

PROJETO Nº: 039202

Linha de Pesquisa: Saude do Trabalhador: relações entre saude, trabalho e meio ambiente

TITULO

Projeto Vigiar: Biomonitoramento da qualidade do ar através do ensaio em *Tradescantia pallida*.

RESUMO

A poluição gerada pela queima de biomassa em veículos automotores influencia diretamente na qualidade do ar nos centros urbanos. Estudos têm demonstrado uma relação entre os aumentos nos níveis dos poluentes atmosféricos e do número de internações por doenças respiratórias. O biomonitoramento com *Tradescantia* é uma importante ferramenta para a avaliação de risco, em especial devido à sensibilidade do método. O objetivo é monitorar a qualidade do ar na região de Teresópolis através da *T. pallida*.

PALAVRAS-CHAVE

Poluição. Biomonitoramento. *Tradescantia*

INTRODUÇÃO

A qualidade do ar atmosférico nos centros urbanos está freqüentemente comprometida por diversos fatores, implicando diretamente na qualidade de vida das pessoas que vivem nestas áreas. Entre os fatores que influenciam significativamente para reduzir a qualidade do ar nos centros urbanos, destaca-se a emissão de gases pela queima de combustível fóssil advindos dos veículos automotores. Entre os vários compostos gerados direta e indiretamente pela queima de biomassa, destacam-se os óxidos de carbono (COx), enxofre (SOx) e nitrogênio (NOx); hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA); material particulado (PM) e o ozônio (Batalha, Guimarães et al., 1999; Monarca, Feretti et al., 1999; Artaxo, Lara et al., 2003; Nastos, Paliatsos et al., 2010). Em termos de agravos à saúde humana gerados pela exposição aos poluentes atmosféricos, estudos têm demonstrado que o aumento nos níveis dos poluentes atmosféricos está associado ao aumento do número de internações hospitalares por doenças respiratórias (Saldiva, Lichtenfels et al., 1994; Braga, Saldiva et al., 2001; Farhat, Paulo et al., 2005; Cançado, Saldiva et al., 2006), tendo como população mais susceptível as crianças, idosos e portadores de doenças cardiorrespiratórias prévias, incluindo os asmáticos. A presença de um determinado poluente ou de uma mistura complexa pode ter a capacidade, em altas concentrações ou após longa exposição, de induzir danos na molécula do DNA não apenas em humanos, como também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a saúde dos ecossistemas (Isidori, Ferrara et al., 2003). Entre os muitos biomarcadores empregados para avaliação do potencial mutagênico da atmosfera, a pesquisa de micronúcleo em células de vegetais destaca-se por sua simplicidade metodológica e alta sensibilidade. O Teste de Micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores devido à simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta à exposição aos agentes genotóxicos (Batalha, Guimarães et al., 1999; Guimaraes, Domingos et al., 2000). O teste Trad-MCN foi valido por Ma e colaboradores (1984) através da exposição da plantas a 140 tipos de substâncias, com diferentes propriedades. Os Micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (Heddle, Hite et al., 1983). Refletem, portanto, a ocorrência tanto de danos estruturais quanto de segregação cromossômica, permitindo detectar a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (Evans, 1997; Sisenando, Batistuzzo De Medeiros et al., 2009).

JUSTIFICATIVA

A implantação do Projeto Vigiar e a utilização do espécime vegetal *Tradescantia pallida* como uma ferramenta no biomonitoramento da poluição atmosférica e dos danos advindo da sua exposição justifica-se pela capacidade da queima de biomassa em liberar, no ambiente, uma grande

concentração de substâncias químicas com alta capacidade de gerar danos na molécula de DNA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, material particulado, ozônio, outros). Entre estes danos, as lesões de caráter oxidativo (ex: 8-oxodG) e a formação de adutos de DNA são os mais evidenciados na literatura. Os danos na molécula, quando não reparados, podem gerar pequenos fragmentos nucleares independentes do núcleo que são originados de reações clastogênicas ou aneugênicas, podendo ser evidenciados através do ensaio de micronúcleo em células de tétrades.

OBJETIVOS

Geral:

Realizar o monitoramento da qualidade do ar através da utilização da *T. pallida* em locais de tráfego intenso de veículos na região de Teresópolis/RJ.

Específicos:

Avaliar o potencial genotóxico através da frequência de micronúcleos em células em estágio de tétrades em *T. pallida* (Trad-MCN).

Avaliar o potencial citotóxico através do ensaio de viabilidade polínica (Trad-Pólen) em *T. pallida*;

Avaliar o dano anatômico foliar em *T. pallida* exposta à poluição atmosférica.

METODOLOGIA

Ensaio de Micronúcleo em *T. pallida* (Trad-MCN):

Após o período de adaptação, serão coletadas inflorescências jovens após diferentes períodos de exposição. As inflorescências serão fixadas em solução de etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas e então transferidas para uma solução de etanol 70% para estocagem (Ma, Cabrera *et al.*, 1994). Os botões florais contendo tétrades em estágios iniciais serão dissecados e cinco lâminas por tratamento serão preparadas usando-se a técnica do carmim-acético desenvolvida por Ma e colaboradores (1994). A análise consistirá na contagem de 300 tétrades por lâmina, somando um total de 1500 células por ponto experimental, onde será determinada a frequência de micronúcleos que serão classificados segundo os critérios adotados por Fenech (1993).

Ensaio de Viabilidade Polínica em *T. pallida* (Trad-Pólen)

Será seguido o protocolo descrito por Micieta & Murín (1996). Após cada período de exposição, as flores serão retiradas e fixadas em 3:1 de etanol e ácido acético glacial. Após 24 h serão substituídas por etanol a 70%. As anteras são colocadas em lâminas de vidro e os grãos de pólen retirados com auxílio de agulhas. A lâmina será corada com aceto-carmim a 1% e coberta com lamínula, para análise da forma, tamanho e cor, evidenciando a falta de viabilidade (aborto) ou a possível ocorrência de aberrações cromossômicas (anomalias). Serão contados 3.000 polens de pelo menos 10 flores por ponto de análise e tipo de exposição.

Teste de Detecção de Dano Anatômico Foliar em *T. pallida* (Trad-Foliar)

Será seguido o protocolo descrito por Alves e colaboradores (2001). Após cada período de exposição, as amostras serão retiradas da região mediana das folhas provenientes de todos os pontos estudo e estas serão seccionadas transversalmente a mão-livre. As secções serão clarificadas com hipoclorito de sódio a 20% e, em seguida, submetidas ao processo de dupla coloração com azul de astra (1%) e safranina (1%) aquosos na proporção de 9:1, sendo montadas em glicerina a 66%. Para a obtenção de material diafanizado das superfícies adaxial e abaxial das folhas, será utilizado hidróxido de sódio (20%) e hipoclorito de sódio (20%). Após clarificação, esse material será duplamente corado com soluções aquosas de azul de alcian (1%) e safranina (0,5%). O número de estômatos e o número de células epidérmicas serão contados em 1 mm² na região mediana de três folhas, totalizando 30 campos avaliados de cada uma das superfícies. A partir desses resultados, será calculado, para cada superfície, o índice estomático.

ESTRATÉGIAS DE COLETA DE DADOS

Preparação das Floreiras

As *Tradescantias pallidas* serão cultivadas em vasos, no laboratório de toxicologia do Curso de Graduação em Farmácia da UNIFESO, seguindo o protocolo adotado por Sisenando e colaboradores (2009), e posteriormente serão transportadas para os locais de estudo.

Área de Estudo e Pontos Amostrais

O estudo será realizado no município de Teresópolis/RJ, localizado a 91 km de distância da capital do Estado (Rio de Janeiro/Brasil) e que apresenta uma população de 163.805 habitantes numa área de 770,5 Km². Segundo dados do DENATRAN (<http://www.denatran.gov.br>), a cidade apresenta uma frota de 61.152 veículos, com um índice de 2,7 habitantes por veículo. O estudo terá 03 pontos amostrais, dois pontos testes e um ponto controle. Os pontos teste serão localizados em dois locais que apresentam intenso tráfego de veículos, e o ponto controle será localizado no Campus do Vale do Paraíso/UNIFESO. Após o período de adaptação das plantas aos pontos (30 dias), as coletas de inflorescências e folhas ocorrerão de mensal e todo o material será enviado ao laboratório de Toxicologia/UNIFESO para análise.

ESTRATÉGIAS DE ANALISE E TRATAMENTO

Será realizada uma análise descritiva após tabulação dos dados em Excel 2010.

Os dados serão analisados através da análise de variância com a subsequente realização de um pós-teste de comparação entre os valores médios obtidos pelos grupos testes e controle, de forma paramétrica ou não paramétrica, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados de frequência de micronúcleo, aborto de pólen, e dano foliar serão correlacionados e será realizada uma análise multivariada. As análises estatísticas serão realizadas no programa SPSS[®] versão 16.

BIBLIOGRAFIA

Alves, E. S., P. M. Giusti, *et al.* Anatomic studies on *Tradescantia* hybrid clone 4430 leaves: changes caused by urban air pollution. Rev. Bras. Bot., v.24, n.4, p.597-576. 2001.

Artaxo, P., L. B. L. S. Lara, *et al.* Dry and wet deposition in Amazonia: from natural biogenic aerosols to biomass burning impacts. IGAC Newsletter, v.27, p.12-16. 2003.

Batalha, J. R. F., E. T. Guimarães, *et al.* Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v.426, n.2, p.229-232. 1999.

Braga, A. L., P. H. Saldiva, *et al.* Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. Pediatr. Pulmonol., v.31, n.2, Feb, p.106-113. 2001.

Cançado, J. E., P. H. Saldiva, *et al.* The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. Environ. Health Perspect., v.114, n.5, May, p.725-729. 2006.

Evans, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. Mutat. Res., v.392, n.1-2, Aug 1, p.5-10. 1997.

Farhat, S. C., R. L. Paulo, *et al.* Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. Braz. J. Med. Biol. Res., v.38, n.2, Feb, p.227-235. 2005.

Fenech, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat. Res., v.285, n.1, Jan, p.35-44. 1993.

Guimaraes, E. T., M. Domingos, *et al.* Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. Environ. Exp. Bot., v.44, n.1, Aug 1, p.1-8. 2000.

Heddle, J. A., M. Hite, *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., v.123, n.1, Sep, p.61-118. 1983.

Isidori, M., M. Ferrara, *et al.* In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). Chemosphere, v.52, n.1, p.121-126. 2003.

Ma, T. H., G. L. Cabrera, *et al.* Tradescantia micronucleus bioassay. Mutat. Res., v.310, n.2, Oct 16, p.221-230. 1994.

Ma, T. H., M. M. Harris, *et al.* Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. Mutat. Res., v.138, n.2-3, p.157-167. 1984.

Micieta, K. e G. Murín. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment. Environ. Exp. Bot., v.36, n.1, p.21-27. 1996.

Monarca, S., D. Feretti, *et al.* Monitoring of mutagens in urban air samples. Mutat. Res., v.426, n.2, May 19, p.189-192. 1999.

Nastos, P. T., A. G. Paliatsos, *et al.* Outdoor particulate matter and childhood asthma admissions in Athens, Greece: a time-series study. Environ Health, v.9, p.45. 2010.

Saldiva, P. H., A. J. Lichtenfels, *et al.* Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. Environ. Res., v.50, n.2, p.218-225. 1994.

Sisenando, H. A., S. R. Batistuzzo De Medeiros, *et al.* Tradescantia pallida: more than a beautiful flower, an important indicator of environmental quality. Genetic. na Escola, v.04, n.02, p.9-13. 2009.

CRONOGRAMA

Etapas	Mês/Ano
Pesquisa bibliográfica	Abril/2011 – Dezembro/2011
Compra do Material e Confecção dos vasos	Abril/2011
Envio das plantas aos locais de Análise	Julho/2011
Ensaio Trad-MCN (genotoxicidade)	Agosto, Setembro, Outubro e Novembro/2011
Ensaio Trad-Pólen (Citotoxicidade)	Agosto, Setembro, Outubro e Novembro/2011
Ensaio Trad-Foliar (Dano anatômico foliar)	Agosto, Setembro, Outubro e Novembro/2011
Análises estatísticas dos dados, confecção do artigo e do relatório final.	Dezembro/2011
Entrega do relatório final	Janeiro/2012

ORÇAMENTO

Item	Descrição do Material	Preço unitário	Qtde	Unid.	Valor Estimado
1	Lâmina laboratorial 26 x 76 x 1,0 cm, de vidro, lisa, extremidade fosca, caixa com 50 unidades.	5,00	20	Cx.	100,00
2	Lamínula laboratorial, 18 x 18 mm, de vidro, caixa com 100 unidades.	5,00	40	Cx.	200,00
3	Pinça Anatômica, 10 cm, em aço inox, acabamento polido.	15,00	04	Un.	60,00
4	Sonda exploradora, 10 cm, em aço e com ponta dupla.	15,00	04	Un.	60,00
5	Espiriteira de vidro a álcool	15,00	04	Un.	60,00
6	Corante Carmim (frasco com 25 gramas)	300,00	01	Un.	300,00
7	Ácido Acético PA, frasco de 1.000 ml	25,00	02	Lt.	50,00
8	Álcool etílico 70%, desinfetante à base de álcool etílico a 70%, para superfícies fixas, frasco de 1.000 ml.	10,00	10	Lt.	100,00
9	Coletor Universal Opaco 80 ml não estéril pacote c/100	0,50	100	Un.	50,00
10	Floreira em Polietileno (50 x 17 x 17 cm).	10,00	60	Un.	600,00
11	Adubo à base de NPK (Nitrogênio, Fósforo e Potássio - 10:10:10), embalagem de 1 Litro.	5,00	10	Lt.	50,00
12	Humus de minhoca	5,00	10	Kg	50,00
13	Vermiculita fina	5,00	10	Kg	50,00
14	Substrato Vegetal (tipo Plantmax [®])	20,00	20	Kg	400,00
15	Corante azul de Alcian (frasco com 25 gramas)	100,00	1	Un.	100,00
16	Corante azul de Astra (frasco com 25 gramas)	100,00	1	Un.	100,00
17	Corante Safranina (frasco com 500 ml)	90,00	1	Un.	90,00
18	Glicerina PA	120,00	1	Lt.	120,00
Valor total estimado (Reais)					2.540,00

ANEXO

Nenhum