

**Teste de micronúcleo com *Tradescantia Pallida* aplicado ao
Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia**

CAMPOS JUNIOR, E.O; KERR, W. E

Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Biologia, Departamento de genética e bioquímica, Campus Umuarama, CEP 38400-902 - Uberlândia, MG – Brasil; email: edimarcampos@yahoo.com

Abstract

Tradescantia micronucleus test applied to Biomonitoring air quality in the city of Uberlândia

The city of Uberlândia in recent years has become the largest wholesale center in Latin America, which brought a significant deterioration of the environmental quality of air due to the increased traffic of vehicles, especially those of large load that are running on diesel. The urban atmosphere of the city contains complex mixtures of air pollutants, including mutagenic and carcinogenic substances. In this study, the genotoxic potential of six different locations in the city of Uberlândia was tested using the test Micronucleus with *Tradescantia pallida*. Twenty young inflorescences of *T. pallida* were collected from each site studied in two different seasons of the year (summer and winter). A total of 300 tetrades per slide was analyzed. The frequency of micronucleus was expressed as the number of micronucleus per hundred tetrades. Simultaneously, the levels of total suspended particles were determined in each place of study. A significant difference in the frequency of micronucleus was observed between the plants of Industrial Sectors exposed in the center-city, with those placed in another setting used as controls ($p < 0.05$). Tests revealed a considerably genotoxic potential in these environments. A positive correlation ($p < 0.05$) was observed between the frequency of micronucleus and the levels of suspended particles.

KEY-WORDS: Biomonitoring, micronucleus, *Tradescantia*

Resumo

A cidade de Uberlândia se tornou nos últimos anos o maior centro atacadista da América Latina, o que lhe trouxe uma significativa deterioração da qualidade ambiental do ar devido ao aumento do tráfego de veículos, especialmente os de grande porte, que são movidos a diesel. A atmosfera urbana da cidade passou a conter complexas misturas de poluentes, incluindo substâncias mutagênicas e carcinogênicas. Neste estudo, o potencial genotóxico de seis localidades diferentes da cidade foi testado utilizando-se o Teste de Micronúcleos com *Tradescantia pallida*. Vinte inflorescências jovens de *T. pallida* foram coletadas de cada local estudado em duas estações diferentes do mesmo ano (verão e inverno). Um total de 300 tétrades por lâmina foi analisado. As frequências de micronúcleos foram expressas como o número de micronúcleos por cem tétrades. Simultaneamente, os níveis de partículas totais suspensas foram determinados em cada local de estudo. Uma significativa diferença na frequência de micronúcleos foi observada entre as plantas expostas nos setores industrial e centro-urbano, com as que foram colocadas em outro ambiente utilizado como controle ($p < 0,05$). Os testes revelaram um considerável potencial genotóxico nestes ambientes. Uma correlação positiva ($p < 0,05$) foi observada entre a frequência de micronúcleos e os níveis das partículas suspensas.

PALAVRAS-CHAVE: Biomonitoramento, micronúcleo, *Tradescantia*

INTRODUÇÃO

A cidade de Uberlândia tornou-se nos últimos anos é o maior centro atacadista da América Latina o que lhe trouxe uma significativa deterioração da qualidade ambiental do ar devido ao aumento do tráfego de veículos, especialmente os de grande porte, que são movidos a diesel. Entre os poluentes gasosos mais freqüentes na atmosfera urbana destacam-se o dióxido de enxofre (SO₂), os nitratos (NO₃) e óxidos de nitrogênio o monóxido de carbono, material particulado, benzeno, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (ALVES, S.E. et al., 2001). O ar das grandes cidades tem sofrido um acréscimo significativo nas taxas de substâncias que são inóspitas ou impróprias aos organismos vivos, inclusive aos seres humanos, podendo a poluição aérea ser vista também como um caso de saúde pública

(HENDERSON, B.E. et al., 1975; Bohm, 1982).

A poluição atmosférica é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos tipos de exposição que mais afeta a saúde humana pela sua potencialidade de causar infecções respiratórias, câncer, doenças crônicas respiratórias e cardiovasculares (Yu, 2001).

A influência de agentes químicos e físicos sobre a frequência de mutações tem sido amplamente estudada por meio da análise de alterações observadas na *Tradescantia*, uma planta utilizada como bioindicador destas alterações (Grant, 1994).

O interesse na utilização de angiospermas para a detecção de agentes ambientais com potencial mutagênico tem sido crescente. *Tradescantia* é uma espécie que apresenta fácil adaptação em qualquer

ambiente e pode se desenvolver durante todo o ano, tanto ao ar livre, nas regiões subtropicais, quanto em estufas, em qualquer parte do mundo. O tamanho, relativamente pequeno, e o cariótipo formado por seis pares de cromossomos relativamente grandes tornaram essa planta um instrumento favorável para estudos citogenéticos (Carvalho, 2005).

A *Tradescantia pallida* é uma espécie muito comum, encontrada com facilidade em jardins e canteiros de várias cidades. É uma espécie tetraplóide, extremamente resistente a parasitas e insetos, que brota e cresce facilmente, florescendo o ano inteiro (SUYAMA, F. et al., 2002).

A avaliação das alterações genéticas de *Tradescantia* pode ser feita tanto pela detecção de mutações em células somáticas, quanto por aberrações cromossômicas em células germinativas induzidas por agentes clastogênicos que estão presentes no ar, solo e água, para tal, foram

desenvolvidos diversos testes, como o teste do micronúcleo que foi desenvolvido para a detecção de eventos clastogênicos durante a meiose (Carvalho, 2005).

O teste de micronúcleo realizado com *Tradescantia* (TMN-TRAD) é um dos ensaios mais comumente utilizados para a detecção de efeitos genotóxicos em organismos. O teste é fundamentado na formação de micronúcleos, que são resultantes de quebras nos cromossomos durante a meiose dos grãos de pólen das inflorescências da *Tradescantia* ssp. Este ensaio foi originalmente desenvolvido a fim de testar os efeitos genotóxicos do 1,2-dibromoetano (MA et al., 1978). Desde então, o teste tem sido aplicado em diversos estudos realizados para avaliar o potencial mutagênico de diversos agentes (RODRIGUES G.S. et al., 1997; MONARCA S. et al., 1999; GUIMARÃES E.T. et al., 2000; ISIDORI M. et al., 2003). Este estudo teve como objetivo biomonitorar o

potencial genotóxico causado pela poluição de seis setores da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil por meio do Teste de Micronúcleos com *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt *var. purpúrea*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Biológico

As plantas *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt *var. purpurea* utilizadas nesse trabalho foram cultivadas na casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia, seguindo o protocolo proposto por Ma et al., 1994. Um fotoperíodo de 16 horas diárias de luz foi aplicado para induzir a floração. As plantas cresceram em vasos com volume de 1L, adaptados para o método de exposição. A fertilização e irrigação também foram sistematicamente controladas. A taxa de mutação espontânea do estoque de plantas da casa de vegetação foi

monitorada em intervalos regulares, não excedendo os níveis de dois micronúcleos a cada 100 tétrades. A produção de mudas a partir de uma mesma matriz garantiu a isogenicidade das amostras.

4.2. Locais monitorados

Foram escolhidas seis localidades para monitoramento, incluindo o ambiente Controle. Os pontos de exposição estavam localizados em diferentes pontos da cidade de Uberlândia-MG. O critério utilizado para a seleção dos locais de exposição das plantas foi apresentar um tráfego diferenciado quanto à quantidade e o tipo de veículos presentes (movido a álcool e gasolina ou movido a óleo diesel). Os 6 pontos adotados foram: a casa de vegetação da Universidade Federal de Uberlândia (Controle); um bairro residencial da cidade (Bairro Custódio- Pereira); o Terminal Central de Transporte

Coletivo; um movimentado cruzamento do centro da cidade (Avenida João Naves de Ávila); uma Rodovia Federal que corta a cidade (BR 050) e o Setor Industrial.

4.3. Exposição

Para a realização do teste de micronúcleo 20 plantas foram simultaneamente expostas, por 30 horas, nas diferentes localidades e em duas estações diferentes do ano (verão e inverno).

A exposição das plantas foi em recipientes plásticos com capacidade para um litro. Os recipientes foram colocados em caixas com suporte para os mesmos, de forma a proteger as plantas do excesso de vento e insolação. As dimensões das caixas eram de 25cm X 25cm X 35cm, foram cobertas com sombrite para 50% de luminosidade nas dimensões de 25cm X 25cm X 11cm e ficaram entre 2m e 2,5m do solo e com uma distância mínima de 1m entre uma

e outra caixa segundo Klumpp et al., 2006.

4.4. Teste do micronúcleo

Após a exposição, as inflorescências jovens das plantas foram colhidas e fixadas imediatamente em solução 3:1 (etanol: ácido acético). As amostras foram levadas ao Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia e, após 24 horas, foram conservadas em etanol 70 % até o momento das análises. Para cada local monitorado, 20 botões florais com células de grão de pólen em estado de tétrade foram utilizados. Para cada lâmina, foram avaliadas 300 tétrades ao microscópio de luz (Nikon YS2 Alphaphot - sob magnificação de 400 X), quanto à presença de micronúcleos. As anteras obtidas dos botões coletados foram maceradas com bastão de vidro sobre lâmina para microscopia após gotejamento com o corante carmim acético. Após a maceração e limpeza

(descarte dos fragmentos das anteras), a lâmina foi coberta com lamínula e rapidamente aquecida a 80 °C para fixação do corante nas tétrades. As frequências de micronúcleos foram registradas em cada lâmina (número de micronúcleos em 300 tétrades) e expressas em termos de número de micronúcleos por 100 tétrades (Ma et al., 1994).

4.5. Amostragem de Material Particulado

Simultaneamente aos testes biológicos, foi quantificada a concentração do Material Particulado presente nos locais avaliados por meio do uso de um Amostrador de Grandes Volumes (*AGV-MP10*), cedido pelo departamento de química da Universidade Federal de Uberlândia, objetivando analisar a presença de correlação entre os resultados obtidos

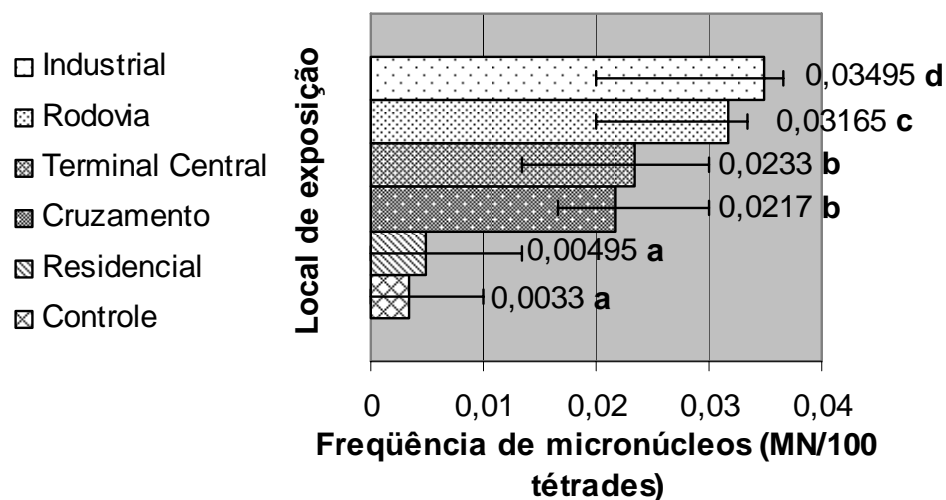
pelos métodos físico-químico e biológico.

4.6. Análise Estatística

As diferenças entre as frequências de micronúcleos dos grupos controle e expostos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis e comparadas entre os diferentes locais de exposição pelo Teste de Dunn. Os índices obtidos pela amostragem de material particulado foram analisados da mesma maneira. Os resultados obtidos pelo TMN-TRAD e pela amostragem de material particulado foram correlacionados pelo Teste de Correlação Linear de Spearman. Valores de P inferiores a 0,01 e inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significantes para os testes de correlação e comparação de medianas, respectivamente (Callegari-Jaques, 2006).

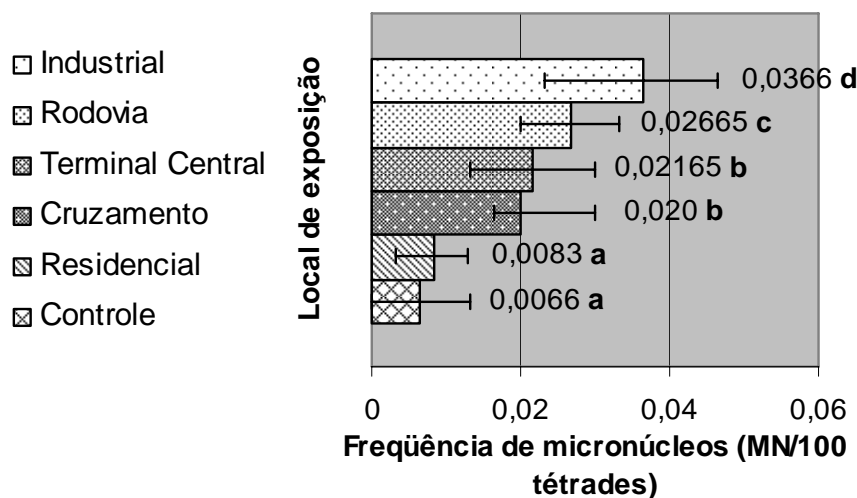
RESULTADOS

Figura 1. Frequência de micronúcleos apresentada pelas plantas expostas aos ambientes analisados durante o Verão de 2007/2008 (Dezembro-Fevereiro).



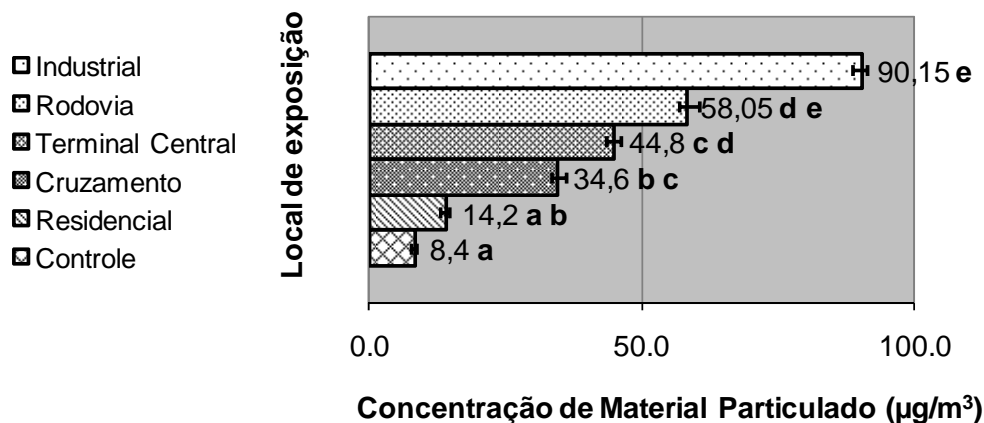
Medianas seguidas por diferentes letras, nas barras, são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, Dunn; $H= 88,166$; $p < 0,01$).

Figura 2. Frequência de micronúcleos apresentada pelas plantas expostas aos ambientes analisados durante o Inverno de 2008 (Junho-Agosto).



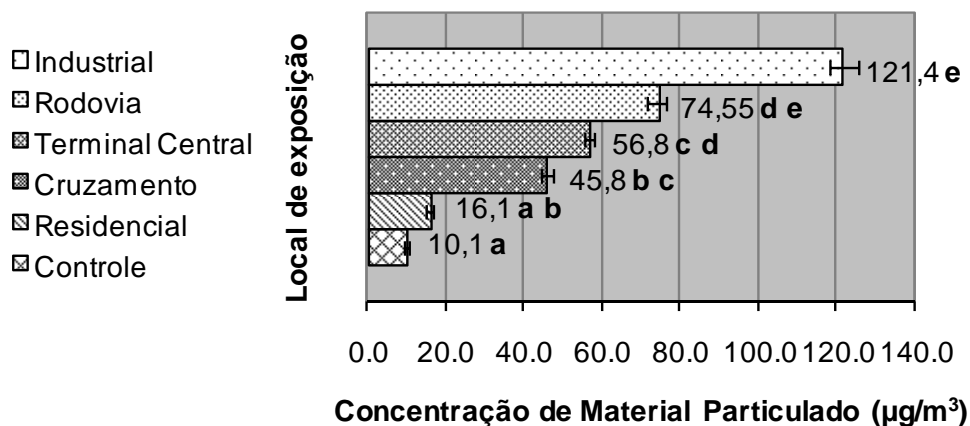
Medianas seguidas por diferentes letras, nas barras, são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, Dunn; $H= 101,020$; $p < 0,01$).

Figura 3. Concentração de Material Particulado em suspensão presente nos locais comparados durante o período de exposição no Verão de 2007/2008 (Dezembro-Fevereiro).



Medianas seguidas por diferentes letras, nas barras, são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, Dunn; $H= 22,459$; $p < 0,01$).

Figura 4. Concentração de Material Particulado em suspensão presente nos locais comparados durante o período de exposição no Inverno de 2008 (Junho-Agosto).



Medianas seguidas por diferentes letras, nas barras, são significativamente diferentes (Kruskal-Wallis, Dunn; $H= 22,400$; $p < 0,01$).

Figura 5. Correlação Linear de Spearman entre as taxas de Micronúcleos e a concentração de Material Particulado no Verão 2007/2008 ($r_s = 0,942913$; $p < 0,05$).

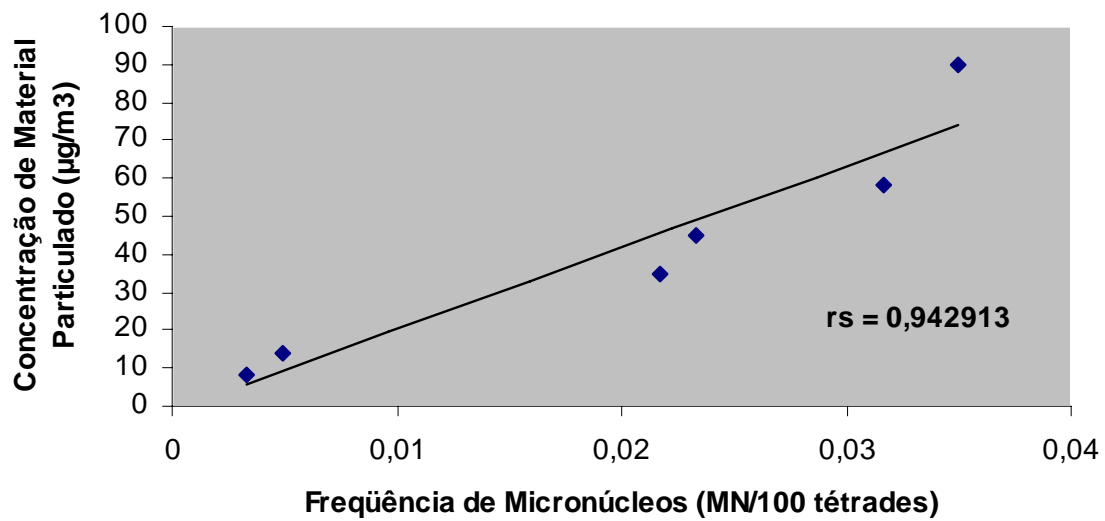
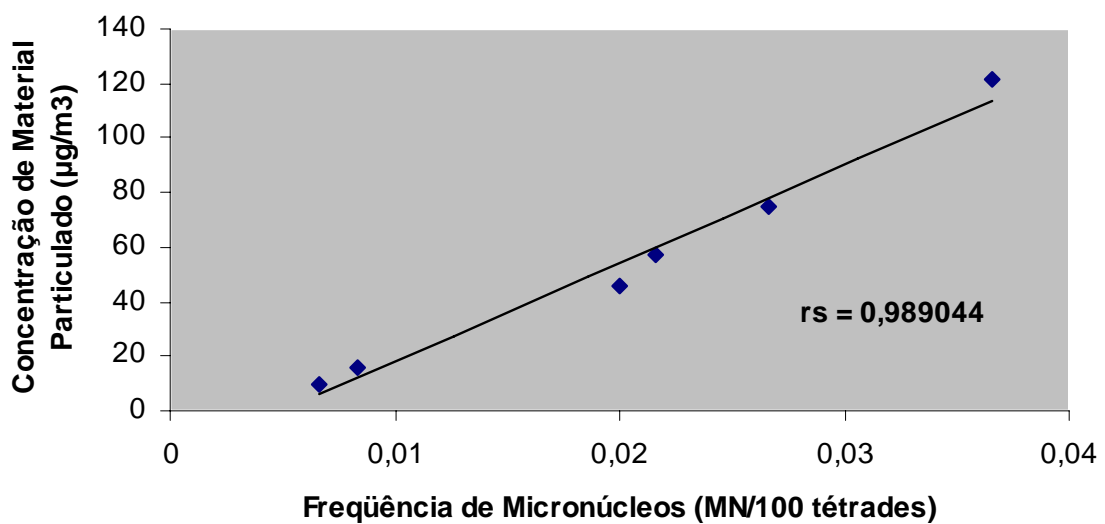


Figura 6. Correlação Linear de Spearman entre as taxas de Micronúcleos e a concentração de Material Particulado no Inverno 2008 ($r_s = 0,989044$; $p < 0,05$).



Como mostrado nas figuras 1 e 2, as taxas de micronúcleos observadas nos grupos controles de ambas as estações do ano foram baixas. A figura 1 revela que houve diferenças significativas nas frequências de micronúcleos apresentadas pelas plantas expostas aos ambientes durante a estação do verão foram constatadas entre o grupo controle e os grupos expostos, exceto no bairro residencial, sendo que os maiores índices de tétrades micronucleadas ocorreram no setor industrial ($p < 0,01$). Durante o inverno, manteve-se o mesmo padrão de resultados encontrados no verão com relação à diferença entre as taxas de micronúcleos verificadas nos grupos controle e expostos (Figura 2).

As Figuras 3 e 4 apresentam os valores referentes à concentração de material particulado presente nos locais comparados durante o período de exposição nas estações de verão e

inverno. Em ambas as análises, foram obtidos o mesmo padrão de resultado, em que o local utilizado como controle conteve um índice baixo de material particulado. Entretanto, os amostradores localizados no cruzamento entre terminal central, a rodovia e o setor industrial registraram índices de material particulado significativamente ($p < 0,01$) diferentes dos observados no local controle.

Para integrar os resultados dos bioensaios com o método analítico de amostragem de material particulado foram realizadas correlações lineares entre as taxas de micronúcleos e a concentração de material particulado de cada estação período de exposição avaliado. As figuras 5 e 6 indicam correlações positivas estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre as variáveis relacionadas de modo que elevadas concentrações de material particulado

estão associadas a taxas também elevadas de micronúcleos.

DISCUSSÃO

Dados da qualidade do ar, gerados através de medidas físico-químicas dos níveis de poluição, apesar de importantes, não podem ser usados diretamente para prever os riscos a que a população está sujeita, já que os organismos vivos reagem aos poluentes aéreos e a outros fatores ambientais de maneira integrada, dessa forma, o biomonitoramento, onde reações da vida são usadas para identificar e/ou caracterizar mudanças antropogeneticamente induzidas na qualidade do ar, é mais eficaz para esse fim (Carvalho, 2005). O monitoramento convencional da qualidade do ar pela análise qualitativa e quantitativa dos componentes presentes na atmosfera é importante por fornecer informações sobre o risco potencial da presença de alguns compostos. No entanto, o

monitoramento biológico é indispensável na complementação dos resultados, na medida em que revela os efeitos causados pelos poluentes *in vivo*. Os dados obtidos com experimentos utilizando a *Tradescantia* são, em geral, consistentes, precisos e confiáveis. Em especial, a resposta a baixos níveis de radiação e mutágenos químicos raramente é obtida com outros ensaios biológicos (KLUMP A. et al., 2006).

O presente estudo evidenciou que locais com fluxo elevado de veículos apresentam altos índices de poluentes. O tráfego de veículos rodoviários é amplamente reconhecido como consequência do desenvolvimento das grandes cidades (Fenger, 1999; COLVILE R.N. et al., 2001). Este incremento na frota automotiva tem causado efeitos graves nas condições ambientais e na saúde humana pela emissão de complexas misturas de substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo mutágenos e carcinógenos

como benzeno, material particulado, metais pesados e hidrocarbonetos aromáticos (SKOV H. et al., 2001; GÁBELOVA A. et al., 2004). Os dados obtidos permitiram evidenciar diferenças nas estações inverno e verão, que pode ser explicado pelo fenômeno da inversão térmica que ocorre na estação de inverno.

Os ensaios deste trabalho mostraram que um significativo incremento nas taxas de mutação foi observado nas localidades em que as plantas foram diretamente expostas a situações de elevada emissão do tráfego, principalmente de veículos pesados, movidos a diesel. A correlação linear positiva obtida sugere o efeito direto dos elevados índices de material particulado nos eventos de mutagênicos observados. Monarca et al (2001) monitoraram os níveis de material particulado com amostradores de grande volume, no entanto não relacionaram esses resultados com nenhum bioensaio.

Os resultados apresentados corroboram outras investigações, nas quais o TMN-TRAD mostrou respostas sensíveis à presença de elementos genotóxicos provenientes da emissão automotiva e da poluição atmosférica em geral (MA T.H. et al., 1978; MONARCA S. et al., 2001; KIM J.K. et al., 2003; KLUMP A. et al., 2006).

CONCLUSÃO

O teste de correlação realizado revela a eficiência do TMN-TRAD no monitoramento da genotoxicidade dos ambientes estudados, sendo assim estudos que envolvem marcadores para contaminação individual, populacional e do ambiente são relevantes por fornecerem parâmetros que possibilitem avaliar e prever os efeitos da poluição atmosférica, visto que os dados obtidos provaram a Consistência, precisão e a confiabilidade do teste. Este tipo de estudo apresenta uma série de vantagens que o torna ideal para ser utilizado em

países em desenvolvimento, pois é um sistema rápido, pouco dispendioso, versátil e que requer um período de treinamento curto com uso de pouco equipamento técnico, podendo servir como teste para uma grande variedade de estudos (KLUMPP A. et al., 2006).

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor DR. Warwick Estevam Kerr, Dr. Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo, e a todos os colaboradores e pesquisadores do Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia, ao professor Euclides Pereira, por colaborar com os dados da amostragem, a FAPEMIG, pelo apoio financeiro referente à bolsa de iniciação científica concedida para realização do trabalho, enfim, todos aqueles que participaram ativamente da pesquisa e conseguintes resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S.E.; GIUSTI, P.M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P.H.N.; GUIMARÃES, E.; LOBO, D.J.A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, 2001, v.24, p. 567-576.
- BÖHM, G.M. Air pollution and lung cancer. **Cancer Detection and Prevention**, 1982, v.5, p. 371-374.
- CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2006, 255p.
- CARVALHO, H.A. A *Tradescantia* como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. **Radiologia Brasileira**, 2005, v.38, p. 459-462.

COLVILE, R.N.; HUTCHINSON, E.J.; MINDELL, J.S.; WARREN, R.F. The transport sector as a source of air pollution. **Atmospheric Environment**, 2001, v.35, p.1537-1565.

FENGER, J. Urban air quality. **Atmospheric Environment**, 1999, v.33, p. 4877-4900.

GÁBELOVÁ, A.; VALOVICOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; BINKOVÁ, B.; SRÁM, R.J.; FARMER, P.B. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. **Mutation Research**, 2004, v. 563, p. 49-59.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, 1994, v. 310, p. 175-185.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI Jr, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.H.N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia* micronucleus (TRAD-MCN) assay. **Environmental and Experimental Botany**, 2000, v. 44, p.1-8.

HENDERSON, B.E.; GORDON, R.J.; MENCK, H.; SOOHOO, J.; MARTIN, S.P.; PIKE, M.C. Lung cancer and air pollution in Southcentral Los Angel coutry. **American Journal of Epidemiology**, 1975, v. 101, p.477-488.

ISIDORI, M.; FERRARA, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. In situ monitoring of urbana ir in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices

(SPMDs). **Chemosphere**, 2003, v. 52, p. 55-61.

KIM, J.K.; SHIM, H.S.; LEE, J.H.; LEE, J.J.; LEE, J.H. Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the *Tradescantia* micronucleus assay and by chemical analysis. **Mutation Research**, 2003, v. 541, p. 55-61.

KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G.; BELLUZZO, N.; CALATAYUD, V.; CHAPLIN, N.; GARREC, J.P.; GUTSCHE, H.J.; HAYES, M. HENTZE, H.W.; KAMBEZIDIS, H.; LAURENT, O.; PEÑUELAS, J.; RASMUSSEN, S.; RIBAS, A.; RO-POULSEN, H.; ROSSI, S. SANZ, M.J. SHANG, H.; SIFAKIS, N.; VERGNE, P. EuroBionet: a Pan-European biomonitoring network for urban air quality assessment. **Environmental Science & Pollution Research**, 2006, v.9, p.199-203.

MA, T.H.; CABREA, G.L.; CHEN, R.; GILL, B.S.; SANDHU, S.S.; VANDENBERG, A.L.; SALAMONE, M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**, 1994, v.310, p. 221-230.

MA, T.H.; SPARROW, A.H. SCHAIRER, L.A. NAUMAN, A.F. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. **Mutation Research**, 1978, v. 58, p.251-258.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZANARDINI, A.; FALISTOCCO, E.; NARDI, G. Monitoring of mutagens in urbana air samples. **Mutation Research**, 1999, v. 426, p. 189-192.

MONARCA, S.; FERETTI, D. ZANARDIDNI, A; MORETTI, M.; VILLARINI, M.; SPIEGELHALDER, B.; ZERBINI, I.; GELATTI, U.;

LEBBOLO, E. Monitoring airborne genotoxicans in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. **Mutation research**, 2001, v. 490, p.159-169.

RODRIGUES, G.S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 1997, v. 16, p.325-359.

SKOV, H. HANSEN, A.B.; LORENZEN, G. ANDERSEN, H.V.; LOFSTROM, P.; CHRISTENSEN, C.S. Benzene exposure and the effect of traffic pollution in Copenhagen,

Denmark. **Atmospheric Environment**, 2001, v. 35, p. 2463- 2471.

SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2002, v. 34, p. 127-129.

YU, M.H. Environmental Toxicology: Impacts of Environmental Toxicants on Living Systems. **Lewis Publishers**, 2001, v.1, p.23-26.