DEUZUITA DOS SANTOS OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE RISCO MUTAGÊNICO DOS POLUENTES PRESENTES NA EXAUSTÃO DE MOTOR DIESEL POR MEIO DO BIOENSAIO TRAD-SH

DEDALUS - Acervo - EESC
31100052169

Dissertação apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos resultados para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Orientador: Prof. Dr. Josmar D. Pagliuso

São Carlos

2005

EESC-USP
Biblioteca
CAMPUS DE S. CARLOS

Class. TESE EESC
Cutt. 4003 p
Tombo T 143/05
Sysno 1446192

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

O48a

Oliveira, Deuzuita dos Santos
Avaliação do potencial de risco mutagênico dos poluentes presentes na exaustão de motor diesel por meio do bioensaio Trad-SH / Deuzuita dos Santos Oliveira. -- São Carlos, 2005.

Dissertação (Mestrado) -- Escola de Engenharia de São Carlos-Universidade de São Paulo, 2005.
Área: Engenharia Mecânica.
Orientador: Prof. Dr. Josmar D. Pagliuso.

1. Motor diesel. 2. Poluição do ar. 3. Poluentes orgânicos. 4. Mutagenicidade e bioensaio Trad-SH. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Engenheira **Deuzuita dos Santos Oliveira**

Dissertação defendida e julgada em 04-04-2005 perante a Comissão Julgadora:

Aprovada

Prof. Dr. **JOSMAR DAVILSON PAGLIUSO (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Dra. **PAULA CRISTINA GARCIA MANOEL CRNKOVIC**
(Pós-Doutoranda/USP)

Aprovada

Dra. **MARISA DOMINGOS**
(IBOT/SEMA)

Prof. Associado **JONAS DE CARVALHO**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Mecânica

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALIJURI**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por sua fidelidade e amor incondicional. A Ele toda honra e toda glória. A meu amado esposo Galber, metade minha e a quem também dedico todo o meu amor. A meus filhos, Galber Júnior, Eduardo e Tiago bênçãos do Senhor em minha vida. A meu pai Genésio e à minha mãe Santa exemplos de vida, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

À minha família pela colaboração na realização dos meus projetos.

Ao Prof. Dr. Josmar D. Pagliuso, pesquisador de grande valor. Minha profunda gratidão pela orientação e apoio.

A Profa. Dra. Marisa Domingos, cuja capacidade, conhecimento científico, simplicidade e gentileza me tocam e encantam. A você meu carinho e eterna gratidão.

A Dra. Paula Manoel Crnkovic, pela competência profissional que muito admiro. Serei eternamente grata por sua amizade, conhecimento científico e pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva que gentilmente disponibilizou os recursos do laboratório de poluição do ar da Faculdade de Medicina de São Paulo.

A Débora Jã que teve paciência e competência de transmitir com sabedoria todo seu conhecimento na utilização da técnica do biensaio Tra-SH.

A Dra. Eliane Tigre pelas sugestões que muito valorizaram este trabalho. Muito obrigado.

Aos Professores Dr. Antonio Moreira, Dr. Geraldo Lombardi, Dr. Sergio Fonte e Professora Ruth Gouveia. Muito obrigado pelo incentivo e apoio.

Aos funcionários que participaram diretamente na realização deste trabalho, Roberto Lourenço, Jorge Nicolau, Teodomiro Luchesi, Donizeti Luchesi, Hélio Trebi e Roberto Prataviera. Meu sincero agradecimento.

A Ivonete Ávila por todo apoio e amizade, pela disposição e colaboração em todas as situações. Obrigada pela pessoa especial que você é.

Ao Manoel Carlos amigo e irmão pelo apoio, confiança e incentivo.

A Cecília por seu carinho e apoio.

A Dileuza e Milton Matos pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório Keyll, Juliana e Júlio.

Aos irmãos em Cristo que oraram pela realização e êxito do meu trabalho, Pastor Jarbas, Luci, Bia, Cássio, Alexandre, Magali, Márcia, Quézia, Wilson, Wilson Soares, Isabel, Rogério, Raquel, Roberta, Elisiara, Marco Antonio, Anderssa, Alfredo e Heloisa entre outros.

A meus sogros Mauro e Marta, meus irmãos, sobrinhos e cunhados.

Ao Valtencir Zucolotto pelo apoio e colaboração.

Ao Mauricio e Milena Mitsuyuri pela amizade e colaboração nas análises estatística.

Ao NETeF - EESC e a Universidade de São Paulo e a todos que contribuíram de certa forma para a realização e conclusão deste trabalho.

EPIGRAFE

"Assim diz o SENHOR: Bendito o homem que confia no SENHOR e cuja esperança é o SENHOR. Porque ele é como árvore plantada junto às águas, que estende as suas raízes para o ribeiro e não receia quando vem o calor, mas a sua folha fica verde; e, no ano de sequidão, não se perturba, nem deixa de dar fruto" (Jeremias 17:7-8).

RESUMO

OLIVEIRA, D.S. (2005). Avaliação do potencial de risco mutagênico dos poluentes presentes na exaustão de motor diesel por meio do bioensaio Trad-SH. São Carlos – SP, 60 p. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

A poluição atmosférica já é considerada um caso de saúde pública nos grandes centros urbanos. Freqüentemente as emissões veiculares são as principais causas dessa poluição, principalmente as provenientes dos motores diesel, os quais, além da produção de material particulado (MP), em cuja superfície são adsorvidas substâncias carcinogênicas e mutagênicas, produzem poluentes como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Contudo, não existe uma avaliação direta dos riscos dessas emissões nos seres vivos, usando a metodologia aplicada neste trabalho. Plantas bioindicadoras podem dar idéia desses riscos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de risco mutagênico da exaustão proveniente de um motor diesel, utilizando o bioensaio Trad-SH (clone KU-20) como bioindicador da poluição do ar. Nos experimentos, a exaustão do motor diesel aspirado de 2.0L de deslocamento volumétrico foi diluída com ar atmosférico de modo a atingir concentrações de uma atmosfera pesadamente poluída (aproximadamente 50,100 e 150 ppm de CO). Obtidos estes níveis de diluição, as inflorescências foram expostas a esta mistura de poluentes por duas horas (doses agudas). A concentração de CO foi monitorada continuamente por meio de um analisador de gases Horiba Enda utilizando o princípio de absorção seletiva no infravermelho. Para se avaliar o efeito mutagênico foi feita uma comparação entre as inflorescências não expostas aos poluentes (grupo 1) e as inflorescências expostas (grupos 2, 3 e 4) com aproximadamente 50, 100 e 150 ppm de CO respectivamente. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente observando-se que, a freqüência média das mutações no grupo 1 (controle), foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 3 e 4, porém foi similar à do grupo 2. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas freqüências de mutações entre os grupos 3 e 4. Os resultados indicam que a exaustão do motor diesel teve um papel significativo no desenvolvimento de mutações, mas somente quando diluída para concentrações de CO acima de 100 ppm.

Palavras chave: motor diesel, poluição do ar, poluente orgânico, mutagenicidade e bioensaio Trad-SH.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D.S. (2005). Evaluation of the mutagenic potential of air pollutants from diesel engines emission using the *tradescantia* stamen hair assay (TSH). São Carlos – SP, 60 p. Dissertação de mestrado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Air pollution caused by vehicle emission has been considered as a major public health concern in the urban centers. Emission from diesel engine powered vehicles, in particular, are highly toxic, since carcinogenic and mutagenic compounds can adsorb on the expelled particles leading to the formation of the so-called polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's). A detailed investigation on the risks of those compounds on the living beings using the methodology applied in the work has not been carried out so far. This work is aimed at evaluating the mutagenic potential of the emission from a diesel engine using the *Tradescantia* stamen hair assay (TSH), by monitoring the stamen hair mutation in the clone KU-20. Experimentally, the inflorescence of the KU-20 clones was kept for 2 h under a simulated urban heavily polluted atmosphere, obtained by mixing the emission from a diesel engine and atmospheric air. The CO concentration in the atmosphere was monitored using a Horiba-Enda gas analyzer. The mutagenic effects of the atmosphere were analyzed by comparing a group of non-exposed control inflorescence (group 1) to inflorescences kept under polluted atmospheres containing 50, 100 and 150 ppm of CO, assigned to as groups 2, 3 and 4. The experimental data were analyzed using statistical methods. The frequency of mutations observed in the inflorescences from group 2 was slightly higher than that observed in the group 1. In the groups 3 and 4, however, the frequency of mutations was significantly higher than that exhibited by the control group. The latter suggests that the emission from a diesel engine plays an important role in the development of plants mutation, especially for atmospheres containing more than 100 ppm of CO.

Keywords: Air pollution, diesel engine, organic pollutants, mutagenic, bioassay Trad-SH.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - Câmara de fumigação para testes de impactos ambientais causados pela poluição do ar, desenvolvida e construída pelo NETeF da EESC/USP e Instituto de Botânica de São Paulo 19

FIGURA 4.1 - Motor diesel 2.0 23

FIGURA 4.2 - Câmara contendo as inflorescências da KU-20 24

FIGURA 4.3 - Misturador de gases 25

FIGURA 4.4 - Analisadores de gases (Horiba) 26

FIGURA 4.5 - Clone KU-20 de *Tradescantia* 27

FIGURA 4.6 - Canteiro do NETeF da EESC com o clone KU-20 27

FIGURA 4.7 - Antera com seus pêlos estaminais (a) e, em destaque, pêlo estaminal com evento de mutação (células de cor rosa) (b) 30

FIGURA 5.1 - Concentração dos gases CO, THC e SO_2 obtidos na diluição da exaustão do motor a diesel para 100 ppm de monóxido de carbono 32

FIGURA 5.2 - Freqüência de mutação nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão do motor a diesel aspirado 2.0 L de deslocamento volumétrico 34

FIGURA 5.3 - Médias das freqüências de mutações em pêlos estaminais do clone KU-20 35

FIGURA 5.4 - Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas à exaustão de motor a diesel, em relação ao tratamento controle (grupos 1) 35

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Principais fontes de poluição do ar e respectivos poluentes..... 7

TABELA 3.2 - Padrões nacionais de qualidade do ar (resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)..... 9

TABELA 3.3 - Limites de emissão para veículos pesados novos (data de vigência 01/01/2002)..... 11

TABELA 5.1 - Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases de exaustão do motor a diesel.... 33

TABELA 5.2 - Análise de variação (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases de exaustão do motor a diesel..... 33

TABELA 5.3 - Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pêlos estaminais do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas à exaustão do motor a diesel..... 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Programa de Controle da Poluição do Ar Por Veículos Automotores (PROCONVE)

Organização Mundial de Saúde (OMS)

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)

Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)

Monóxido de carbono (CO)

Óxidos de nitrogênio (NO_x)

Hidrocarbonetos (HC)

Óxidos de enxofre (SO_x)

Material particulado (MP)

Partículas Totais em Suspensão (PTS)

Dióxido de enxofre (SO_2),

Ozônio (O_3)

Dióxido de nitrogênio (NO_2)

Material particulado (MP_{10}) – com diâmetro acima de 10 μm

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA_S)

Hidrocarbonetos totais (HCT)

SUMÁRIO

RESUMO..... i
ABSTRACT..... ii
LISTA DE FIGURAS..... iii
LISTA DE TABELAS..... iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... v
SUMÁRIO..... vi
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. OBJETIVOS..... 4
3. REVISÃO DE LITERATURA..... 5
3.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA..... 5
3.2. EFEITOS DOS POLUENTES NA SAÚDE HUMANA..... 12
3.3. EFEITOS DOS POLUENTES SOBRE AS PLANTAS..... 15
3.4. BIOMONITORAMENTO..... 17
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 23
4.1. MOTOR A DIESEL..... 23
4.2 CÂMARAS..... 24
4.3. MISTURADOR DE GASES..... 24
4.4. SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS..... 25
4.5. PLANTA BIOINDICADORA..... 27
4.6. METODOLOGIA..... 28
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 32
5.1. RESULTADOS..... 32
5.2. DISCUSSÕES..... 36
6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES..... 41
6.1 CONCLUSÕES..... 41
6.2. SUGESTÕES PARA TABALHOS FUTUROS..... 42
REFERÊNCIAS..... 43

APÊNDICE..... 51
APÊNDICE 1..... 51
APÊNDICE 2..... 52
APÊNDICE 3..... 52
APÊNDICE 4..... 53

1. INTRODUÇÃO

Nas grandes cidades a qualidade de vida da população vem se deteriorando continuamente devido a uma série de fatores. Entre eles, relaciona-se a emissão de poluentes para a atmosfera pelas indústrias e pelo tráfego veicular, os quais são prejudiciais aos organismos vivos, inclusive aos seres humanos.

A poluição atmosférica nos centros urbanos já é vista como um caso de saúde pública, pois estudos epidemiológicos têm mostrado uma relação significativa entre esse tipo de poluição e o aumento de doenças respiratórias (HENDERSON et *al.*, 1975; BÖHM et *al.,* 1983), câncer de pulmão (CARNOW e MÉIER, 1973) mortalidade infantil (SALDIVA et *al.*, 1994) e mortalidade de idosos (SALDIVA et *al.*, 1995). Os poluentes podem potencialmente provocar efeitos genotóxicos, ou seja, induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, entre os quais quebras e aberrações cromossômicas e mutações (MA et *al.*, 1983; RODRIGUES et *al.*, 1997; BATALHA et *al.*, 1999; GUIMARÃES et *al.*, 2000).

A variedade de substâncias lançadas na atmosfera é muito grande e freqüentemente os veículos automotores são os principais emissores de poluentes nas cidades, mais que qualquer outra atividade humana. Essa emissão é composta principalmente por gases como monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SO_x) e material particulado (MP) (CETESB, 2004). De acordo com D'AMATO et *al.* (1994), os poluentes gasosos de origem veicular lesam os tecidos

epiteliais, tornando-os mais sensíveis às infecções além de atuarem como irritantes das vias aéreas.

A avaliação das concentrações destes poluentes na atmosfera é universalmente consagrada como indicadora precisa da qualidade do ar, mas é importante salientar que as condições meteorológicas (direção e velocidade dos ventos, temperatura, incidência solar, ocorrência de chuvas entre outros) determinam também a maior ou menor diluição dos poluentes (FREITAS, 2003). Por sua vez, são essas interações que determinam os efeitos prejudiciais da poluição sobre o homem, animais e plantas (DERÌSIO, 1992).

Medidas físico-químicas podem ser utilizadas para fornecer dados sobre a qualidade do ar, porém não podem ser usados para se prever os riscos aos quais os seres vivos estão sujeitos. O acompanhamento de reações mostradas por determinados seres vivos na presença de poluentes atmosféricos, metodologia denominada biomonitoramento, tem sido uma ferramenta útil e importante, pois pode fornecer informações rápidas e seguras quanto aos efeitos antropogênicos no meio ambiente e, ainda, prever os riscos de danos aos ecossistemas naturais e à saúde dos seres vivos expostos aos poluentes. Além disso, os 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 e SCHWEIGER, 1991).

Espécies vegetais têm sido muito usadas como bioindicadoras em programas de biomonitoramento da qualidade do ar por serem mais sensíveis à poluição que os animais, por poderem diferenciar e descrever mudanças ambientais, pela sua relevância ecológica, facilidade de cultivo, pela sua capacidade de responder aos estímulos ambientais rapidamente, entre outros (ARNDT e SCHWEIGER, 1991).

As respostas genotóxicas de determinadas plantas bioindicadoras, incluindo quebras cromossômicas, mutações, etc, são muito eficientes para demonstrar o potencial genotóxico de poluentes atmosféricos.

Há bioensaios bem padronizados com clones de plantas do gênero *Tradescantia* em que são utilizadas quebras cromossômicas em células mãe de grãos de pólen e eventos mutagênicos em pelos estaminais, detectados pela mudança de cor das células, como indicadoras de riscos clastogênicos e mutagênicos (respectivamente bioensaios Trad-MCN e Trad-SH).

Esses bioensaios podem ser considerados indicadores gerais de contaminação, por não responderem de maneira específica a certos poluentes atmosféricos. Porém, estes, além de serem muito sensíveis, já mostrando reações em baixos níveis de contaminação ambiental, e rapidamente responderem aos agentes genotóxicos, foram padronizados para plantas geneticamente uniformes (clones), o que proporciona reduções na variabilidade das respostas e, conseqüentemente, uma interpretação segura dos resultados. São, ainda, de fácil execução, uma vez que não há necessidade de uso de infra-estrutura complexa de laboratório, e são bastante versáteis podendo ser utilizados para delimitação do potencial genotóxico de agentes presentes no ar, água e solo.

Em vista desse cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar o risco mutagênico de doses agudas da exaustão provenientes de motor diesel empregando o bioensaio Trad-SH em condições experimentais. A resposta obtida nesse biomonitoramento serviu, ainda, para verificar a eficiência do referido bioensaio, como indicador de qualidade do ar em ambiente contaminado pela emissão dos poluentes gerados neste processo de combustão.

2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o potencial de risco mutagênico dos poluentes provenientes da exaustão de um motor diesel por meio da contagem de eventos mutagênicos surgidos em inflorescências de plantas do clone KU-20 de *Tradescantia* após exposição de curta duração.

- ✓ Verificar a sensibilidade do referido bioensaio como indicador de qualidade do ar em ambiente contaminado pela emissão dos poluentes gerados no processo de combustão do motor diesel.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

A palavra poluição vem do latim *Polure*, e significa sujar. Sua definição está associada a qualquer interferência danosa nos processos de transmissão de energia em um ecossistema. Ela também pode ser definida como um conjunto de fatores limitantes de interesse especial para o Homem, constituídos de substâncias nocivas (poluentes) que, uma vez introduzidas no ambiente, podem ser efetiva ou potencialmente prejudiciais ao homem ou ao uso que ele faz de seu habitat (CETESB, 2004).

> Poluição do ar é a presença ou lançamento na atmosfera, mais especificamente na troposfera, de substâncias em concentrações suficientes para interferir direta ou indiretamente na saúde, segurança e bem estar do homem, ou no pleno gozo de sua propriedade. As emissões de certas substâncias são consideradas poluentes se, por sua concentração, tornar esse ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde e inconveniente ao bem-estar público, ser danosas aos materiais, à fauna e à flora ou prejudiciais à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade (DERISIO, 1992, p. 110).

"Em uma apreciação mais ampla, poluição pode ser vista como a destruição rápida promovida pelo homem, de um patrimônio natural resultado de alguns bilhões de anos de evolução (PAGLIUSO, 2004)".

A poluição do ar originada por atividades humana não é um fenômeno recente. Teve início no momento em que o homem descobriu o fogo. Embora a atividade do homem primitivo não possa ser comparada à atual, é provável que eles tenham tido problemas com poluição atmosférica, principalmente, no momento em que atearam fogo dentro de uma caverna. Quando a sociedade passou a se organizar em cidades, os problemas mais sérios relacionados à poluição atmosférica começaram a surgir e se agravaram com a revolução industrial, tornando-se um problema abrangente e ligado à saúde pública, pois o homem passou a usar indiscriminadamente a tecnologia, queimando grande quantidade de carvão, lenha e depois óleo combustível. Por isso, a cada dia, a atmosfera dos grandes centros urbanos torna-se mais prejudicial para a saúde, pois os veículos automotores surgiram como uma grande fonte poluidora do ar (BRANCO e MURGEL, 1996; FREITAS, 2003).

Atualmente, devido ao crescimento populacional, a utilização de veículos automotores tem crescido, ocasionando os episódios críticos de poluição do ar, fazendo muitas vítimas em diversas partes do mundo. Com isso, a população vem progressivamente se conscientizando de que a poluição é um problema real. Os governantes sentiram que devem existir normas rígidas de controle de poluição e o meio científico tem direcionado pesquisas para a minimização da emissão de poluentes, como por exemplo, a utilização de combustíveis renováveis como o Biodiesel, o uso de misturas de combustíveis (etanol, etanol puro na gasolina) (SOTTO PAU, 2003) e o desenvolvimento de sistemas de injeção de etanol em motor de ignição por compressão para substituição parcial do diesel por etanol hidratado (FEITOSA, 2003).

Os poluentes do ar são provenientes de diversas fontes, as quais são classificadas em estacionárias, móveis, naturais ou secundárias (**Tabela 3.1**). Nas fontes estacionárias, se enquadram os processos industriais, os processos de combustão e eliminação de resíduo sólido. As fontes móveis são constituídas por diversos tipos de veículos movidos a álcool, gasolina ou diesel.

Tabela 3.1- Principais fontes de poluição do ar e respectivos poluentes.

FONTES POLUIDORAS		POLUENTES
Estacionárias	Combustão	Material Particulado Dióxido de enxofre e Trióxido de enxofre Monóxido de Carbono, Hidrocarbonetos e Óxidos de Nitrogênio.
	Processo Industrial	Material Particulado (fumos, poeiras, névoas). Gases – SO_2, SO_3, HCl, Hidrocarbonetos, Mercaptanas, HF, H_2S, NO_x.
	Queima de resíduo sólido	Material Particulado Gases – SO_2, SO_3, HCl, NO_x, HC.
	Outros	Hidrocarbonetos, Material Particulado.
Móveis	Veículos (Álcool, Diesel e Gasolina), Locomotivas, Aviões, Motocicletas, Barcos, etc.	Material Particulado, Monóxido de Carbono, Óxidos de Enxofre, Óxidos de Nitrogênio, Hidrocarbonetos, Aldeídos, Ácidos Orgânicos.
Naturais		Material Particulado – Poeiras Gases – SO_2, H_2S, CO, NO, NO_2, hidrocarbonetos.
Reações Químicas na Atmosfera Ex: Hidrocarbonetos + Óxidos de Nitrogênio (luz solar)		Poluentes Secundários – O_3, Aldeídos, Ácidos Orgânicos, Nitratos, Aerosol Fotoquímicos, etc.

Fonte: Derísio, 1992.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) divide as fontes de poluição do ar em naturais e antropogênicas. As fontes naturais incluem ação vulcânica, fogo em florestas, tempestades de poeira e formação de partículas radioativas de gases. De modo geral, as fontes naturais excedem as fontes antropogênicas, na produção de algumas substâncias consideradas poluentes, como por exemplo, o SO_2. Porém, para a maioria delas, a dispersão e distribuição desses poluentes resultam numa concentração média menor do

que as que existem próximas a fontes antropogênicas (WARK, et al., 1998). Considerando-se os efeitos da poluição na saúde, principalmente nas áreas urbanas onde a densidade demográfica é grande, as fontes antropogênicas são importantes e as tentativas de controle estão geralmente direcionadas a elas (www.cetesb.sp.gov.br/ar/emissões/proconve2.asp).

Para garantir a proteção da saúde e do bem estar das pessoas foi criado um padrão de qualidade do ar que indica as concentrações máximas de um componente na atmosfera. No Brasil o CONAMA regulamenta a concentração dos poluentes do ar usando como parâmetros às partículas totais em suspensão (PTS), fumaça, partículas inaláveis, dióxido de enxofre (SO_2), monóxido de carbono (CO), ozônio (O_3) e dióxido de nitrogênio (NO_2) (**Tabela 3.2**).

Com a constatação de que a poluição ambiental nos grandes centros urbanos era causada predominantemente pelos poluentes atmosféricos gerados na queima de combustíveis fósseis em veículos automotores, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) criou em 1986 o Programa de Controle da Poluição do Ar Por Veículos Automotores (PROCONVE). Este programa tem como objetivo reduzir os níveis de emissões de poluentes, além de incentivar o desenvolvimento tecnológico nacional na engenharia automotiva, bem como a introdução de métodos e equipamentos para a realização de ensaios e medições de poluentes (www.cetesb.sp.gov.br/ ar/emissões/proconve2asp).

Sistemas de transportes e atividades industriais são as causas mais sérias de poluição do ar em todo o mundo e estudos sobre ambos são bem documentados em países desenvolvidos (VDI, 1999). Isso mostra que a poluição do ar tem-se constituído numa das mais graves ameaças à qualidade de vida de seus habitantes.

Tabela 3.2- Padrões Nacionais de Qualidade do Ar (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)

Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão primário ($\mu g/m^3$)	Padrão secundário ($\mu g/m^3$)	Método de medição
Partículas totais em suspensão	24 horas (1) MGA (2)	240 80	150 60	Amostradores de grandes volumes
Dióxido de enxofre	24 horas MAA (2)	365 80	100 40	Pararosanílina
Monóxido de carbono	1 hora (1) 8 horas	40.000 35 ppm 10.000 (9 ppm)	40.000 35 ppm 10.000 (9 ppm)	Infravermelho não dispersivo
Ozônio	1 hora (1)	160	160	
Fumaça	24 horas (1) MAA (3)	150 60	100 40	Refletância
Partículas inaláveis	24 horas (1) MAA (3)	150 50	150 50	Separação Inercial/filtração

(1) Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano, (2) Média geométrica anual e (3) Média aritmética anual.

Fonte: Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90

As emissões produzidas por veículos carregam substâncias tóxicas, que em contato com o sistema respiratório, podem produzir efeitos negativos sobre a saúde. Essa emissão é composta de material particulado (MP) (que possuem uma composição variada, incluindo, metais pesados) e gases como óxidos de carbono, nitrogênio, enxofre e hidrocarbonetos. Esses gases originam poluentes secundários presentes no smog fotoquímico, como o ozônio (O_3) e o PAN (nitrato de peroxi-acetila) por meio de reações químicas mediadas pela luz solar (MANNING e FEDER, 1980; FREEDMAN, 1995). Os gases de escape de veículos automotores estão entre os principais formadores de ozônio (FELLENBERG, 2003). A maioria dos poluentes originados durante o smog fotoquímico, como, por exemplo, O_3 e PAN, é comprovadamente tóxica e

acarreta danos a curto e em longo prazo à saúde da população e aos ecossistemas (PANDEY e AGRAWAL, 1994; FREEDMAN,1995).

As emissões veiculares ocorrem pelo cano de escapamento, pelo respiro do cárter do motor e pela evaporação do combustível. Uma variação nas emissões de poluentes pelos motores é observada de acordo com a operação do veículo (aceleração, desaceleração, marcha lenta, etc.), com o sistema de combustão e tecnologia empregada (PAGLIUSO, 1999; ÁVILA, 2003), bem como pelo uso de conversor catalítico, usado para o controle de emissões (MARTINS, 2003) e com o tipo de combustível usado (SOTTO PAU, 2003). Tanto o processo de combustão como o desgaste de pneus e de pastilhas ou lonas de freios emite material particulado, que pode causar graves riscos à saúde pública, por seu tamanho microscópico, suas propriedades químicas e pela persistência na atmosfera.

A exaustão de motores diesel representa uma fonte importante de poluição atmosférica nas grandes cidades e em certos locais de trabalho. O material particulado e os óxidos de nitrogênio emitidos por tais motores são oriundos dos combustíveis contendo frações pesadas de hidrocarbonetos que queimam em câmaras com alta pressão e temperatura elevada. Em áreas urbanas, devido a sua alta concentração, o material particulado tem sido alvo de muitos estudos, devido ao seu impacto na saúde, pois os mesmos podem adsorver substâncias tóxicas em sua superfície, como metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos que possuem propriedades carcinogênicas, mutagênicas e são fácil de penetrarem nas vias respiratórias e se depositarem nos pulmões. Uma exposição de longa duração às partículas finas aumenta o índice de câncer de pulmão (POPE III et al., 2002). Já os hidrocarbonetos resultantes também dos processos de combustão dos motores reagem com os raios ultravioleta produzindo o smog fotoquímico e ainda contribuem para a formação da chuva ácida.

Apesar de se aumentarem os regulamentos e se aperfeiçoarem os controles tecnológicos, as emissões veiculares nas ruas e estradas continuam um sério problema, principalmente devido ao número de veículos. Mundialmente, o número de veículos em uso de todos os tipos, cresceu de menos de cinco milhões para mais de quinhentos milhões nos últimos quarenta anos e já foi estimado que este número possa exceder um bilhão até 2015 (WARK et *al.* 1998).

Atualmente, no Brasil, os níveis de emissão de poluentes por veículos pesados novos são estabelecidos pelo PROCONVE e os limites aceitos estão listados na **Tabela 3.3**. Assim, todos os novos modelos de veículos e motores nacionais e importados são submetidos obrigatoriamente à homologação quanto à emissão de poluentes. Para tal, são analisados os parâmetros de engenharia do motor e do veículo relevantes à emissão de poluentes, sendo também submetidos a rígidos ensaios de laboratório, onde as emissões reais são quantificadas e comparadas aos limites máximos em vigor (CETESB, 2004).

Tabela 3.3 - Limites de emissão para veículos pesados novos (data de vigência 01/01/2002)

Limites de emissão (g/KWh)			
CO	HC	NO_x	Partículas
4,0	1,10	7,0	0,15

(www.cetesb.sp.gov.br/Ar/emissoes/proconve2.asp).

A redução nos níveis de emissão é fator fundamental, mas não garante, por si só, a melhoria da qualidade do ar. É necessário garantir também que os veículos sejam mantidos conforme as recomendações dos fabricantes. Por esse motivo, com base em resolução CONAMA, foi criado em 1993 o PIV

(Programa de Inspeção Veicular) para fazer a inspeção e manutenção de veículos em uso nos grandes centros urbanos (www.cetesb.sp.gov.br/ar /emissões/im.asp).

3.2. EFEITOS DOS POLUENTES NA SAÚDE HUMANA

A poluição só foi relacionada à saúde no século passado. Contudo, mesmo antes da Revolução Industrial, por volta de 1700, já havia uma preocupação em se controlar os poluentes emitidos na atmosfera. Vários episódios graves de poluição atmosférica ocorreram após a segunda guerra mundial, dentre os quais destaca-se o que ocorreu em Londres, Inglaterra, em dezembro de 1952, que resultou na morte de 3.500 pessoas. (SCHWARTZ e MARCUS, 1990; BRANCO e MURGEL, 1996). Desde então, em diversas partes do mundo, vêm sendo feitas muitas pesquisas visando a conhecer os efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde humana, incentivar a ação do governo no monitoramento da qualidade do ar e diminuir os níveis de poluentes do ar (BRANCO e MURGEL, 1996).

O efeito que um poluente provoca depende basicamente de sua concentração no ar que respiramos e do tempo de exposição, ou seja, depende da dose de exposição. Nas grandes cidades, o ar vem apresentando concentrações crescentes de substâncias que são prejudiciais aos seres vivos, tornando a poluição do ar um caso de saúde pública. Os principais efeitos dos poluentes atmosféricos sobre a saúde são: doenças respiratórias, problemas oftalmológicos, injúrias na pele, problemas cardiovasculares, gastro-intestinais e alguns tipos de câncer. Esta visão é confirmada por estudos epidemiológicos, que têm mostrado uma relação entre o aumento da poluição do ar nos centros urbanos e o aumento de doenças respiratórias (HENDERSAON et al.1975; BÖHM, 1982), e de câncer de pulmão (CARNOW e MEIER, 1973). Estudos mostram, ainda, uma relação entre a poluição atmosférica e as mortalidades infantil (SALDIVA et al. 1994) e de idosos (SALDIVA et al., 1995).

A poluição atmosférica está associada com a mortalidade por doenças respiratórias e a uma freqüência maior de sintomas alérgicos e asma brônquica (BASCOM et al., 1996). Estudos epidemiológicos demonstram estreita relação entre asma e rinite com a intensidade do tráfego próximo a residências em regiões urbanas (WJST et al. 1993; NICOLAI, 2002).

Os problemas respiratórios igualmente constituem uma importante causa de morbidade na distribuição de doenças no Brasil. Em 2002, os dados do ministério da saúde mostraram que 1.936.444 pacientes foram internados em hospitais da rede pública brasileira com problemas pulmonares. Entre os fatores ambientais, a poluição atmosférica é uma das principais causas dos problemas respiratórios (NICOLAI, 2002).

Vários estudos demonstram que a poluição urbana, resultante das emissões veiculares, produz alterações inflamatórias no parênquima pulmonar de ratos expostos por longos períodos em locais poluídos da cidade de São Paulo (BOHM et al., 1989; SALDIVA et al., 1992). A associação entre NO_2, SO_2 e CO é mais significativa na investigação da mortalidade intra-uterina do que quando analisados separadamente (PEREIRA et al., 1998).

A exaustão de motores diesel contribui substancialmente para a poluição do ar ambiental, embora estes motores tenham baixa emissão de CO, menores até mesmo que a dos motores a álcool (PAGLIUSO, 2004). Contudo, o material particulado (MP), o dióxido de enxofre e outros produtos de combustão típicos do diesel mostraram associações com mortalidade por câncer de pulmão (ABBEY et al., 1999). Além do mais, foi classificada como carcinogênica para animais, em condições experimentais, e provavelmente como carcinogênicas aos seres humanos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1989). O efeito carcinogênico da exposição à exaustão do diesel ocorre principalmente pela inalação de partículas, pois as fuligens da exaustão do diesel adsorvem em sua superfície reconhecidos ou suspeitos, mutágenos e

carcinógenos, como os compostos policíclicos aromáticos (HPA_S), (HUISING et al., 1978). Devido ao seu diâmetro dinâmico médio, (0.01-0.3 μm), a maioria das partículas é facilmente inalável e 10% são depositadas na região alveolar do pulmão (SCHEEPERS e BOSS, 1999).

Estudos epidemiológicos revelaram riscos significantes de aumento de ocorrência de câncer de pulmão depois de um longo tempo de exposição ocupacional a altas concentrações de exaustão de motores a diesel (BATHIA et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que a urbanização e os altos níveis de emissão veicular e o moderno estilo de vida estão correlacionados também com o aumento da freqüência de alergias respiratórias induzidas por pólen. Pessoas que vivem nas áreas urbanas são mais afetadas por alergias respiratórias induzidas por pólen, mais do que as pessoas que vivem na zona rural (D'AMATO et *al.*, 2001).

As vias urbanas são os principais locais de exposição humana ao monóxido de carbono (SKIBA e BAVYDOVA-BELITSKAYA, 2003). No entanto, vale ressaltar que nos motores diesel a emissão é baixa. O CO é um gás, venenoso, inodoro, incolor e tem um tempo de residência na atmosfera de dois a quatro meses (WARK, WARNER, 1996). Em altas concentrações, acima de 750 ppm, pode causar doenças e mudanças fisiológicas, pois a hemoglobina tem, aproximadamente 200 a 240 vezes mais afinidade pelo CO do que pelo oxigênio, privando assim o organismo do oxigênio necessário (WARK et al., 1998). Efeitos no sistema nervoso têm sido associados com os altos níveis de monóxido de carbono no ar. A emissão desse poluente varia de acordo com o combustível e a tecnologia empregada (SOTTO PAU, 2003).

Muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado que câncer de pulmão é mais comum em áreas urbanas do que em regiões rurais (STOCKS, 1960) Contudo, existem fatores de confusão, tais como: hábitos alimentares, uso de bebidas alcoólicas, condições de trabalho e fumo ativo e passivo. Esses fatores também aumentam o risco de tumores de pulmão em habitantes urbanos (CARNOW e MEIER, 1973; BUFFLER et *al.*, 1998).

Por conter agentes mutagênicos e carcinogênicos reconhecidos, como por exemplo: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, fibras minerais, nitrosaminas e nitroaromáticos a poluição do ar está relacionada com a mutagênese e com o câncer de pulmão (ARCHER, 1990). Devido à ação oxidante dos poluentes as células epiteliais ativam os fatores de transcrição de certos genes para certas citosinas, como as enzimas inflamatórias (BARNES, 1995).

Efeitos indiretos na saúde podem ser associados com as mudanças climáticas causadas pela poluição do ar. Um aumento na temperatura do ar tem impacto na distribuição da fauna e da flora afetando a distribuição no espaço de alguns vetores de doenças (RIBEIRO e CARDOSO, 2003). Além disso, a acumulação do calor em áreas urbanas, associada com a poluição do ar, tem efeito adverso na saúde principalmente para pessoas idosas.

3.3. EFEITOS DOS POLUENTES SOBRE AS PLANTAS E FLORESTAS

Impactos adversos da poluição do ar sobre plantas ao redor de indústrias e cidades metropolitanas têm sido relatados em várias partes do mundo, nas últimas décadas. Um dos casos mais conhecidos de efeitos de poluição ocorreu no Canadá no século 19 onde florestas inteiras foram

perdidas e, ainda hoje, os efeitos da poluição atmosférica são evidentes mesmo com a redução das emissões naquele local (GUNN et al., 1995).

As primeiras observações de que os poluentes atingem negativamente as plantas foram feitas por NYLANDER em 1866. O primeiro método baseado no emprego de plantas como sentinelas para provar a ocorrência de danos nos vegetais causados por poluição foi proposto por SORAUER em 1911. A partir de então milhares de espécies já foram utilizados como bioindicadoras e já foram estudados os efeitos de mais de 20 tipos diferentes de poluentes com publicação de centenas de artigos por ano (ARNDT e SCHWEIZER 1991; VDI 1999).

Atualmente, os principais poluentes considerados como causadores de maiores danos nas vegetações são: dióxido de enxofre (SO_2), óxidos de nitrogênio (NO_x), ozônio (O_3) e material particulado (MP). Esses poluentes afetam diretamente a vitalidade das espécies em um ecossistema, aumentando a predisposição a outros estresses bióticos e abióticos; afetam, além disso, o processo inicial da vida, pois as plântulas parecem ser mais sensíveis aos poluentes. A absorção dos poluentes resulta em mudanças de crescimento e na arquitetura das plantas, retardam o crescimento e reduzem a biomassa, além de causarem a diminuição da produtividade nas culturas agrícolas (EMBERSON et al., 2003).

Os vegetais não respondem de forma específica a um poluente, eles mostram tendências que sistematicamente se repetem, dificultando assim o estabelecimento das relações de dose-resposta, pois pode haver sinergismo ou antagonismo dos poluentes (DASSLER e BORTITZ, 1988).

Os efeitos diretos da poluição nas plantas são classificados como injúrias visíveis, observadas nas superfícies foliares na forma de

descolorações, pigmentações ou necroses causadas por danos ou morte nas células e injúrias invisíveis, que resultam dos impactos nos processos bioquímicos ou fisiológicos na planta (EMBERSON et al., 2003).

Os poluentes atmosféricos causam impactos na vegetação de diversas maneiras e existem milhares de trabalhos que empregam o biomonitoramento ativo ou passivo sob condições controladas de laboratório ou sob condições naturais para avaliar estes impactos. Milhares de plantas já foram estudadas tanto no campo da fitopatologia como nos campos da agricultura e da fisiologia, ecologia, bioquímica e anatomia de plantas (BENNET e BUCHEN, 1995).

No Brasil, o caso mais conhecido de impacto da poluição sobre as plantas foi o declínio da Mata Atlântica (em Cubatão) que compreende um mosaico de ecossistemas ao longo da costa brasileira. Estudos mostraram uma grande redução na biodiversidade de árvores com base nos dados obtidos no início da industrialização. Indivíduos adultos de *Tibouchina pulchra*, uma espécie pioneira, aparentemente tolerante à poluição do ar exibiu alterações na anatomia do lenho (MAZONNI e VIVEIROS, 1996).

3.4. BIOMONITORAMENTO

Biomonitoramento é qualquer método que faz uso de reações da vida em qualquer nível – do sub-celular à comunidade – para indicar e/ou caracterizar mudanças induzidas nas condições ambientais, entre as quais as induzidas pela poluição atmosférica (ELLENBERG, 1991; ARNDT e SCHWEIZER, 1991). É particularmente útil para monitoramento de longo prazo em grandes áreas sem emprego de equipamentos sofisticados.

O biomonitoramento não substitui os métodos diretos de medidas dos níveis de poluição, mas representa um método complementar que amplia os limites do monitoramento através de estratégias convencionais para avaliar o risco ambiental.

O uso do biomonitoramento apresenta características vantajosas tais como: alta sensibilidade, poder de diferenciar e descrever as mudanças ambientais, relevância ecológica e capacidade de detectar mudanças ambientais mais rapidamente, entre outras.

Uma das características dos seres vivos é sua habilidade em responder a estímulos externos, os quais ativam processos que ajudam na sua sobrevivência. Essas características podem ser usadas como indicadoras de alteração de seu ambiente (ARNDT e SCHWEIZER, 1991). Indivíduos que possuem algumas dessas características são chamados bioindicadores, os quais são definidos como organismos, populações ou comunidade de organismos que reagem a mudanças ambientais através de alterações em suas funções vitais ou em sua composição química, permitindo, assim, a avaliação da saúde ambiental. As plantas superiores estão entre os organismos bioindicadores mais utilizados para monitoramento da qualidade do ar (ELLENBERG, 1991; ARDNT e SCHWEIZER, 1991).

As plantas são mais sensíveis à poluição do que os animais, incluindo o homem. Por este motivo, estudos sobre os efeitos dos poluentes na vegetação fornecem subsídios importantes para programas de controle da poluição do ar (ALVES et al., 2001). Além do mais, são facilmente cultivadas, mantidas e utilizadas em estudos; muitas plantas possuem ciclos de vida curtos, o que torna possível avaliar os efeitos causados por poluição ambiental em curto prazo. (ARNDT e SCHWEIZER, 1991).

O biomonitoramento pode ser feito em campo, ao ar livre, ou em câmaras especiais, denominadas câmaras de fumigação. No primeiro caso é útil para avaliar os efeitos dos poluentes presentes no ar, já o uso das câmaras permite uma simulação controlada, embora restrita da ação atmosférica destes poluentes. O uso de câmaras tem ainda outra aplicação importante, que é a avaliação direta do impacto das fontes de poluição, através de seu acoplamento a exaustão de motores, incineradores e outras fontes de emissão ligadas ao transporte ou à atividade industrial (**Figura 3.1**)

Figura 3.1- Câmara de fumigação para testes de impactos ambientais causados pela poluição do ar, desenvolvida e construída pelo NET e F da EESC/USP e Instituto de Botânica de São Paulo.

Os efeitos da poluição atmosférica podem ser monitorados através do uso de quatro tipos básicos de plantas bioindicadoras: 1- bioindicadoras, que são também chamadas monitoras sensíveis, mostram sintomas visíveis como clorose e necrose, por exemplo, a folha do tabaco exposta a altas

intermediárias entre as sensíveis e acumuladoras, mostram respostas invisíveis, ou seja, mostram alterações fisiológicas, bioquímicas e genéticas como, por exemplo, as mutações; 3- bioacumuladoras ou monitoras acumuladoras, que acumulam os elementos químicos provenientes da poluição atmosférica em seus tecidos, por exemplo, acúmulo de metais pela *Tillandsia usneoides.* 4- indicadoras ecológicas, também denominadas apontadoras, que são populações ou comunidades vegetais que apontam interferências da poluição em nível ecossistêmico (GARREC e VAN HALUWYN, 2002; DE TEMMERMAN et al. 2004).

Várias espécies de plantas têm sido usadas como bioindicadoras em programas de biomonitoramento da qualidade do ar. Clones de *Tradescantia* vêm sendo usadas desde 1960 como bioindicadoras eficientes na determinação do potencial genotóxico de poluentes atmosféricos (MA, 1982; BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000). Os bioensaios com plantas são eficazes nos estudos de mutagênese de curta duração, nos biomonitoramentos in situ e em laboratório (MA, 1979; MA, 1981; BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al. 2000).

Os clones do gênero *Tradescantia* são plantas biosensoras ou biomonitoras de grande importância. Eles têm sido utilizados para biomonitoramento do potencial genotóxico de substâncias que contaminam o ar, água e solo, em virtude de uma série de características favoráveis, entre as quais, possuem apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, e às células de quase todas as partes da planta fornece material excelente para estudos citogenéticos (MA, 1982).

De acordo com MA (1994), o ensaio com pelo estaminal de *Tradescantia* (Trad-SH), desenvolvido por ARNOLD H. S. SPARROW é uma ferramenta eficaz para monitorar os riscos impostos aos organismos por agentes mutagênicos (ICHIKAWA, 1992). Este ensaio 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. 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 dois eventos de mutação.

Níveis de poluição do ar, monitorado através de medidas físico-químicas, são dados importantes da qualidade do ar, mas não podem ser usados diretamente para prever os riscos aos quais os seres vivos estão sujeitos. O uso das plantas bioindicadoras é mais eficaz para esse fim, pois todas as influências externas afetam a natureza de suas respostas às alterações ambientais, traduzindo em uma única reação mensurável. Essa peculiaridade permite ainda a detecção de níveis crônicos de poluição, a determinação de valores limites de respostas, visando o controle de emissão de poluentes e fornece subsídios para o estabelecimento de medidas concretas previstas na legislação (ARDNT e SCHWEIZER, 1991).

Bioensaio de mutagênese usando plantas parece ser uma ferramenta importante na investigação das conseqüências do impacto ambiental devido à poluição do ar, principalmente na saúde humana. Embora esses efeitos não possam ser extrapolados diretamente para populações humanas, não se pode deixar de considerar que esses bioensaios são indicadores precisos de riscos potenciais aos quais os seres vivos estão expostos. Então, pressupõe-se que, se uma substância não trouxer nenhum prejuízo à planta, que geralmente é mais sensível, também não trará prejuízo nenhum ao homem. Além do mais, como as plantas mostram respostas positivas em curto prazo, os bioensaios podem ser usados para prevenção dos impactos da poluição ambiental sobre os seres vivos.

A escolha do bioensaio Trad-SH como marcador do potencial mutagênico da exaustão dos motores diesel se deveu não somente à sua versatilidade e propriedades de bioensaio para testes em laboratório, como também à sua extraordinária sensibilidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MOTOR DIESEL

A mistura de poluentes à qual as plantas foram expostas era proveniente da exaustão de um motor de combustão interna aspirado, volume de 2.0 L, diesel como mostrado na **Figura 4.1**. Este motor está em operação no laboratório de motores do Núcleo de Engenharia Térmicas e Fluidos (NETeF) e, para cada experimento, foi mantido em funcionamento em regime de marcha lenta por duas horas.

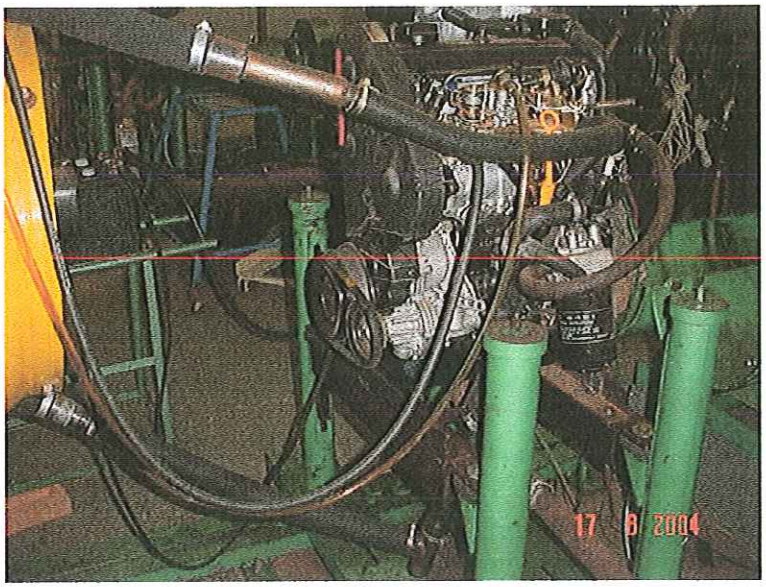


Figura 4.1 – Motor diesel 2.0 L utilizado nos experimentos.

4. 2. CÂMARAS

As câmaras usadas para a intoxicação das plantas com os poluentes provenientes da emissão do motor a diesel foram montadas com recipientes plásticos, fechados com tampa rosqueável onde havia dois orifícios, sendo um para entrada e outro para saída dos gases. Estas câmaras têm 12 cm de diâmetro, 19 cm de altura, e um volume de 1,8 litros (**Figura 4.2**). As câmaras foram usadas tanto para as inflorescências expostas aos poluentes quanto para as não expostas.

Figura 4.2 - Câmara contendo as inflorescências da KU-20.

4.3. MISTURADOR DE GASES

Para simular uma concentração de poluentes mais próxima da realidade urbana, os gases do motor depois de coletados diretamente do escapamento utilizando uma mangueira foram misturados com ar atmosférico fornecido por um compressor, por intermédio de um misturador de gases (**Figura 4.3**). As

mangueiras utilizadas se encontrava em posição tangencial. A vazão do ar atmosférico foi ajustada por meio de válvulas manuais controladoras da pressão e vazão, então a mistura era conferida por um analisador de CO.

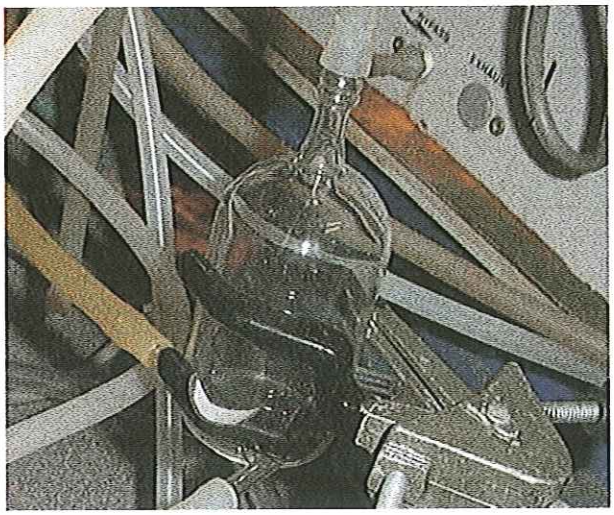


Figura 4.3 – Misturador de gases

4.4. SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS

Foi montado um sistema para aquisição de dados da concentração de poluentes gasosos, composto por um microcomputador com uma placa de aquisição PCI-6023, acoplada a um chassi SCXI-1000 com módulo multiplexador SCXI-1100 conectado a um bloco terminal SCXI-1300, todos da *National Instruments*. O módulo foi configurado com ganho baixo (10 vezes), sendo que os três primeiros canais foram utilizados para coletar os sinais de tensão de 0 a 10V das saídas analógicas dos analisadores de monóxido de carbono, hidrocarbonetos totais e dióxido de enxofre. Os sinais transferidos para a placa de aquisição foram coletados e tratados por um software desenvolvido na plataforma de programação LabView, que recuperava o valor da concentração dos gases levando em consideração as faixas de fundo de escala em operação nos analisadores e gases. O software estava preparado

para registrar coletas longas, exportando os dados coletados para posterior tratamento.

As concentrações dos gases foram medidas com analisadores Horiba Enda 1400, modelo VIA-510, para SO_2, CO e CO_2; modelo MPA-510 para O_2; modelo CLA – 510, para NO_x e modelo FIA-510, para HCT. Estes analisadores são sensíveis aos gases, porém, há uma dificuldade em medir concentrações muito baixas. Alguns destes analisadores de gases são mostrados na **Figura 4.4**.

Figura 4. 4 – Analisadores de gases (Horiba).

Os equipamentos têm precisão de 0,5% do fundo de escala e possuem de quatro a cinco faixas de calibração. A calibração dos analisadores foi executada com gases de padrão primário contendo frações do gás de análise em N_2 equivalentes a cerca de 80% do fundo de escala nas várias faixas de calibração. O procedimento de calibração foi repetido várias vezes antecedendo os experimentos.

4.5. PLANTA BIOINDICADORA

A planta bioindicadora utilizada nos experimentos foi o clone KU-20 de *Tradescantia* (**Figura 4.5**). Esse clone foi desenvolvido na universidade de Kyoto-Japão (ICHIKAWA, 1984). Sua origem exata é desconhecida, contudo, apresenta parte das características de *T. Ohiensis* parecendo originar-se de um híbrido entre essa espécie e uma outra não determinada (ICHIKAWA, 1992). Para este trabalho as primeiras mudas foram cedidas pela Faculdade de Medicina da USP-SP, as quais foram cultivadas nos canteiros do NETeF da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) (**Figura 4.6**).

Figura 4.5 – Clone KU-20 da *Tradescantia*.

Figura 4.6 – Canteiro do NETeF da EESC com o clone KU-20.

4.6. METODOLOGIA

Nos ensaios, as inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* foram expostas às emissões resultantes da exaustão do motor diesel, em diferentes diluições e por 2 horas, pois esse bioindicador apresenta uma resposta satisfatória neste intervalo de tempo. Neste trabalho, o procedimento foi denominado intoxicação.

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais conforme descrito abaixo:

I. Grupo 1 (controle): inflorescências colhidas no canteiro do NET e F, inseridas na câmara por duas horas, porém não submetidas à exaustão do motor diesel.

II. Grupo 2: inflorescências intoxicadas com as emissões da exaustão do motor diluídas com ar atmosférico. A diluição foi feita com base na concentração de CO, que ficou em torno de 50 ppm.

III. Grupo 3: Semelhante ao grupo 2, porém a diluição foi feita com base na concentração de CO, que foi fixada em torno de 100 ppm.

IV. Grupo 4: Semelhante ao grupo 2, porém a diluição foi feita com base na concentração de 150 ppm de CO.

Os experimentos foram feitos no período de maio a novembro de 2004. Mais especificamente, os testes para o grupo 2 e seu respectivo controle foram feitos nos meses de maio e agosto; para o grupo 3 (e controle) no mês de agosto e para o grupo 4 (e controle) nos meses de outubro e novembro.

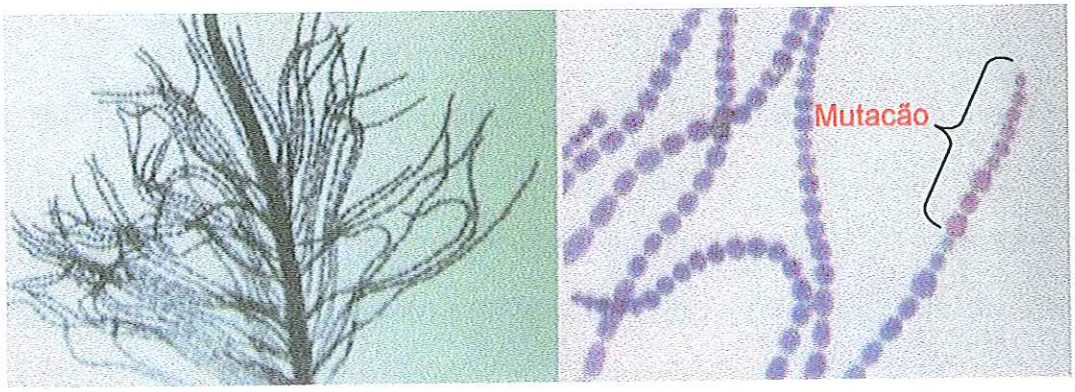
A diluição das emissões no ambiente da câmara na qual as plantas ficaram expostas foi uma solução de compromisso entre o valor encontrado no ambiente urbano poluído e a sensibilidade do equipamento utilizado. FREITAS, 2003 chegou a registrar na cidade de Ribeirão Preto-SP picos de até 15 ppm de CO em pesquisas realizadas naquela cidade em 2003. De acordo com boletim da CETESB (WWW.cetesb.gov.br/arboletim.asp), a faixa de concentração de CO $\geq$ 40,1 ppm indica que a qualidade do ar é critica, e o ar já é considerado poluído quando a concentração de CO excede 9 ppm por mais de 8 horas ou 35 ppm durante uma hora e uma única vez no ano.

Após a intoxicação, as inflorescências foram retiradas das câmaras e mantidas em um becker com água sob um sistema de aeração, por aproximadamente três dias. Durante este 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 eram feitas no período matutino, quando as flores estavam abertas.

Para se fazer a leitura ao microscópio foi feito o seguinte procedimento: primeiramente os seis estames de cada flor foram colocados lado a lado sobre uma lâmina e, sobre cada estame acrescentou-se 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 com câmara AxioCam marca ZEISS modelo MRRC em operação no NUMA (Núcleo de Manufatura Avançada) da EESC. Inicialmente, estimou-se o número médio de pêlos estaminais para cada flor, partindo da contagem do número de pelos em dois estames, sendo um de pétalas e um de sépalas. Em seqüência, foi feita a contagem do número de eventos de mutação em todos os estames. Cada evento mutagênico foi caracterizado por uma célula ou um

grupo de cor rosa entre as células normais de cor roxa, conforme descrito por MA et al.(1994). A **Figura 4.7** mostra um conjunto de células de cor rosa mutante entre os pelos estaminais.



Fonte: Sant'Anna, 2003.

(a) (b)

Figura 4.7 – Estame de *Tradescantia* com seus pêlos estaminais (a) e, em destaque, pêlo estaminal com evento de mutação (células de cor rosa) (b).

Após a contagem, foi feita uma estimativa do número de eventos de mutação por 1000 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.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi feita a adequação do modelo estatístico. Primeiro foi traçado o gráfico de probabilidade normal dos resíduos, em seguida foi feito uma correlação dos resíduos e por último, o teste de homogeneidade de variância dos resíduos. A análise estatística foi feita usando-se o software no programa de Estatística (versão 5.5). O nível de significância foi ajustado em 5%.

EESC-USP Biblioteca Campus de S. Carlos

Os dados originados nos testes por apresentarem igualdade de variância e distribuição normal, foram avaliados por análise de variância, seguida por analise de comparações múltiplas (teste de DUNCAM), para verificar se houve diferenças significativas entre as freqüências de mutações observadas nos grupos experimentais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADOS

As concentrações de CO, HCT e SO_2 nas emissões do motor diesel, diluídas com base na concentração de 100 ppm de CO, são mostradas na **Figura 5.1**. Os níveis de contaminação das plantas correspondem a doses muito mais altas que as encontradas num ambiente urbano poluído, conforme descrito na seção 4.6. Não foram analisadas emissões para 50 e 150 ppm de CO.

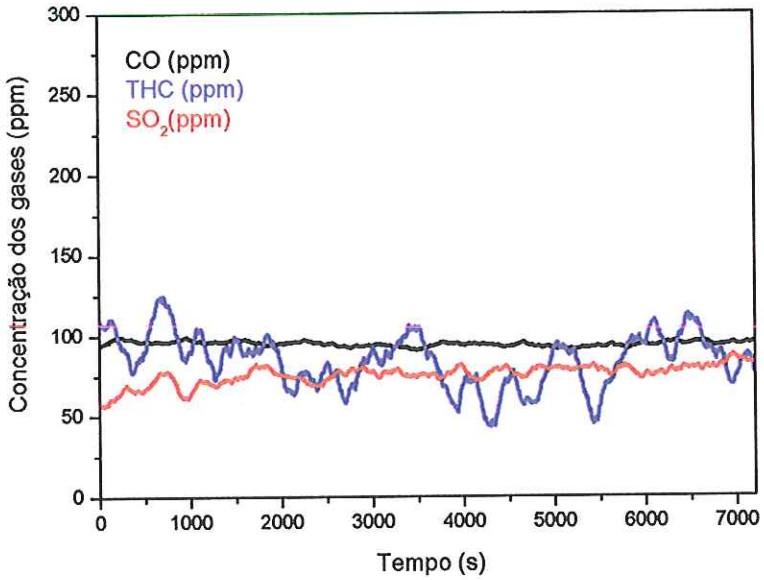


Figura 5.1. Concentração dos gases CO, HCT e SO_2 obtidos na diluição da exaustão do motor a diesel para 100 ppm de monóxido de carbono. Os valores foram detectados pelos respectivos analisadores de gases Horiba.

A análise descritiva dos valores de mutação encontrados nos experimentos da exposição das inflorescências do clone KU – 20 de *Tradescantia* são mostrados na **Tabela-5.1** e a análise de variância dos experimentos (ANOVA) na **Tabela-5.2**. Na **Tabela-5.3** foi incluída a comparação das médias, adotando o 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 5.2 e 5.3**. Os dados detalhados dos valores de mutações obtidos a partir dos ensaios referentes aos grupos 1 (controle), grupo 2 (50 ppm CO), grupo 3 (100 ppm CO) e grupo 4 (150 ppm CO) encontram-se no apêndice 1 (**Tabela-a**).

Tabela 5.1 – Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases de exaustão do motor diesel.

	Valores de mutação para cada flor				
Grupos	Número de flores analisadas	mínimo	máximo	Médio	Desvio-padrão
Grupo 1	35	2,68	24,19	12,88	7,46
Grupo 2	17	2,74	33,33	15,11	9,35
Grupo 3	22	14,38	79,13	40,92	18,22
Grupo 4	17	28,90	69,36	39,48	13,31

Tabela 5.2 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos gases de exaustão do motor diesel.

Fonte	Graus de liberdade	Soma dos quadrados dos resíduos	Média dos quadrados médios dos resíduos	Teste de hipóteses (F)	Probabilidade Pr > F
Modelo	3	164,82	54,94	38,61	< 0,0001
Erro	87	123,79	1,42		
Correção total	90	288,61			

$R^2 = 0,57$

Tabela 5.3 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas à exaustão do motor diesel.

Grupos	Média	N
1 (controle)	12,88 A	35
2 (50 ppm CO)	15,11 A	17
3 (100 ppm CO)	40,92 B	22
4 (150 ppm CO)	39,48 B	17

Médias seguidas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste de DUNCAN (significância de 5%).

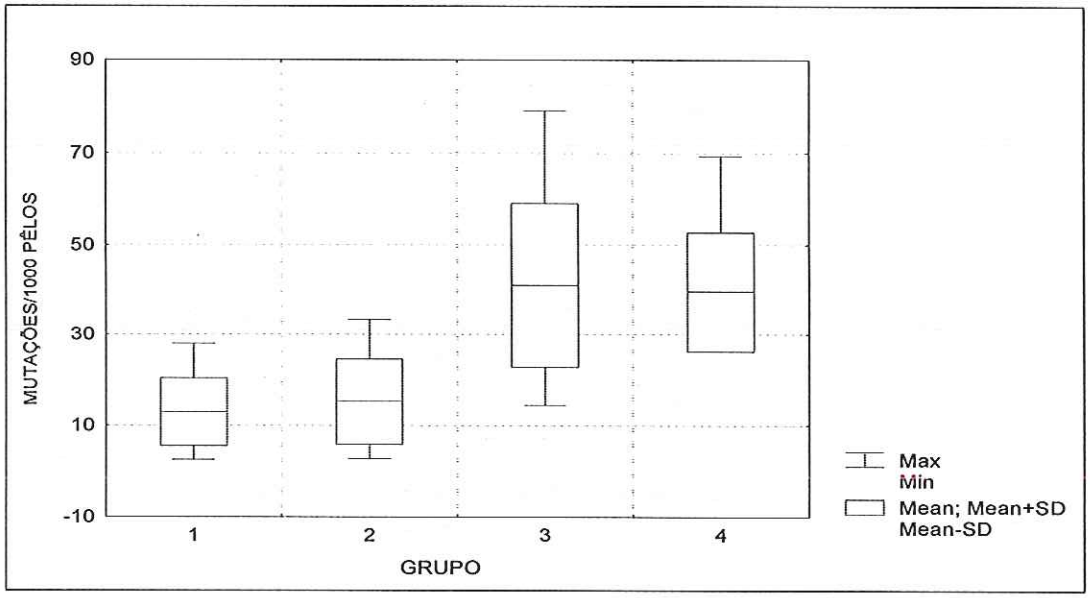


Figura 5.2. Freqüência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor a diesel aspirado de 2.0 L de deslocamento volumétrico.

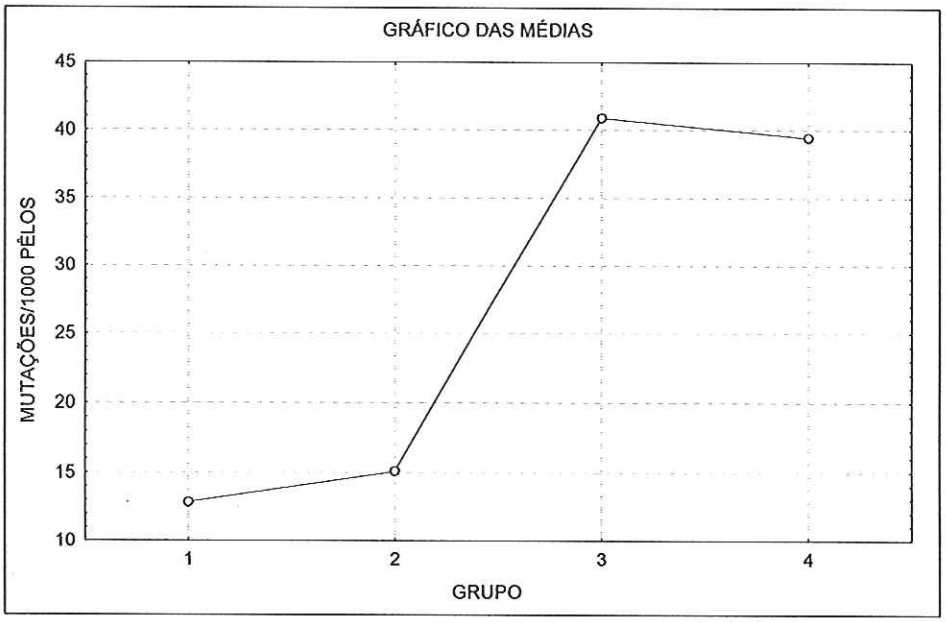


Figura 5.3. Médias das freqüências de mutações em pêlos estaminais do clone KU-20.

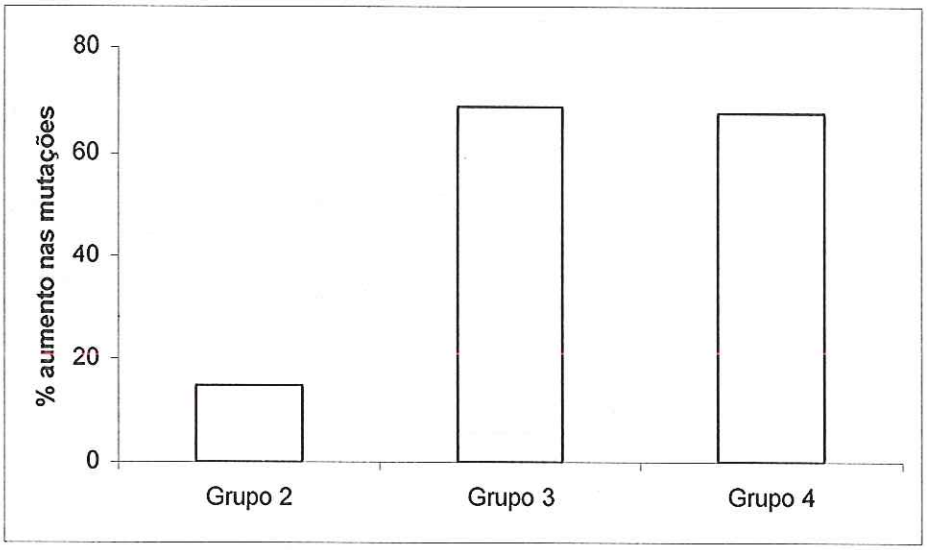


Figura 5.4. Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas à exaustão de motor a diesel, em relação ao tratamento controle (grupo 1).

Pelos valores das médias, os grupos experimentais foram separados significativamente em dois grandes grupos ($p < 0,001$). A freqüência média das mutações observadas no Grupo 1 (controle), foi significativamente mais baixa do que aquela dos Grupos 3 e 4, porém foi similar a do Grupo 2. Por sua vez, não houve diferenças significativas nas freqüências de mutações entre os Grupos 3 (100 ppm CO) e 4 (150 ppm CO). Quando se observa o aumento percentual nas mutações em relação ao controle nota-se que há um aumento em torno de 20%, 70% e 70% para os grupos 2, 3 e 4 respectivamente (**Figura 5.4**).

Para adequação do modelo estatístico (ANOVA) utilizado, foram traçados os gráficos de normalidade dos resíduos, homogeneidade de variância e ordem dos resíduos, indicando que o modelo foi adequado para mostrar a freqüência de mutações em pelos estaminais. Estes dados estão apresentados nos apêndices 2 (**Figura a**), 3 (**Figura b**) e 4 (**Figura c**) respectivamente.

Para a realização da análise de variância e o teste de comparação múltipla os dados das respostas, ou seja, os números de mutações sofreram uma transformação (raiz quadrada) para satisfazer a suposição do modelo de normalidade dos resíduos. O R^2 obtido após o ajuste foi de 57%, ou seja, o modelo explica 57% da variabilidade existente nos dados.

5.2. DISCUSSÃO

Como foi destacado no Capítulo 4, foram utilizados neste trabalho três grupos experimentais de inflorescências submetidas à exaustão do motor a diesel com diferentes concentrações de poluentes, estabelecidas por diluição, tendo como base a concentração de CO de 50, 100 e 150 ppm. Os resultados

obtidos foram comparados aos do grupo controle, não expostos às emissões do motor diesel.

Tais níveis de contaminação foram, de fato, críticos, se forem comparado com os piores índices de qualidade do ar, que ocorrem com mais freqüência durante o inverno. Por exemplo, registros na cidade de Ribeirão Preto-SP mostraram que as concentrações de CO atingiram valores máximos de até 15 ppm nesse período (FREITAS, 2003). Embora tenha sido usada a concentração de monóxido de carbono como parâmetro para simular uma atmosfera poluída, a exaustão dos motores diesel contém outros poluentes, tais como CO_2, NO_x, SO_2, HCT e MP. Por isso, não somente as concentrações de CO foram medidas, mas também a dos outros poluentes. Na **Figura 6.1** encontra-se esses valores para o CO, HCT e SO_2. Dentro da categoria de poluentes, coletivamente conhecidos como HCT, existe uma série de poluentes orgânicos como os HPAs e outros aos quais se pode atribuir prioritariamente os efeitos observados nas plantas.

Os resultados dos bioensaios indicam que a emissão do motor diesel diluída para alcançar a concentração de 50 ppm de CO, não promoveu o aumento de mutações em inflorescências do clone KU-20. Cabe ressaltar que as plantas das quais foram retiradas as inflorescências, tanto para o controle quanto para a exposição à exaustão do motor, encontravam-se num local onde há um fluxo considerável de veículos. Isto pode indicar certa aclimatação ao ambiente poluído, diminuindo a capacidade de resposta das plantas. Observe-se, entretanto, que a concentração de CO no local não passa de alguns ppm e que o trânsito é no local majoritariamente de veículos leves, com pouca presença de motores diesel. GUIMARÃES et al (2000) verificaram o mesmo efeito de aclimatação quando avaliaram riscos clastogênicos da emissão veicular em locais com intenso tráfego da cidade de São Paulo, colhendo inflorescências de *Tradescantia pálida cv. Purpúrea* plantada em canteiros públicos.

Por outro lado, os resultados apresentados pelos Grupos 3 e 4 indicam que, em atmosfera contendo mais do que 100 ppm de CO o índice de mutação aparentemente atingiu um limite máximo de alterações no material genético. Este resultado mostra que eventualmente pode haver uma limitação na aplicação do bioensaio às fontes poluentes, traduzidas pela faixa relativamente estreita de concentração onde pode obter-se respostas diferenciadas e significativas.

Além disso, quando as inflorescências de KU-20 são expostas a uma concentração de ar semelhante a uma atmosfera urbana poluída as freqüências de mutações em pelos estaminais aumentam rapidamente. Essa característica faz com que a análise do pêlo estaminal do clone KU-20 seja mais vantajosa que a de outros bioindicadores igualmente usados para avaliar o risco mutagênico da poluição atmosférica.

As inflorescências expostas a 100 ppm e 150 ppm de CO apresentaram um aumento percentual nas mutações em torno de 70% em relação ao grupo controle, contudo esse poluente pode não ter sido o causador das mutações, já que não há menção na literatura de efeito mutagênico desse poluente. Outros compostos gerados na combustão do motor, que foram igualmente diluídos quando se simulava uma atmosfera contaminada por 50, 100 e 150 ppm de CO, como MP e alguns compostos orgânicos parecem ter sido os agentes mutagênicos mais prováveis.

O aumento da freqüência de mutações encontradas nos pêlos estaminais das inflorescências de KU–20 expostos à exaustão do motor diesel, já era esperado, pois nessas emissões encontram-se, entre outros poluentes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e materiais particulados, reconhecidos como mutagênicos e carcinogênicos. BURBER et al., 2000, observaram em condições experimentais, que o alto conteúdo de enxofre nos combustíveis,

altas cargas e as altas rotações nos motores estão associados também com um aumento do potencial mutagênico da combustão do diesel. De fato SAN'TANNA (2003) demonstrou que as partículas urbanas têm papel significativo no desenvolvimento de mutações em pelos estaminais de KU–20.

Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com aqueles obtidos por HUSING et al. (1978), com extratos orgânicos obtidos das partículas de exaustão do diesel, que agiram como mutágenos em testes in vitro com bactérias e mamíferos. BATALHA et al., (1999) prepararam soluções com amostras de MP obtidas do ar do centro de São Paulo e incubaram inflorescências de *Tradescantia pallida* e verificaram que houve um aumento significativo na freqüência de micronúcleos em célula mães de grãos de polens (bioensaio Trad – MCN) na medida em que as soluções tornavam-se mais concentradas.

Neste trabalho verificou-se que o bioensaio Trad-SH se mostrou eficiente para o biomonitoramento de contaminação aguda da exaustão dos motores diesel. Contudo, como esse nível de contaminação não ocorre freqüentemente no meio urbano, sendo a exposição crônica a situação mais próxima da realidade, é interessante estabelecer as relações entre doses crônicas de exposição, ou seja, a baixas concentrações por um período maior de tempo, e respostas mutagênicas nos pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20. Além do mais, são necessários também estudos adicionais para se determinar quais são precisamente os componentes da exaustão do motor diesel que afetam o DNA das células dos pêlos estaminais do clone KU-20 de *Tradescantia* causando mutações.

No entanto, o bioensaio Trad-SH com o clone KU-20 de *Tradescantia* mostrou-se capaz de reconhecer, embora aparentemente de forma não linear os diferentes níveis de concentração dos poluentes provenientes do motor.

Esses resultados mostram que a exaustão do motor diesel é significativa no desenvolvimento de mutações. Portanto, é interessante o uso desse bioensaio para se avaliar o potencial de riscos mutagênicos aos organismos vivos expostos à exaustão dos veículos automotores, bem como para avaliar alguns aspectos da qualidade do ar sem o uso de equipamentos de alto custo. Pode ainda ser empregado para monitorar áreas de grande extensão.

6. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

6.1. CONCLUSÕES

- ✓ A exaustão do motor diesel teve um papel significativo no desenvolvimento de mutações, mas somente quando diluída para alcançar concentração de CO igual ou acima de 100 ppm (Grupo 3 e 4). No tratamento em que as inflorescências foram submetidas à emissão mais diluída (50 ppm de CO), não houve acréscimo estatisticamente significativo das mutações em pelos estaminais. Porém, a emissão mais concentrada (150 ppm de CO) não promoveu um acréscimo adicional na freqüência de mutação em relação ao que já havia sido observada para o Grupo 3.

- ✓ Os testes mostraram que as emissões do motor Diesel causam aumento no número de mutações de organismos vivos submetidos a eles. Testes comparativos com outros combustíveis podem revelar-se importantes em uma avaliação mais completa dos impactos ambientais provocados pelo uso dos transportes.

- ✓ A metodologia foi adequada ao trabalho proposto e serve como parâmetros para a realização de outros trabalhos nesta linha de pesquisa, abrindo assim um leque de oportunidades para novas pesquisas.

- ✓ O bioensaio Trad-SH com flores estaminais do clone KU-20 mostrou-se eficiente para avaliação do potencial de risco mutagênico dos poluentes gerados na exaustão do motor diesel.

6.2. SUGESTÕES PARA TABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação e comparação do potencial de risco mutagênico dos poluentes provenientes da exaustão dos motores diesel, biodiesel, gasolina e álcool, usando o bioensaio Trad-SH e igual diluição dos gases para todos eles.

- ✓ Determinação precisa dos poluentes específicos provenientes da exaustão dos motores (diesel, biodiesel, gasolina e álcool) que afetam o DNA das células de plantas do gênero *Tradescantia* causando mutações.

- ✓ Avaliar a qualidade do ar na cidade de São Carlos-SP usando plantas do gênero *Tradescantia*.

REFERÊNCIAS

ABBEY, D.E.; NISHINO, N.; MCDONNELL, W.F.; BURCHETTE, R.J.; KNUTSEN, S.F.; BEESON, W.L.; YANG, J.X. (1999). Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v. 159 (2), p. 373-382, fev.

ALVES, E. S.; GIUSTI, P.M.; DOMINGOS, M. SALDIVA,; P.H.N.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D.J.A. (2001). Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 24, n. 4 (suplemento), p. 567-576. dez.

ARCHER, V.E. (1990). Air pollution fatal lung disease in three Utah counties. *Archives of Environmental Health*. v. 45 (6), p. 325-334.

ARDNT, U.; SCHWEIZER, B. (1991). The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical counties. In: Biological monitoring. *Signals from the environmental* (Ellenberg et al., eds.). Vieweg, Eschborn, p. 199-298.

ÁVILA, M.T. (2003). Estudo de um motor regenerativo utilzando etanol vaporizado. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos-USP, orientação do Prof. Dr. Pagliuso, J.D.

BARNES, P.J. (1995). Air-pollution and asthma-molecular mechanisms. *Molecular Medicine Today*. v. 1(3), p. 149-155. jun.

BASCOM, R.; BROMBERG, P.; COSTA, D.; DELVIN, R,; DOCKERY, D.; FRAMPTON, M.; LAMBERT, W.; SAMET, J.; SPEIZER, F.; UTELL, M. (1996).

Health effects of outdoor air pollution. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. v.153, p.3–50.

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. *Mutation Research*. v. 426, p. 229-232.

BATHIA, R.; LOPIPERO, P.; SMITH, A. H. (1998). Diesel exhaust exposure and lung cancer. *Epidemiology*. v. 9, p. 84-91.

BENNET, J.P.;BUCHEN, M.J. (1995). Bioleffe: three databases on air pollution effects on vegetation. *Environmental Pollution*. v. 88, p. 262-265.

BOHM, G.M.; MASSAD, E.; SALDIVA, P.H.N.; GOUVEIA, M.A.; PASQUALACCI, C.A.; CARDOSO, L.M.N.; CALDEIRA, M.P.R.; CALHEIROS, D.F. (1983). Comparative toxicity of alcohol and gasoline fueled automobile exhaust fumes. In: *Developments in the Science and Practice of Toxicology* by HAYES, A. W.; SCHNELL, R.C.; MIYA, T.S. Eds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdan. p. 479-482.

BOHM, G.M.; SALDIVA, P.H.N.; PASQUALUCCI, C.A.G.; MASSAD, E.; MARTIN, M.A.; ZIN, W.A.; CARDOSO, W.V.; CRIADO, P.M.P.; KOMATSUZAKI, M.; SAKAE, R.S.; NEGRI, E.M.; LEMOS, M.; CAPELOZZI, V.D.; CRESTANA, C.; SILVA, R. (1989). Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. *Environment Research*. v. 49, p. 208-216.

BRANCO, S.M.; MURGEL, E (1996). Poluição do ar. 5ª ed. São Paulo. Editora Moderna.

BUFFLER, P.A.; COOPER, S.P,; STINNETT, S.; CONTANT, C.; SHIRTS, S.; HARDY, R.J.; AGU, V.; GEHAN, B.; BURAU, K. S. (1988). Air-Pollution and Lung-Cancer Mortality in Harris-County, Texas, 1979-1981. *American Journal of Epidemiology*. v. 128 (4), p.683-699, out.

BÜRGER, J.; MULLER, M.M.; KRAHL, J.; BAUM, K.; WEIGEL, A.; HALLIER, E.; SCHULZ, T.G. (2000). Mutagenity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis*. v. 15(5), p. 391-397.

CARNOW, B. W.; MEIER, P. (1973). Air pollution and pulmonary cancer. *Archives of Environmental Health*. v. 27, p. 207j-218.

CETESB.(2004). Relatório da qualidade do ar no Estado de São Paulo. Disponível em: www.cetesb.sp.gov.br.

D'AMATO, G.; LICCARD, G. (1994). Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clinical and experimental allergy*. v. 24, p. 210-219.

D'AMATO, G.; LICCARDI, G.; D`AMATO, M.; CAZZOLA, M. (2001). The role of outdoor air pollution and climatic changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respiratory Medicine*. v. 95, p. 606-611, abr.

DÄSSLER, H. G.; BÖRTITZ, S. (1988). Air pollution and its influence on vegetation. Dr. W. Jung Publishers, Dordrecht.

DE TEMMERMAN, L.. et.al. (2004). Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future: Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness. Edited by Klumpp, A.; Ansel, W.; Klumpp, G. Cuvilier Veriang – Göttingen, p. 337-373.

DERÌSIO, J.C. (1992) Introdução ao controle de poluição ambiental. 1ª ed. São Paulo, Imprensa Oficial do Estado de São Paulo S.A.(IMESP).

ELLENBERG, H. (1991). Bioindicators and biological monitoring. In. biological monitoring signals from the environment (H. Ellenberg, ed.). Vieweg, Braunschweig, p. 13-74.

EMBERSON, L.D. et. al. (2001). Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. *Water Air and Soul Pollution*. v. 130, p. 107-118.

FEITOSA, M.V. (2003). Desenvolvimento do motor de ignição por compressão alimentado por injeção direta de óleo diesel e por etanol pós-vaporizado no coletor de admissão. Tese de doutorado. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Orientador Prof. Dr. Antonio Moreira Santos.

FELLENBER, G. (2003). Introdução aos problemas da poluição ambiental/FELLENBER, G; MAAR, J.H.; FREOHLICH, C.G. São Paulo: Epu; Springer, 196 p.

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, *Journal of Air Waste Manage*. v. 50, p. 1852-1856.

FLORES, F.E.V. (1987). Uso de plantas como bioindicadores de poluição no ambiente urbano-industrial: experiências em Porto Alegre, RS, Brasil, *Turbiger Geographische Studien*. v. 96, p. 79-86.

FREEDMAN, B. (1995). Environmental ecology. Academic Press Inc. 2ª ed. San Diego.

FREITAS, M.K. (2003). Investigação da produção e dispersão de poluentes do ar no ambiente urbano: determinação empírica e modelagem em rede neural da concentração de CO. Tese de doutorado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

GARREC, J.P.; VAN HALUWYN, C. (2002). Biosurveillance vegetale de la qualité de l'air. Editons Tec & Doc. Paris, 117 p.

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 *Trandescantia* – micronucleus (Trad – MCM) assay. *Environmental and Experimental Botany*. v. 44, p. 1– 8.

GUNN, J. ; KELLER, W.; NEGUSANTI, J.; POTVIN, R.; BECKETT, P.; WINTERHALDER, K. (1995). Ecosystem recovery after emission reductions: Sudbury, Canada. *Water Air and Soil Pollution*. v. 85(3), p. 1783-1788. dez.

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

HUISING, J.; BRADOW, R.; JUNGERS, R.; CLAXTON, L. ZWEIDINGES, R. TEJADA, S.; BUMGARNER, J.; DUFFIELD, F.; WATERS, M. (1978). Application of bioassay to the characterization of diesel particle emissions. In Waters, M.D.; Nesnow, S.; Hisings, J.L.; Sandhu, S.S.; Claxton, L.D. (eds). *Application of Short-term Bioassay in the Fractionation and Analysis of Complex Enviromental Mixtures.* Plenum Press, New York, NY, p. 382-418.

IARC (1989); IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. v. 46. *Disel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes.*IARC, Lyon, p. 41-185.

ICHIKAWA, S. (1984). Spontaneous somatic mutation frequency in the stamen-hair of 14 different *Tradescantia* clone heterozygous for flower color. *Environmental and Experimental Botany*. v. 24, p. 259-566.

ICHIKAWA, S. (1992). *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity its responses to ionizing radiation and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Research*. v. 270, p. 3-22.

MA, T.H. (1979). Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* – a promising mutagen system. *Mutation Research*. v. 64, p. 307-313.

MA, T.H. (1981). *Tradescantia* micronucleos biossay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspective.* v. 37, p. 85-90.

MA, T.H. (1982). *Tradescantia* cytogenetic tests (roop-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the U.S. Enviromental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research.* v. 99, p. 293-302.

MA, T.H. (1994). *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Research*. v. 310, p. 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" *Environmental Mutagenesis*. v. 5, p. 127 – 137.

MANNING, W.J.; FEDER, W.A.; (1980). Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers, London.

MARTINS, K.C.R. (2003). Estudo da aplicação de conversores catalíticos platina/paládio como auxiliar no processo de controle das emissões gasosas automotivas. Tese de Mestrado, NET e F da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, orientador Antonio Moreira dos Santos.

MAZONNI-VIVEIROS, S.C. (1996). Aspectos estruturais de *Tibouchina pulchra* cogn. (Melastomataceae) sob o impacto de poluentes atmosféricos provenientes do cmplexo industrial de Cubatão-SP – Brasil. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil.

MBULIGWE, S.E, KASSENGA, G.R.(1997). Automobile air pollution in Dar es Salaam City, Tanzania. *The Science of the Total Environment*. v. 199, p. 227-235.

NICOLAI, T. (2002). Pollution, environmental factors and childhood respiratory allergic disease. *Toxicology*. v. 181-182, p. 317-321.

PAGLIUSO, J.D. (1999). Redução de emissões poluentes dos motores de ignição por centelha através do uso de álcool pré-vaporizado e combustão com grande excesso de ar. Projeto FAPESP.

PAGLIUSO, J.D. (2004). Notas de aula da disciplina Poluição do Ar. Engenharia Ambiental, SEA-5858, Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

PANDEY, J.; AGRAWAL, M. (1994). Evaluation of air pollution phytotoxicity in a seasonally dry tropical urban environment using three woody perennials. *New Phytol*. v. 126, p. 53-61.

PEREIRA, L.A.A.,; LOOMIS, D.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; BRAGA, A.L.F.; ARCAS, R.M.; HISHI, H.S.; SINGER, J.M.; BÖHM, G.M.; SALDIVA, P.H.N. (1998). Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environmental Health Perspectives*. v. 106(6), p. 325-329.

POPE III, C.A.; BARNETT, R.T.; THUN, M.J.; CALLE, E.E.; KREWSKI, D,; ITO, K.; THURSTON, G.D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and

long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA(r) Journal of the American Medical Association*. v. 287(9), p. 1132-1141.

RIBEIRO, H.; CARDOSO, M.R.A. (2003). Air pollution and children's health in São Paulo (1986-1998). *Social Science & Medicine.* v. 57, p. 2013-2022.

RODRIGUES, G.S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. (1997). *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis – a review. *Critical Reviews in Plant Sciences*. v. 16(4), p. 325-359.

SALDIVA, P.H.N.; KING, M.; DELMONTE, V.L.C.; MACCHIONE, M.; PARADA, M.A.C.; DALIBERTO, M.L.; SADAE, R.S.; CRIADO, P.M.P. SILVEIRA, P.S.P.; ZIN, W.A.; BÖHM, G.M. (1992). Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environmental Research*. v. 57, p. 19-33.

SALDIVA, P.H.N.; LICHTENFELS, A..J.F.C.; PAIVA, I.A.; 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 *Environmental Research.* v. 65, p. 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 mortaly in elderly people: a times-series in São Paulo. *Archives of Environmental*. v. 50, p. 159-163.

SAN'TANNA, E.T.G. (2003). Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero *Tradescantia*. São Paulo. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

SCHEEPERS, P.T.J.; BOS, R.P. (1999). Combustion of diesel fuel from a toxicological perspective, I. Origen of incomplete combustion products. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. v. 64, p. 146-161.

SHWARTZ, J.; MARCUS, A. (1990). Mortality and air pollution in London: A time series analysis. *America Journal Epidemiological.* v. 131, p. 185-194;

SKIBA, Y.N.; BAVYDOVA-BELITSKAYA, V. (2003). On the estimation of impact of vehicular emissions. *E*cological *Modelling*. v. 166, p. 169-184.

SOTTO PAU, F. (2003). Análise experimental dos fenômenos da combustão e de emissão de gases em motores de combustão interna utilizando misturas de etanol e gasolina combustível. Tese de doutorado da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. Orientação Prof. Dr. Antonio Moreira.

STOCKS, P. (1960). On the relation between atmospheric pollution in urban and rural localities and mortality from cancer, bronchitis and pneumonia with particular references to 3-4 benzo-pyrene, beryllium, molybdenum, vanadium and arsenic. *British Journal of Cancer* . v. 14, p. 397-418.

VDI – Verin Deuscher Ingenieure (1999). Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamental aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft. v. 1a, Beuth, Berlin.

WARK, K.; WARNER, C.F. (1996). Contaminación del aire. Origen y control. Noriega Editores, Limusa.

WARK, K.; WARNER, C.F.; DAVIS, W.T. (1998). Air pollution: Its origin and control. 3ª ed. Menlo Park, California: Addisonj-Wesley.

WJST, M.; REITMEIR, P.; DOLD, S.; WULFF, A.; NICOLAY, T. VONLOEFFELHOLZCOLBERG, E.F.; VONMUTIUS, E. (1993). Road traffic and adverse-effects on respiratory health in children. British Medical Journal. v. 307(6904), p. 596-600. set.

WWW.CETESB.GOV.BR/ARBOLETIM.ASP

WWW.CETESB.SP.GOV.BR / AR / EMISSÕES / IM.ASP

WWW.CETESB.SP.GOV.BR/AR/EMISSÕES/PROCONVE 2.ASP

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Tabela a – Todos os dados obtidos.

Flor (nº)	Concentração (ppm)	Mutações/1000	Flor (nº)	Concentração (ppm)	Mutações/1000
1	0	13,44	47	50	6,57
2	0	2,68	48	50	21,92
3	0	5,37	49	50	8,77
4	0	21,5	50	50	19,73
5	0	24,19	51	50	15,35
6	0	18,81	52	50	10,26
7	0	13,44	53	100	60
8	0	24	54	100	41
9	0	20	55	100	79,13
10	0	16	56	100	41
11	0	16	57	100	26,37
12	0	16	58	100	45,56
13	0	24	59	100	45,56
14	0	22	60	100	14,38
15	0	28	61	100	15,34
16	0	18	62	100	55,22
17	0	17	63	100	55,22
18	0	19	64	100	35,53
19	0	21	65	100	78,89
20	0	9,34	66	100	41,42
21	0	3	67	100	53,25
22	0	9,34	68	100	43,3
23	0	9,34	69	100	19,68
24	0	6,23	70	100	23,62
25	0	6,23	71	100	28,57
26	0	11,97	72	100	47,61
27	0	7,98	73	100	20,95
28	0	7,75	74	100	28,57
29	0	5,16	75	150	28,9
30	0	10,33	76	150	32,75
31	0	2,58	77	150	28,9
32	0	2,58	78	150	34,68
33	0	9,34	79	150	30,82
34	0	3	80	150	69,36
35	0	6,23	81	150	35,39
36	50	2,74	82	150	47,78
37	50	8,24	83	150	26,54
38	50	10,98	84	150	28,35
39	50	10,98	85	150	28,35
40	50	10,98	86	150	33,62
41	50	8,24	87	150	64,85
42	50	33,33	88	150	41,84
43	50	31,25	89	150	56,48
44	50	27,08	90	150	48,11
45	50	6,25	91	150	34,47
46	50	24,12			

APÊNDICE 2

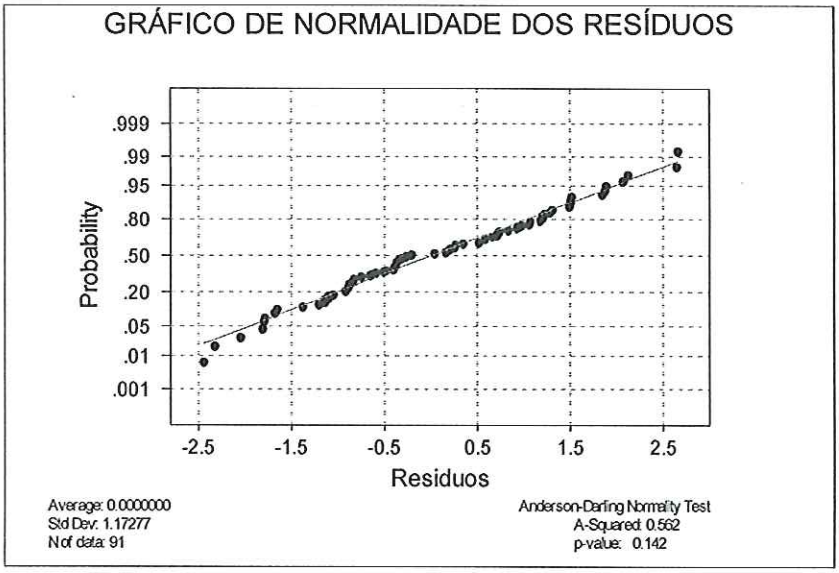


Figura a – Gráfico de normalidade dos resíduos.

APÊNDICE 3

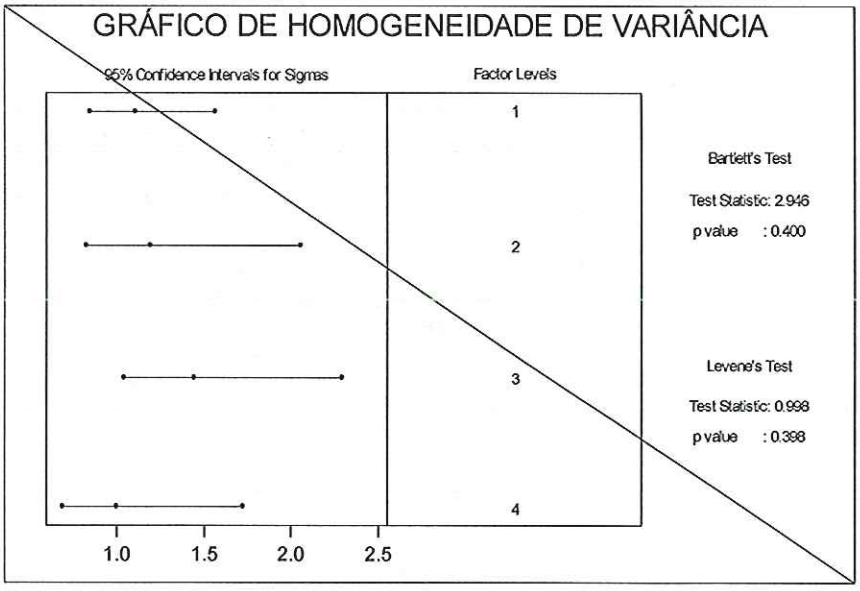


Figura b – Gráfico de homogeneidade de variância.

APÊNDICE 4

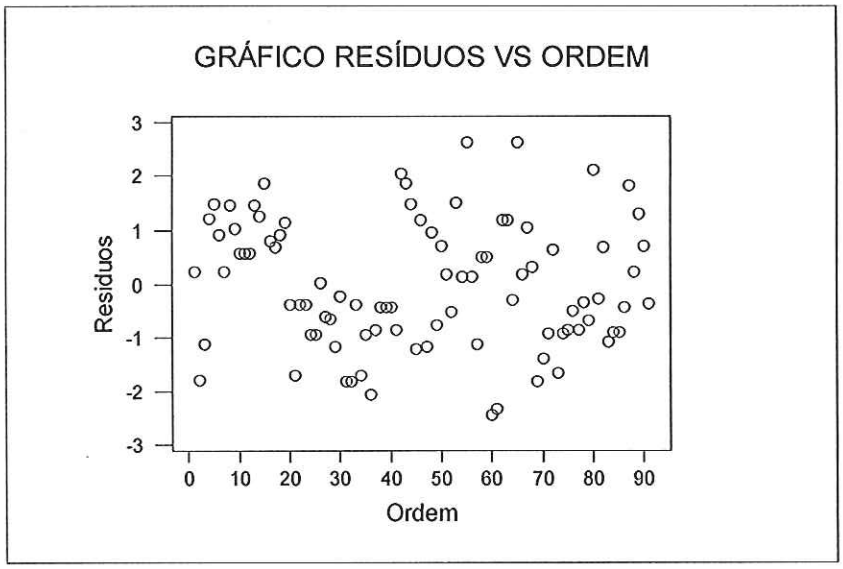


Figura c – Gráfico dos resíduos versus a ordem.