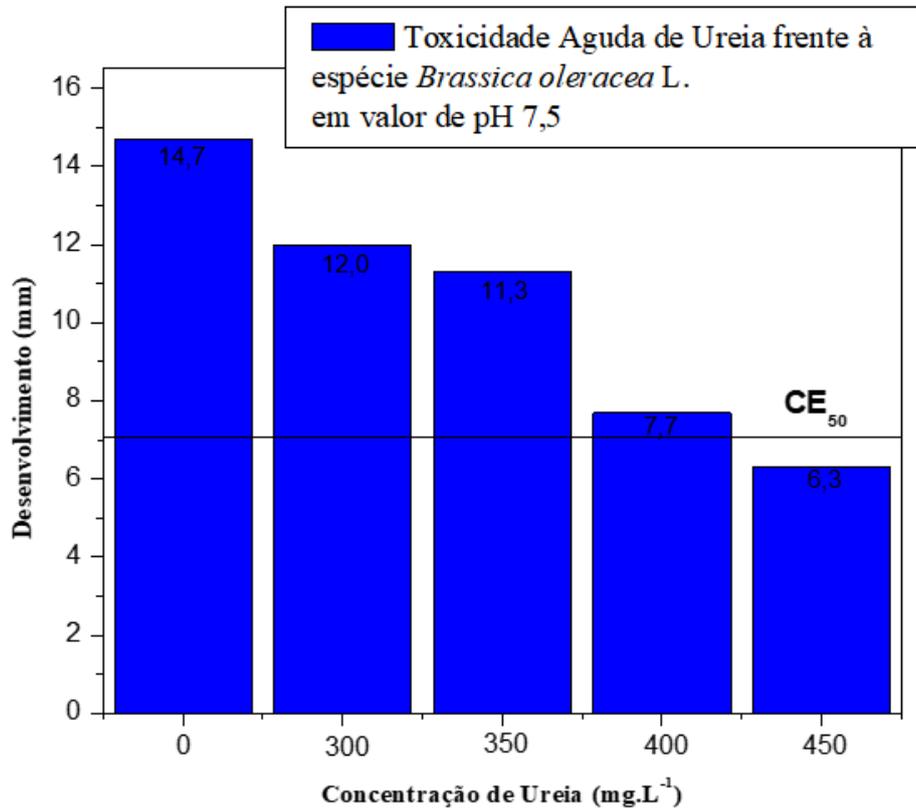


Figura 4 - Toxicidade Aguda de ureia frente à couve em valor de pH 7,5. O CE₅₀ apresenta valor de aproximadamente 418,0 mg.L⁻¹, para um desenvolvimento de 7,4 mm.

CONCLUSÕES

Por meio deste trabalho, é notável que para cada cultura haverá sempre uma demanda de nutrientes própria da espécie que está sendo cultivada. Conclui-se que a couve, pelo fato de ser a espécie mais sensível em tempo de análise prolongada, é

mais indicada para avaliações ambientais principalmente de estudo de nitrogênio orgânico. Destarte, o rabanete apresentou-se mais indicado para estudos de toxicidade aguda, já que reage mais rapidamente em concentrações menores.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi implementada a partir do Programa de Educação Tutorial - PET Licenciatura em Química (PET/MEC/SESu/DIFES), Centro de Ciências Agrárias (CCA) - Universidade

Federal de São Carlos (UFSCar). Os autores agradecem o suporte técnico e as bolsas cedidas pela CAPES por meio do Programa PET.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHMANN, C.; BRAISSANT, O.; VILLARD, A.; BOULAT, O.; HENRY, H.; Ammonia toxicity to the brain and creatine. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, p. S52-S57, 2004.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Coordenação Geral de Apoio Laboratorial. **Regras de Análise de Sementes**. Brasília, 399 p., 2009.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente (MMA). Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). **Resolução CONAMA Nº 357, de 17/03/2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BURGESS, R. M.; PELLETIER, M. C.; HO, K. T.; SERBST, J. R.; RYBA, S. A.; KUHN, A.; PERRON, M. M.; RACZELOWSKI, P.; CANTWELL, M. G.; Removal of ammonia toxicity in marine sediment TIEs: a comparison of *Ulva lactuca*, zeolite and aeration methods. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 607-618, 2003.

CONEGLIAN, C. M. R.; Diminuição da Concentração de Amônia de Efluente Industrial REPLAN/Petrobrás, 2001. 140 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas) - **Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista**, Rio Claro, 2001.

CONEGLIAN, C. M. R.; CONCEIÇÃO, D. M.; ANGELIS, F. D.; MARCONATO, C.; BIDÓIA, E.; Diminuição da concentração de amônia em efluente industrial de refinaria de petróleo. **Revista Salusvita**, Bauru, v. 21, n. 1, p. 35-42, 2002.

CONTIERI, G. A.; CHINI, M. A.; MARGARIDO, V. O.; PELEGRINI, R. T. Desenvolvimento de Técnica de Clonagem de Plantas por Processo de Estaquia *in vitro* Empregando Vitamina B1 como Regulador de Enraizamento. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, v. 12, n. 4, p. 383-393, 2018.

GUARATINI, C. C. I; ZANONI, M. V. B.; Corantes Têxteis. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.

KÄLLQVIST, T.; SVENSOM, A.; Assessment of ammonia toxicity in tests with the microalga, *Nephroselmis pyriformis*, Chlorophyta. **Water Research**, v. 37, p. 477-484, 2003.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, ALOYSIO, S. F. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. Microbiologia Aplicada: Conceitos e Aplicações. **Makron Books do Brasil Editora LTDA**, São Paulo - SP, v. 2, 1996.

PELEGRINI, R. P.; MEDINA, A. F.; MENDES, F.; MOLENA, J. C.; GREVE, L. F.; SALMAZO, L. G. S.; MILANI, P. A.; ANDRADE, P. G.; TOGNOLI, R. B. Metodología de evaluación ecotoxicológica empleando germinación de semillas en gel nutriente como medio de cultura. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, p. 359-372, 2014.

SEIZI, O. Fundamentos da Toxicologia. **Atheneu Editora**, São Paulo - SP, p. 3-7, 1996.

VIEIRA, R. F., Ciclo do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas. **Embrapa Meio Ambiente**, Distrito Federal- DF, 1ª ed., p. 16-18, 2017.

Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/175460/1/2017LV04.pdf>>.

Acesso em 29 de novembro de 2018.

WUR, W. A. Daily pH Cycle and Ammonia Toxicity. **World Aquaculture**, v. 34, n. 2, p. 20-21, 2003.