

MUTAGENICIDADE DOS POLUENTES PROVENIENTES DO MOTOR DIESEL EM PÊLOS ESTAMINAIS DO COLONE KU-20

Deuzuita S. Oliveira

Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - Av. Trabalhador São-carlense, n.º. 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.
deuzuita@sc.usp.br

Paula M. Crnkovic

Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - Av. Trabalhador São-carlense, n.º. 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.
paulam@sc.usp.br

Josmar D. Pagliuso

Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo - Av. Trabalhador São-carlense, n.º. 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.
josmar@sc.usp.br

Resumo. O propósito deste trabalho foi avaliar o potencial de risco mutagênico dos poluentes provenientes da exaustão de um motor diesel por meio da contagem de eventos mutagênicos surgidos em inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* após exposição de curta duração. Nos experimentos, a exaustão do motor Diesel foi diluída com ar atmosférico de modo a atingirem concentrações típicas de uma atmosfera poluída (50, 100 e 150 ppm de CO). Obtidos estes níveis de diluição, as inflorescências foram expostas a esta mistura de poluentes por duas horas respectivamente, e, monitorada por meio de um analisador de gás Horiba. Para se avaliar o efeito mutagênico, foi feita uma comparação das inflorescências não expostas aos poluentes (grupo 1), com as inflorescências expostas aos poluentes (grupos 2, 3 e 4). Análises estatísticas mostraram que a frequência média de mutações do grupo 1 foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 3 e 4, porém foi similar a do grupo 2. Por sua vez, os grupos 3 e 4 apresentaram um aumento percentual nas mutações em torno de 70 % em relação o controle. Os resultados indicaram que as emissões provenientes da exaustão do motor a diesel desempenham um papel significativo no desenvolvimento de mutações..

Palavras chave: motor diesel, poluição do ar, poluentes orgânicos e mutagenicidade.

1. Introdução

A variedade de substâncias lançadas na atmosfera é muito grande e freqüentemente os veículos automotores são os principais emissores de poluentes, nas cidades, com forte participação daqueles que utilizam motores diesel. Essa emissão é composta principalmente por gases como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), hidrocarbonetos totais (THC), óxidos de enxofre (SO_x), e material particulado (MP) (CETESB 2004).

De acordo com D'Amato et al. (1994), os poluentes gasosos de origem veicular lesam os tecidos epiteliais, tornando-os mais sensíveis às infecções além de atuarem como irritantes das vias aéreas. Os produtos de combustão típicos de motor diesel mostraram associações com a mortalidade por câncer de pulmão (Abbey et al. 1999) e, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC 1989) são potencialmente carcinogênicos aos seres humanos. O efeito carcinogênico da exposição a estes gases ocorre principalmente devido à inalação de material particulado, pois é na sua superfície que são adsorvidos os compostos policíclicos aromáticos (HPAs), considerados mutagêneos e carcinógenos (Huisin et al. 1978).

Medidas físico-químicas podem ser utilizadas para fornecer dados sobre a qualidade do ar, porém não podem ser usados para se prever os riscos aos quais os seres vivos estão sujeitos.

O acompanhamento de reações mostradas por determinados seres vivos na presença de poluentes atmosféricos, metodologia denominada biomonitoramento, tem sido uma ferramenta útil e importante no fornecimento de informações rápidas e seguras quanto aos efeitos antropogênicos no meio ambiente e, ainda, para prever os riscos de danos aos ecossistemas naturais e à saúde dos seres vivos expostas aos poluentes. Além disso, estes organismos bioindicadores reagem aos poluentes e a outros fatores ambientais de maneira integrada, tornando a medida da qualidade do ar mais realista sob o ponto de vista biológico (Flores 1987, Arndt & Schweiger 1991).

Espécies vegetais, por serem mais sensíveis à poluição que os animais, têm sido muito usadas como bioindicadoras em programas de biomonitoramento da qualidade do ar. Dentre as principais características que fazem com que as espécies vegetais sejam bons bioindicadores, pode-se salientar: a capacidade de diferenciar e descrever mudanças

ambientais, relevância ecológica, facilidade de cultivo, capacidade de responder aos estímulos ambientais rapidamente, entre outros (Arndt & Schweiger 1991).

Batalha et al. (1999) prepararam soluções com amostras de MP obtidas do ar do centro de São Paulo e incubaram inflorescências de *Tradescantia pallida* e verificaram que houve um aumento significativo na frequência de micronúcleos em células mães de grãos de polens (bioensaio Trad-MCN) na medida em que as soluções tornavam-se mais concentradas.

Há bioensaios bem padronizados com clones de plantas do gênero *Tradescantia* em que são utilizadas quebras cromossômicas em células mãe de grãos de pólen e eventos mutagênicos em pelos estaminais, denominados como bioensaios Trad-MCN e Trad-SH respectivamente. Para o segundo caso, os riscos mutagênicos são indicados pela mudança de cor das células.

Esses bioensaios podem ser considerados indicadores gerais de contaminação, por não responderem de maneira específica a certos poluentes atmosféricos. Porém, além de serem muito sensíveis, já mostrando reações em baixos níveis de contaminação ambiental, e rapidamente responderem aos agentes genotóxicos, foram padronizados para plantas geneticamente uniformes (clones), o que proporciona reduções na variabilidade das respostas e, conseqüentemente, uma interpretação mais segura dos resultados. São ainda de fácil execução, uma vez que não há necessidade de uso de infra-estrutura complexa de laboratório, além de serem bastante versáteis podendo ser utilizados para delimitação do potencial genotóxico de agentes presentes no ar, água e solo.

Em vista desse cenário, o objetivo deste estudo é empregar o bioensaio Trad-SH para avaliar o risco mutagênico de doses agudas de gases provenientes da exaustão de motor diesel.

2. Materiais e Métodos

A planta bioindicadora utilizada nos experimentos foi o clone KU-20 de *Tradescantia* (Fig. 1), desenvolvida na universidade de Kyoto-Japão (Ichikawa 1984). Sua origem exata é desconhecida, contudo, apresenta parte das características de *T. Ohiensis* parecendo originar-se de um híbrido entre essa espécie e uma outra não determinada (Ichikawa 1992). Para este trabalho as primeiras mudas foram cedidas pela Faculdade de Medicina da USP-SP, as quais foram cultivadas nos canteiros do NETeF da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC).



Figura 1. Clone KU-20 da *Tradescantia*.

Nos ensaios, as inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* foram expostas às emissões resultantes da exaustão do motor diesel (Fig. 2), em diferentes diluições, por 2 horas.

Para se obter as diluições desejadas, os gases do motor foram misturados com ar atmosférico, através de um misturador de gases fabricado no próprio NETeF (Fig. 2), cuja vazão foi ajustada por válvulas manuais. Estabelecido o ajuste, a mistura era continuamente conferida por um analisador de gás específico para CO (HORIBA ENDA 1400, modelo VIA-510 – Fig. 3).

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais conforme descrito abaixo:

Grupo um (controle): inflorescências colhidas no canteiro do NETeF, inseridas na câmara por duas horas, porém não submetidas à exaustão do motor.

Grupo dois: inflorescências intoxicadas com as emissões da exaustão do motor diluídas com ar atmosférico. A diluição foi feita com base na concentração de CO, que ficou em torno de 50 ppm.

Grupo três: Semelhante ao grupo dois, porém a diluição foi feita com base na concentração de CO, fixada em torno de 100 ppm.

Grupo quatro: Semelhante ao grupo dois, porém com concentração de 150 ppm. Os experimentos foram feitos no período de maio a novembro de 2004.

Após a intoxicação, as inflorescências foram retiradas das câmaras e mantidas em um becker com água sob um sistema de aeração, por aproximadamente três dias. Durante este período e diariamente, à medida que as flores se abriam, estas eram coletadas e analisadas quanto ao número de eventos de mutação nos pêlos estaminais. As coletas e análises eram feitas no período matutino, quando as flores estavam abertas.



Figura 2. Motor a diesel 2.0.



Figura 3. Misturador de gases.



Figura 4. Analisadores de gases (HORIBA).

Para se fazer a leitura ao microscópio foi feito o seguinte procedimento:

1- Primeiramente os seis estames de cada flor foram colocados lado a lado sobre uma lâmina e, sobre cada estame acrescentou-se uma gota de água;

2- Em seguida, os pêlos estaminais foram alinhados manualmente com uma pinça de modo a facilitar sua visualização.

3- Após o procedimento anterior, os pêlos estaminais foram observados sob microscópio estereoscópico marca ZEISS, modelo Stemi 2000-C acoplado com câmara AxioCam marca ZEISS modelo MRRC.

4- Após a contagem, foi feita uma estimativa do número de eventos de mutação por 1000 pêlos estaminais.

Todo esse procedimento, desde a exposição até a contagem de mutações em pêlos estaminais de *Tradescantia*, é referido comumente na literatura como bioensaio Trad-SH e está descrito em detalhes em Oliveira (2005).

Na Fig. 5 é apresentada a câmara usada para a intoxicação das plantas com os poluentes gasosos. As mesmas foram montadas com recipientes plásticos fechados com tampa rosqueável com dois orifícios, sendo um para entrada e outro para saída dos gases. estas câmaras possuem as seguintes dimensões: 12 cm de diâmetro, 19 cm de altura, conferindo um volume de 1,8 litros.



Figura 5. Câmara contendo as inflorescências da KU – 20.

Para a determinação das diferenças entre a frequência de mutações entre os grupos foi feita inicialmente a adequação do modelo estatístico. Os dados originados nos testes, por apresentarem igualdade de variância e distribuição normal, foram avaliados por análise de variância, seguida por análise de comparações múltiplas (teste de Duncam), para verificar se houve diferenças significativas entre as frequências de mutações observadas nos grupos experimentais.

3. Resultados e discussões

Embora tenha sido usada a concentração de monóxido de carbono como parâmetro para monitorar a simulação de uma atmosfera poluída, a exaustão dos motores diesel contém outros poluentes, por isso, não somente as concentrações de CO foram medidas, mas também as de THC e SO₂.

As concentrações de CO, THC e SO₂ nas emissões do motor diesel, diluídas com base na concentração de 100 ppm de CO, são mostradas na Fig. 6. Nota-se que a emissão de THC variou entre 50 e 120 ppm, estabelecendo-se um valor médio em torno de 60 ppm, enquanto que a emissão de SO₂ ficou constante em torno de 75 ppm.

Os resultados dos bioensaios indicam que a exaustão do motor diesel diluída para alcançar a concentração de 50 ppm de CO, não promoveu um aumento significativo de mutações em inflorescências do clone KU-20. Entretanto, para valores de 100 e 150 ppm os resultados apontaram um aumento nas frequências de mutações (Fig. 7).

Cabe ressaltar que as plantas das quais foram retiradas as inflorescências, tanto para o controle quanto para a exposição à exaustão do motor, encontravam-se num local onde há um fluxo considerável de veículos. Isto pode indicar certa aclimação ao ambiente poluído, diminuindo a capacidade de resposta das plantas. Observa-se, entretanto, que a concentração de CO no local onde as plantas são cultivadas está em torno de 8 ppm, média de 24 horas de aquisição e que o trânsito neste local é majoritariamente de veículos leves, com pouca presença de motores diesel.

Nota-se que os resultados apresentados pelos Grupos três e quatro indicam que, na atmosfera contendo mais do que 100 ppm de CO o índice de mutação aparentemente atingiu um limite máximo de alterações no material genético. Estes dados mostram que pode haver uma limitação no emprego do bioensaio como feito neste estudo, com perda progressiva e assintótica de sensibilidade na resposta. A exploração mais detalhada da faixa de concentração até 100 ppm, associada ao uso de diferentes tempos de ensaio pode mostrar onde o método é mais efetivo.

As inflorescências expostas a 100 ppm e 150 ppm de CO apresentaram um aumento percentual nas mutações em torno de 70% em relação ao grupo controle. Nestas emissões encontram-se, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

(HPAs) e outros compostos orgânicos, além dos óxidos de enxofre, que são conhecidos como agentes mutagênicos e carcinogênicos.

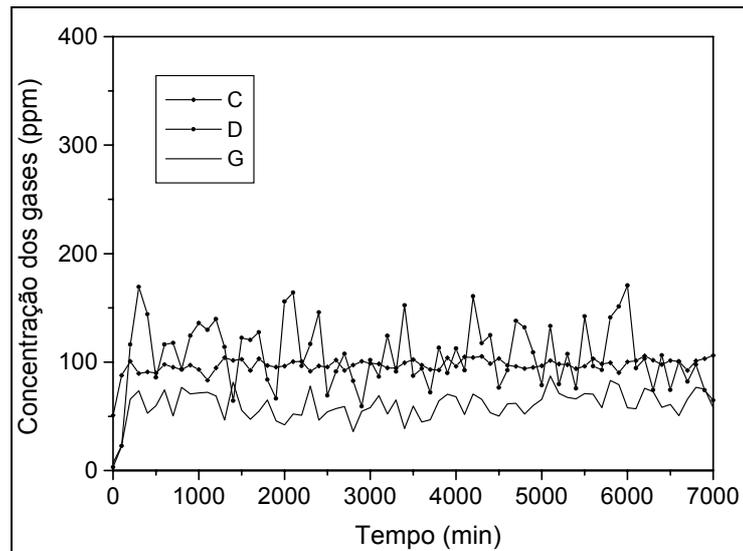


Figura 6. Concentração dos gases CO, THC e SO₂ obtidos na diluição da exaustão do motor a diesel para 100 ppm de monóxido de carbono.

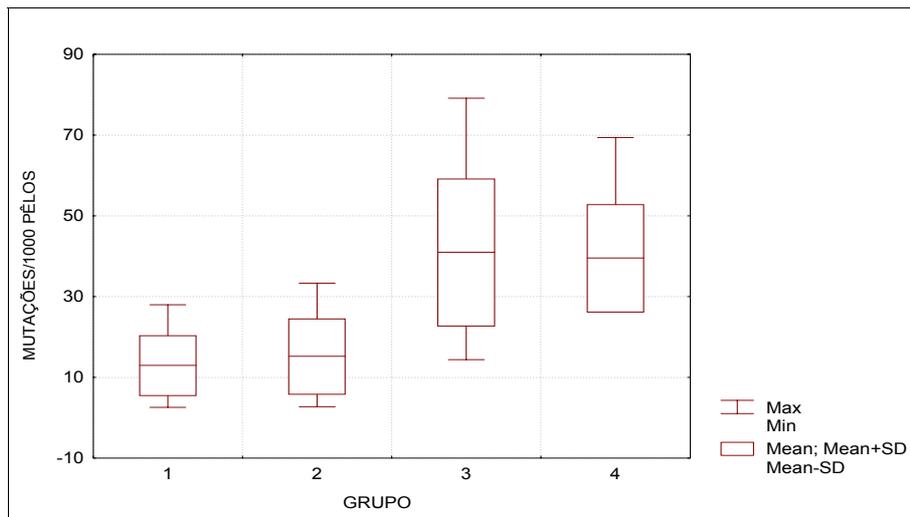


Figura 7. Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor a diesel aspirado de 2.0 L de deslocamento volumétrico.

Neste trabalho verificou-se que o bioensaio Trad-SH se mostrou eficiente para o biomonitoramento de contaminação aguda da exaustão dos motores diesel. Contudo, como esse nível de contaminação não ocorre frequentemente no meio urbano, sendo a exposição crônica a situação mais próxima da realidade, é interessante estudar respostas mutagênicas nos pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 e estabelecer as relações entre doses crônicas de exposição, ou seja, a baixas concentrações por um período maior de tempo. Além do mais, são necessários também estudos adicionais para se determinar quais são precisamente os componentes da exaustão do motor diesel, responsáveis pelas mutações.

No entanto, o bioensaio Trad-SH com o clone KU-20 de *Tradescantia* mostrou-se capaz de reconhecer, embora aparentemente de forma não linear, os diferentes níveis de concentração dos poluentes provenientes do motor. Esses resultados mostram que a exaustão do motor diesel é significativa no desenvolvimento de mutações. Portanto, é interessante o uso desse bioensaio para se avaliar o potencial de riscos mutagênicos aos organismos vivos expostos à exaustão dos veículos automotores, bem como para avaliar alguns aspectos da qualidade do ar sem o uso de equipamentos de alto custo. Pode ainda ser empregado para monitorar áreas de grande extensão.

4. Conclusões

A exaustão do motor diesel teve um papel significativo no desenvolvimento de mutações, quando diluída para alcançar concentração de CO iguais ou acima de 100 ppm (Grupo 3 e 4). No tratamento em que as inflorescências foram submetidas à emissão mais diluída (50 ppm de CO), não houve acréscimo estatisticamente significativo das mutações em pelos estaminais. Porém, a emissão mais concentrada (150 ppm de CO) não promoveu um acréscimo adicional na frequência de mutação em relação ao que já havia sido observada para o Grupo 3. Os testes mostraram que as emissões do motor Diesel causam aumento no número de mutações de organismos vivos submetidos a eles. Testes comparativos com outros combustíveis podem revelar-se importantes em uma avaliação mais completa dos impactos ambientais provocados pelo uso dos transportes. A metodologia foi adequada ao trabalho proposto e serve como parâmetros para a realização de outros trabalhos nesta linha de pesquisa, abrindo assim um leque de oportunidades para novas pesquisas. O bioensaio Trad-SH com flores estaminais do clone KU-20 mostrou-se eficiente para avaliação do potencial de risco mutagênico dos poluentes gerados na exaustão do motor diesel.

5. Agradecimentos

Ao Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NETeF), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) pela infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste trabalho.
À CAPES pelo apoio financeiro.

6. Referências

- ARDNT, U. & SCHWEIZER, B. (1991). The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical counties. In: biological monitoring: Signals from the environment (Ellenberg et al. eds.). Vieweg, Eschborn, p.199-298.
- BATALHA, J.R.F., GUIMARÃES, E.T., LOBO, D.J.A., LICHTENFELS, A.J.F.C., DEUR, T., CARVALHO, H.A., ALVES, E.S., DOMINGOS, M., RODRIGUES, G.S. & SALDIVA, P.H.N. 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research 426:229-232.
- BOHM, G.M., MASSAD, E., SALDIVA, P.H.N., GOUVEIA, M.A., PASQUALACCI, C.A., CARDOSO, L.M.N., CALDEIRA, M.P.R. & CALHEIROS, D.F. 1983. Comparative toxicity of alcohol and gasoline fueled automobile exhaust fumes. In: developments in the science and practice of toxicology (HAYES, A. W., SCHNELL, R.C. & MIYA, T.S. eds) Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 479-482.
- CETESB 2004. Relatório da qualidade do ar no estado de São Paulo. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br.
- D'AMATO, G., LICCARD, G. 1994. Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. Clinical and Experimental Allergy 24:210-219.
- FLORES, F.E.V. (1987). Uso de plantas como bioindicadores de poluição no ambiente urbano-industrial: experiências em Porto Alegre, RS, Brasil. Turbiger Geographische Studien 96:79-86.
- GUIMARÃES, E.T., DOMINGOS, M., ALVES, E. S., CALDINI, N., LOBO, D. J. A., LICHTENFELS, A. J. F. C. & SALDIVA, P. H. N. 2000. Detection of genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* – micronucleus (Trad-MCM) assay. Environmental and Experimental Botany 44:1– 8.
- ICHIKAWA, S. (1992). *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity its responses to ionizing radiation and chemical mutagens, and some synergistic effects found. Mutation research. V. 270, p. 3-22.
- OLIVEIRA, D. S. (2005). Avaliação do potencial mutagênico dos poluentes presentes na exaustão de motor a diesel por meio do bioensaio Trad-SH. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, v.1, 53p.

EVALUATION OF THE MUTAGENIC POTENTIAL OF AIR POLLUTANTS FROM DIESEL ENGINES EMISSION USING THE *TRADESCANTIA* STAMEN HAIR ASSAY (TSH)

Deuzuita S. Oliveira

Group and Thermal and Fluids Engineering, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.

deuzuita@sc.usp.br

Paula M. Crnkovic

Group and Thermal and Fluids Engineering, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.

paulam@sc.usp.br

Josmar D. Pagliuso

Group and Thermal and Fluids Engineering, School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, Av. Trabalhador São-carlense 400, 13566-590, São Carlos - SP, Brazil.

josmar@sc.usp.br

Abstract

This work is aimed at evaluating the mutagenic potential of the emission from a diesel engine using the *Tradescantia* stamen hair assay. Experimentally, the inflorescence of the KU-20 clones was kept for 2h under a simulated urban polluted atmosphere, obtained by mixing the emission from a diesel engine and atmospheric air. The CO concentration in the simulated atmosphere was monitored using a gas analyzer. The mutagenic effects of the atmosphere were analyzed by comparing a group of non-exposed control inflorescence (group one) to inflorescences kept under polluted atmospheres containing 50, 100 and 150 ppm of CO (groups two, three and four). The frequency of mutations observed in the inflorescences from group two was slightly higher than that observed in the group one. In the groups three and four, however, the frequency of mutations was significantly higher than that exhibited by the control group. The latter suggests that the emission from a diesel engine plays an important role in the development of plants mutation, especially for atmospheres containing more than 100 ppm of CO.

Keywords: Air Pollution, Diesel Engine, Organic Pollutants and Mutagenicity.