

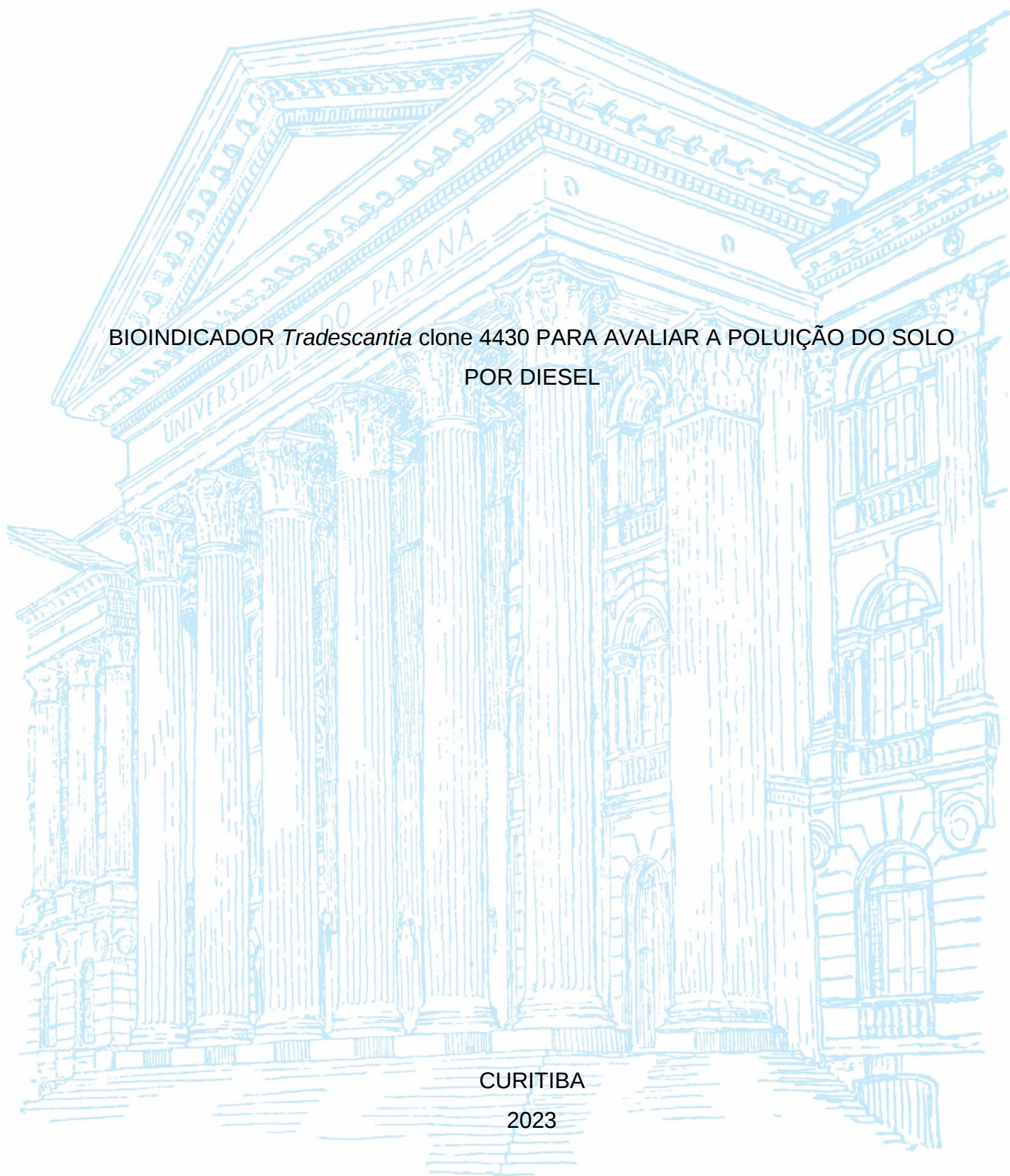
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BARBARA SANCHES ANTUNES GOELDNER

BIOINDICADOR *Tradescantia* clone 4430 PARA AVALIAR A POLUIÇÃO DO SOLO
POR DIESEL

CURITIBA

2023



BARBARA SANCHES ANTUNES GOELDNER

BIOINDICADOR *Tradescantia* clone 4430 PARA AVALIAR A POLUIÇÃO DO SOLO
POR DIESEL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Engenharia Ambiental, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Emílio Graciliano Ferreira
Mercuri

CURITIBA

2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE TECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

TERMO DE APROVAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BARBARA SANCHES ANTUNES GOELDNER

BIOINDICADOR *Tradescantia* clone 4430 PARA AVALIAR A POLUIÇÃO DO SOLO
POR DIESEL

Trabalho de Conclusão do Curso II, aprovado como requisito parcial para a obtenção do Diploma de Bacharel em Engenharia Ambiental no Curso de Graduação em Engenharia Ambiental do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, com **nota 93**, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:

Emílio Graciliano Ferreira Mercuri
Departamento de Engenharia Ambiental (UFPR)

Membro 1:

Isabela Galarda Varassin
Departamento de Botânica (UFPR)

Membro 2:

Leatrice Talita Rodrigues
Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (UFPR)

Curitiba, 6 de dezembro de 2023

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - EQUIPAMENTOS USADOS PARA A CONTAMINAÇÃO DO SOLO COM DIESEL (a) BACIA; (b) BALANÇA DIGITAL; (c) BALANÇA COMERCIAL; (d) BÉQUER; (e) MICROPIPETA.....	15
FIGURA 2 - PLANTAS NO DIA 13 DE OUTUBRO DE 2022.....	15
FIGURA 3 – PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA 31/10/2022	18
FIGURA 4 - PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG DIA 17/11/2022 I.....	18
FIGURA 5 – PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA 17/11/2022 II.....	19
FIGURA 6 – PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA 03/12/2022	19
FIGURA 7 - QUADRANTES DE CAPTURA DE IMAGEM.....	20
FIGURA 8 - QUADRANTES (a) 1a; (b) 1b; (c) 2a; (d) 2b; (e) 3a; (f) 3b; (g) 4a; (h) 4b	21
FIGURA 9 - CONTAGEM VISUAL DAS CÉLULAS	22
FIGURA 10 - ALTERAÇÕES NOS PELOS ESTAMINAIS (A) E (B) CÉLULAS ANÃS; (C), (D) E (E) PELOS RAMIFICADOS; (F) CÉLULA ATROFIADA; (G), (H) E (I) CÉLULAS GIGANTES; (H) E (I) CÉLULAS INCOLORES ...	26
FIGURA 11 – GRÁFICOS DAS MÉDIAS DE MUTAÇÕES POR CONCENTRAÇÃO COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%.....	27
FIGURA 12 - VERIFICAÇÃO DE NORMALIDADE DO RESÍDUOS.....	27
FIGURA 13 - BIBLIOTECAS IMPORTADAS.....	29
FIGURA 14 - IMPORTAÇÃO ARQUIVO CSV	29
FIGURA 15 - ENCONTRANDO IMAGENS DO ARQUIVO CSV.....	30
FIGURA 16 - CRIAÇÃO DA MÁSCARA.....	31
FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DO FUNDO	32
FIGURA 18 - REMOÇÃO DE RUÍDOS	32
FIGURA 19 - MÁSCARA.....	33
FIGURA 20 - IMAGEM RGB SEM O FUNDO	33
FIGURA 21 - CONTAGEM DE PIXELS.....	34

FIGURA 22 - IMPRESSÃO DOS RESULTADOS.....	35
FIGURA 23 - AMOSTRAS COR ROSA E AZUL	36
FIGURA 24 -COR DO LIMITE INFERIOR DA MÁSCARA.....	37
FIGURA 25 -GRÁFICO FRAÇÃO DE CÉLULAS ROSAS POR AZUIS E FRAÇÃO DE PIXELS ROSAS POR AZUIS	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE DIESEL POR VASO	14
TABELA 2 – DATA DE COLETA E ANÁLISES REALIZADAS	18
TABELA 3 - VALORES DE INTERPRETAÇÃO PARA COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO	23
TABELA 4 - DATA DE COLETA E QUANTIDADE DE MUTAÇÕES OBSERVADAS	24
TABELA 5 - TESTE DE TUKEY	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 OBJETIVOS.....	9
1.1.1 Objetivo geral	9
1.1.2 Objetivo específico	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3 METODOLOGIA.....	14
3.1 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO.....	14
3.2 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS APÓS A CONCLUSÃO DO TRABALHO	
16	
3.3 ANÁLISE DOS ESTAMES E CAPTURA DE IMAGEM.....	17
3.4 IMAGENS PARA O BANCO DE DADOS	20
3.5 CONTAGEM DAS CÉLULAS	22
3.6 CORRELAÇÃO DE PEARSON.....	22
4 RESULTADOS E ANÁLISES DE DADOS.....	24
4.1 QUANTIDADE DE MUTAÇÕES.....	24
4.2 RELAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE DIESEL	26
4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA PARA IDENTIFICAÇÃO	
AUTOMÁTICA DAS CÉLULAS ROSAS.....	28
4.3.1 DESENVOLVIMENTO DO CÓDIGO PARA CONTAGEM DAS CÉLULAS.....	29
4.3.2 ESPAÇO DE CORES RGB	35
4.3.3 BIBLIOTECA OPENCV	36
4.3.4 ANÁLISE CONTAGEM AUTOMÁTICA	37
5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do solo com produtos derivados de petróleo é um problema geralmente causado por rompimento de oleodutos, vazamentos em poços e tanques de armazenamento subterrâneo, acidentes rodoferroviários ou em atividades não controladas em aterros. Combustíveis automotivos, como diesel e gasolina, são misturas tóxicas, que quando entram em contato com o solo trazem um grande risco ambiental, podendo contaminar outras áreas, com a liberação de gases para a atmosfera ou contaminação de corpos hídricos (ROMERO; MONTERROSO, 2015).

Poluir o solo com substâncias derivadas do petróleo traz um efeito negativo tanto nas propriedades químicas quanto nas propriedades físicas e biológicas do mesmo. A poluição no solo também pode causar danos aos organismos que estão expostos indiretamente a esses poluentes (GOSPODAREK; RUSIN, 2020).

O solo é o ecossistema natural mais heterogêneo capaz de acumular poluentes tóxicos, com efeito direto e permanente nas plantas terrestres, microorganismos do solo e invertebrados (CESNIENE *et al.*, 2014). Ações do homem que mexam com a diversidade genética de organismos ou mudem a microbiota do solo podem contribuir para a alteração da qualidade do solo (PEREIRA *et al.*, 2014).

O risco associado a um evento de contaminação do solo por algum tipo de combustível, geralmente é avaliado determinando a concentração de seus compostos. Uma área que vem ganhando espaço na análise de contaminação do solo são os bioensaios, que podem avaliar a toxicidade de misturas complexas. Para isso plantas podem ser usadas como bioindicadores de contaminação do solo, já que elas podem indicar mutações observáveis quando plantadas em solos contaminados (ROMERO; MONTERROSO, 2015).

A qualidade do solo pode ser comprometida a partir de mudanças em suas características, para verificar essas mudanças são usados indicadores, que são capazes de mostrar a condição ambiental do solo (SANTOS; MAIA, 2013). Entre os indicadores existentes há os bioindicadores, que são propriedades ou processos biológicos que determinam a condição do solo (ARAÚJO; MONTEIRO, 2007), com a capacidade de responder rapidamente às mudanças no solo (SANTOS; MAIA, 2013).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho é avaliar a influência de cinco diferentes concentrações de diesel misturadas no solo, na toxicidade do bioindicador *Tradescantia* clone 4430.

1.1.2 Objetivo específico

Este trabalho tem como objetivo específico criar um banco de dados de imagens capturadas pelo microscópio Nikon Modelo Eclipse E200MV R, pelo bioensaio Trad-SHM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Green *et al.* (1996) trazem um estudo sobre a fitotoxicidade versus a mutagenicidade do diesel, para isso a *Tradescantia* clone foi escolhida para o teste, devido a sua sensibilidade para detectar mutagênicos pelo teste de micronúcleo. Os experimentos de Yakovleva *et al.* (2011) e Cesniene *et al.* (2010), também são realizados com a *Tradescantia*.

O experimento de Green *et al.* (1996) foi realizado em estufa, onde as plantas foram colocadas em vasos e regadas diariamente. Para o acompanhamento dos efeitos relacionados à contaminação, foram feitos 5 testes com 0, 0.1, 1.0, 10.0 e 100.0 microgramas de diesel por quilograma de solo.

Após a primeira semana do plantio foi observado que para todas as concentrações houve algum tipo de mudança nas plantas, porém as plantas da concentração de 100.0 µg/ kg não apresentavam nenhuma flor ou botão. Na segunda semana para as concentrações mais baixas havia quantidades semelhantes de flores e botões, exceto para concentração de 100.0 µg/ kg e algumas plantas de concentrações menores já demonstravam recuperação. Após a terceira semana nas plantas para a concentração de 100.0 µg/ kg começaram a surgir os primeiros botões e na quarta semana surgiram novas mudas, flores e botões, demonstrando que esse grupo de plantas começava a se recuperar.

No trabalho de Yakovleva *et al.* (2011) é visto as respostas da *Tradescantia* (clone 02) a diferentes concentrações de benzo(a)pireno no solo, mostrando a frequência de mutações morfológicas da flor e dos pelos estaminais e as mutações fisiológicas nas células dos pelos estaminais. O benzo(a)pireno foi misturado ao solo em quatro concentrações diferentes, 10, 20, 30 e 40 nanogramas por grama de solo, além do vaso de controle que não continha benzo(a)pireno. As flores brotaram do dia 4 até o dia 50 depois da contaminação e os pelos estaminais foram analisados em microscópio diariamente.

Cesniene *et al.* (2010) usaram a *Tradescantia* clone 4430 para estudar a genotoxicidade em solos de territórios urbanos e militares da Lituânia, a partir do teste de micronúcleo e do teste de pelos estaminais, outro teste realizado foi o de pelo estaminal ramificado. Em cada território militar duas amostras de solos em diferentes regiões foram coletadas, para essas mesmas amostras de solo, em uma publicação anterior, foi determinada a concentração de 28 metais.

No experimento as plantas foram mantidas em estufa, elas ficaram de molho em água da torneira por 24 horas, depois foram tratadas por 6 horas nas amostras de solo. O tempo de recuperação para as amostras foi de 24 horas, para que ocorresse a formação de micronúcleos e mutações rosa nos pelos estaminais. Após a exposição as inflorescências foram deixadas durante 24 horas em uma solução de 1:3 de Carnoy e depois transferidas para etanol 70%.

O teste de micronúcleo foi usado nos experimentos de Green *et al.* (1996) e Cesniene *et al.* (2010). Para Green *et al.* (1996) o teste de micronúcleo não mostrou efeitos para nenhuma das concentrações. Como o estudo da fitotoxicidade foi o único que apresentou algum tipo de resultado, foi realizado um experimento alternativo, colocando as plantas sob mais iluminação natural. Nove dias após a exposição ao diesel, nas mesmas concentrações do experimento anterior, 10 de 15 plantas morreram, devido ao estresse do transplante. O grupo de 100.0 µg/ kg foi o único grupo que demonstrou algum tipo de mudança, como pontas murchas.

No estudo de Cesniene *et al.* (2010), para as amostras de solo mais genotóxicas, vindas de uma base de aviação a qual era muito usada na época soviética, o teste de micronúcleo foi capaz de mostrar um alto efeito clastogênico. Esse teste também mostrou efeito clastogênico em outras amostras de solo, como a amostrada de um campo de tiro.

A alta genotoxicidade da amostra do campo de tiro também pode ser observada através de mutações rosas nos pelos estaminais, o teste de pelo estaminal ramificado também apresentou mutagenicidade nessa amostra. O teste pelo estaminal ramificado foi bem sucedido para as amostras de solo da base especial de Kazlu, uma maior frequência de pelos estaminais ramificados foi encontrada em uma amostra de solo que foi tratada com um extrato aquoso vindo de uma floresta localizada perto de um aeroporto. Para uma outra amostra tratada com um extrato aquoso de um campo minado também foram identificados pelos ramificados.

As amostras de solo vindas de áreas urbanas, também apresentaram níveis de genotoxicidade através dos testes de micronúcleo e de pelos estaminais. Em uma amostra coletada onde havia casas construídas no final do século XVIII e sem grandes empresas, os testes que avaliam o pelo estaminal e o micronúcleo mostraram uma genotoxicidade significativa, porém para o teste de pelo estaminal ramificado houve uma baixa frequência de pelos ramificados. Uma amostra de solo

foi retirada da avenida Savanoriu, uma avenida que tinha um intenso tráfego de veículos, muitas fábricas e duas centrais hidrelétricas alimentadas a gás. Com o teste de pelo estaminal foi descoberto que nessa amostra continham produtos genotóxicos, a especificidade desses poluentes só foi descoberta depois com outros tipos de testes.

Na amostra de controle, coletada no jardim botânico da Universidade de Vilnius, os testes de pelo estaminal, micronúcleo e pelo estaminal ramificado demonstraram uma baixa frequência, indicando que havia uma contaminação por metais pesados, mesmo que leve. Com outros testes realizados depois foi confirmado a presença de metais e vale ressaltar que essa amostra era considerada sem contaminação.

O teste de pelos estaminais usado por Cesniene *et al.* (2010), também foi usado no experimento de Yakovleva *et al.* (2011). Durante as análises de Yakovleva *et al.* (2011) foram notadas mudanças de coloração de azul para rosa, que é um indicador dos efeitos mutagênicos do benzo(a)pireno sobre a planta. A frequência dessa mudança de coloração é o indicador mais sensível para observar a reação da planta ao estresse sofrido e essa frequência foi maior nas concentrações de 20 ng/ g e 40 ng/ g. Após um mês e meio do cultivo, as plantas foram cortadas para que fosse calculado a biomassa total da planta, das raízes e das folhas. A biomassa teve o pico de crescimento para as contaminações de 20 ng/ g e 30 ng/ g.

Outras mutações morfológicas também foram observadas, como o número de células gigantes e anãs, a ramificação nos pelos estaminais, eventos de mutação branca e inibição da divisão celular. Durante o experimento foram observadas mutações morfológicas nas plantas para as diferentes concentrações de benzo(a)pireno, notou-se que a frequência de mutações crescia com o aumento da concentração de benzo(a)pireno, assim como as mutações morfológicas nos pelos estaminais da *Tradescantia* (clone 02).

Os testes de micronúcleo e de pelo estaminal são os mais recorrentes na literatura. O teste de micronúcleo examina os grãos de pólen e analisa a formação de micronúcleos em alteração meiótica (MA, 1982 *apud* RODRIGUES, 2021), ele observa a frequência da formação de micronúcleos a partir da quebra cromossômica em células-mãe de grãos de pólen em fase inicial de meiose, quando expostas a contaminação. Esse teste também pode ser denominado como Trad-MCN (MA, 1979 *apud* RODRIGUES, 2021).

O teste da mutação no estaminal (Trad – SHM), usado por Cesniene *et al.* (2010) e Yakovleva *et al.* (2011), analisa as células mitóticas dos pelos estaminais das flores da *Tradescantia*. O teste se baseia no fato de que essas células são heterozigotas para a cor da flor, com o marcador visível sendo a alteração fenotípica da cor azul (dominante) para a rosa (recessiva). Grande parte das mutações no alelo azul produzirá uma célula rosa recessiva entre as células azuis, uma mutação rosa que acontece neste momento pode continuar a se dividir e gerar uma série contínua de células rosas (MA *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.* 1997).

A mudança fenotípica na coloração de azul para rosa, na pétala ou no pelo estaminal, tem sido usada como um marcador genético, pressupondo que as células das pétalas e dos pelos estaminais são heterozigotas para a cor azul, e que se o alelo dominante para a cor azul sofrer mutação ou for perdido o alelo recessivo determina que as células filhas serão rosas (SPARROW *et al.*, 1974; EMMERLING-THOMPSON e NAWROCKY, 1980).

Emmerling-Thompson e Nawrocky (1980) estudaram a herança da pigmentação rosa nas células das pétalas e dos pelos estaminais da *Tradescantia* clone 4430 em cruzamentos do clone 4430 com o seu clone parente 2241, de flores cor de rosa, e em cruzamento com plantas irmãs. Os resultados desses cruzamentos são condizentes com a hipótese de que a cor rosa é determinada por um par de alelos, e que a cor azul é dominante ao rosa.

A base genética para as alterações fenotípicas da cor das células de azul para rosa na *Tradescantia* clone 02 já foi estabelecida, porém o seu mecanismo ainda não foi explicado adequadamente (MERICLE e MERICLE, 1971; SPARROW *et al.*, 1971; UNDERBRINK *et al.*, 1973 *apud* SPARROW *et al.*, 1974). A base genética para as alterações fenotípicas pode estar associada a quebra de cromossomos, mutação de genes, não-disjunção cromossômica ou cruzamento somático (SPARROW *et al.*, 1974).

Com o teste Trad-SHM, também podem ser observadas outros tipos de alterações nos pelos estaminais, como células de tamanhos diferentes, células duplas ou triplas, bifurcação e anomalias de crescimento (SPARROW e SCHAIRER, 1971; MAZIVIERO, 2011 *apud* RODRIGUES, 2021).

Neste trabalho é adotada a hipótese de que a mudança fenotípica da cor azul para rosa, nas células dos pelos estaminais da *Tradescantia* clone 4430 é um marcador genético.

3 METODOLOGIA

3.1 DESCRIÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento teve início no dia 13 de outubro de 2022, neste dia foram montados os recipientes com a plantas *Tradescantia* clone 4430 com diferentes concentrações de diesel. Foram usados 5 recipientes de 20 centímetros de diâmetro, que já estavam com terra e a *Tradescantia* clone 4430 plantada, em cada recipiente continha 1,6 kg de terra. Os valores escolhidos para as concentrações de diesel foram determinados com base nos valores usados no artigo de Green *et al.* (1996). Os valores para as concentrações de diesel adicionadas em cada recipiente são mostrados na tabela 1.

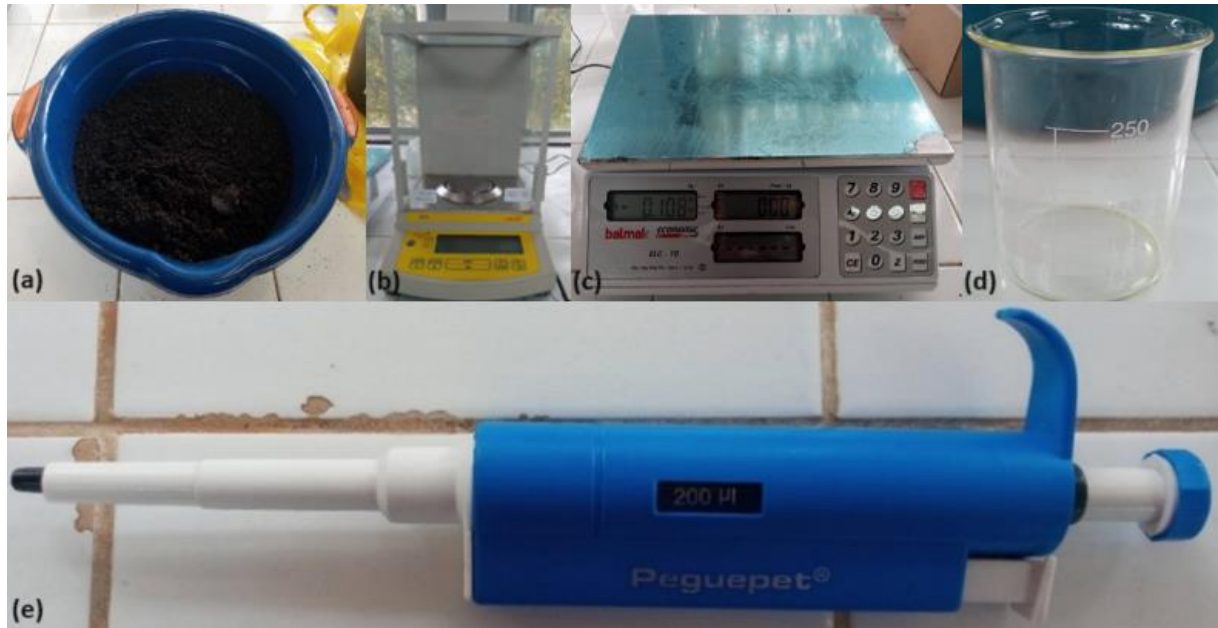
TABELA 1 - CONCENTRAÇÃO DE DIESEL POR VASO

Vaso	Diesel (mg)
0	0
1	160
2	1600
3	16000
4	160000

FONTE: A autora (2022)

Para adicionar o diesel na terra, a planta foi retirada do recipiente e a terra foi transferida para uma bacia, para então ser adicionado o diesel. Para as concentrações de 160 mg de diesel e 1600 mg de diesel, o diesel foi adicionado à terra com o auxílio de uma micropipeta de alta precisão Paguepet, para a concentração de 16000 mg de diesel, o diesel foi pesado em uma balança digital para massas de unidades menores e para concentração de 160000 mg de diesel, o diesel foi pesado em uma balança digital comercial, para a pesagem do diesel na balança foi usado um béquer, os materiais utilizados são mostrados na figura 1.

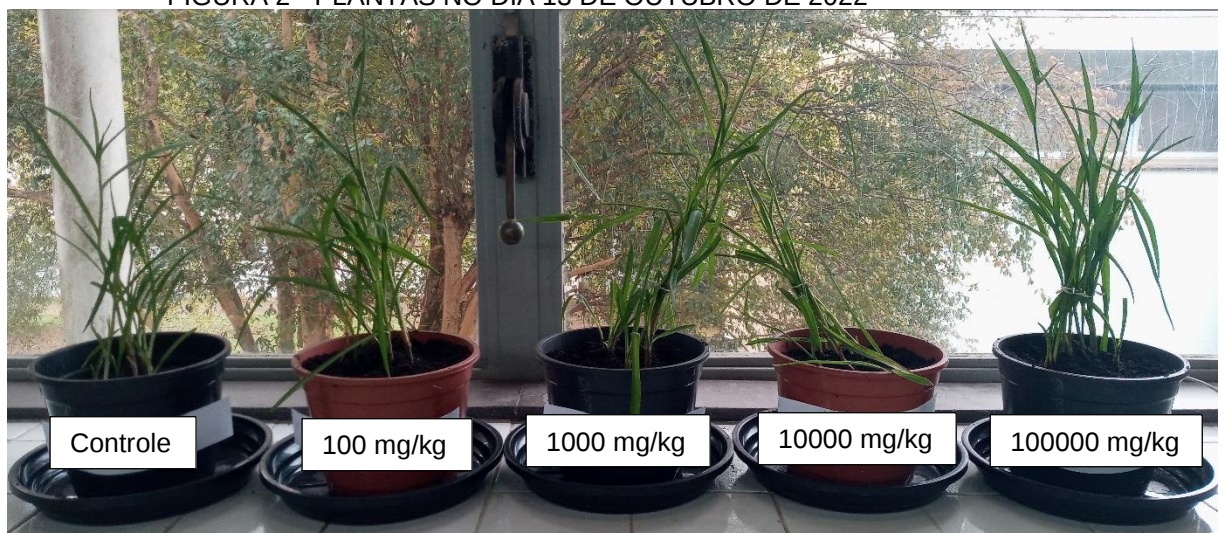
FIGURA 1 - EQUIPAMENTOS USADOS PARA A CONTAMINAÇÃO DO SOLO COM DIESEL (a) BACIA; (b) BALANÇA DIGITAL; (c) BALANÇA COMERCIAL; (d) BÉQUER; (e) MICROPIPETA



FONTE: A autora (2022)

Depois de adicionado o diesel a terra, esta foi misturada para que o diesel se espalhasse da maneira mais uniforme possível, em seguida a terra foi devolvida ao recipiente e a *Tradescantia* clone 4430 plantada novamente. Após isso, todos os recipientes foram regados com água e acondicionados em um balcão em frente a uma janela (FIGURA 2), no laboratório de Engenharia Ambiental no Centro Politécnico, para terem a mesma incidência de radiação solar.

FIGURA 2 - PLANTAS NO DIA 13 DE OUTUBRO DE 2022



FONTE: A autora (2022)

3.2 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS APÓS A CONCLUSÃO DO TRABALHO

Concluído o trabalho os resíduos contaminados foram destinados para a empresa Geoquímica, localizada na cidade de São José dos Pinhais. A Geoquímica possui uma central de armazenamento e classificação que faz o preparo, trituração e blendagem para coprocessamento dos resíduos sólidos.

3.3 ANÁLISE DOS ESTAMES E CAPTURA DE IMAGEM

O teste escolhido para avaliar a reação das plantas de *Tradescantia* clone 4430 as diferentes concentrações de diesel foi o bioensaio Trad-SHM, seguindo os mesmos processos de Rodrigues (2021).

As flores da *Tradescantia* sp. clone 4430 começaram a ser coletadas para análise a partir do dia 03 de novembro de 2022, três semanas após o início do experimento, as coletas realizadas são mostradas na tabela 2. No dia 31 de outubro de 2022 a planta no vaso de concentração de 100000 mg/ kg começou a murchar e apresentar folhas e caules amarelados (FIGURA 3), no dia 17 de novembro de 2022 a planta já estava completamente murcha predominantemente da cor marrom e com as folhas um pouco oleosas (FIGURA 4 e FIGURA 5), no dia 03 de dezembro de 2022 a planta já estava seca (FIGURA 6). Logo para a concentração de 100000 mg/ kg não foi possível coletar nenhuma flor.

Para retirar as flores foi cortado o pedúnculo e, logo após, as flores eram acondicionadas em recipientes plásticos devidamente identificados com a concentração de diesel do vaso onde a planta se encontrava. Após esse processo as flores eram levadas para o Laboratório de Ecologia e Conservação - LEC.

TABELA 2 – DATA DE COLETA E ANÁLISES REALIZADAS

Data da análise	Concentração				
	Controle	100 mg/ kg	1 000 mg/ kg	10 000 mg/Kg	100 000 mg/ kg
03/11/2022	1		1	1	
11/11/2022			1		
17/11/2022				2	
18/11/2022		1		2	
29/11/2022			1		
01/12/2022	1	1	1		
02/12/2022	1	1	1		
08/12/2022		1		1	
09/12/2022	2		1		
13/12/2022	1			1	
20/12/2022				1	
05/01/2023		2			
10/01/2023	1		1		
12/01/2023		1			
17/01/2023			1		
02/02/2023			1		
06/02/2023			1		
10/02/2023			1		
17/03/2023			1		
27/04/2023				1	
02/05/2023				1	
11/05/2023			1		
TOTAL	7	7	13	10	0

FONTE: A autora (2023)

FIGURA 3 – PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA 31/10/2022



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 4 - PLANTA NO VASO DE CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG DIA 17/11/2022 I



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 5 – PLANTA NO VASO DE
CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA
17/11/2022 II



Fonte: A autora (2022)

FIGURA 6 – PLANTA NO VASO DE
CONCENTRAÇÃO 100000 MG/KG, DIA
03/12/2022

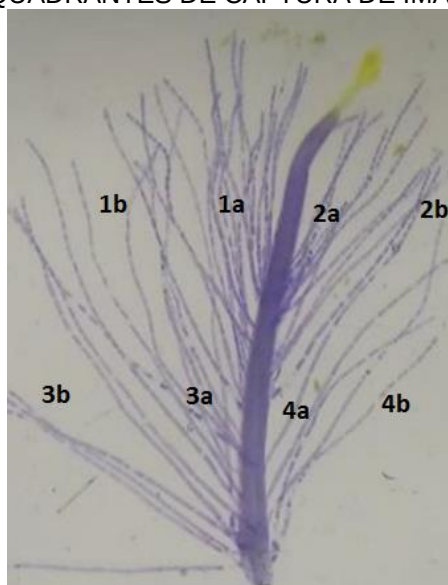


Fonte: A autora (2022)

No laboratório foi realizado o processo de análise dos estames e captura de imagens, primeiro foram montadas as lâminas para análises, para isso foram retirados os estames da flor com o auxílio de uma pinça, o estame então era colocado sobre a lâmina e pingado uma solução de 1:1 de álcool 70% e glicerina. Com o auxílio da lupa, de uma agulha e de uma pinça, os pelos estaminais foram separados para melhor visualização no microscópio.

Em seguida, as lâminas foram analisadas no microscópio óptico e realizada as capturas de imagens com o auxílio do software ToupView. As capturas de imagens foram feitas em quadrantes, como mostrado na figura 7, e para identificação das imagens foi usado o padrão de nomeação F-EAAAAMDDCCCCCCCQQ. O dígito F é número da flor coletada, pois em um mesmo dia ocorreu a análise de duas flores da mesma concentração, E é o estame analisado, já que em cada flor contém seis estames. Os quatro dígitos AAAA são para o ano, MM os dois dígitos para o mês, DD os dois dígitos para o dia, formando a data de análise. Os dígitos CCCCCC são referentes a concentração de diesel no vaso e QQ refere-se ao quadrante da imagem.

FIGURA 7 - QUADRANTES DE CAPTURA DE IMAGEM



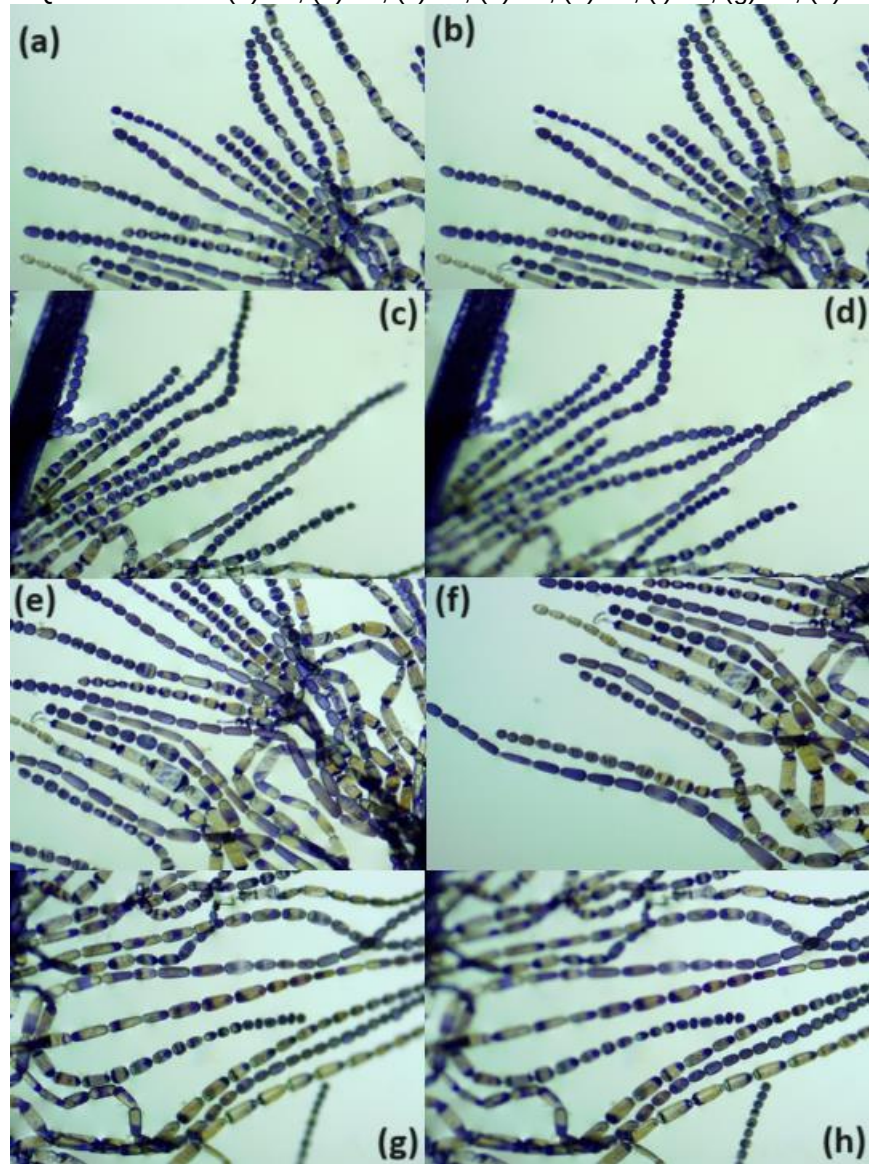
FONTE: Adaptado de Rodrigues (2021)

No dia 08 de dezembro de 2022 foi observado que as plantas estavam com uma infestação de pulgões, em algumas plantas foi observado folhas amareladas, murchas e com pontas secas, alguns botões das flores também secaram. Como processo de eliminação da praga, no dia seguinte, foi borrifado em todas as plantas uma mistura de água com sabão em pó, na proporção de 10 gramas de sabão em pó para 1 litro de água. No dia 13 de dezembro de 2022 a quantidade de pulgões nas plantas era bem menor do que a observada nos dias anteriores, novamente foi borrifada a mistura, apenas nas folhas que ainda estavam com pulgões. No dia 15 de dezembro de 2022 já não havia mais pulgões. Dia 05 de janeiro de 2023 houve novamente o aparecimento de pulgões, onde foi utilizada a mesma mistura para a eliminação do inseto.

3.4 IMAGENS PARA O BANCO DE DADOS

O banco de dados está sendo formado em uma pasta na plataforma de armazenamento em nuvem Google Drive. As imagens são capturadas com o software ToupView, nomeadas conforme descrito na seção 3.3 e em seguida é feito o upload na pasta do Google Drive. A seguir (FIGURA 8) um exemplo de captura de imagens de um estame retirado da flor do vaso com concentração de 1000 mg/ kg no dia 03 de novembro de 2022. Cada imagens mostra como foram feitas as imagens por quadrantes do item 3.3.

FIGURA 8 - QUADRANTES (a) 1a; (b) 1b; (c) 2a; (d) 2b; (e) 3a; (f) 3b; (g) 4a; (h) 4b

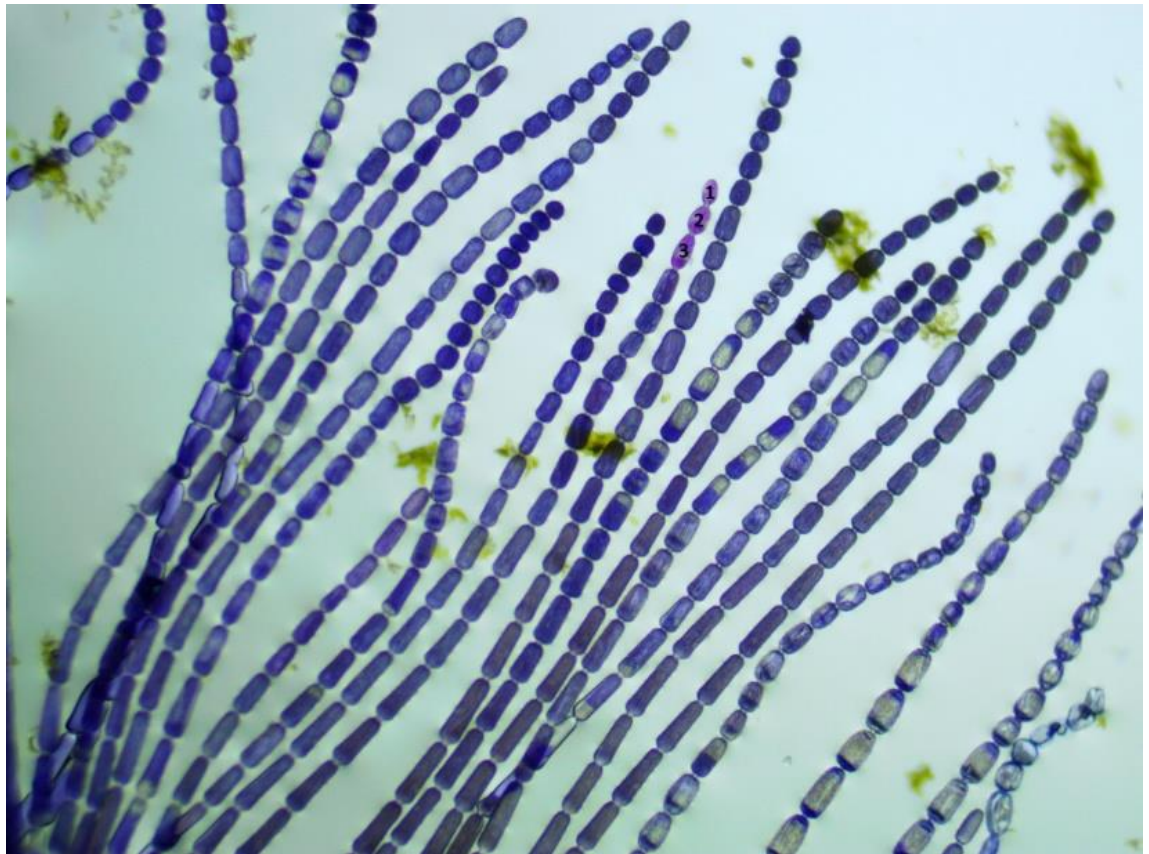


FONTE: A autora (2023)

3.5 CONTAGEM DAS CÉLULAS

A contagem das células foi feita de forma visual, onde foram contadas cada célula que continha presente a pigmentação azul e cada célula com pigmentação rosa, como na figura 9 que tem 3 células rosas e 367 células azuis. Esta forma de contagem foi feita para todas as imagens que visualmente apresentaram células com a cor rosa.

FIGURA 9 - CONTAGEM VISUAL DAS CÉLULAS



Fonte: A autora (2023)

3.6 CORRELAÇÃO DE PEARSON

Em seu artigo Schober *et al.* (2018) explicam que a correlação é um teste estatístico que associa duas variáveis de forma monotônica, onde à medida que o valor de uma variável aumenta o mesmo ocorre com a outra ou à medida que o valor de uma aumenta o da outra diminui. Quando os dados estão correlacionados a mudança na magnitude de uma variável está associada a mudança da magnitude da outra, sendo ela positiva, associada a valores maiores, ou negativa, associada a

valores menores. O coeficiente de correlação de Pearson é uma medida adimensional que varia de -1 a $+1$.

Para a interpretação do valor do coeficiente, eles sugerem que o valor deve ser visto como uma medida de força relacionado ao contexto em que está inserido, a quantidade de valores avaliados também deve ser considerada, já que uma quantidade maior de valores terá uma correlação mais elevada do que uma quantidade menor. A tabela 3 traz os valores de uma interpretação convencional do coeficiente de correlação, esta tabela serviu como base para interpretações de coeficientes de correlação de Pearson encontrados neste trabalho.

TABELA 3 - VALORES DE INTERPRETAÇÃO PARA COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO

Table. Example of a Conventional Approach to Interpreting a Correlation Coefficient	
Absolute Magnitude of the Observed Correlation Coefficient	Interpretation
0.00–0.10	Negligible correlation
0.10–0.39	Weak correlation
0.40–0.69	Moderate correlation
0.70–0.89	Strong correlation
0.90–1.00	Very strong correlation

FONTE: Schober *et al* (2018)

4 RESULTADOS E ANÁLISES DE DADOS

4.1 QUANTIDADE DE MUTAÇÕES

A coleta das flores foi feita à medida que as mesmas iam nascendo, logo a quantidade de análise dos pelos estaminais não é igual para as diferentes concentrações de diesel. A tabela 4 mostra a data das análises e a quantidade de mutação para cada concentração de diesel. As análises tiveram início no dia 03 de novembro de 2022 e a última análise feita foi no dia 11 de maio de 2023.

TABELA 4 - DATA DE COLETA E QUANTIDADE DE MUTAÇÕES OBSERVADAS					
Data da análise	Concentração				
	Controle	100 mg/ kg	1 000 mg/ kg	10 000 mg/Kg	100 000 mg/ kg
03/11/2022			10	6	
11/11/2022			4		
17/11/2022				9	
18/11/2022				3	
29/11/2022			10		
01/12/2022		3	4		
02/12/2022	2	12			
08/12/2022		1			
09/12/2022					
13/12/2022					
20/12/2022				8	
05/01/2023		7			
10/01/2023			5		
12/01/2023		1			
17/01/2023					
02/02/2023					
06/02/2023					
10/02/2023					
17/03/2023					
27/04/2023				1	
02/05/2023					
11/05/2023					
TOTAL	2	24	33	27	0

Fonte: A autora (2023)

Observando os dados da tabela 4 nota-se que a quantidade de mutações em cada concentração foi próxima. A maior quantidade de mutações para as 3 concentrações foi no primeiro mês de análise, cerca de 70 % do total de mutações.

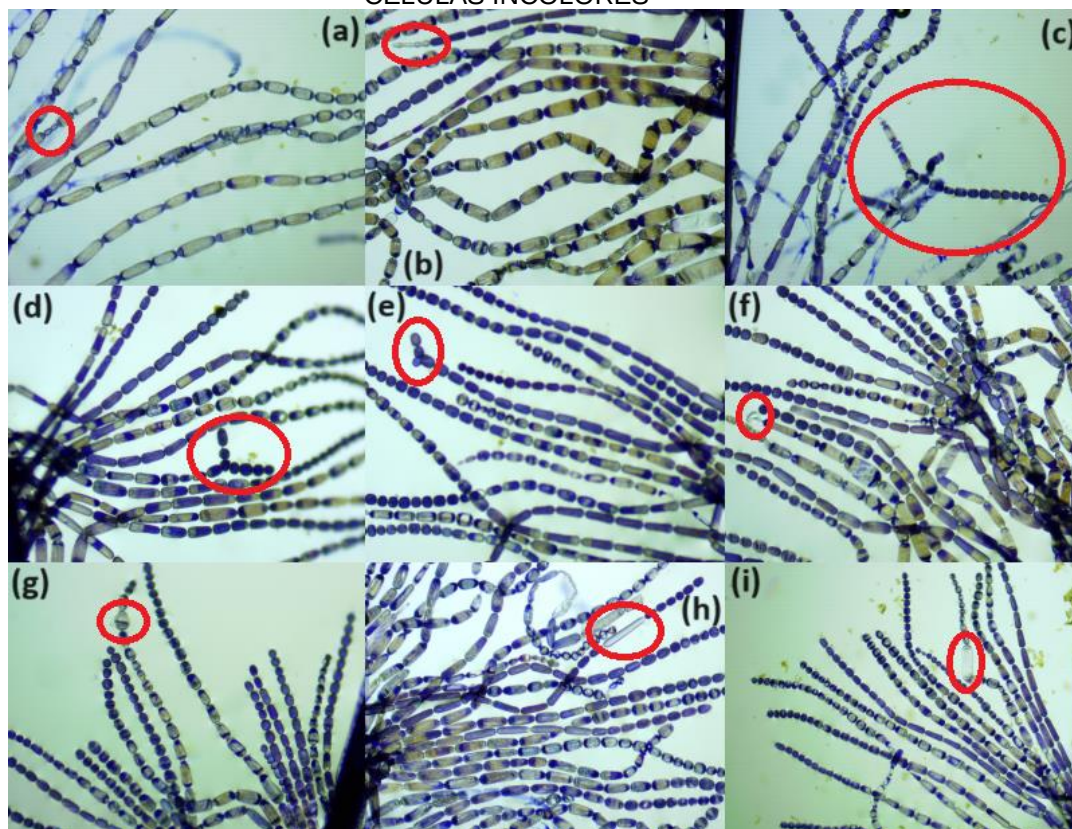
A partir da metade de janeiro de 2023 quase não houve a ocorrência de mutações, apesar de ainda nascerem flores nas plantas. Isso pode acontecer pelo fato das plantas terem começado a se recuperar da contaminação, foi observado durante as análises que em março de 2023 as plantas que foram contaminadas começaram a morrer e novas mudas começaram a surgir, um sinal de que elas possam ter se recuperado como em Green *et al.* (1996).

Em dezembro de 2022 as células dos pelos estaminais das flores da planta de controle apresentaram duas mutações, o que pode ser considerado uma exceção. Essas mutações podem ser consideradas resultado de uma mutação espontânea que acontece mesmo que o ambiente de estudo não esteja contaminado (XIAO *et al.*, 1998; CHRISTIANSON, 1975).

Além da mudança de cor das células dos pelos estaminais outras alterações nos pelos estaminais foram observadas durante as análises. Segundo Underbrink, Schairer e Sparrow (1973) existem alterações morfológicas que podem ser reconhecidas e classificadas são elas, células de tamanho normal, células gigantes e células anãs, células atrofiadas e pelos curvados e ramificados, outra alteração são as células incolores. A natureza dessas outras alterações ainda não é clara.

A figura 10 mostra algumas dessas alterações encontradas durante as análises, estas alterações não foram contabilizadas.

FIGURA 10 - ALTERAÇÕES NOS PELOS ESTAMINAIS (A) E (B) CÉLULAS ANÃS; (C), (D) E (E) PELOS RAMIFICADOS; (F) CÉLULA ATROFIADA; (G), (H) E (I) CÉLULAS GIGANTES; (H) E (I) CÉLULAS INCOLORES



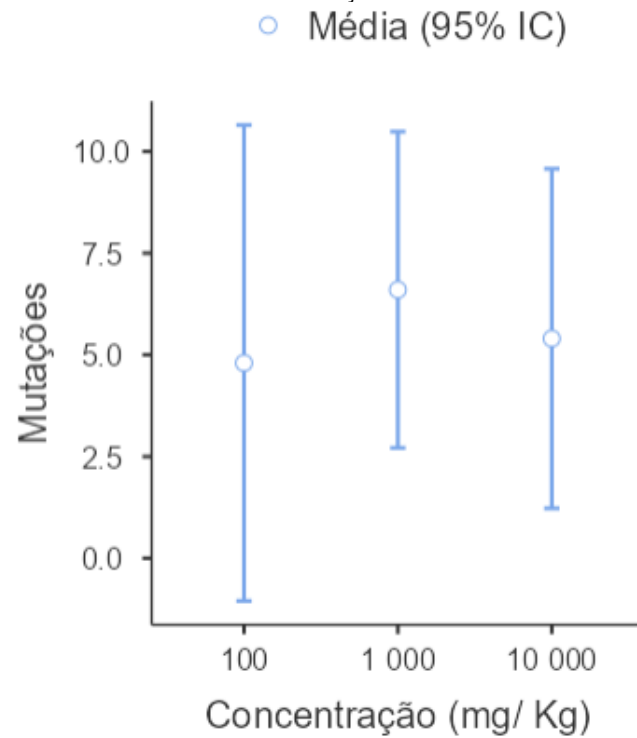
FONTE: A autora (2023)

4.2 RELAÇÃO ENTRE MUTAÇÕES E CONCENTRAÇÕES DE DIESEL

Para verificar se existem relação entre o número de mutações e a concentração de diesel, foi realizada a análise de variância (ANOVA), com os resultados do p-valor com nível de significância de 5%.

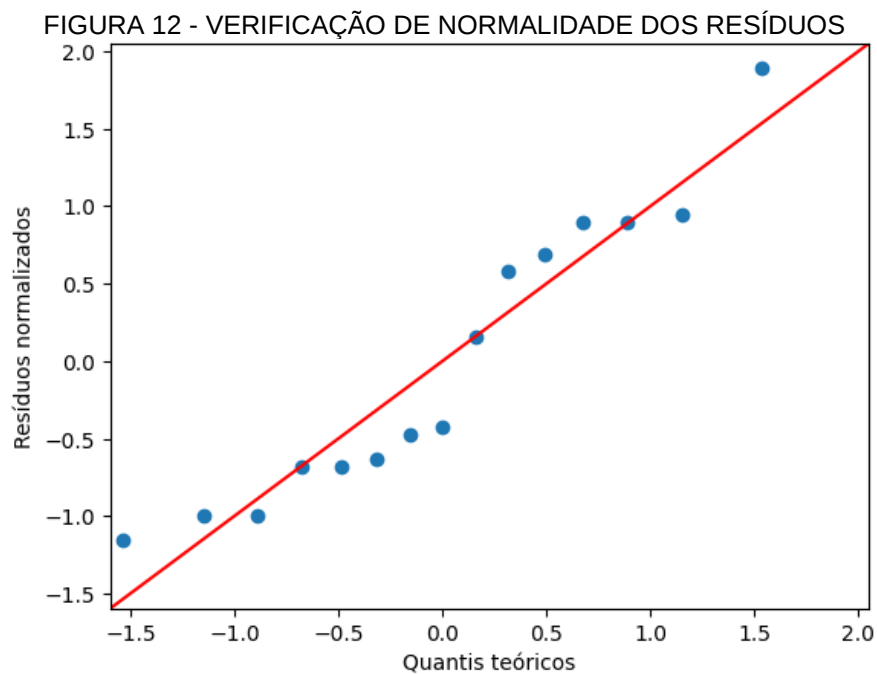
Com o resultado do valor de $p = 0,75 > 0,05$, é possível estimar que não há diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de mutações para as diferentes concentrações de diesel, ou seja, não houve mais mutações em um grupo do que no outro. Isso também pode ser visto na figura 11, onde os intervalos de confiança englobam as médias das outras concentrações, trazendo uma tendência de que não houve uma diferença significativa de mutações entre as diferentes concentrações.

FIGURA 11 – GRÁFICOS DAS MÉDIAS DE MUTAÇÕES POR CONCENTRAÇÃO COM INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%



FONTE: A autora (2023)

Para verificar se os resíduos seguem uma distribuição normal foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, tendo como resultado $p = 0,13 > 0,05$, então a distribuição não se difere significativamente de uma distribuição normal, o que também pode ser visto na figura 12.



FONTE: A autora (2023)

A verificação da homogeneidade entre as variâncias foi feita pelo teste de Levene resultando o valor de $p = 0,49 > 0,05$, confirmando que houve homogeneidade das variâncias.

Como complemento à ANOVA foi feito o teste de Tukey (TABELA 5), que também mostrou que não houve diferença significativa entre as mutações por cada concentração, tendo $p > 0,05$.

TABELA 5 - TESTE DE TUKEY

Concentrações (mg/ Kg)		Diferença média	p-valor
100	1 000	1,8	0,73
100	10 000	0,6	0,9
1 000	10 000	1,2	0,87

Fonte: A autora (2023)

4.3 DESENVOLVIMENTO DE UM PROGRAMA PARA IDENTIFICAÇÃO AUTOMÁTICA DAS CÉLULAS ROSAS

Como alternativa para a identificação das células rosas nas imagens, foi desenvolvido um código em linguagem Python no Google Colaboratory, que identifica a coloração rosa das imagens de forma automática e mais rápida. Este é um caminho que pode ser desenvolvido e aplicado em sua melhor forma para trabalhos futuros.

O código conta o número de pixels da cor rosa e da cor azul de cada imagem. Para isso o código importa as imagens em formato RGB, após a importação é feita uma máscara para a remoção do fundo da imagem, assim somente os pixels dos pelos estaminais serão contados. Para cada imagem, após a aplicação da máscara, o código identifica quais são os pixels rosas e azuis, a partir de uma escala RGB previamente estabelecida para ambos.

Após o tratamento das imagens e contagem dos pixels, é calculada a proporção de pixels rosas sobre azuis para cada imagem ($f_{r/a}^p$), conforme a equação (1).

$$f_{r/a}^p = \frac{\text{número de pixels rosas}}{\text{número de pixels azuis}} \quad (1)$$

E a proporção de células rosas sobre azuis ($f_{r/a}^c$) conforme a equação (2), com os resultados obtidos da contagem visual, importados através de um arquivo CSV.

$$f_{r/a}^c = \frac{\text{número de células rosas}}{\text{número de células azuis}} \quad (2)$$

4.3.1 DESENVOLVIMENTO DO CÓDIGO PARA CONTAGEM DAS CÉLULAS

Primeiro foram importadas todas as bibliotecas necessárias para o processamento e leitura dos dados (FIGURA 13).

FIGURA 13 - BIBLIOTECAS IMPORTADAS

```
# importando bibliotecas
from matplotlib import pyplot as plt
from urllib.request import urlretrieve
from PIL import Image
import os
import cv2
import pandas as pd
import numpy as np
import numpy
from collections import Counter
from skimage.color import rgb2lab, deltaE_cie76
from matplotlib import pyplot
```

Fonte: A autora (2023)

Em seguida foi importado o arquivo CSV que contém o nome, a quantidade de células rosas e azuis somente das imagens que apresentaram células rosas na contagem visual, e feito o acesso até a pasta que armazena todas as imagens (FIGURA 14).

FIGURA 14 - IMPORTAÇÃO ARQUIVO CSV

```
from google.colab import drive
drive.mount('/content/drive')

contagem_manual = pd.read_csv('/content/drive/MyDrive/TCC 2/Teste/todas_rosas.csv', sep=';')
contagem_manual

%cd /content/drive/MyDrive/Imagens Tradescantia /TODAS
```

Fonte: A autora (2023)

As imagens usadas são no padrão RGB, assim foram definidos valores RGB da cor rosa e da cor azul e também a tolerância para cada um deles. Então foram criadas cinco listas que armazenam o erro, a quantidade de células azuis da contagem visual, a quantidade de células azuis da contagem automática, a quantidade de células rosas da contagem visual e a quantidade de células rosas da contagem automática, isso para cada imagem.

Um looping é criado para comparar o nome das imagens do arquivo CSV com a pasta que contém todas as imagens. Para cada nome que está na tabela é identificado qual é a imagem correspondente na pasta, é associado o número de células rosas e azuis da contagem visual, também é definido o comando que irá imprimir a imagem correspondente ao nome na tabela (FIGURA 15).

FIGURA 15 - ENCONTRANDO IMAGENS DO ARQUIVO CSV

```
rosa_range = (134,76,184)
tolerancia_rosa = 27

azul_range = (70,75,163)
tolerancia_azul = 35

lista_erros = []
lista_azuis_m = []
lista_azuis_a = []
lista_rosas_m = []
lista_rosas_a = []

for file in contagem_manual['Imagem']:
    file2=file+'.bmp'
    print(file2)

    rosas = contagem_manual[contagem_manual['Imagem']==file]['Nrosas'].values
    #print('Número de células rosas: ', rosas[0])

    azuis = contagem_manual[contagem_manual['Imagem']==file]['Nazuis'].values
    #print('Número de células azuis: ', azuis[0])

    imagem = Image.open(file2)
    pixels = imagem.load()

    imagem2 = cv2.imread(file2)[:,:,:-1]
    plt.imshow(imagem2)
    plt.show()
```

Fonte: A autora (2023)

Na figura 16 para a criação da máscara que irá remover o fundo das imagens, são definidos os limites inferior e superior da máscara que irá identificar qual o fundo da imagem (FIGURA 17), então aplicam-se operações morfológicas na imagem para que sejam removidos os ruídos, para melhor separar o fundo das células, é possível ver a remoção dos ruídos comparando as figuras 17 e 18. Como

a imagem retornada (FIGURA 18) tem o fundo branco, as cores são invertidas para que o fundo fique preto, com valores nulos para os três canais RGB, assim os pixels do fundo da imagem não serão contados. Então a máscara (FIGURA 19) é aplicada nas imagens, como mostra a figura 20.

FIGURA 16 - CRIAÇÃO DA MÁSCARA

```
rgb = imagem2

a, b = rgb.shape[:2]

# Definindo os limites para a máscara
superior = numpy.array([150, 150, 150])
inferior = numpy.array([255, 255, 255])

# Criando a máscara
thresh = cv2.inRange(rgb, superior, inferior)

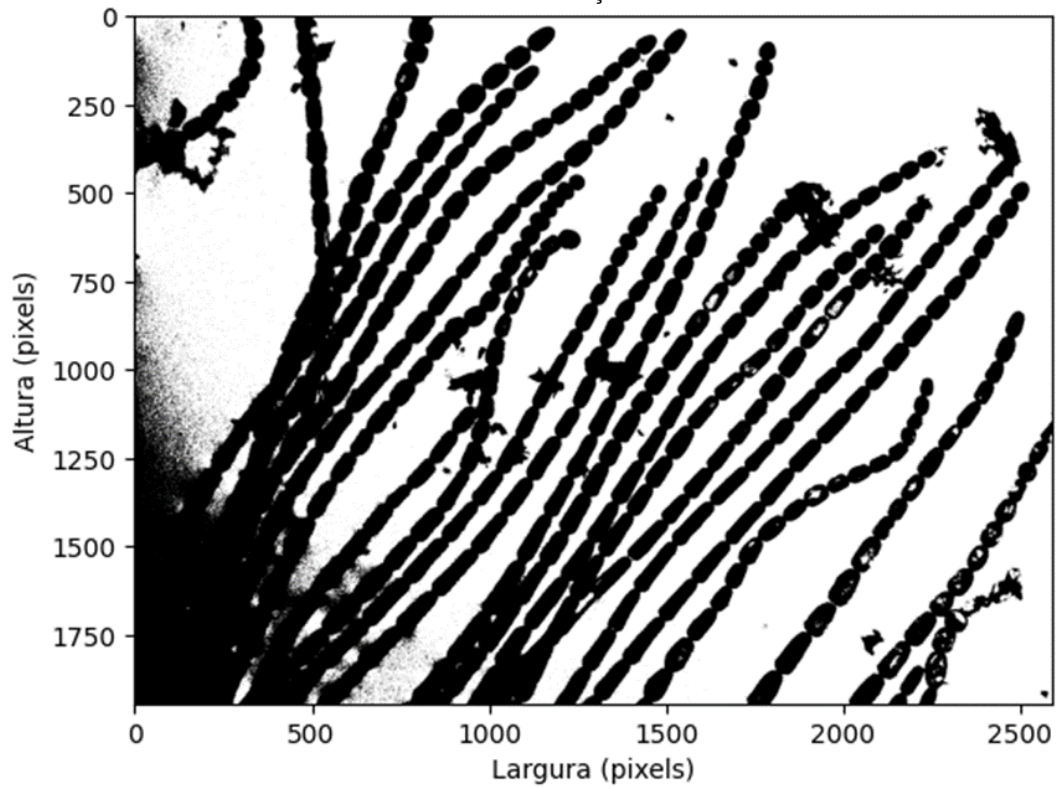
# Aplicando a morfologia
kernel = cv2.getStructuringElement(cv2.MORPH_ELLIPSE, (15, 15))
morfo = cv2.morphologyEx(thresh, cv2.MORPH_CLOSE, kernel)

# Invertendo
mascara = 255 - morfo

# Aplicando a máscara na imagem
resultado = cv2.bitwise_and(rgb, rgb, mask=mascara)
```

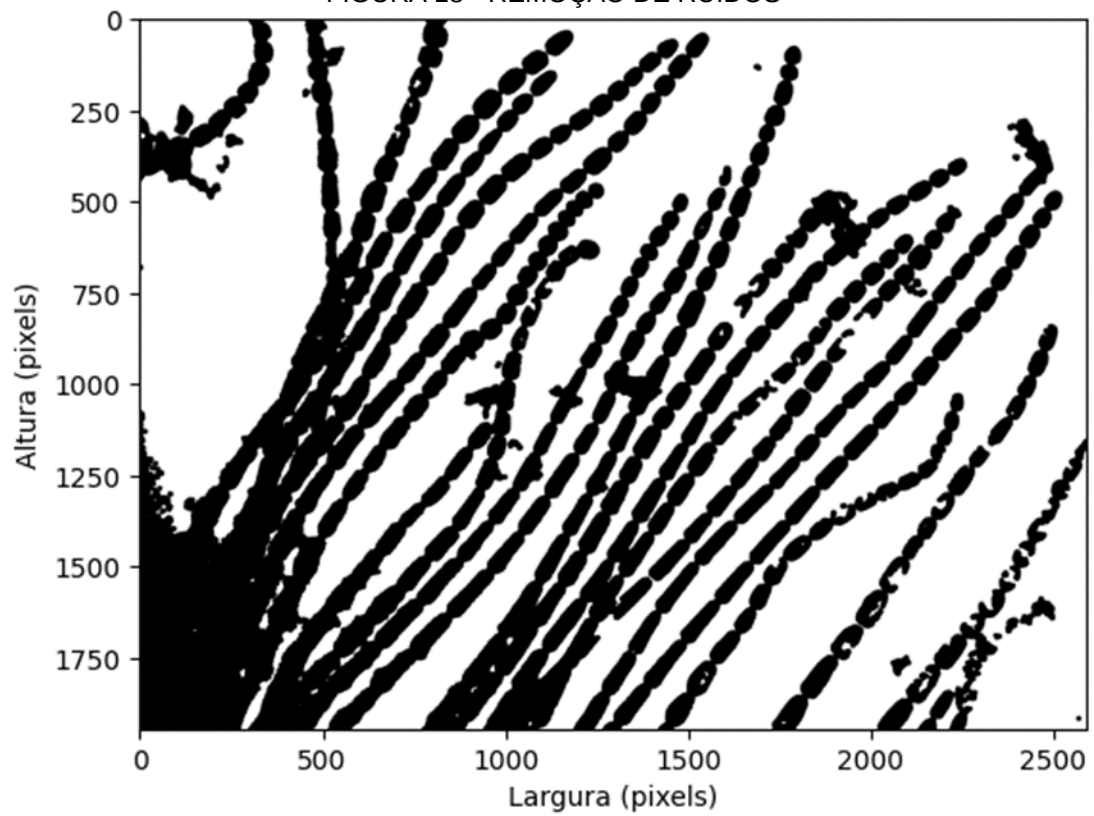
Fonte: A autora (2023)

FIGURA 17 - IDENTIFICAÇÃO DO FUNDO



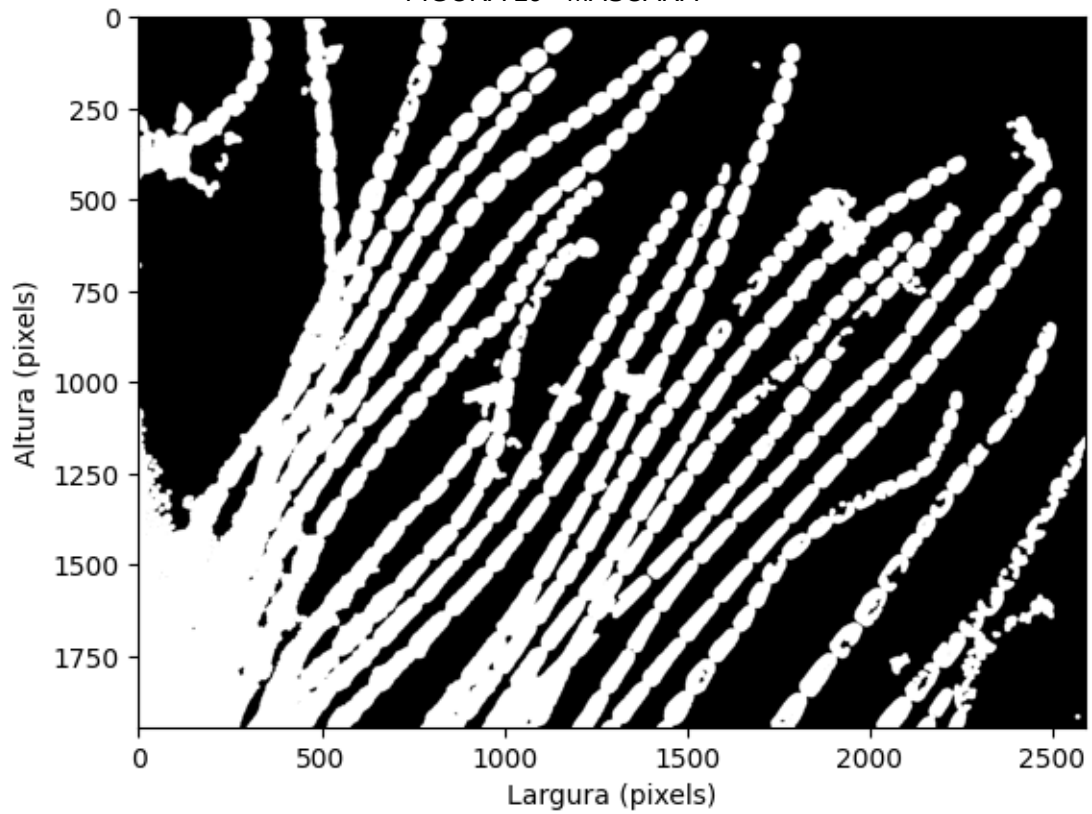
Fonte: A autora (2023)

FIGURA 18 - REMOÇÃO DE RUÍDOS



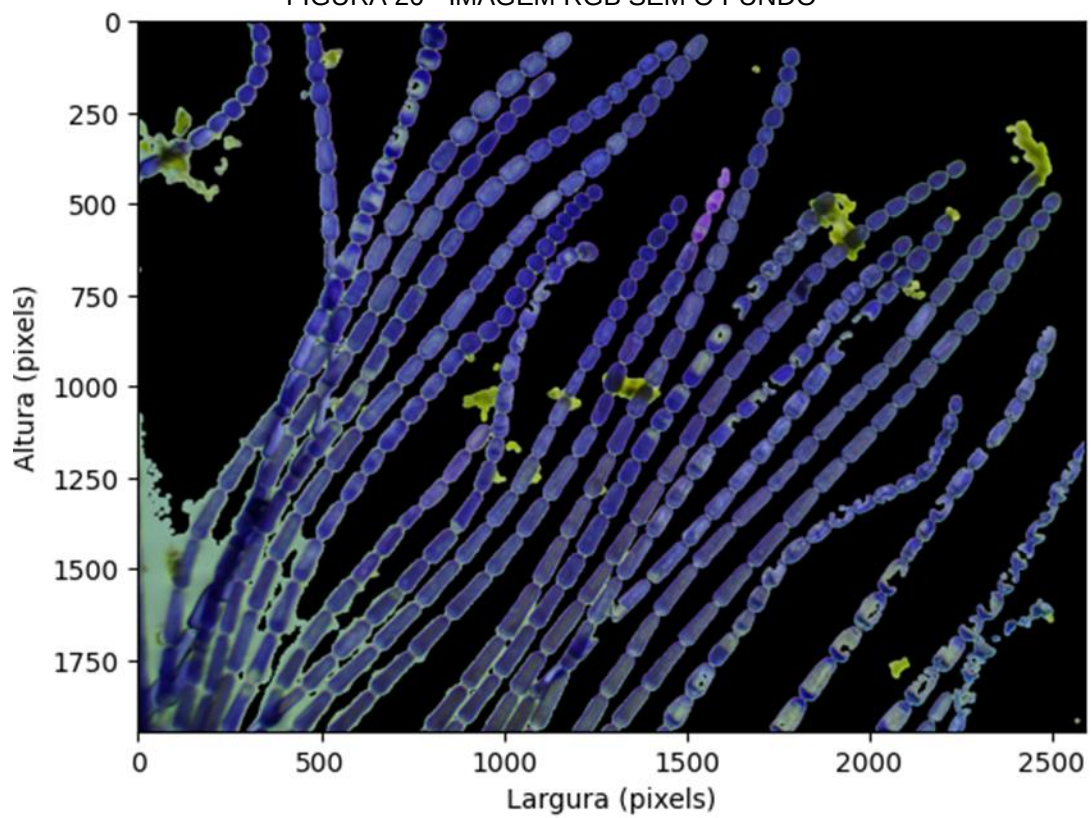
Fonte: A autora (2023)

FIGURA 19 - MÁSCARA



Fonte: A autora (2023)

FIGURA 20 - IMAGEM RGB SEM O FUNDO



Fonte: A autora (2023)

Na figura 21 são criadas duas variáveis que irão armazenar a quantidade de pixels rosas e azuis de cada imagem. São criados dois loopings, um dentro do outro, que irão percorrer todos os pixels da imagem, são feitas duas condições, uma para se o pixel for da cor rosa e outra para se for da cor azul. Se para cada canal RGB o valor absoluto da diferença entre o valor RGB do pixel e o valor RGB de referência for menor ou igual do que a tolerância, o pixel é contado na variável de armazenamento, ao terminar o looping se tem a quantidade de pixels azuis e rosas de cada imagem.

FIGURA 21 - CONTAGEM DE PIXELS

```
cont_rosa = 0
cont_azul = 0

pixel_color = resultado

for x in range(imagem.width):
    for y in range(imagem.height):
        pixel_color = pixels[x, y]

        if (abs(pixel_color[0] - rosa_range[0]) <= tolerancia_rosa) and (abs(pixel_color[1] - rosa_range[1]) <= tolerancia_rosa) and (abs(pixel_color[2] - rosa_range[2]) <= tolerancia_rosa):
            cont_rosa += 1

        if (abs(pixel_color[0] - azul_range[0]) <= tolerancia_azul) and (abs(pixel_color[1] - azul_range[1]) <= tolerancia_azul) and (abs(pixel_color[2] - azul_range[2]) <= tolerancia_azul):
            cont_azul += 1
```

Fonte: A autora (2023)

O programa então calcula o erro absoluto e imprime para cada imagem que contém células rosas, a própria imagem, a imagem sem o fundo, a contagem visual e automática, as proporções para a contagem visual e automática e o erro absoluto entre as proporções (FIGURA 22).

FIGURA 22 - IMPRESSÃO DOS RESULTADOS

```
erro = abs(cont_rosa/cont_azul - rosas[0]/azuis[0])
lista_erros.append(erro)
lista_rosas_a.append(cont_rosa)
lista_azuis_a.append(cont_azul)
lista_rosas_m.append(rosas[0])
lista_azuis_m.append(azuis[0])

print('Contagem manual (rosa, azul): ', rosas[0], azuis[0])
print('Contagem automatica (rosa, azul): ', cont_rosa, cont_azul)
print('')
print('Proporção contagem manual (rosa/azul): ', rosas[0]/azuis[0])
print('Proporção Contagem automatica (rosa/azul): ', cont_rosa/cont_azul)
print('')
print('Erro absoluto entre as proporções: ', erro)
```

Fonte: A autora (2023)

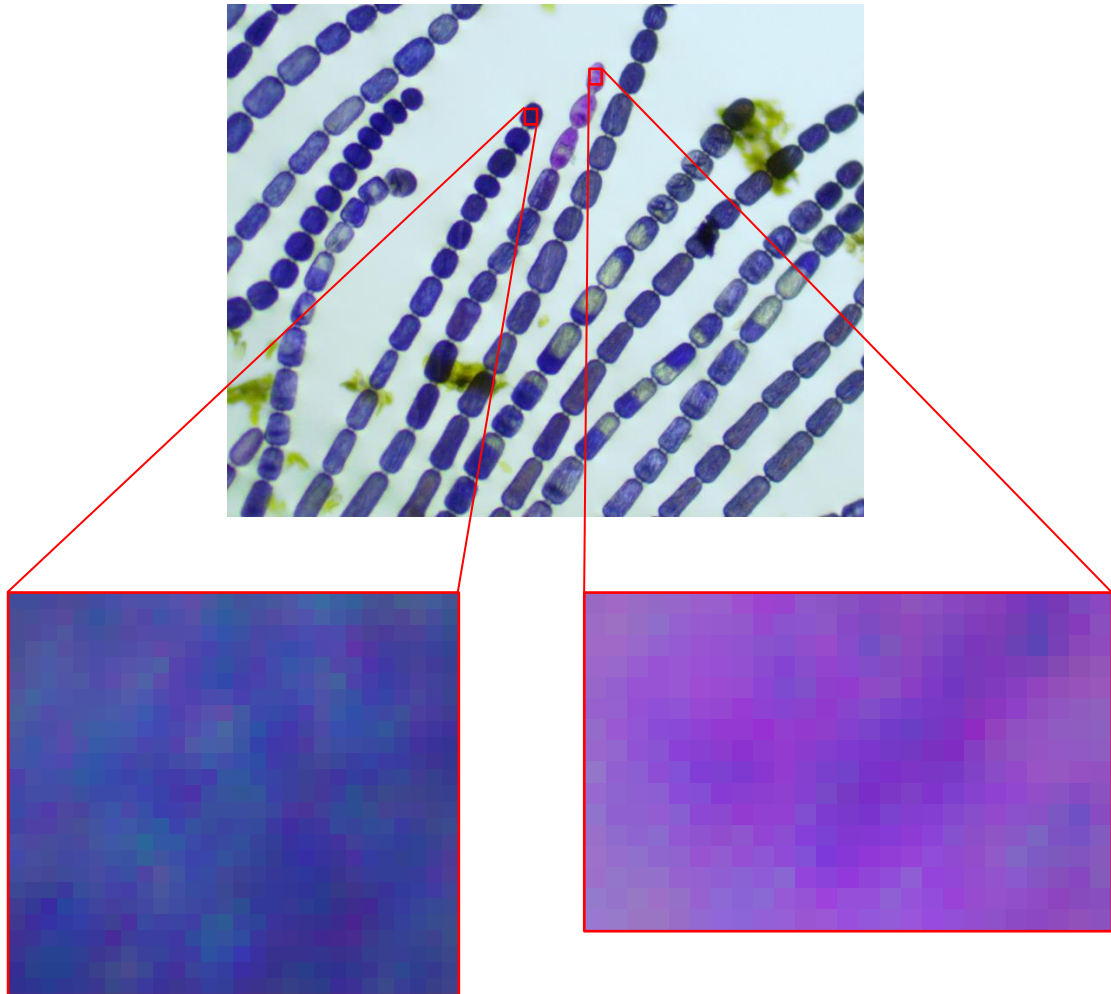
4.3.2 ESPAÇO DE CORES RGB

O espaço de cores RGB considera três cores primárias, vermelho (red), verde (green) e azul (blue), a mistura dessas três cores permite a obtenção das demais cores (BARELLI, 2018). Cada cor obtida está dentro de uma escala que varia de 0 a 255, quando a combinação das três cores está no valor mínimo (0, 0, 0) resulta a cor preta, quando está no valor máximo (255, 255, 255) resulta na cor branca (FERREIRA; RODRIGUES, 2021). As imagens em RGB são matematicamente retratadas como matrizes tridimensionais, uma para cada canal. Cada elemento da matriz é um número inteiro que varia de 0 a 255, expressando a intensidade de cor de um pixel relativo a um canal (BARELLI, 2018).

Para definir os valores RGB da cor rosa (134, 76, 184) e da cor azul (70, 75, 163), usados para identificar os pixels rosas e azuis em cada imagem, foram recortadas seis amostras de tons de rosa e seis amostras de tons de azul (FIGURA 23). Então foi feita a média de cada canal RGB dos pixels de todas as amostras de cor, resultando nos valores usados. Foi calculado também o desvio padrão para

cada canal RGB, os valores encontrados foram usados para se chegar aos valores 27 e 35, usados na tolerância para a cor rosa e azul.

FIGURA 23 - AMOSTRAS COR ROSA E AZUL



Fonte: A autora (2023)

4.3.3 BIBLIOTECA OPENCV

A OpenCV é uma biblioteca multiplataforma, feita para o desenvolvimento de aplicativos na área de visão computacional, processamento de imagens, estrutura de dados e álgebra linear (BARELLI, 2018). Ela foi a principal biblioteca usada para fazer o tratamento das imagens, retirando o fundo a partir da máscara para posteriormente ser feita a contagem de pixels.

Na criação da máscara foi usada a função `cv2.inRange`, que recebe a imagem como uma matriz e os limites inferior e superior que definem a faixa de valores RGB para a cor do fundo das imagens. O limite inferior é dado pelo valor

(150,150,150), cor da figura 24, e o superior é (255,255,255) que é a cor branca, todas as cores que estiverem entre essas duas tonalidades será identificada como sendo o fundo das imagens. A função retorna uma imagem com o fundo da imagem em branco, e o resto em preto.

FIGURA 24 -COR DO LIMITE INFERIOR DA MÁSCARA



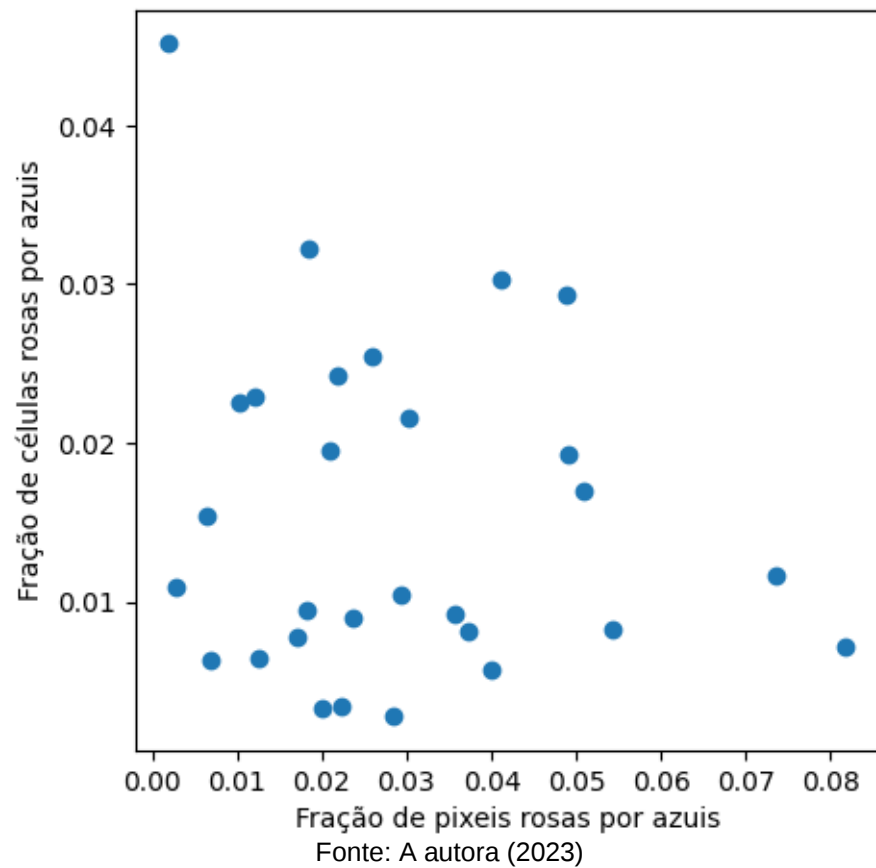
Fonte: Converting Colors (2023)

Em seguida a função `cv2.getStructuringElement` define a vizinhança que será analisada em torno de cada pixel, como o que se quer realçar são as células dos pelos estaminais que tem formatos circulares ou elípticos, a função tem como argumento o componente de estruturação elíptico. Então para a remoção dos ruídos da imagem é usada a função `cv2.morphologyEx`, essa função recebe como argumentos a imagem para remoção dos ruídos, a operação morfológica e o componente de estruturação.

4.3.4 ANÁLISE CONTAGEM AUTOMÁTICA

Com os valores das frações de células rosas sobre azuis e das frações de pixels rosas sobre azuis foi feito o gráfico de dispersão da figura 25. O gráfico exhibe uma nuvem de pontos mostrando que não há correlação entre os valores das frações de células rosas sobre azuis e das frações de pixels rosas sobre azuis. O cálculo do coeficiente de correlação de Pearson para as frações, com o valor de 0,39, mostra uma correlação fraca.

FIGURA 25 -GRÁFICO FRAÇÃO DE CÉLULAS ROSAS POR AZUIS E FRAÇÃO DE PIXELS ROSAS POR AZUIS



Nas imagens feitas é possível notar que dentro das células azuis há pixels da cor rosa, assim como dentro das células rosas há alguns pixels de cor azul. Esse é um fator que pode ter elevado o número de pixels rosas além das células rosas contadas de maneira visual, trazendo um número elevado de pixels rosas por imagem.

5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

O trabalho analisou a frequência de mutações nos pelos estaminais da *Tradescantia* clone 4430 usando o bioensaio Trad-SHM. As mutações ocorreram de forma mais intensa no primeiro mês de análise, a partir do quarto mês as plantas já demonstravam sinais de estarem se recuperando da contaminação. Não há uma diferença significativa no número de mutação para cada concentração de diesel. Pela análise de variância (ANOVA) foi possível confirmar esta informação.

Em trabalhos futuros poderiam ser feitos mais recipientes para as concentrações de diesel, para se ter mais flores amostradas já que a recuperação das plantas acontece em poucos meses. Poderia também ser realizado um estudo sobre qual a concentração máxima de diesel que a *Tradescantia* clone 4430 consegue suportar, usando valores de concentração de diesel entre 10 000 mg/ Kg, maior concentração analisada neste trabalho, e 100 000 mg/ Kg, concentração que a *Tradescantia* clone 4430 não suportou no começo das análises. Outra sugestão seria realizar uma análise química do solo para verificar o comportamento do poluente ao longo do tempo, e comparar com os resultados obtidos do bioindicador.

O programa em Python desenvolvido para contar os o número de pixels da cor rosa e da cor azul de cada imagem funcionou de maneira satisfatória para a identificação da coloração rosa nas células, quando seu resultado é comparado com o da contagem visual não é demonstrada correlação. Algumas sugestões para que o programa obtenha resultados melhores seriam mudar a forma como são definidos os tons de rosa e azul a serem identificados, podem ser testados formatos diferentes para as imagens de entrada e também as imagens podem receber tratamentos diferentes, o uso de redes neurais também pode facilitar melhorar o processamento das imagens assim como os resultados obtidos.

O bioensaio Trad-SHM é um teste prático e de resposta rápida, com ele foi possível determinar as mutações e observar as alterações morfológicas nos pelos estaminais da *Tadescantia* clone 4430, que como o esperado demonstrou ser sensível ao teste com diferentes concentrações de contaminação por diesel e, após alguns meses demonstrou ter se recuperado.

REFERÊNCIAS

- ANTONELLO, R. **Introdução a Visão Computacional com Python e OpenCV**. Disponível em: <https://cv.antonello.com.br/visao-computacional/>. Acesso em: 17 out. 2023.
- ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, jul./set. 2007.
- BARELLI, F. **Introdução à Visão Computacional: Uma abordagem prática com Python e OpenCV**. Casa do Código, 2018.
- CESNIENE, T. *et al.* Soil-surface genotoxicity of military and urban territories in Lithuania, as revealed by *Tradescantia* bioassays. **Elsevier**, v. 697, p. 10-18, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.02.004>. Acesso em: 02 dez. 2022.
- CESNIENE, T. *et al.* Use of *Tradescantia* clone 4430 for direct long-term soil mutagenicity studies. **Elsevier**, v. 768, p. 23-32, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.010>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- CHRISTIANSON M. L. Mitotic crossing-over as an important mechanism of floral sectoring in *Tradescantia*. **Mutation Research**, v. 28, p. 389-395, 1975.
- CONVERTING COLORS. Disponível em: [https://convertingcolors.com/rgb-color-150_150_150.html?search=RGB\(150,150,150\)](https://convertingcolors.com/rgb-color-150_150_150.html?search=RGB(150,150,150)). Acesso em: 31 out. 2023
- EMMERLING-THOMPSON, M.; NAWROCKY M. M. Genetic basis for using *Tradescantia* clone 4430 as an environmental monitor of mutagens. **The Journal of Heredity**. v. 71, p. 261-265, 1980.
- FERREIRA, L. O.; RODRIGUES, W. M. Funções lineares no estudo do sistema de cores RGB. In: GARCIA, A. R. G. *et al.* **Coletânea de trabalhos do PROFMAT/UFERSA voltado aos estudos de funções e suas aplicações ao ensino médio**. 1º ed. Piracanjuba: Conhecimento Livre, 2021. p. 54-80.
- GOSPODAREK, J.; RUSIN, M. Effect of Soil Polluted with Petroleum-Derived Substances during Bioremediation on the Occurrence of Collembola and Acarina. **Polish Journal of Environmental Studies**, Cracóvia, v. 29, n. 5, p. 3115-3125, 2020.
- GREEN, B. T. *et al.* Phytotoxicity observed in *Tradescantia* correlates with diesel fuel contamination in soil. **Environmental and Experimental Botany**, Mankato, v. 36, n. 3, p. 313-321, 1996.
- ICHIKAWA, S.; WUSHUR, S. Analyses of spontaneous pink mutant events in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated in a nutrient solution circulating growth chamber. **Elsevier**, Japão, v. 472, p. 37-49, 2000.

JACQUES-CALLEGARI, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

MA, T. H. *et al.* Tradescantia stamen hair mutation bioassay. **Elsevier**, v. 310, p. 211-220, 1994.

MERICLE, L.W.; MERICLE R. P. Somatic mutations in clone 02 *Tradescantia*: a search for genetic identity. **The Journal of Heredity**, v. 31, p. 323-328, 1971.

PEREIRA, R. D. *et al.* Efeitos clastogênicos em *Tradescantia pallida* cv *purpurea* cultivada em solos tratados com lodos de diferentes origens. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 10, n. 12, p. 234-254, 2014.

RODRIGUES, G. S. *et al.* Tradescantia Bioassays as Monitoring Systems for Environmental Mutagenesis: A Review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, n.4, p. 325-359, 1997.

RODRIGUES, L. T. **Monitoramento de material particulado usando sensor ótico SDS011 e o bioindicador Tradescantia sp. clone 4430 em Curitiba**. 2021. 121 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Ambiental) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

ROMERO B. M.; MONTERROSO, C. Phytotoxicity of fuel to crop plants: influence of soil properties, fuel type, and plant tolerance. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 96, n. 8, p. 1162-1173, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1009462>. Acesso em: 11 nov. 2022.

SANTOS, V. M. dos; MAIA, L. C. Bioindicadores de qualidade do solo. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 10, p.195-223, 2013.

SCHÖBER, P. *et al.* Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. **Special Article**, v. 126, n. 5, mai. 2018.

SPARROW, A. H. *et al.* Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. **Mutation Research**, Nova Iorque, v. 26, p. 265-276, 1974.

UNDERBRINK, A. G. *et al.* Tradescantia stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: Hollaender, A. **Chemical Mutagen: Principles and Methods for Their Detection**. New York: Plenum Press, 1973. p.171-207.

XIAO, L. Z.; ICHIKAWA S. Antagonistic effects of ethyl methanesulfonate and maleic hydrazide in inducing somatic mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. **Genes & Genetic Systems**, v. 73, p. 287-292, 1998.

YAKOVLEVA, E. V. *et al.* Genotoxic Effects in *Tradescantia* Plant (Clone 2) Induced by Benzo(a)pyrene. **Sibirskii Ekologicheskii Zhurnal**, v. 18, n. 6, p. 805-812, 2011. DOI. 10.1134/S1995425511060051

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5. Ed. Prentice Hall, 2010.