

ESTUDO COMPARATIVO DA TOXIDEZ AGUDA DE COMBUSTÍVEIS AUTOMOTIVOS UTILIZANDO *ESCHERICHIA COLI*

José Roberto Guimarães e Wilson de Figueiredo Jardim*

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas - Cx.P. 6154 - 13081 - Campinas - SP

Recebido em 16/3/92; cópia revisada em 20/7/92

Short-term toxicity tests using *Escherichia coli* were carried out for mixtures of vehicle fuels and their individual components. For a bacterial suspension contaminated with 1% (V/V) of MEG fuel (a mixture containing 33% methanol, 60% ethanol, and 7% gasoline) the bacterial doubling time was of 107 min, while at 2% (V/V), a total inhibition in the respiration was detected. For the non-stressed culture (control) the doubling time was of 26 min. When the bacterial suspension was contaminated with pure methanol in the concentration of that used in the MEG fuel, the doubling time was of 28 min. The results show that MEG fuel is more toxic to *E. coli* than pure methanol probably due to synergic interactions. The decreasing order of fuel toxicity was MEG > Ethanol > Gasoline, whereas for the individual components the sequence was Ethanol > Gasoline > Methanol. Toxicity tests using gasoline (88% gasoline and 12% ethanol) and ethanol fuels (95% ethanol and 5% gasoline), as well as their individual components were also carried out.

Keywords: fuel oxygenates, toxicity, *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

No cenário atual, as fontes tradicionais de energia tais como o carvão, o gás natural e a energia nuclear não podem ser aproveitadas no setor de transportes com grande êxito sob o aspecto custo/benefício ou risco/benefício. Desta maneira, as misturas de hidrocarbonetos, principalmente a gasolina e mais recentemente o óleo diesel têm sido os principais combustíveis no suprimento de parte da demanda energética e principalmente da indústria automotiva¹. Com a crise mundial do petróleo, por volta de 1973, muitos foram os países que dedicaram esforços para a obtenção de outros recursos energéticos, principalmente fontes de energias renováveis²⁻⁵.

O metanol é um combustível que vem se firmando como um dos mais promissores para o futuro. Esta substância já foi utilizada em motores desde a segunda guerra mundial⁶ e devido à escassez sazonal do etanol no mercado brasileiro, o metanol volta a ocupar um lugar de destaque dentre os combustíveis alternativos.

Os produtos emitidos na queima da mistura combustível metanol/gasolina, contendo desde 0 a 100% (V/V) de metanol e a várias temperaturas, têm sido largamente pesquisados. As principais substâncias estudadas são os hidrocarbonetos, o monóxido de carbono, os óxidos de nitrogênio, o formaldeído e o próprio metanol⁷⁻¹⁰.

O metanol, sendo um composto de cadeia orgânica muito pequena, tende a apresentar uma oxidação mais completa do que outros combustíveis (por exemplo a gasolina), que possuem cadeias longas de carbono, necessitando um maior número de reações para a completa oxidação a dióxido de carbono¹¹.

Os efeitos tóxicos do metanol em exposições agudas e crônicas são fartamente documentados²⁻⁵. A penetração desse composto no organismo pode ocorrer por três vias: a respiratória, a cutânea e a digestiva, sendo que a probabilidade de absorção é maior pelas vias respiratória e cutânea⁶.

A maior parte do metanol absorvido pelo organismo é passível de oxidação, originando o formaldeído e o ácido fórmico, compostos esses responsáveis pela ação tóxica do metanol. Entretanto, uma pequena parte é eliminada através do ar

expirado e pela urina na sua forma original².

No momento atual, a chamada mistura combustível ternária, contendo 33% de metanol, 60% de etanol e 7% de gasolina está sendo largamente utilizada nos grandes centros brasileiros. Neste sentido, há a necessidade de um melhor monitoramento dos produtos de combustão, bem como do próprio combustível quanto a seu potencial tóxico. Não apenas para o ser humano, mas quanto ao possível comprometimento da qualidade ambiental do ecossistema como um todo.

Cabe ressaltar que os órgãos responsáveis pela liberação desse novo combustível tomam como base os estudos toxicológicos do composto metanol e não da mistura contendo o metanol. Como consequência, estes dados toxicológicos podem não refletir a toxicidade real da mistura combustível por não considerar os possíveis efeitos sinérgicos, bem como antagonísticos, uma vez que o combustível é composto por três substâncias discretas (na verdade uma mistura quaternária devido à água presente no etanol).

Testes de toxicidade usando microorganismos, particularmente bactérias, têm sido descritos por vários autores (ver Bitton e Dutka¹²). Dentre os testes de toxicidade nos quais são utilizadas bactérias como organismo teste, o Microtox tem sido o mais empregado. Este teste foi desenvolvido pela Beckman Instruments Inc.¹³ para avaliar a toxicidade aguda em amostras aquáticas. O teste é baseado na medida da atividade da bactéria marinha bioluminescente *Photobacterium phosphoreum*, a qual emite luz sob condições normais.

Neste trabalho comparou-se a toxicidade aguda do três tipos de combustíveis atualmente utilizados no Brasil para a bactéria *Escherichia coli*. Foram também estudados os efeitos do componentes individuais das misturas combustíveis.

PARTE EXPERIMENTAL

I - Teste de Toxicidade:

a- Procedimento do teste de toxicidade

Os testes de toxicidade aguda em *Escherichia coli* foram baseados na inibição da respiração microbiana (medida via

* fone para contato (0192) - 397011

CO₂) causada pelas misturas combustíveis, bem como pelos seus componentes individuais.

O meio de cultura líquido (1 litro) foi contaminado com *E. coli* (mantida em agar) e deixado à temperatura ambiente até que a suspensão bacteriana começasse a turvar. Em seguida, colocou-se num banho de água a 37°C e fez-se o monitoramento do CO₂ (descrito abaixo) até que sua concentração atingisse 0,25 mM de CO₂. Cuidadosamente, alíquotas de 100ml foram transferidas desta suspensão estoque de bactéria para erlenmeyers de 150 ml, também mantidos no banho a 37°C. A cultura foi então contaminada com o agente tóxico. O frasco que não recebeu nenhuma adição atuou como controle. O monitoramento de CO₂ foi feito a cada 20 minutos de acordo com a seguinte ordem de análise: primeiramente analisou-se o controle; em seguida, as culturas contaminadas e finalmente o branco. Após a determinação do CO₂ nesta série de frascos, o controle era novamente analisado. A concentração de CO₂ nos diversos frascos foi obtida por interpolação da curva de calibração.

A bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cedida pelo Departamento de Patologia Clínica/Serviço de Microbiologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

b - Meio de cultura para crescimento de bactérias

O meio de cultura para a bactéria *E. coli* foi preparado pela adição de 1,6 g de K₂HPO₄, 1,6 g de KH₂PO₄, 1,0 g de NaCl, 4,0 g de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g de MgSO₄ e 0,3 g de ácido cítrico em 1 litro de água destilada¹⁴. O pH final foi ajustado em 7,00 usando uma solução de NaOH 4 M. O meio de cultura foi colocado num forno de microondas, levado até a fervura e fechado com rolha de algodão. Após o resfriamento até aproximadamente 90°C, 2,5 g de glucose foram adicionados na solução e o meio de cultura foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente.

II - Determinação do dióxido de carbono total pelo sistema de análise por injeção em fluxo contínuo

O procedimento experimental utilizado na determinação de CO₂ foi baseado no trabalho de Jardim e colaboradores¹⁵. Neste procedimento, um volume determinado da amostra (300µl) contendo as espécies carbônicas (CO₂, HCO₃⁻ e CO₃²⁻) é injetado num fluxo carregador (água deionizada) o qual conflui com outro fluxo de ácido sulfúrico diluído (0,2 M). O meio ácido favorece o equilíbrio no sentido da formação do CO₂.

O gás formado (CO₂), no meio ácido, ao passar pela cela de difusão, permeia por uma membrana de Teflon e atinge um fluxo de água deionizada, deslocando o equilíbrio para a formação dos íons HCO₃⁻ e H⁺. A condutividade deste fluido que vinha sendo monitorado constantemente, é então alterada devido ao CO₂ presente na amostra^{16,17}. A mudança na condutância é proporcional à concentração total de CO₂ presente na amostra.

III - Amostras

a - Combustíveis

As amostras de combustíveis foram adquiridas em postos de vendas ao consumidor e utilizadas sem nenhum pré-tratamento. Foram utilizados os seguintes tipos de combustíveis: M-gasolina (mistura contendo 88% de gasolina e 12% de etanol anidro), M-etanol (mistura contendo 95% de etanol e 5% de gasolina) e MEG (mistura contendo 60% de etanol, 33% de metanol e 7% de gasolina).

Neste trabalho, as misturas combustíveis serão denominadas de M-gasolina, M-etanol e MEG para diferenciá-las de seus componentes.

b - Componentes individuais dos combustíveis

A fim de se avaliar possíveis efeitos antagônicos e/ou sinérgicos entre os componentes de cada um dos combustíveis testados, foram realizados ensaios utilizando-se individualmente a gasolina, o etanol e o metanol nas proporções equivalentes às em que estes componentes estão presentes na mistura MEG.

A gasolina pura foi obtida tratando-se a M-gasolina com excesso de água para a extração do etanol. O etanol utilizado foi grau P.A. (QUIMIS) e o metanol também grau P.A. (MERCK).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes de toxicidade são baseados no uso de material vivo para definir a natureza e o grau de efeitos nocivos produzidos por um simples agente tóxico ou por uma mistura de agentes tóxicos. Nesse tipo de ensaio, certos organismos selecionados são usualmente expostos a um potencial contaminante por um certo período de tempo. Os testes de toxicidade podem ser feitos para se determinar inúmeros parâmetros, tais como a taxa de mortalidade, a imobilidade, a taxa de respiração, as taxas de reprodução e de crescimento, entre outras^{12,18}.

Os testes de toxicidade são categorizados por subdivisões baseadas na duração do teste, isto é, sobre o período de exposição ou sobre o período de observação, se ambos diferirem. Os dois mais utilizados compreendem a exposição crônica e a exposição aguda. Para uma melhor classificação, tem-se que analisar os resultados quando ao tempo de resposta do ensaio e tempo de vida do organismo testado¹⁹.

A figura 1 mostra o comportamento do crescimento das bactérias frente aos combustíveis M-gasolina, M-etanol e MEG na concentração de 1% (V/V). Os resultados indicam que houve uma inibição da respiração microbiana frente ao combustível M-gasolina quando comparado ao controle. Para o M-etanol, a inibição foi mais acentuada, enquanto que o combustível MEG foi o que mais inibiu a respiração microbiana.

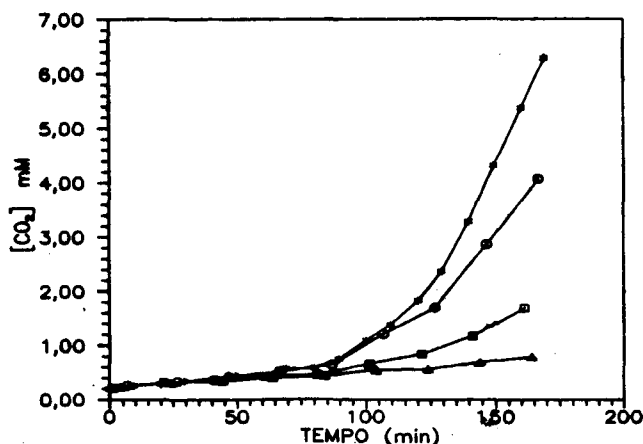


Figura 1. Comportamento microbiano frente aos combustíveis M-gasolina (○), M-etanol (□), MEG (Δ) na concentração de 1% (V/V) comparado com o controle (*) que não foi contaminado.

A título de comparação, foram realizados testes de toxicidade com os mesmos combustíveis na concentração de 2% (V/V). O comportamento na respiração da bactéria *Escherichia coli* é mostrado na figura 2. Nota-se que tal comportamento foi semelhante àquele da figura 1, porém com um efeito nocivo mais acentuado. Este comportamento já pode ser notado num tempo relativamente curto após o contato das bactérias com o contaminante, ou seja, aproximadamente 20 minutos.

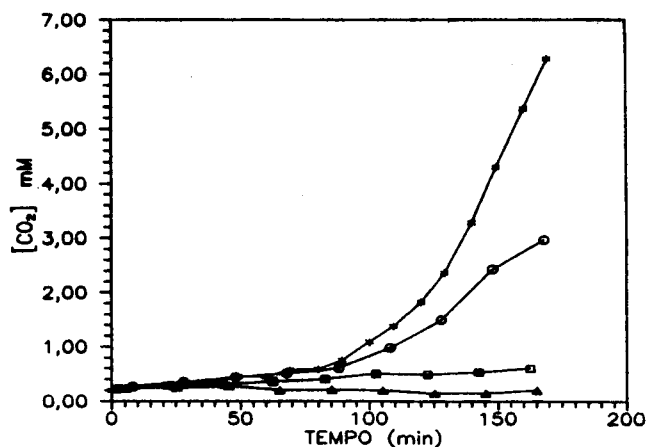


Figura 2. Comportamento microbiano frente aos combustíveis M-gasolina (○), M-etanol (□), MEG (Δ) na concentração de 2% (V/V) comparado com o controle (*) que não foi contaminado.

Na tabela 1 são apresentados estes resultados na forma do tempo de duplicação da população das bactérias. A equação utilizada para esse cálculo foi a seguinte:

$$\ln(C_t/C_0) = kt$$

onde C_t é a concentração do dióxido de carbono (mM) num tempo qualquer, C_0 é a concentração do dióxido de carbono (mM) presente no meio de cultura no início de cada bioensaio, k é a constante relacionada com o crescimento bacteriano (1/min) e t é o tempo expresso em minutos. Note que $\ln 2/k$ (ou $0,693/k$) fornece o tempo de duplicação da biomassa bacteriana (em minutos) nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 1. Tempo de duplicação das culturas contaminadas com os três combustíveis nas concentrações de 1 e 2% (V/V).

	Tempo de duplicação (min)	
	1%	2%
Controle	26	26
M-gasolina	33	36
M-etanol	44	133
MEG	107	inibição total *

* durante o tempo de duração do ensaio (160 min).

Como foi observado nas figuras 1 e 2, o combustível MEG foi o que apresentou uma maior inibição da respiração microbiana quando comparado aos outros dois combustíveis (M-gasolina e M-etanol). Quando comparado com o tempo de duplicação do controle (26 min), note que a cultura contaminada com MEG 1% (V/V) necessita agora de 107 min para duplicar sua biomassa.

Realizaram-se também testes de toxicidade com os três componentes do combustível separadamente e na proporção na qual eles estão presentes na mistura combustível (MEG), quando utilizado na concentração de 1 e 2% (V/V). Os resultados desses ensaios estão apresentados nas figuras 3 e 4, os quais mostram diferenças significativas quando comparados com os resultados obtidos para as misturas combustíveis.

Para uma melhor comparação entre estes resultados, a tabela 2 apresenta os resultados dos ensaios com os componentes puros na forma do tempo de duplicação microbiana.

É importante comparar os resultados mostrados na tabela 1 com aqueles da tabela 2. Nos testes de toxicidade aguda utilizando-se as misturas combustíveis, o MEG mostrou ser o mais tóxico deles para a bactéria *Escherichia coli*, apresentando inclusive uma inibição total da respiração microbiana

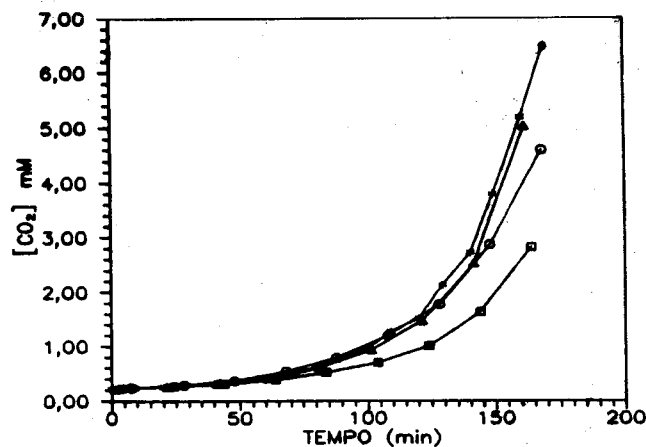


Figura 3. Comportamento microbiano frente aos componentes: (Δ) metanol, 0,33% (V/V), (○) gasolina, 0,07% (V/V) e (□) etanol, 0,6% (V/V) comparado com o controle (*) que não foi contaminado.

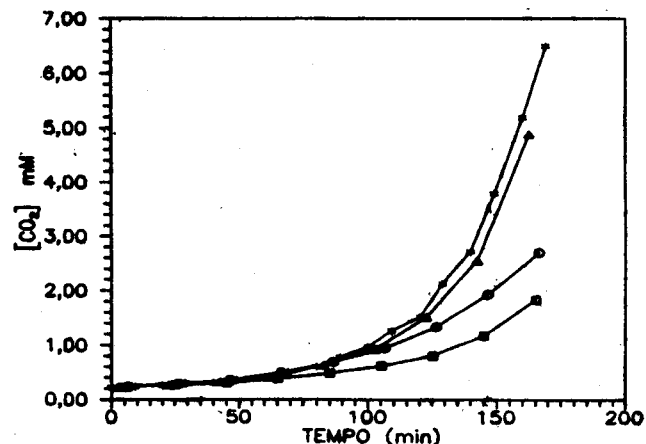


Figura 4. Comportamento microbiano frente aos componentes: (Δ) metanol, 0,66% (V/V), (○) gasolina, 0,14% (V/V) e (□) etanol, 1,2% (V/V) comparado com o (*) controle que não foi contaminado.

Tabela 2. Tempo de duplicação das culturas contaminadas com os três componentes do combustível MEG em concentração relativa 1 e 2% (V/V)

	Tempo de duplicação (min)			
	1% (V/V)		2% (V/V)	
Controle		26		26
Metanol	0,33	28	0,66	28
Gasolina	0,07	32	0,14	41
Metanol	0,60	39	1,20	49

quando utilizado na concentração de 2% (V/V). Este comportamento não se repete, entretanto, quando os bioensaios utilizam os componentes individuais presentes nas misturas combustíveis. Na tabela 2, por exemplo, fica claro que o metanol puro é menos tóxico do que a gasolina e o etanol.

Cabe ressaltar que nos resultados obtidos para o estudo da gasolina pura observou-se uma tendência na inibição da respiração bacteriana com aumento da concentração desse composto (0,07 a 0,14%). Esse comportamento foi muito menos acentuado nos ensaios realizados com a mistura M-gasolina, apesar da gasolina estar presente numa concentração bem maior (0,88 e 1,76%). Esses dados sugerem um possível efeito antagônico entre o etanol e a gasolina, diminuindo assim o efeito tóxico deste último para o organismo teste nas condições experimentais utilizadas neste ensaio.

No caso do etanol, efeitos sinérgicos ou antagônicos não foram detectados. No entanto, pode ser observado que a inibição aumenta com o aumento da concentração no meio de cultura, independentemente do composto estar presente na forma pura ou misturado à gasolina.

Esses resultados vêm comprovar que os efeitos sinérgicos, bem como antagônicos, não podem ser desconsiderados em se tratando da avaliação do potencial tóxico das misturas combustíveis. Infelizmente, os procedimentos utilizados usualmente na avaliação da toxicidade dos combustíveis são baseados em dados obtidos para os componentes separadamente⁵. Estudos mais detalhados desta possível interação certamente serão necessários para esclarecer pontos ainda obscuros nestes estudos de ecotoxicidade.

Num estudo recente, Branco e colaboradores²⁰, afirmam que "A despeito de não terem sido desenvolvidos estudos específicos para o gerenciamento de acidentes e o manuseio de "metanol-combustível", pode-se admitir que os procedimentos indiscutivelmente aceitos para o "metanol-produto-químico" e para outros combustíveis líquidos são suficientes para o controle dos riscos envolvidos neste caso...". Esta afirmativa pode ser questionada a partir dos dados apresentados neste trabalho, que mostram claramente que a toxicidade aguda do metanol para um organismo ubíquo no meio ambiente é muito menor do que a toxicidade da mistura combustível contendo este composto.

CONCLUSÃO

Pelos dados obtidos nos testes de toxicidade aguda utilizando *E. coli* pode-se concluir que:

a) A ordem decrescente de toxicidade para as misturas combustíveis estudadas foi: MEG > M-etanol > M-gasolina.

b) A ordem decrescente de toxicidade para os componentes individuais foi: Etanol > Gasolina > Metanol.

Desse modo, pode-se afirmar que estudos para avaliação do potencial tóxico de combustíveis automotivos devem ser realizados com a mistura combustível e não apenas com seus componentes separadamente. Os resultados dos testes de toxicidade obtidos nesse trabalho indicam um possível efeito sinérgico nas misturas combustíveis.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem aos assessores dessa revista pela valiosa contribuição na discussão dos resultados desse trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Ecklund, E.E.; Mills, G.A.; *Chemtech* (1989), **19**, 549.
2. Azevedo, F.A.; Borges, E.L.; "Breves referências aos aspectos toxicológicos do metanol (séries monografias FJS)", Fundação José Silveira; Salvador-Bahia (1990).
3. Mills, G.A.; Ecklund, E.E.; *Chemtech* (1989), **19**, 626.
4. Manahan, S.E.; "Environmental Chemistry", Brooks/Cole Publishing Company (4ª edição); Monterey-California (1984).
5. Moreira, J.R.; Saldiva, P.H.N.; Szwarc, A.; "Estudo de impacto no meio ambiente. O uso do metanol como combustível"; Versão final, CETESB; São Paulo (1990).
6. "Metanol: solução ou problema? Atualidades em prevenção de acidentes", Fundacentro, São Paulo (1990), **21** (242).
7. Snow, R.; Baker, L.; Crews, W.; Davis, C.O.; Duncan, J.; Perry, N.; Siudak, P.; Stump, F.; Ray, W.; Braddock, J.; *J. Air Waste Manage. Assoc.* (1989), **39**, 48.
8. Gabele, P.A.; *J. Air Waste Manage. Assoc.* (1990), **40**, 296.
9. Williams, R.L.; Lipari, F.; Potter, R.A.; *J. Air Waste Manage. Assoc.* (1990), **40**, 747.
10. Sodhi, D.; Abraham, M.A.; Summers, J.C.; *J. Air Waste Manage. Assoc.* (1990), **40**, 352.
11. Gray, C.L.Jr.; Alson, J.A.; *Sci. Am.* (1989), **261**, 86.
12. Bitton, G.; Dutka, B.J.; "Toxicity testing using microorganisms", (Editado por Bitton, G. e Dutka, B.J.), Vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton-Florida (1986).
13. Beckman Instruments, Inc.; "Advantages of Using Several Test Time", Microtox Application Notes, N.M102, Carlsbad, CA. (1981).
14. Doward, E.J.; Barisas, B.G.; *Environ. Sci. Technol.* (1984), **18**, 967.
15. Jardim, W.F.; Pasquini, C.; Guimarães, J.R.; Faria, L.C.; *Water Res.* (1990), **24**, 351.
16. Faria, L.C. "Determinação condutométrica de amônia em digeridos de Kjeldhal, águas e solos por análise por injeção em fluxo"; Tese de mestrado; Instituto de Química, UNICAMP (1987).
17. Campos, M.L.M., "Fotodegradação de compostos orgânicos presentes em ambientes aquáticos naturais e suas interações com metais cobre, ferro e cádmio"; Tese de mestrado; Instituto de Química, UNICAMP (1988).
18. HMSO Books; "Acute toxicity with aquatic organisms, (1981)"; Her Majesty's Stationery Office (Ed), Londres (1983).
19. Guimarães, J.R., "Determinação do dióxido de carbono por FIA: Aplicação em testes de toxicidade"; Tese de mestrado; Instituto de Química, UNICAMP (1990).
20. Branco, G.M.; Szwarc, A.; Farah, E.L.; Conti, E.W.; Costa, W., "Pesquisa de combustíveis com metanol"; CETESB; São Paulo (1990).

Publicação financiada pela FAPESP