

Comportamento de *Lactuca sativa* exposta a amostras ambientais sob diferentes condições de armazenamento: uma abordagem para Ecotoxicologia

Davi de Souza Alves¹

Arthur Arnoni Occhiutto²

João Vitor Calvelli Barbosa³

Antônio Rodrigues da Cunha Neto⁴

Alexandra dos Santos Ambrósio⁵

Sandro Barbosa⁶

Uso de tecnologia para monitoramento ambiental

Resumo

A conservação e preservação adequadas de amostras são essenciais para assegurar a confiabilidade dos biotestes utilizados no monitoramento ecotoxicológico. No Brasil, embora exista regulamentação para o monitoramento de contaminantes ambientais, esta não contempla suficientemente o uso de espécies vegetais em seus protocolos, resultando em lacunas importantes a serem estudadas. Este estudo, portanto, tem como objetivo avaliar o impacto das condições de preservação de amostras de efluentes em biotestes de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*. Para tal, foram realizados dois experimentos para comparação: no primeiro, as sementes foram expostas à amostra de efluentes refrigerados e no segundo, com a amostra previamente congelada. Ambos experimentos incluíram um controle negativo com água destilada. As sementes foram dispostas em placas de Petri, incubadas a 24 °C, com um fotoperíodo de 12 horas de luz. Os parâmetros avaliados incluíram: Germinação final; número de plântulas normais; o comprimento da parte aérea e o alongamento das raízes. Os resultados revelaram variações significativas possivelmente associadas às diferentes condições de preservação, indicando que a falta de padronização pode comprometer a validade dos dados. Os resultados sugerem que diretrizes mais claras para a conservação de amostras em ensaios com organismos vegetais possam ser benéficas para melhorar a reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados.

Palavras-chave: Amostra; Conservação; efluente; *Lactuca sativa*; monitoramento

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas - Instituto de Ciências da Natureza, davi.alves@sou.unifal-mg.edu.br

²Mestrando em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas - Instituto de Ciências da Natureza, arthur.aocc@gmail.com.

³Doutorando em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas - Instituto de Ciências da Natureza, joão.barbosa@sou.unifal-mg.edu.br.

⁴Pesquisador de pós-doutorado em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas - Instituto de Ciências da Natureza, antoniorodrigues.biologia@gmail.com.

⁵Mestra em Ciências Ambientais. UNIFAL-MG – Instituto de Ciências da Natureza, alexandra_dsa@hotmail.com

⁶Professor Associado IV – UNIFAL-MG, Instituto de Ciência da Natureza, sandrobarbosa@gmail.com



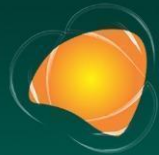
INTRODUÇÃO

Atualmente, no Brasil, ainda há uma parcela grande da população sem acesso a tratamento adequado de suas águas residuárias, causando problemas ambientais e socioeconômicos em diversas regiões do país (Montagner et al., 2017). Além disso, o aumento do consumo de água impulsionado pelo crescimento da população gera, em consequência, uma maior quantidade de efluentes, de modo que o número de estações de tratamento seja insuficiente para atender toda a população (Silva et al, 2024).

Águas residuais, classificadas como efluentes líquidos, consistem em substâncias provenientes de processos domésticos, industriais, hospitalares (Beltrame et al., 2016) e agrícolas (Aguiar et al., 2016). Essa diversidade de resíduos acarreta em uma composição mista de rejeitos sólidos, compostos químicos orgânicos e inorgânicos, partículas coloidais, metais pesados e poluentes potencialmente tóxicos à saúde dos seres vivos (Agrahari et al., 2024). Contaminantes emergentes como fármacos, microplásticos, produtos de cuidados pessoais, pesticidas e microorganismos resistentes também vem causando bastante preocupação devido à sua baixa degradabilidade (Calvelli et al., 2023).

Embora exista regulamentação para o monitoramento de contaminantes, esta não abrange especificamente o uso de espécies vegetais em bioensaios ecotoxicológicos para amostras dessa classe, além disso, sua aplicação ainda é incipiente em diversas regiões do país. (Montagner et al., 2017). Além do tratamento pré estabelecido, o amplo desenvolvimento de pesquisas também se mostra necessário para a criação e o aperfeiçoamento de métodos de monitoramento a serem aplicados ao tratamento dos efluentes. Neste cenário, ensaios ecotoxicológicos são sugeridos por agências de monitoramento como a ANA (Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico) e a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) como forma de ampliar a percepção destes contaminantes nas águas (Bertoletti, 2013). No estado de Minas Gerais, a FEAM (Fundação Estadual do Meio Ambiente) e o IGAM (Instituto Mineiro de Gestão das Águas) estão associados ao desenvolvimento de políticas públicas para abordar essas questões (IGAM, 2008).

Em biotestes de fitotoxicidade e citogenotoxicidade *Allium cepa* e *Lactuca sativa* são espécies amplamente utilizadas devido à sua sensibilidade e a padronização do comportamento resposta, sendo capazes de averiguar as alterações causadas na germinação, no desenvolvimento inicial e no ciclo celular (Santos et al. 2017; Lima et al. 2019). Além disso, modelos vegetais são frequentemente utilizados em experimentos de toxicidade devido ao seu baixo custo e pela capacidade de analisar o



efeito nocivo nos vegetais. (Simões et al.2013).

Os biotestes com modelos vegetais apresentam variações significativas nos resultados devido à diversidade genética intrínseca de cada indivíduo, bem como a efeitos de posicionamento e a eventos imprevisíveis associados aos organismos experimentais. Para minimizar essas variações, os biotestes de fitotoxicidade são realizados com um número predefinido de indivíduos, sendo geralmente conduzidos em triplicata ou quadruplicata. Os resultados são analisados por meio da comparação das médias, ao invés de comparações individuais, para assegurar a representatividade estatística dos dados (Silveira et al., 2017).

Para que os resultados dos experimentos sejam dados como confiáveis, é importante que os experimentos com amostras ambientais sejam realizados de acordo com um padrão, como o indicado na Deliberação COPAM-CERH/MG nº 8/22 de Minas Gerais (MINAS GERAIS, 2022), criada para o estabelecimento de critérios para o lançamento de efluentes, baseados em testes com organismos aquáticos. A Resolução CONAMA nº 430/11 (BRASIL, 2011), que complementa e altera a Resolução CONAMA nº 357/05 para classificação e diretrizes dos corpos de água (BRASIL, 2005), também estabelece parâmetros para o descarte apropriado de águas residuais, estipulando condições e padrões para ensaios ecotoxicológicos (Pimenta et al., 2023).

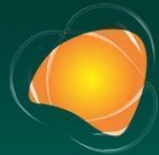
Diante do exposto, foi objetivo deste trabalho avaliar o impacto das condições de preservação de amostras de efluentes em biotestes de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*.

METODOLOGIA

Os biotestes foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (Biogen) da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), utilizando amostras de efluentes coletadas em uma estação de tratamento localizada em Poços de Caldas, MG. As amostras de efluentes foram transportadas frescas para o laboratório, onde foram fracionadas: uma alíquota foi refrigerada para a realização do primeiro bioteste, enquanto o restante do material foi congelado para uso posterior.

Foram realizados 2 experimentos: *Experimento 1*- Realizado com a amostra fresca, previamente armazenada em geladeira. *Experimento 2*- Após 3 semanas, ainda dentro do que é estabelecido para a conservação de amostras desta classe para organismos similares (CETESB, 2023), a amostra foi descongelada para a realização de outro bioteste e para a confirmação dos resultados obtidos no primeiro teste.

Em cada bioteste foram depositadas 30 sementes de *Lactuca sativa* em placas de Petri de 9 cm



de diâmetro forradas com duas camadas de papel germitest. Em seguida, 3 mL de amostra de efluente pré tratado (0,1 mL por semente) foi depositado sobre a primeira placa e na segunda, 3 mL de amostra de efluente pós tratamento. Para o controle negativo foram utilizados 3 mL de água destilada. Cada bioteste foi realizado em triplicata como ilustrado na Figura 1.

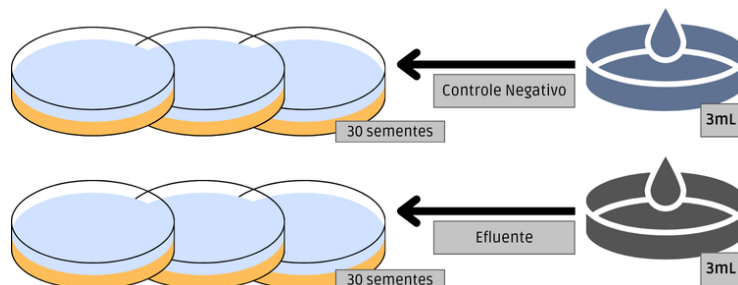


Figura 1: Delineamento ilustrativo do bioteste.

As placas foram mantidas em incubadora do tipo BOD a 24 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de ausência de luz. O posicionamento de cada placa foi determinado por delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as sementes germinadas foram contabilizadas após 24 horas, 4 dias e ao final do experimento como determinado pela Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Também foi avaliado o número de plantas normais (NPN) de cada placa ao final do experimento e aferidos o comprimento de parte aérea (CPA) e alongamento de raiz (AR) das 10 maiores plantas de cada placa através do *software* Image J (Fiji). Os resultados foram comparados através do teste de Tukey com 5% de significância com o auxílio do *software* RStudio ®.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados 1ª avaliação: Ao final do primeiro experimento (Figura 2a) foi observado que em todas as placas mais de 80% das sementes germinaram nos 4 primeiros dias após a exposição ao efluente e ao controle negativo. Contudo, em ambas as amostras (pré e pós tratamento) houve drástica redução no número de plantas normais (NPN) (Figura 2b) e conseqüentemente na média de tamanho do comprimento de parte aérea (CPA) e alongamento de raiz (CPA) das plântulas (Figura 2c).



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

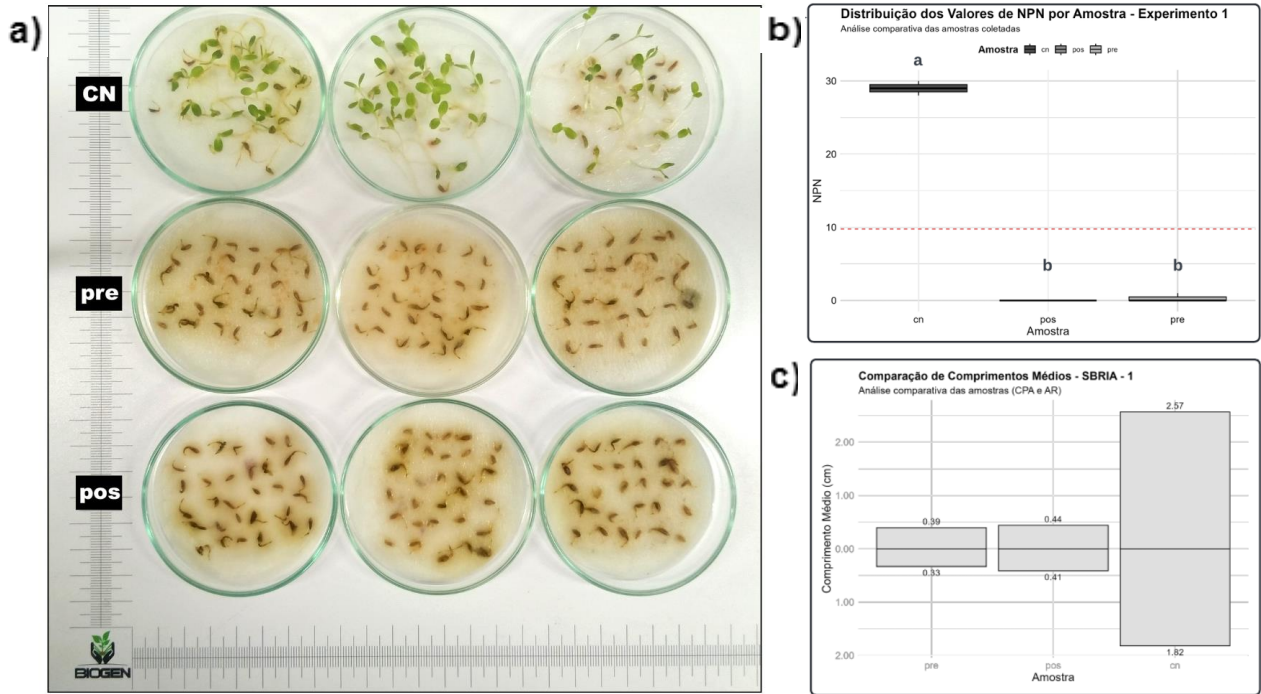


Figura 2: a) Fotografia das placas ao final do experimento 1. b) Número de plantas normais (eixo y) de cada amostra (eixo x). c) Comprimento de parte aérea e alongamento de raiz (cm) (eixo x) das 10 maiores plântulas de cada amostra.

Resultados 2ª avaliação: Mesmo com a manutenção da porcentagem de germinação, a amostra de efluente bruto apresentou um número significativamente maior número de plantas normais (NPN) ao final do experimento (Figura 3a) e uma média de tamanho do comprimento de parte aérea (CPA) e alongamento de raiz (CPA) das plântulas também consideravelmente maior (Figura 3b), quando comparado com o resultado do primeiro experimento com a mesma amostra.

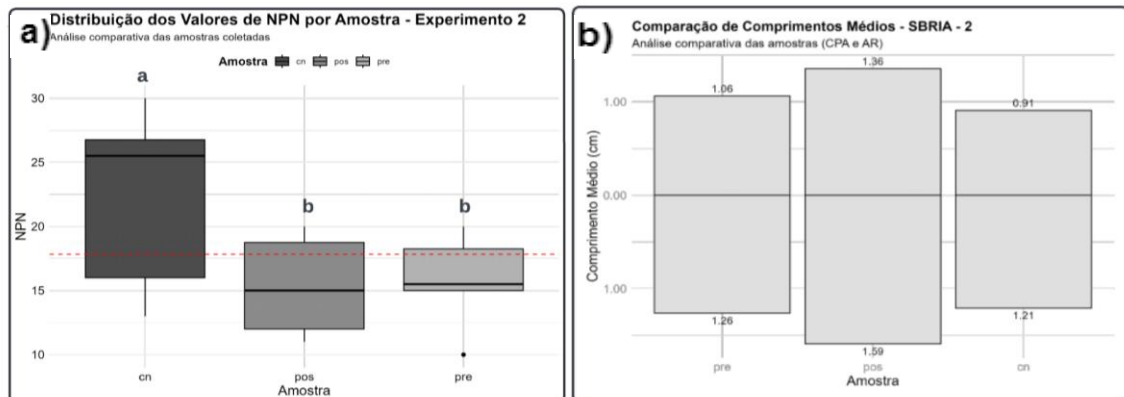


Figura 03: a) Número de plantas normais (eixo y) de cada amostra (eixo x). b) Comprimento de parte aérea e alongamento de raiz (cm) (eixo x) das 10 maiores plântulas de cada amostra.



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

Observando os resultados apresentados de forma comparativa (Figura 4), verifica-se uma distinção evidente entre o número de plantas normais (NPN) e os valores mensurados para o comprimento da parte aérea (CPA) e o alongamento da raiz (AR) em cada experimento. Essas diferenças indicam variações significativas nas respostas das plantas às condições testadas, refletindo o impacto das diferentes amostras e tratamentos nos parâmetros de crescimento avaliados.

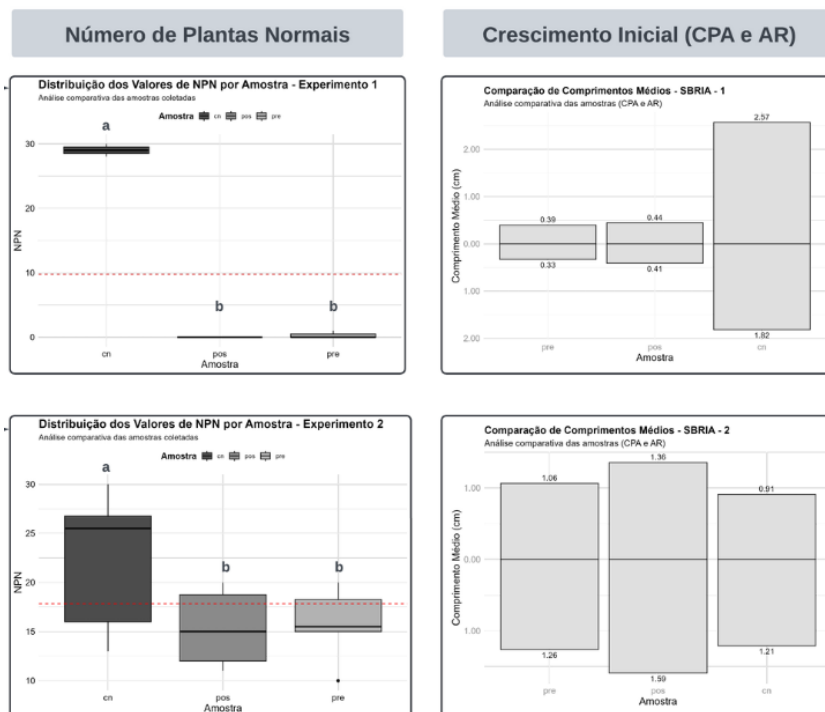


Figura 04: Comparação dos resultados do experimento 1 (acima) e experimento 2 (abaixo).

Assim, considerou-se a conservação ou a fração da amostra selecionada para o experimento como o fator relacionado à diferença dos resultados observados em cada um dos experimentos. As normas foram então revisadas para a verificação dos protocolos utilizados e foi observado que apesar das metodologias para biotestes de fitotoxicidade com espécies vegetais serem bastante estabelecidas, a conservação das amostras desta classe só é bem estabelecida nas normativas legais (COPAM-CERH/MG nº 8/22, CONAMA nº 430/11 e nº 357/05; ANA; CETESB, 2023) para outras espécies, havendo lacuna de padronização para biotestes e ensaios ecotoxicológicos com organismos vegetais que busquem aferir efeitos de amostras ambientais desta classe.

Sobre a conservação das amostras, a Resolução CONAMA nº 430/11 (BRASIL, 2011) que altera a Resolução CONAMA nº 357/05 (BRASIL, 2005), estabelece principalmente questões relacionadas aos parâmetros que as amostras devem atender e não sobre os métodos de conservação



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

destas, delegando esta função a competência de outros órgãos reguladores como estabelecido no Art. 25:

“As coletas de amostras e as análises de efluentes líquidos e em corpos hídricos devem ser realizadas de acordo com as normas específicas, sob responsabilidade de profissional legalmente habilitado.” (BRASIL, 2011)

A Deliberação COPAM CERH/MG nº 8/22 (MINAS GERAIS, 2022), também não propõem um meio específico para coleta e conservação de amostras ambientais, estipulando apenas, no Art. 8, que os laboratórios responsáveis por essa atividade devem estar em concordância com a Deliberação COPAM nº 216/17, que dispõe para as exigências de laboratórios que emitem relatórios e certificados sobre medições ambientais (MINAS GERAIS, 2017):

“A coleta das amostras, os ensaios e análises dos parâmetros de qualidade de água de que trata esta deliberação normativa deverão ser realizados por laboratórios que adotem os procedimentos de controle de qualidade analítica necessários ao atendimento das condições exigíveis, conforme Deliberação Normativa Copam nº 216, de 27 de outubro de 2017.” (MINAS GERAIS, 2011)

Neste sentido, normas como as contidas na Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 15469, 2007) contemplam melhor questões relacionadas ao tratamento de amostras desta classe. O Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras (CETESB, 2023) possui informações importantes sobre procedimentos de coleta, armazenamento e preservação de amostras para organismos como: *Mysidopsis juniae*, *Lytechinus variegatus*, *Leptocheirus plumulosus*, *Vibrio fischerii*, *Daphnia similis*, *Pimephales promelas*, *Ceriodaphnia dubia* e *Hyalella azteca*. Todavia, não contempla parâmetros de conservação das amostras para testes com organismos vegetais. Entende-se que esse guia, bem como os demais produzidos pela ANA, CETESB e outros órgãos e agências supracitados tem o foco em padronizar procedimentos relacionados a organismos aquáticos levando em consideração a premissa de que ensaios ecotoxicológicos utilizam diferentes níveis de organização biológica — desde moléculas a comunidades — para proporcionar uma avaliação abrangente dos efeitos adversos em um ecossistema (Silveira et al., 2017). Porém, ainda há uma lacuna na padronização de ensaios que



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

propõem uma análise de diferentes níveis tróficos.

Essa abordagem multiescalar é importante porque os impactos tóxicos podem se manifestar de maneiras variadas, dependendo do nível biológico considerado; por exemplo, uma substância pode causar danos celulares que não se traduzem imediatamente em efeitos populacionais de um determinado organismo, mas que, a longo prazo, podem comprometer a sobrevivência, reprodução e funcionamento de outras populações e comunidades. Assim, a utilização de diferentes níveis permite uma compreensão mais completa da toxicidade ambiental, contribuindo para a proteção eficaz dos ecossistemas e para o desenvolvimento de políticas ambientais relacionadas ao tema.

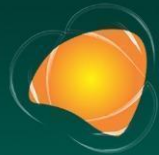
CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os biotestes conduzidos, considera-se que a preservação da amostra sob condições não padronizadas pode ter introduzido variabilidade nos resultados obtidos, potencialmente afetando a integridade química e biológica das substâncias tóxicas presentes. Condições de armazenamento, como variações de temperatura, umidade ou exposição à luz, podem catalisar processos de degradação ou inativação de compostos químicos ativos, reduzindo sua toxicidade aparente. Essa degradação pode, por sua vez, causar uma diferença nos parâmetros avaliados, comprometendo a acurácia e a reprodutibilidade dos resultados experimentais.

Assim, considera-se relevante que os órgãos e agências competentes, bem como a comunidade científica, possam trabalhar no estabelecimento de padrões claros para o armazenamento e preservação de amostras ambientais destinadas a ensaios de toxicidade de efluentes com organismos vegetais, ou na ampliação da acessibilidade a esses padrões, caso já estejam disponíveis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Funding Code 001], CAPES/BRASIL PDPG No. 1026/2022, CAPES/BRASIL PDPG-POSDOC No. 2930/2022, CAPES/BRASIL MEC/SESu/FNDE/PET. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) for their financial support and research scholarships.



REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT NBR 15469: ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA: PRESERVAÇÃO E PREPARO DE AMOSTRAS. RIO DE JANEIRO, 2007.

AGRAHARI, S.; KUMAR, S. EMERGING AND FUTURISTIC PHYTO-TECHNOLOGIES FOR SUSTAINABLE WASTEWATER TREATMENT WITH RESOURCE RECOVERY AND ECONOMICAL ASPECTS. JOURNAL OF WATER PROCESS ENGINEER, v. 65, 2024.

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVID, J. A. O. EVALUATION OF THE TOXIC POTENTIAL OF COFFEE WASTEWATER ON SEEDS, ROOTS AND MERISTEMATIC CELLS OF *LACTUCA SATIVA* L. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENT SAFETY, v. 133, p. 366–372. 2016.

BELTRAME, T. F. BELTRAME, A. F.; LHAMBY, A. R.; PIRES, V. K. EFLUENTES, RESÍDUOS SÓLIDOS E EDUCAÇÃO AMBIENTAL: UMA DISCUSSÃO SOBRE O TEMA. REVISTA ELETRÔNICA EM GESTÃO, EDUCAÇÃO E TECNOLOGIA AMBIENTAL, v. 20, n. 1, p. 283-294, 2016.

BERTOLETTI, E. CONTROLE ECOTOXICOLÓGICO DE EFLUENTES LÍQUIDOS NO ESTADO DE SÃO PAULO. COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO – CETESB, 2013.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. REGRAS PARA ANÁLISE DE SEMENTES. BRASÍLIA: MAPA/ ACS, 2009.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA Nº. 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. DISPÕE SOBRE A CLASSIFICAÇÃO DOS CORPOS DE ÁGUA E IRETRIZES AMBIENTAIS PARA O SEU ENQUADRAMENTO, BEM COMO ESTABELECE AS CONDIÇÕES E PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS.

BRASIL. RESOLUÇÃO CONAMA Nº. 430, DE 13 DE MAIO DE 2011. DISPÕE SOBRE AS CONDIÇÕES E PADRÕES DE LANÇAMENTO DE EFLUENTES, COMPLEMENTA E ALTERA A RESOLUÇÃO NO 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005, DO CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA.

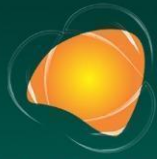
CALVELLI, J. V. B.; NEHME T. M.; OCCHIUTTO, A. A.; PIMENTA, L.; NETO, A. R. C.; SANTOS, L. V. S.; SANTOS, B. R.; SILVA, G. A.; BARBOSA, S. CONTAMINANTES EMERGENTES: UMA VISÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE O IMPACTO DOS FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE E NA SAÚDE PÚBLICA. ANTENA, 2023.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. GUIA NACIONAL DE COLETA E PRESERVAÇÃO DE AMOSTRAS. 2. ED. SÃO PAULO: CETESB, 2023.

SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, U. S. TRINDADE, L. O. R.; ASSIS, M. D. O.; CAMPOS, J. M. S.; SALGADO, E. G.; BARBOSA, S. GENOTYPES SELECTION FOR PLANT BIOASSAYS USING *LACTUCA SATIVA* L. AND *ALLIUM CEPA* L. PARK. J. BOT, v. 49, 2017.

SILVA, J. B. ET AL. RECYCLING OF MUNICIPAL SEWAGE SLUDGE FROM BRAZILIAN WASTEWATER TREATMENT PLANTS FOR THE MANUFACTURE OF ENVIRONMENTALLY FRIENDLY CERAMIC BRICKS. CASE STUDIES IN CONSTRUCTION MATERIAL, v. 21. 2024.

LIMA, M.G.F. ; SILVEIRA, G.L. ; TECHIO, V.H. ; ANDRADE-VIEIRA, L.F. EFFECTS OF THREE



EXTREMOS CLIMÁTICOS: **IMPACTOS ATUAIS** E RISCOS FUTUROS

ANTIMITOTIC AGENTS ON KARYOTYPE OF *ALLIUM CEPA* L. AND *LACTUCA SATIVA* L.: TWO PLANT MODEL SPECIES FOR CYTOGENOTOXIC ASSESSMENTS. SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY, v. 125, p. 244-250, 2019.

MINAS GERAIS. DELIBERAÇÃO NORMATIVA COPAM Nº 216, DE 27 DE OUTUBRO DE 2017. DISPÕE SOBRE AS EXIGÊNCIAS PARA LABORATÓRIOS QUE EMITEM RELATÓRIOS DE ENSAIOS OU CERTIFICADOS DE CALIBRAÇÃO REFERENTES A MEDIÇÕES AMBIENTAIS. BELO HORIZONTE, MG: SIAM, 2017.

MINAS GERAIS. DELIBERAÇÃO NORMATIVA CONJUNTA COPAM-CERH/MG Nº 8, DE 21 DE NOVEMBRO DE 2022. 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. BELO HORIZONTE, MG: SIAM, 2017.

MONTAGNER, C. C. ET AL. CONTAMINANTES EMERGENTES EM MATRIZES AQUÁTICAS DO BRASIL: CENÁRIO ATUAL E ASPECTOS ANALÍTICOS, ECOTOXICOLÓGICOS E REGULATÓRIOS. QUÍMICA NOVA, 2017.

PIMENTA, L. EM CALVELLI, J. V. B.; NEHME T. M.; OCCHIUTTO, A. A.; PIMENTA, L.; NETO, A. R. C.; SANTOS, L. V. S.; SANTOS, B. R.; SILVA, G. A.; BARBOSA, S. DIRETRIZES AMBIENTAIS LEGAIS PARA MITIGAR O POTENCIAL DE CONTAMINAÇÃO POR FÁRMACOS. EM CONTAMINANTES EMERGENTES: UMA VISÃO ECOTOXICOLÓGICA SOBRE O IMPACTO DOS FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE E NA SAÚDE PÚBLICA. ANTENA, p. 22–40, 2023.

INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS – IGAM. MONITORAMENTO DA QUALIDADE DAS ÁGUAS SUPERFICIAIS NA BACIA DO RIO PARÁ. RELATÓRIO ANUAL, 2008.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE, L. F. TOXIC EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS: COMPARATIVE INVESTIGATION USING *ALLIUM CEPA* L. AND *LACTUCA SATIVA* L. CHEMOSPHERE, v. 178, p. 359–367, 2017.

SIMÕES, M. S.; MADAIL, R. H.; BARBOSA, S.; NOGUEIRA, M. L. PADRONIZAÇÃO DE BIOENSAIOS PARA DETECÇÃO DE COMPOSTOS ALELOPÁTICOS E TOXICANTES AMBIENTAIS UTILIZANDO ALFACE. BIOTEMAS, v. 26, n. 3, 2013.