

DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DA DOSE DE REDUÇÃO DO CRESCIMENTO (GR₅₀) E DA DOSE LETAL (LD₅₀) DE SOJA IRRADIADA POR RAIOS GAMA

A.C. de Barros¹ & V. Arthur²

¹Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, Av. Prof. Lineu Prestes, 2.242, CEP 05508-000, São Paulo SP, Brasil. E-mail: acbarros@cena.usp.br

RESUMO

O grau de radiosensibilidade de um embrião vegetal depende da espécie, do estágio de desenvolvimento deste embrião durante a irradiação, da dose empregada e do critério usado para medir o efeito biológico. Um dos critérios mais comuns utilizado para avaliar a radiosensibilidade de sementes é medir a altura da planta em um tempo determinado após a germinação. A dose de radiação necessária para provocar uma redução de 50% na altura média da população estudada chama-se GR₅₀ (growth reduction to 50%) e a dose que mata 50% da população em estudo é chamada de dose letal para 50% da população ou LD₅₀ (lethal dose to 50%). O objetivo deste trabalho foi estudar quantitativamente a sensibilidade da soja à radiação gama através do GR₅₀ e LD₅₀. As sementes variedade IAC 12 provenientes do Instituto Agrônomo, Campinas, SP, foram irradiadas em uma fonte de ⁶⁰Co tipo gammacell modelo 220 no CENA com taxa de dose de 1,481 kGy/h. As doses em kGy foram as seguintes: 0,0 (controle), 0,10, 0,20, 0,30, 0,40 e 0,50. Concluiu-se que o GR₅₀ da soja ocorre em 0,30 ± 0,04 kGy. Não foi possível determinar o LD₅₀ para a faixa de doses utilizadas neste experimento.

PALAVRAS-CHAVE: Soja, irradiação de alimentos, radiosensibilidade, radiações, efeito biológico, raios gama.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE GROWTH REDUCTION DOSE (GR₅₀) AND THE LETHAL DOSE (LD₅₀) FOR SOYBEANS IRRADIATED BY GAMMA RAYS. The degree of radiosensitivity depends mostly on the species, the stage of the embryo at irradiation, the doses employed and the criteria used to measure the effect. One of the most common criteria to evaluate radiosensitivity in seeds is to measure the average plant height at a determined time after germination. The radiation dose value that causes a 50% growth reduction of a population is called GR₅₀. The goal of this research was to study soybean radiosensitivity from a quantitative point of view. Soybean seeds from Instituto Agrônomo, Campinas, SP, were irradiated in a ⁶⁰Co gamma source type 220 excell from MDS Nordion with dose rate of 1.48 kGy / h in CENA. Applied doses in kGy unit was follows: 0.0, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 and 0.50. It was concluded that the GR₅₀ of soybeans is 0.30 ± 0.04 kGy. It was not possible to determine the LD₅₀ for the dose range employed in this experiment.

KEY WORDS: Soya, food irradiation, radiosensitivity, radiation, biological effects, gamma rays.

INTRODUÇÃO

A irradiação de plantas pode resultar em morte, inibição do crescimento, alteração do metabolismo, anomalias morfológicas e mutações. A intensidade dos efeitos depende de características da radiação, das espécies estudadas e da idade das plantas. O estudo dos efeitos da radiação ionizante em plantas pode ser conduzido em pólen, embriões, sementes,

raízes etc. O parâmetro de análise pode ser o crescimento das plantas, alterações morfológicas e histológicas, efeito sobre os hormônios etc. (CASARETT, 1968a).

Durante a década compreendida entre 1974 e 1984, muitos experimentos sobre mutação radioinduzida em sementes de soja foram realizadas para a obtenção de linhagens mutantes, algumas das quais altamente radiosensíveis (SMUTKUPF *et al.*, 1985).

²Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA, Piracicaba, SP, Brasil.

O grau de radiosensibilidade de um embrião de planta depende da espécie, do estágio de desenvolvimento deste embrião durante a irradiação e do critério usado para medir o efeito biológico. Um dos critérios mais comuns de avaliar a radiosensibilidade de sementes é medir a altura da planta em um tempo determinado após a germinação (CASARETT, 1968a).

Define-se GR_{50} (growth reduction to 50%) como a dose de radiação necessária para provocar uma redução de 50% na altura média da população estudada.

As sementes dormentes são menos radiosensíveis do que as sementes com embriões em desenvolvimento, provavelmente devido ao seu estado quiescente caracterizado por pouca divisão ou diferenciação e também ao seu baixo conteúdo de água (CASARETT, 1968a). Define-se LD_{100} à dose de radiação requerida para matar toda a população de plantas estudadas. Define-se LD_{50} à dose letal que mata metade da população de plantas estudadas (HALL, 1994).

O conteúdo de água de sementes tem grande influência sobre sua radiosensibilidade (CASARETT, 1968). Esta variação se deve à concentração de radicais livres que aumenta várias vezes após a irradiação e não se trata de um fenômeno linear. Outros fatores que modificam a radiosensibilidade das sementes são: idade, tempo de armazenamento, deficiência nutricional, balanço hormonal, fase do ciclo celular etc.

O objetivo deste trabalho foi determinar quantitativamente o grau de sensibilidade da soja à radiação gama utilizando os seguintes parâmetros:

- $GR_{50,30}$: dose de redução do crescimento em 50% da população com relação à altura média das plantas não irradiadas, após 30 dias de observação;
- $LD_{50,30}$: dose letal para 50% da população após 30 dias de observação.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material proveniente do Instituto Agrônomo, Campinas, consistiu em sementes de soja variedade IAC 12. As sementes eram novas com idade inferior a 2 anos e foram irradiadas em uma fonte de ^{60}Co tipo gammacell modelo 220 excell da MDS Nordion, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura com taxa

de dose aproximadamente igual a 1,481 kGy/h. As doses de radiação aplicadas foram respectivamente 0,10 kGy, 0,20 kGy, 0,30 kGy, 0,40 kGy e 0,50 kGy. O controle não recebeu o tratamento (dose = 0,0 kGy).

As sementes foram irradiadas à tarde e semeadas pela manhã do dia seguinte em canteiro previamente preparado para recebê-las. O delineamento estatístico aplicado na análise de variância dos dados foi o de experimentos em blocos ao acaso (VIEIRA, 1999). Procedeu-se com três repetições (3 blocos) e seis tratamentos distintos (6 doses). O canteiro foi subdividido e procedeu-se como sorteio dos blocos e das diferentes doses utilizadas que resultou no esquema apresentado na Figura 1.

Os dados numéricos coletados durante 30 dias de observação foram organizados em tabelas e analisados no software Origin versão 6.0 da Microcal, onde se procedeu com uma linearização gráfica dos pontos para a determinação do GR_{50} e LD_{50} . Utilizamos o teste de Tukey (PIMENTEL, 1990; VIEIRA, 1999) para a comparação das médias obtidas nos diferentes blocos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de variância seguiu o delineamento de experimentos em blocos ao acaso (VIEIRA, 1999) obtendo-se os resultados exibidos na Tabela 1.

O valor tabelado de f , ao nível de significância de 5% e com 5 graus de liberdade de tratamentos e 10 graus de liberdade do resíduo é $F = 3,33$ (VIEIRA, 1999). Deste modo o valor $F_{calc} = 147,33$ é altamente significativo nesse nível de significância pois $F_{calc} \gg F$, indicando

Tabela 1 - resultados da análise de variância dos dados de altura média em função da dose. GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F_{calc} = valor de f calculado.

Causas de variação	GL	SQ	QM	F_{calc}
Tratamentos	5	512,932	102,586	147,331
Blocos	2	27,630	13,815	
Resíduo	10	6,963	0,696	
Total	17	547,525		

Soja																	
Bloco I			Bloco II			Bloco III											
6	3	4	5	2	1	6	5	4	2	3	1	5	4	2	1	3	6

Fig. 1 - Legenda que exibe as divisões feitas no canteiro para germinação da soja irradiada e os números sorteados para cada fileira. A relação dos números sorteados com a dose de radiação gama empregada é a seguinte: 1 - controle; 2 - 0,10 kGy; 3 - 0,20 kGy; 4 - 0,30 kGy; 5 - 0,40 kGy, 6 - 0,50 kGy.

Tabela 2 - Comprimento médio das plantas (altura total em cm) em função da dose (kGy). Os coeficientes a, b, c e d representam o teste de Tukey: Quando os coeficientes que acompanham duas médias são iguais, a diferença entre elas não é estatisticamente significativa. Quando são diferentes, é significativa a diferença entre elas.

Dose (kGy)	Bloco I	Bloco II	Bloco III	média
0,0	15,5 ± 2,9	20,2 ± 2,6	18,9 ± 3,8	18,2 ± 2,4 ^a
0,10	15,3 ± 2,5	19,1 ± 2,0	18,8 ± 1,5	17,7 ± 2,1 ^a
0,20	8,5 ± 2,2	11,7 ± 3,2	11,2 ± 4,0	10,5 ± 1,7 ^d
0,30	6,3 ± 1,5	8,3 ± 2,5	9,3 ± 3,5	8,0 ± 1,5 ^b
0,40	5,1 ± 1,8	6,0 ± 1,6	7,1 ± 1,7	6,1 ± 1,0 ^{bc}
0,50	3,9 ± 1,3	5,5 ± 1,6	4,6 ± 1,3	4,6 ± 0,8 ^c

do ponto de vista quantitativo que os diferentes tratamentos afetam o parâmetro de altura das plantas.

Os resultados das comparações das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey estão inseridos na Tabela 2 através dos índices a, b, c e d. Duas médias com o mesmo índice não apresentam diferenças significativas e com índices diferentes apresentam. O valor de diferença mínima significativa calculada para este experimento é d.m.s. = 2,24 cm. Considerando m_1 a média do controle é, portanto, significativa a diferença entre m_1 e m_3 , m_1 e m_4 , m_1 e m_5 , m_1 e m_6 . Estes resultados podem ser verificados também do ponto de vista qualitativo nas fotos das Figuras 3 e 4.

Pôde-se observar uma redução drástica da altura média das plantas com o aumento da dose para os diferentes blocos. Os valores de doses empregadas nesta etapa do experimento foram adequadas ao objetivo de se determinar o GR_{50} , mas uma modelagem matemática mais aprofundada pode ser implementada

pois a regressão linear dos dados exibe uma simplificação extrema deste fenômeno radiobiológico que não apresenta um comportamento linear e tampouco exponencial. A regressão apresentada na figura 1, foi utilizada para a determinação do GR_{50} cujo valor foi de $0,30 \pm 0,04$ kGy.

Uma regressão polinomial ou sigmoideal da curva obtida na Figura 2 poderia revelar informações mais detalhadas sobre o comportamento de certos pontos como aquele relativo à dose de 0,10 kGy, discrepante porém evidente em todos os blocos. Segundo LUCKEY (1980) baixas doses de radiação apresentam a capacidade de estimular os bio-sistemas, invertendo-se o efeito com o aumento da dose. Esta teoria denominada Hormese, ainda não muito bem compreendida e muito questionada poderia explicar o referido pico de crescimento para a dose de 0,10 kGy com subsequente queda dos valores de altura das plantas em função do aumento da dose.

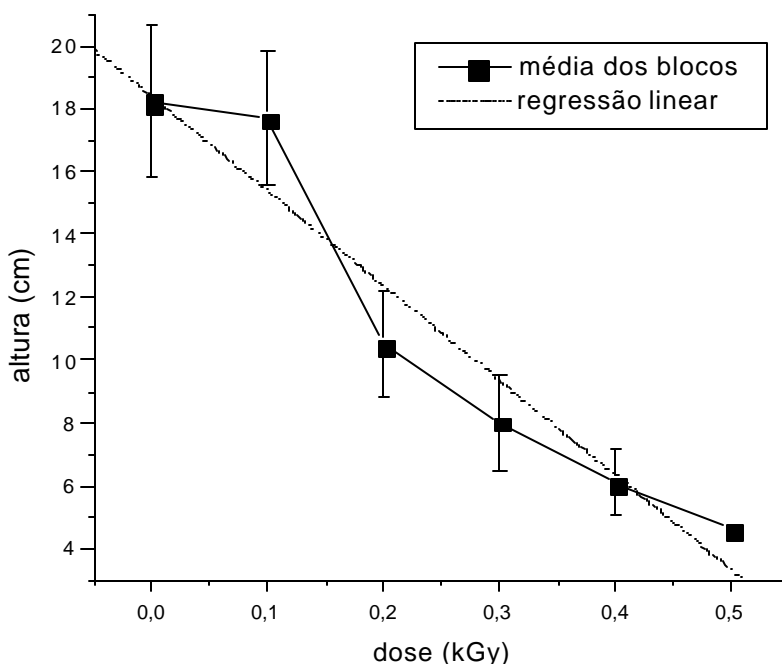


Fig. 2 - Gráfico da altura média das plantas em função das doses de radiação ionizante aplicadas, ao final de um período de observação de 30 dias.



Fig. 3 - Detalhe do experimento com a soja para observação do desenvolvimento geral: à esquerda estão as plantas de sementes irradiadas com dose de 0,50 kGy; a direita estão as plantas - controle.



Fig. 4 - Detalhe do experimento com a soja para observação da altura das plantas: primeira cova da direita para a esquerda, dose de 0,50 kGy. Na segunda cova, dose de 0,20 kGy. A terceira cova é o controle.

Tabela 3 - Sobrevivência das plantas após germinação: número de indivíduos no 30º dia de observação.

Dose kGy	Bloco I	Bloco II	Bloco III	Média e desvio padrão
0,0	36	46	39	40,3 ± 5,1
0,10	37	33	34	34,6 ± 2,1
0,20	35	33	42	36,6 ± 4,7
0,30	31	41	34	35,3 ± 5,1
0,40	29	32	30	30,3 ± 1,5
0,50	31	36	39	35,3 ± 4,0

Em total oposição à teoria de hormese está o princípio ALARA da proteção radiológica (INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION, 1990; COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR, 1988) que afirma ser prejudicial qualquer dose de radiação aos organismos, por menor que ela seja.

Ainda citando Luckey, experiências sobre aumento de produtividade pós colheita alcançaram bons resultados com trigo, soja, milho e batata entre outros irradiando-se as sementes ou tubérculos com baixas doses antes da semeadura.

Não foi possível realizar a determinação experimental da dose que mata 50% da população estudada (LD_{50}) para os valores de dose testados neste experimento.

Os dados obtidos após 30 dias de observação das plantas que sobreviveram, encontram-se na Tabela 3. A tentativa de linearização gráfica desses dados exigiu extrapolações muito longas que implicaram em erro e incerteza.

Tornou-se claro, portanto, não ser possível a determinação numérica deste critério para a faixa de doses empregadas, sendo necessário refazer o experimento com doses mais elevadas.

Uma comparação com a pesquisa realizada por CONSTANTIN & KILLION (1972) nos fornece informações complementares à respeito de um outro critério não verificado neste experimento: o peso seco de brotos de sementes de soja expostas à radiação gama do ^{60}Co . A comparação é difícil porque os referidos pesquisadores trabalham com a grandeza física Exposição (em roentgens) enquanto neste experimento utilizamos a grandeza física Dose Absorvida (em grays). Além disso, CONSTANTIN & KILLION (1972) realizam o experimento empregando exposições fracionadas com intervalo de 120 min enquanto neste experimento empregamos dose única. Finalmente, deve-se considerar as diferenças de variedade da soja e o tempo de observação após o tratamento, que no experimento de Constantin é de 23 dias após a irradiação enquanto neste experimento foi de 30 dias. Considerando o caráter cumulativo dos efeitos biológicos da radiação ionizante, procedeu-se à soma dos valores de exposição sofridas pelas sementes de soja na primeira e na segunda exposição no experimento de

Constantin a fim de se obter uma base numérica de comparação com este experimento. O valor médio que corresponde a uma redução de 50% do peso seco de brotos é 3680 ± 170 R.

Fez-se uma conversão grosseira, para efeito de comparação dos experimentos onde $100 \text{ R} \approx 0,95 \text{ Gy}$ (BIRAL, 2002) e chegou-se a um valor de 35 Gy como dose que provocaria uma redução do peso seco de brotos em 50% comparando com o controle, segundo os dados fornecidos no experimento de CONSTANTIN & KILLION (1972). Esse valor é 8,5 vezes menor do que o encontrado neste experimento para o GR₅₀ da soja, indicando que o critério testado por Constantin seria ainda mais radiosensível do que o GR₅₀ e LD₅₀ para a soja.

CONCLUSÕES

- Os critérios utilizados neste experimento para avaliar a radiosensibilidade da soja, GR_{50,30} e LD_{50,30} indicaram respostas muito diferentes entre si.
- O GR_{50,30} da soja ocorreu em $0,30 \pm 0,04$ kGy.
- Não foi possível determinar o LD_{50,30} da soja com os valores de dose empregados neste experimento pois seriam necessárias extrapolações muito extensas que gerariam erros e incertezas. No entanto sabe-se que é superior à 0,50 kGy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIRAL, A.R. *Radiações ionizantes para médicos, físicos e leigos*. Florianópolis: Editora Insular, 2002. 230p. Capítulo 6:

Definições referentes a dosimetria das radiações ionizantes.

- CASARETT, A.P. *Radiation biology*. New Jersey: Prentice Hall, 1968. 368 p. Chapter 13: Effects of radiation on higher plants and plant communities (a).
- COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR. (Brasil). Diretrizes Básicas de Radioproteção. Norma CNEN-NE-3.01, setembro de 1988. 129p. Princípio da otimização, p.12.
- CONSTANTIN, M.J. & KILLION, D.D. Response of the soybean seedling to fractionated exposures of ⁶⁰Co gamma radiation: An apparent protective effect induced by the initial exposure. *Radia. Res.*, v.51, p.538, 1972.
- HALL, E.J. *Radiobiology for the radiologist*. 4.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. 478p.
- IGUE, T. & LASCA, D.H.C. Experimentação de campo. *Bol. Téc. CATI*, n.191, p.1-32 1986.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON RADIOLOGICAL PROTECTION (ICRP-60). Oxford: Pergamon Press, 1990. 201p. Princípio da otimização, p.28.
- LUCKEY, T.D. *Hormesis with ionizing radiation*. Flórida: CRC Press, 1980.
- PIMENTEL, F. *Estatística experimental*. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.
- SMUTKUPT, S.; WONGPIYASATID, A.; LAMSEEJAN, S. Soybean mutants induced by gamma radiation. *Environ. Mutagen. S.*, v.7, supl.3, p.41, 1985.
- VIEIRA, S. *Estatística experimental*. 2.ed. São Paulo: Editora Atlas, 1999. 185p.

Recebido em 30/3/05

Aceito em 27/6/05