

SETAC – Brazil

Biomonitoramento *indoor* do Potencial Mutagênico dos Gases Provenientes da Queima de Incenso por Meio da Avaliação de Pêlos Estaminais da *Tradescantia*

D. S. OLIVEIRA,^{1*} P. M. CRNKOVIC,¹ V. G. F. VIANA,² P. H. N. SALDIVA,³ M. DOMINGOS⁴ & J. D. PAGLIUSO¹

¹Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NETeF) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), Avenida Trabalhador São-carlense 400, C. P. 369, CEP 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

²Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, PI, Brasil

³Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Av. Dr. Arnaldo 455, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brasil

⁴Instituto de Botânica, C. P. 4005, CEP 01061-970, São Paulo, SP, Brasil

(Received July 6, 2006; Accepted June 17, 2007)

RESUMO

O bioensaio Trad-SH, desenvolvido com o clone KU-20 de *Tradescantia*, tem-se mostrado um excelente bioindicador da qualidade do ar. Portanto, este trabalho teve por objetivo monitorar, através do bioensaio Trad-SH, o potencial mutagênico dos poluentes provenientes da queima de incensos em ambiente fechado (*indoor*). Nos experimentos, as inflorescências do clone KU-20 foram expostas por 2, 4 e 6 horas aos gases provenientes da queima dos incensos (tipo 1 e 2), em uma sala fechada com um volume de 25,83 m³. Para avaliar o efeito mutagênico foi realizada uma comparação entre as inflorescências não expostas aos gases poluentes (grupo 1, controle) e as inflorescências expostas por 2, 4 e 6 horas (grupos 2, 3 e 4, respectivamente). Análises estatísticas mostraram que a frequência média das mutações no grupo 1 foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 2, 3 e 4. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas frequências de mutações entre os grupos 3 e 4. Porém, a frequência de mutações nas inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 1 foi maior do que as do tipo 2. Os resultados indicam que o bioensaio é uma ferramenta eficaz para o monitoramento da qualidade do ar em ambientes fechados.

Palavras-chave: biomonitoramento *indoor*, bioensaio Trad-SH, mutagenicidade, poluição atmosférica.

ABSTRACT

Indoor biomonitoring of mutagenic potential of air pollutants from emission incense using the *Tradescantia* stamen hair assay

The Trad-SH has been successfully employed to qualify the environment air, which is contaminated by mutagens. So, this work is aimed at evaluating the mutagenic potential of the emission from the incense *indoor*. Experimentally, the inflorescence of the KU-20 clones was kept for 2, 4 and 6 hours the emission from the incenses (kind 1 and 2) in a closed room of 25.83 m³ of volume. The mutagenic effects of the atmosphere were analyzed by comparing a group of non-exposed inflorescence –control-(group one) to inflorescences kept under polluted atmospheres, in a closed room, for 2, 4 and 6 hours (groups two, three and four). The experimental data were analyzed using statistical methods. The frequency of mutations observed in the inflorescences from group one was significantly lower than that exhibited by the groups two, three and four. The results suggest that the emission from the incense plays an important role in the development of plants mutation and that the Trad-SH assay is a useful tool for routine *indoor* biomonitoring in environments where chemical substances are used.

Key words: air pollution, *indoor* biomonitoring, mutagenicity, Trad-SH bioassay.

*Corresponding author: Deuzuita S. Oliveira, e-mail: deuzuita@sc.usp.br.

INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica vem causando prejuízos cada vez maiores à saúde da população. Dentre as várias fontes de poluentes em ambientes fechados (*indoor*), a queima de incenso tem sido foco de estudos. Esta é uma prática comum em muitos lares há séculos, tanto por razões cerimoniais como simplesmente para aromatizar o ambiente. Com o aumento da consciência em relação à saúde, as pessoas estão atentas para os problemas causados pela queima do incenso em ambientes fechados e em ambientes públicos. O incenso é uma fonte significativa de hidrocarbonetos policíclicos aromático (HPAs), monóxido de carbono (CO), benzeno, isopreno e material particulado (MP) (Fan & Zhang, 2001), constituindo-se assim em fonte de poluição atmosférica.

A poluição atmosférica tem sido associada aos efeitos adversos à saúde, tanto em termos de mortalidade (Saldiva et al., 1994; Saldiva et al., 1995) como morbidade. Os poluentes podem potencialmente provocar efeitos genotóxicos, ou seja, induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, entre as quais quebras e aberrações cromossômicas e mutações (Ma et al., 1983; Rodrigues et al., 1997; Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000).

Estudos sobre a poluição *indoor* em residência onde há queima de incenso mostram que os níveis de poluentes excedem os padrões de qualidade do ar para ambientes fechados, causando efeitos adversos à saúde pública.

Medidas físico-químicas podem gerar dados sobre a qualidade do ar, dos níveis de poluição, mas não podem prever os riscos aos quais os seres vivos estão expostos.

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 expostos 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).

Algumas plantas do gênero *Tradescantia* são reconhecidas como excelentes indicadoras dos efeitos citogenéticos e mutagênicos, podendo ser usadas tanto em ambientes fechados (*indoor*) quanto abertos Grant (1999). Alguns bioensaios, como o Trad-SH, desenvolvido por Arnold H. S. Sparrow de acordo com Ma (1994), é excelente para testar e monitorar o grau de toxicidade de agentes genotóxicos presentes no ambiente. Apresentam grande sensibilidade, podendo detectar tais agentes em baixas concentrações.

Este bioensaio detecta mutações com base na mudança de pigmentação de azul (dominante) para rosa (recessivo),

pois as células dos pêlos estaminais são heterozigóticas para a cor, tornando possível detectar mutações com base na mudança de pigmentação de azul para rosa. A célula mutante rosa pode continuar a se dividir, dando origem a uma série de células contíguas de cor rosa, sendo esse um único evento de mutação. Duas células mutantes separadas por células azuis são consideradas como dois eventos de mutação. O aumento na frequência de mutações nos pêlos estaminais acima do valor de mutação espontânea é, portanto, um indicativo seguro de que as inflorescências estiveram em contato com agentes mutagênicos. O bioensaio é realizado através da exposição de inflorescências jovens aos agentes mutagênicos.

Aplicando o bioensaio Trad-SH, Oliveira (2005) detectou aumento significativo nas mutações de inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* exposta a doses agudas de poluentes provenientes da exaustão do motor diesel. Sant'Anna (2003) mostrou que o bioensaio Trad-SH é adequado para o biomonitoramento intensivo e de curta duração do potencial mutagênico de poluentes urbanos em locais poluídos da cidade de São Paulo. Esse bioensaio pode ser usado não somente para monitoramento intensivo de curta duração, mas também para amostragens de longa duração, como fizeram Ferreira et al. (2000).

Alves et al. (2003), aplicando o bioensaio Trad-MCN (contagem de mutações – micronúcleos – em células-mãe do grão de pólen), detectaram aumento na frequência de micronúcleos em *Tradescantia pallida* “purpúrea” exposta ao ar ambiente de herbário de fanerógamas, onde o naftaleno é empregado como inseticida.

Os resultados acima mencionados indicam que os ensaios com plantas do gênero *Tradescantia* podem ser utilizados para caracterizar o potencial mutagênico dos contaminantes, tanto *in vitro* quanto *in situ*. O bioensaio Trad-SH com flores do clone KU-20 de *Tradescantia* é mais eficiente que o ensaio Trad-MCN com inflorescências de *T. pallida* “purpúrea” em biomonitoramento de curta duração do potencial mutagênico de poluentes (Sant'Anna, 2003). O uso desse bioensaio é eficiente para monitorar o potencial mutagênico de substâncias químicas ou de poluentes aéreos e para avaliar a qualidade do ar em ambientes fechados. Pode ser usado como indicador da qualidade do ar, auxiliando na criação de normas de segurança que minimizam a contaminação ambiental.

Esses estudos abrem novos horizontes de pesquisa na área ambiental e na medicina do trabalho, pois os bioensaios com plantas são, em geral, mais sensíveis do que a maioria dos outros sistemas de avaliação da qualidade do ar (EPA, 1980). Dentre as principais características que fazem com que as espécies vegetais sejam bons bioindicadores, podem-se destacar a capacidade de responder aos estímulos ambientais rapidamente, a facilidade de cultivo e o baixo custo. O clone KU-20 é, portanto, um bioindicador eficiente e versátil que pode ser usado para biomonitoramento tanto em ambientes abertos como em ambientes fechados (*indoor*).

Diante desse cenário, o presente estudo teve por objetivo monitorar, através do bioensaio Trad-SH com flores do clone KU-20 de *Tradescantia*, o potencial mutagênico dos poluentes presentes na queima de incensos em ambiente fechado (*indoor*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NETeF) da EESC-USP, em São Carlos. O local de estudo foi uma sala com as dimensões de 2,70 m de comprimento por 3,38 m de largura e 2,83 m de altura. O biomonitoramento *indoor* foi realizado diariamente por 2, 4 e 6 horas (grupos: 2, 3 e 4, respectivamente), no período de 15 de junho a 15 de julho de 2005. Para a realização dos experimentos foram utilizados dois tipos de incensos, classificados como tipo 1 e tipo 2. O incenso tipo 1 possui a seguinte composição: essências, resinas aromáticas, carvão vegetal, madeira, corante vermelho e altura CI 16035. O incenso tipo 2: carvão, pó de madeira, fragrância e palito de bambu.

Para a realização do bioensaio Trad-SH, as primeiras mudas do Clone KU-20 foram cedidas pela Faculdade de Medicina da USP, SP, as quais foram cultivadas nos canteiros do NETeF da EESC. As inflorescências com pedúnculo entre 10 e 15 cm foram coletadas no período matutino, colocadas em béqueres com água, armazenadas e mantidas na referida sala com incenso queimando.

Para comparar o aumento da frequência de mutações nas inflorescências avaliou-se também o grupo controle (grupo 1). Esse grupo foi mantido em outra sala, com as mesmas dimensões, porém isenta de poluentes provenientes da queima de incenso.

Após as respectivas exposições dos grupos 1, 2, 3 e 4, as inflorescências foram retiradas das salas e mantidas em béqueres com água, sob um sistema de aeração, por aproximadamente três dias. Durante esse período, 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 foram realizadas no período matutino, quando as flores estavam abertas.

Para realizar a leitura ao microscópio foi utilizado o seguinte procedimento: primeiramente, os seis estames de cada flor foram colocados lado a lado sobre uma lâmina e pôs-se sobre cada estame uma gota de água. Em seguida, os pêlos estaminais foram alinhados manualmente com uma pinça de modo a facilitar sua visualização. Após este procedimento, os pêlos estaminais foram observados sob microscópio estereoscópico marca ZEISS, modelo Stemi 2000-C, acoplado à câmara AxioCam marca ZEISS, modelo MRRC. Estimou-se o número médio de pêlos estaminais para cada flor, partindo da contagem do número de pêlos em dois estames, sendo um de pétala e um de sépala. Em seqüência, foi realizada a contagem do número de eventos de mutação em todos os estames. Cada evento mutagênico foi caracterizado por uma

célula ou um grupo de células de cor rosa entre as normais de cor roxa, conforme descrito por Ma *et al.* (1994). Após a contagem, foi realizada uma estimativa do número de eventos de mutação por 1.000 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.

Análise estatística

Todos os dados obtidos neste estudo foram transformados em log 10, uma vez que os mesmos não tinham distribuição normal e/ou igualdade de variância. Em seguida foi realizada uma análise de variância paramétrica (teste F) com os dados transformados. Como a análise indicou diferença nos tratamentos, foi realizado teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls para localizá-las entre os tratamentos. O nível de significância foi ajustado em 5%.

RESULTADOS

A análise descritiva dos valores de mutação encontrados nos experimentos de exposição das inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases provenientes da queima de incenso é mostrada na Tabela 1. Na Tabela 2 são incluídas as comparações das médias, adotando-se um nível de significância de 5%. Os valores médios dos eventos de mutações e os respectivos erros-padrão observados nos quatro grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 1 e 2.

A frequência média das mutações (Figuras 1 e 2) para os incensos (tipo 1 e tipo 2, respectivamente) observadas no grupo 1 (controle) foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 2, 3 e 4. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas frequências de mutações entre os grupos 3 (4 horas de exposição) e 4 (6 horas de exposição). Observa-se aumento percentual nas mutações em relação ao controle de em torno de 15%, 20% e 25% para os grupos 2, 3 e 4, respectivamente (nas inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 1), e de 20%, 35% e 45% para os grupos 2, 3 e 4, respectivamente (inflorescências expostas aos poluentes provenientes da queima do incenso tipo 2).

DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios mostraram que a exposição por um período de 2 horas à queima de ambos os incensos já é suficiente para aumentar significativamente a atividade mutagênica em inflorescências do clone KU-20. Entretanto, para uma exposição de 6 horas os resultados apontaram que não há aumento adicional de mutagênese em comparação com o encontrado na exposição por 4 horas. As inflorescências expostas aos poluentes provenientes do incenso tipo 2 apresentaram frequência de mutação maior que aquelas expostas aos poluentes provenientes do incenso tipo 1.

Tabela 1 – Análise descritiva dos valores de mutações encontrados nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes provenientes da queima de incensos (tipo 1 e tipo 2).

Incenso tipo 1			
Grupos	Número de flores analisadas	Média	Desvio-padrão
Controle	35	8,4	3,6
2 horas	31	13,5	6,5
4 horas	33	19,4	9,3
6 horas	34	27,0	14,6
Incenso tipo 2			
Grupos	Número de flores analisadas	Média	Desvio-padrão
Controle	32	8,4	3,6
2 horas	33	20,6	10,3
4 horas	36	33,8	14,9
6 horas	34	45,1	5,1

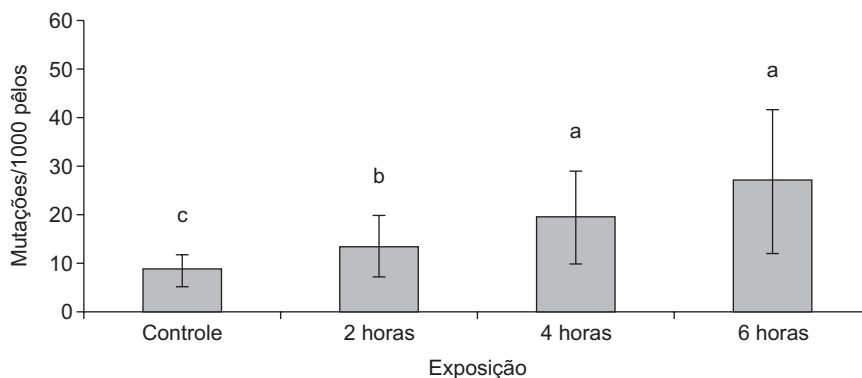


Figura 1 – Freqüência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 da *Tradescantia* causadas pelos gases provenientes da queima do incenso tipo 1. (Letras diferentes indicam diferenças significativas.)

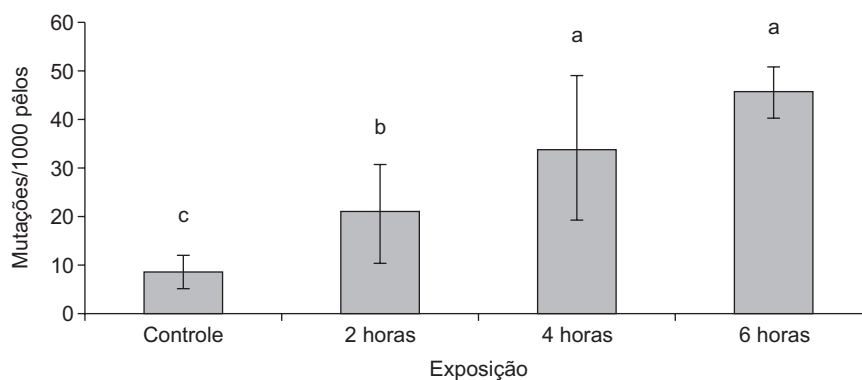


Figura 2 – Freqüência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 da *Tradescantia* causadas por gases provenientes de queima do incenso tipo 2. (Letras diferentes indicam diferenças significativas.)

O aumento da frequência de mutações encontradas nos pêlos estaminais do clone KU-20, expostos às emissões dos incensos, ocorreu, provavelmente, porque nessas emissões encontram-se, entre outros poluentes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no material particulado, com reconhecida atividade mutagênica e/ou carcinogênica (NRC, 1983). Rovieri *et al.* (1998) observaram, em condições experimentais, que alguns tipos de incensos chineses estão associados com dermatite de contato alérgica e fotossensibilização. Tung *et al.* (1999), identificaram maior concentração (23%) de material particulado (PM10) em casas que queimavam incenso do que naquelas sem atividades de poluição do ar *indoor*. Além disso, foi observado que a concentração de HPAs *indoor* geralmente excede a concentração de HPAs *outdoor* (Li, 1994). A contaminação ambiental provocada pelos HPAs provenientes da queima do incenso e a falta de ventilação desse local, provavelmente, induziram o aumento na frequência de mutações nas inflorescências, pois são compostos conhecidos como mutagênicos e carcinogênicos.

Neste trabalho verificou-se que o bioensaio Trad-SH se mostrou eficiente para o biomonitoramento de contaminação *indoor* dos poluentes provenientes da queima de incenso, pois provou-se capaz de reconhecer, embora aparentemente de forma não linear, os diferentes tempos de exposição. Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com Ma *et al.* (1994), que afirmam que os bioensaios nos quais são empregados diferentes clones de *Tradescantia* nos quais mostram-se adequados para uma rápida averiguação do perigo de substâncias mutagênicas aos sistemas biológicos, podendo o agente investigado estar diluído em meio líquido ou apresentar-se em forma gasosa.

Esses resultados provam que os gases provenientes da queima de incenso atuam significativamente no desenvolvimento de mutações. Portanto, o uso desse bioensaio é eficiente na avaliação do potencial mutagênico dos poluentes atmosféricos aos quais os seres vivos estão expostos. Embora esses resultados não possam ser diretamente extrapolados para a população humana, eles são indicativos de que, se uma substância não trouxer nenhum prejuízo ao bioindicador, que geralmente é mais sensível, também não trará nenhum prejuízo ao homem.

Além de esse bioensaio ser um bom detector de poluentes, pode também avaliar alguns aspectos relativos à qualidade do ar sem utilizar equipamentos de alto custo, podendo ainda ser empregado para monitorar áreas de grande extensão.

Agradecimentos — Os autores agradecem à CAPES e à FAPESP pelo auxílio financeiro e ao NETeF (EESC) por possibilitar a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, E. S., PEDROSO, A. N. V., DOMINGOS, M., GUIMARÃES, E. T. & SALDIVA, P. N., 2003, Biomonitoramento *indoor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. *Hoehnea*, 30: 89-94.
- ARDNT, U. & SCHWEIZER, B., 1991, The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. p. 199-298. In: Ellenberg et al. (eds.). *Biological monitoring: signals from the environmental*. Vieweg, Eschborn.
- 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. *Mutat. Res.*, 426: 229-232.
- EPA, 1980, *Current status of bioassays in genetic toxicology (Gene-Tox)*. 69p.
- FAN, C. W. & ZHANG, J. J., 2001, Characterization of emissions from portable household combustion devices particle size distributions, emission rates and factors, and potential exposures. *Atmos. Environ.*, 35(7): 1281-1290.
- FERREIRA, M. I., PETRENKO, H., LOBO, D. J. A., RODRIGUES, G. S., MOREIRA, A. & SALDIVA, P. H. N., 2000, In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emissions of a solid waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *J. of Air Waste Manage. Assoc.*, 50: 1852-1856.
- FLORES, F. E. V., 1987, Uso de plantas como bioindicadores de poluição no ambiente urbano-industrial: experiências em Porto Alegre, RS, Brasil. *Tüb. Geogr. Stud.*, 96: 79-86.
- GRANT, W. F., 1999, Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations j- a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.*, 426: 107-112.
- 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. *Environ. Exp. Bot.*, 44: 1-8.
- LI, C. S., 1994, Elemental components of residential *indoor* PM 10 in the urban atmosphere of Taipei. *Atmos. Environ.*, 28: 3139-3144.
- MA, T. H., 1994, *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.*, 310: 211-220.
- MA, T. H., ANDERSON, V. A., HARRIS, M. M. & BARE, J. L., 1983, *Tradescantia* – Micronucleos (TRA – MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environ. Mut.*, 5(2): 127-137.
- NRC (NATIONAL RESEARCH COUNCIL), 1983, *Polycyclic aromatic hydrocarbons: evaluation of sources and effects*. Committee on Pyrene and Selected Analogues, Board on Toxicology and Environmental Health Hazard, Commission on Life Sciences, National Academy Press, Washington, DC.
- OLIVEIRA, D. S., 2005, *Avaliação do potencial mutagênico dos poluentes presentes na exaustão de motor diesel por meio do bioensaio Trad-SH*. Dissertação de mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- RODRIGUES, G. S., MA, T. H., PIMENTEL, D. & WEINSTEIN, L. H., 1997, *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis – a review. *Crit. Rev. in Plant Sci.*, 16(4): 325-359.
- ROVIERE, P., ANDRISANO, V., DI PIETRA, A. M. & CAVRINI, V., 1998, 282 GC-MS analysis of incenses for possible presence of allergenic nitromusks. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17: 393-398.
- SALDIVA, P. H. N., LICHTENFELS, A. J. F. C., PAIVA, P. S. O., BARONE, I. A., MARTINS, M. A., MASSAD, E., PEREIRA, J. C. R., XAVIER, V. P., SINGER, J. M. & BÖHM, G. M., 1994, Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: A preliminary report. *Environ. Res.*, 65: 218-225.

SALDIVA, P. H. N., POPE III, C. A., SCHWARTZ, J., DOCKERY, D., LICHTENFELS, A. J. F. C., SALGE, J. M., BARONE, I. A. & BOHN, G. M., 1995, Air pollution and mortality in elderly people: a times-series in São Paulo. *Arch. Environ. Health*, 50: 159-163.

SANT'ANNA, E. T. G., 2003, *Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e metagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia*. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

TUNG, T. C. W., CHAO, C. Y. H., BURNET, J., PANG, S. W. & LEE, R. Y. M., 1999, A territory wide survey on *indoor* particulate level in Hong Kong. *Build. Environ.*, 34(2): 213-220.