

CETESB

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

DIRETORIA DE PESQUISA

GERÊNCIA DE PESQUISA DE AR E RUÍDO

16550

CETESB - CIA. DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL

BIBLIOTECA

Av. Prof. Frederico Leoni, Jr., 345 - CEP. 05459 - Pinheiros

SÃO PAULO - BRASIL

PROJETO - 456.652 - VERIFICAÇÃO DA
TOXICIDADE DE DIVERSAS SUBSTÂNCIAS
PRESENTES NA EMISSÃO DE VEÍCULOS A
DIESEL, PRINCIPALMENTE SUBSTÂNCIAS
EXISTENTES EM MATERIAL PARTICULADO

DEZEMBRO/1984

8	8210
	C3385
	16550

DIRETORIA DE PESQUISA

Prof. Samuel Murgel Branco

ASSISTENTE TÉCNICO-CIENTÍFICO

Prof. Aristides Almeida Rocha

ASSISTENTE ADMINISTRATIVA

Eng^a Neusa Monteiro de Arruda Juliano

GERÊNCIA DE PESQUISAS DE AR E RUÍDO

Eng^o Gabriel Murgel Branco

EQUIPE TÉCNICA

Eng^o Homero Carvalho

Eng^o Alfredo Silvio Castelli

Eng^o Wanderley Costa

Técnico Alcides Pascutti

Técnico Claudio Domiciano de Souza

Técnico Joaquim Marcolino

Técnico João Vilas Boas Neto

Datilógrafa Maria Cleumãria da Silveira Porta

1. INTRODUÇÃO

Em 27.11.84, foram coletadas nas instalações da Massey Ferguson Perkins S/A, em São Bernardo do Campo, São Paulo, 4 amostras de material particulado emitido por motores ciclo Diesel que estavam em operação nas bancadas de ensaio.

A coleta das amostras foi feita tendo em vista a confirmação, através do teste de Ames, de característica mutagênica das amostras coletadas anteriormente em motor Diesel de 6 cilindros, (Relatório de 06.08.84, amostras 7 e 13).

Nesta série de 4 ensaios foram realizadas algumas alterações na metodologia e nos equipamentos de amostragem, visando eliminar as possíveis interferências nos resultados causadas pelo equipamento utilizado naquela ocasião.

2. METODOLOGIA E EQUIPAMENTOS

As amostras foram coletadas de um motor Perkins de seis cilindros, modelo 6354, alimentado com óleo diesel de padrão comercial.

Foram selecionados dois regimes de velocidade angular e carga, realizando-se duas amostragens, com tempos de 1 e 3 minutos respectivamente.

A título de acompanhamento, foram coletadas nas mesmas condições de operação, amostras para verificação do grau de enegrecimento BOSCH.

TABELA 1 - CONDIÇÃO DE OPERAÇÃO DO MOTOR

Motor	Veloc. (RPM)	Carga (%)	Tempo de Amostr. (min)	Amostras
6354	1400	50	1	1
	1400	50	3	2
	2800	50	1	3
	2800	50	3	4

TABELA 2 - GRAU DE ENEGRECIMENTO

AMOSTRA	GRAU DE ENEGRECIMENTO
1	0,1
2	0,1
3	1,0
4	1,0

As amostras foram coletadas com o auxílio de um sistema de amostragem composto por bomba de vácuo, porta filtro de 142 mm de diâmetro e sonda coletora de vidro, conectada ao ponto de tomada de amostras localizado no coletor de escape do motor.

As amostras destinadas ao Teste de Ames foram coletadas com membranas de filtro de acetato de celulose, Millipore RAWP 14250, 1,2 µm e 142 mm de diâmetro, enquanto que aquelas destinadas à medição do grau de enegrecimento foram coletadas com filtros de papel BOSCH 1680009004 de 45 mm de diâmetro. Utilizou-se para a medição do grau de enegrecimento o medidor ótico BOSCH EFAW 68A.

As amostras foram dissolvidas em dimetil sulfóxido (DMSO) e então submetidas ao teste de Ames, cujo resultado é positivo quando a razão de mutagenicidade (M.R.) é maior ou igual a 2.

TABELA 3 - TESTE DE AMES
Detecção de Substâncias Mutagênicas

Nº DOC	AMOSTRA	RAZÃO DE MUTAGENICIDADE (M.R.)					
		TA-98		TA-100		TA-1535	
		Sem S-9	Com S-9	Sem S-9	Com S-9	Sem S-9	Com S-9
74.429	1	0,95	1,15	0,95	0,70	1,08	1,19
74.430	2	0,91	1,37	0,85	0,76	0,63	1,19
74.431	3	0,75	0,76	0,87	0,79	0,82	1,19
74.432	4	0,98	1,44	0,76	0,80	0,70	1,19

OBSERVAÇÕES:

1. TA-98, TA-100 e TA-1535 são cepas de bactéria *Salmonella* *tiphimurium*.
2. S-9 é um ativador enzimático preparado a partir de um homogenado de fígado de rato.

3. ANÁLISES DOS RESULTADOS:

O exame da TABELA 3 mostra que todas as amostras apresentaram atividade mutagênica negativa (M.R.<2).

Este resultado, antagônico ao obtido na primeira série de ensaios, pode ter sido causado pelos seguintes fatores:

- a) face a dúvida que se levantou quanto a adequação da bomba de amostragem empregada na série de ensaios anterior (bomba de aspiração por embolo BOSCH EFAW 65 A), resolveu-se empregar um sistema de amostragem constituído por sonda de vidro conectada ao porta filtro através de mangueira plástica e finalmente uma bomba de aspiração/sucção. Empregou-se uma sonda de vidro devido a alta temperatura (400°C) dos gases de escape coletados no ponto de tomada de amostras do motor.

Este arranjo contornou de maneira satisfatória o problema da temperatura da amostra, contudo verificou-se uma deposição apreciável de partículas de carbono no trecho inicial da sonda, junto ao motor, as quais deixaram de ser coletadas no filtro, falseando assim a precisão da coleta.

Em se considerando a influência da técnica de amostragem nas amostras, temos que os resultados de mutagenicidade apresentados podem estar demonstrando uma atividade biológica menor que a real.

- b) Consideramos que as amostras, pelo fato de não terem sido dissolvidas em DMSO imediatamente após a coleta, tiveram maximizada a possibilidade de conversão química de substâncias contidas nas partículas.

4. CONCLUSÕES

As amostras podem não ter apresentado atividades mutagênica positiva devido as características da técnica de amostragem utilizada.

O trabalho de amostragem e de medição do grau de enegrecimento esteve a cargo do Engenheiro Homero Carvalho e do Estagiário Marco Antonio Saltini, da CETESB, contando com o acompanhamento dos Engenheiros Ary F. Favero e João Carlos Sebastiany, da Massey Ferguson Perkins S.A.

Os testes de Ames foram realizados pela Divisão de Microbiologia da CETESB.

TESTE DE AMES

O teste de Ames é um teste "in vitro" que utiliza cepas de bactéria *Salmonella Tiphimurium* para a detecção de substâncias que são potencialmente mutagênicas ou cancerígenas.

As cepas das bactérias utilizadas perderam a capacidade de se desenvolver na ausência da histidina, devido a uma alteração genética. A ação de uma substância potencialmente mutagênica provoca a reversão do processo, possibilitando que as bactérias se desenvolvam na ausência da histidina.

A frequência desta mutação reversa é medida pelo número de colônias formadas e então comparada com o número formado pela ação do "branco".

A razão entre o número de colônias formadas sob a ação da substância pesquisada e o número formado pela ação do "branco", é conhecida como Razão de Mutagenicidade (R.M.).

Considera-se como amostras positivas aquelas que apresentam R.M. maior ou igual a 2.

Para se detectar os agentes que necessitam de ativação metabólica para apresentar ação mutagênica, o teste inclui extrato de microssomas de fígado de rato (porção S-9) que tenha sido tratado com agentes indutores de ação enzimática (p. ex: PCB).

Estudos realizados demonstram alta correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade, sendo que 90% de conhecidos carcinogênicos testados apresentaram resultado positivo e 87% dos não carcinogênicos testados apresentaram resultado negativo ($R.M < 2$).

Estas e outras evidências que indicam que grande parte das substâncias carcinogênicas também são mutagênicas, pode ser explicada pelo fato de que as substâncias que apresentam esta característica causam câncer através de mutação somática.

O teste é de grande utilidade como triagem de fontes potenciais de compostos mutagênicos e carcinogênicos e vem sendo utiliza

do em diversos estudos internacionais de avaliação toxicológica do material particulado emitido por motores diesel.

PROJETO : 456.652 -- VERIFICAÇÃO DA TOXICIDADE DE DIVERSAS SUBSTÂNCIAS PRESENTES NA EMISSÃO DE VEÍCULOS A DIESEL PRINCIPALMENTE SUBSTÂNCIAS EXISTENTES EM MATERIAL PARTICULADO.

RELATÓRIO

Em 29.05.84, foram coletadas nas instalações da MASSEY FERGUSON PERKINS S.A, em São Bernardo do Campo, São Paulo, 26 amostras de material particulado emitido por motores ciclo diesel que estavam em operação nas bancadas de ensaio.

A coleta das amostras foi feita tendo em vista a verificação, através do TESTE DE AMES, (vide anexo) de caráter mutagênico e carcinogênico da porção solúvel presente nas amostras.

METODOLOGIA E EQUIPAMENTOS

As amostras foram coletadas de motores modelo PERKINS 4236, 6354 e 6358 alimentados com óleo diesel de padrão comercial, fornecido pela PERKINS. Foram selecionados diversos regimes de velocidade angular e carga, conforme TABELA 1, sendo que foram coletadas duas amostras para cada regime (P e V).

A título de acompanhamento, foram coletadas nas mesmas condições de operação, amostras para verificação do grau de enegrecimento BOSCH.

TABELA 1 - CONDIÇÃO DE OPERAÇÃO DO MOTOR

MOTOR	VELOCIDADE (RPM)	CARGA (%)	AMOSTRAS
4236	2.800	100	1P. 1V
	2.800	50	2P. 2V
	2.800	0	3P. 3V
	1.500	100	4P. 4V
	1.500	50	5P. 5V
6354	2.800	100	6P. 6V
	2.800	50	7P. 7V
	1.400	100	8P. 8V
	1.400	50	9P. 9V
6358	3.000	100	10P. 10V
	3.000	50	11P. 11V
	1.600	100	12P. 12V
	1.600	50	13P. 13V

As amostras foram coletadas com o auxílio de uma bomba de amostragem, de aspiração por êmbolo BOSCH EFAW 65 A, conectada em série com as sondas de amostragem existentes nos sistemas de exaustão de gás das bancadas de ensaio.

As amostras destinadas ao TESTE DE AMES foram coletadas, com membranas - filtro de acetato de celulose, Milipore RAWP 04700, 1,2 μ m e 45 mm de diâmetro, colocadas em série com filtros de papel BOSCH 1680009004, para aumentar sua resistência mecânica enquanto que aquelas destinadas à medição do grau de enegrecimento foram coletadas com filtros de papel BOSCH 1680009004 de 45 mm de diâmetro. Utilizou-se para a medição do grau de enegrecimento o medidor ótico BOSCH EFAW 68 A.

As amostras P foram dissolvidas em 2,6ml de dimetil sulfoxido (DMSO) e então submetidas ao TESTE DE AMES. As amostras que apresentaram resultado positivo, ou seja, razão de mutagenicidade maior ou igual a 2, tiveram sua amostra similar V submetida à extração líquida com diclorometano e o resíduo ressuspendido em 2,6ml de DMSO. Após a extração, foram submetidas ao TESTE DE AMES.

RESULTADOS

1- Grau de Enegrecimento (média de 2 amostras)

AMOSTRA	GRAU DE ENEGRECIMENTO
1	3,6
2	0,2
3	0,1
4	4,3
5	0,5
6	4,7
7	0,1
8	4,9
9	0,1
10	4,4
11	0,1
12	4,9
13	0,1

2 - TESTE DE AMES - DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS MUTAGÊNICAS

Nº DOC	AMOSTRA	RAZÃO MUTAGENICIDADE (R.M.)					
		TA-98		TA-100		TA-1535	
		sem S-9	com S-9	sem S-9	com S-9	sem S-9	com S-9
36.620	1 P	0,94	0,84	1,14	0,91	0,75	1,07
36.621	2 P	0,94	0,86	1,00	0,89	0,86	1,04
36.622	3 P	0,74	0,83	0,89	1,02	0,78	1,06
36.623	4 P	1,00	0,75	1,05	0,88	0,92	1,41
36.624	5 P	1,11	0,78	1,12	1,08	0,84	1,18
36.625	6 P	1,13	0,86	1,23	1,33	0,92	1,16
36.626	7 P	1,04	0,84	1,35	1,26	0,84	2,55
36.627	8 P	0,87	0,90	1,22	1,11	1,12	1,25
36.628	9 P	1,12	0,92	0,97	1,00	0,91	1,56
36.629	10 P	1,21	1,16	0,94	1,08	0,65	0,96
36.630	11 P	1,50	1,47	1,50	1,13	0,88	0,94
36.631	12 P	1,02	1,29	1,31	0,92	0,80	1,64
36.632	13 P	0,93	0,97	1,06	1,08	0,69	2,24
36.633	7 V	1,09	1,56	1,02	0,99	0,75	1,22
36.634	13 V	0,98	1,41	0,94	0,88	1,08	1,66

OBSERVAÇÕES :

- 1 - TA-98, TA-100 e TA-1535 são cepas da bactéria Salmonella tiphimurium
- 2 - S-9 é um ativador enzimático preparado a partir de um homogenado de fígado de rato

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Das 13 amostras P, verificou-se atividade mutagênica positiva nas amostras 7 P e 13 P quando testadas frente a cepa TA-1535 com S-9. As amostras 7 V e 13 V apesar de apresentaram atividade mutagênica negativa frente às três cepas testadas demonstraram uma Razão de Mutagenicidade (RM) próxima a 2.

Acredita-se que a diferença dos resultados obtidos nas amostras P e V possa ser devido a perdas por volatilização ocorridas durante o armazenamento das amostras V em temperatura ambiente e/ou por extração incompleta.

Observou-se que as amostras 7 e 13 (P e V) foram obtidas em condições de 50% de carga e apresentaram baixo grau de enegrecimento. Portanto, temos uma condição em que embora haja uma menor emissão em massa de material particulado do que nos regimes a plena carga, ocorre uma maior emissão de hidrocarbonetos. Sabe-se que dentre as diversas espécies existentes no gás de exaustão, temos os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que são reconhecidamente cancerígenos e tidos por vários pesquisadores como os maiores responsáveis pela atividade mutagênica observada em amostras submetidas ao TESTE DE AMES. Pode-se observar que nas amostras 9 P e 11 P, também coletadas em condições de 50% de carga, os valores de R.M. se aproximam de 2.

Curiosamente, as amostras 2 P, 3 P e 5 P coletadas respectivamente em condições de 50%, 0% e 50% de carga não apresentam a mesma tendência, visto os resultados obtidos não diferirem significativamente daqueles obtidos com amostras coletadas em condições de 100% de carga. Excluindo-se possíveis problemas de amostragem, temos que as amostras 2 P, 3 P e 5 P foram coletadas de um motor de 4 cilindros enquanto que as amostras 7 P, 9 P, 11 P e 13 P são oriundas de motores com 6 cilindros. Sabe-se que os extratos submetidos ao TESTES DE AMES apresentam um variado grau de mutagenicidade dependendo das características do motor. Não deve-se desconsiderar portanto a influência do modelo do motor sobre os resultados.

Deve-se observar ainda que a técnica de amostragem utilizada talvez não seja a mais apropriada visto termos uma grande perda de carga na membrana filtro o que pode provocar perda de componentes voláteis presentes nas

partículas devido ao vácuo parcial formado durante a sucção da amostra.

No caso de influência da técnica de amostragem nas amostras, temos que os resultados de mutagenicidade apresentados podem estar demonstrando uma atividade biológica menor que a real.

Finalmente, consideramos que as amostras P, pelo fato terem sido dissolvidos em DMSO imediatamente após a coleta, tiveram minimizada a possibilidade de conversão química das substâncias contidas nas partículas.

CONCLUSÕES

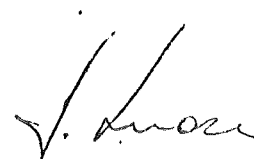
1 - Foi observada atividade mutagênica positiva em duas das 26 amostras coletadas.

2 - As demais amostras podem não ter apresentado atividade mutagênica positiva devido às características da técnica de amostragem utilizada.

O trabalho de amostragem e medição do grau de enegrecimento esteve a cargo dos Engenheiros Alfred Szwarc e Homero Carvalho da CETESB contando com o acompanhamento do Engenheiro João Carlos Sebastiany da MASSEY FERGUSON PERKINS S/A.

Os TESTES DE AMES foram realizados pela Divisão de Microbiologia da CETESB.

São Paulo, 06 de agosto de 1.984


ENGº MEC. ALFRED SZWARC

REG. Nº 01.2310-0

CREA Nº 96.777/D

TESTE DE AMES

O TESTE DE AMES é um teste "in vitro" que utiliza cepas da bactéria SALMONELLA TYPHIMURIUM para a detecção de substâncias que são potencialmente mutagênicas ou cancerígenas.

As cepas das bactérias utilizadas perderam a capacidade de se desenvolver na ausência da histidina, devido a uma alteração genética. A ação de uma substância potencialmente mutagênica provoca a reversão do processo, possibilitando que as bactérias se desenvolvam na ausência da histidina.

A frequência desta mutação reversa é medida pelo número de colônias formadas e então comparada com o número formado pela ação do "branco". A razão entre o número de colônias formada sob a ação da substância que está sendo pesquisada e o número formado pela ação do "branco" é conhecida como Razão de Mutagenicidade (R.M.). Considera-se como amostras positivas aquelas que apresentam R.M. maior ou igual a 2.

Para se detectar os agentes que necessitam de ativação metabólica para apresentar ação mutagênica, o teste inclui extrato de microsomas de fígado de rato (porção S9) que tenha sido tratado com agentes indutores de ação enzimática (por exemplo: PCB).

Estudos realizados demonstram alta correlação entre mutagenicidade e carcinogenicidade, sendo que 90% de conhecidos carcinogênicos testados apresentaram resultado positivo e 87% dos não carcinogênicos testados apresentaram resultado negativo (R.M. < 2).

Estas e outras evidências que indicam que grande parte das substâncias carcinogênicas também são mutagênicas pode ser explicada pelo fato de que as substâncias que apresentam esta característica causam câncer através de mutação somática.

O teste é de grande utilidade como triagem de fontes potenciais de compostos mutagênicos e carcinogênicos e vem sendo utilizado em diversos estudos internacionais de avaliação toxicológica do material particulado emitido por motores diesel.

Date	12/6/87
Time	10:00
Location	12/6/87
Remarks	