UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

DEUZUITA DOS SANTOS OLIVEIRA

Avaliação comparativa do risco mutagênico dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) e não renováveis (gasolina e diesel) através do bioensaio Trad-SH

SÃO CARLOS

2010

DEUZUITA DOS SANTOS OLIVEIRA

Avaliação comparativa do risco mutagênico dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) e não renováveis (gasolina e diesel) através do bioensaio Trad-SH

Tese apresentada a Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica

Área de concentração: Térmica e Fluidos

Orientador: Prof. Dr. Josmar Davilson Pagliuso

SÃO CARLOS

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

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

Oliveira, Deuzuita dos Santos

048^a Avaliação comparativa do risco mutagênico dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) e não renováveis (gasolina e diesel) através do bioensaio Trad-SH / Deuzuita dos Santos Oliveira; orientador Josmar Davilson Pagliuso. – São Carlos, 2010. 89 p.

Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica e Área de Concentração em Térmica e Fluidos). - - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. Emissão veicular. 2. Combustíveis fósseis e renováveis. 3. Mutagenicidade. 4. Bioensaio Trad-SH.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Licenciado DEUZUITA DOS SANTOS OLIVEIRA.

Tese defendida e julgada em 22.10.2010 perante a Comissão Julgadora:

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

Aprovada

Prof. Dr. **ANTONIO MOREIRA DOS SANTOS**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **WICLEF MARRA JUNIOR**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

APROVADA

Dr.ª. **MARIZA DOMINGOS**
(Instituto de Botânica de São Paulo/IBOT)

APROVADA

Dr. **RUI ABRANTES**
(Companhia Ambiental do Estado de São Paulo/CETESB)

Aprovada

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

Prof. Titular **GERALDO ROBERTO MARTINS DA COSTA**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por sua fidelidade e amor incondicional. A Ele toda honra e toda glória. Ao meu esposo Vicente Galber, a quem também dedico todo o meu amor. A meus filhos, Galber Júnior, Eduardo Bruno, Tiago José e Selônia Patrícia (filha do coração) bênçãos do Senhor em minha vida. A meu pai Genésio e à minha mãe Santa exemplos de vida, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Josmar D. Pagliuso, sábio pesquisador e mentor minha profunda gratidão pela orientação e apoio.

A Profa. Dra. Marisa Domingos, pesquisadora competente, gentil e que muito admiro. Serei eternamente grata por seu apoio e pela co-orientação 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.

Ao Edson Elpidio, Antonio Carlos, Edegar Hirai, Miriam Spasiani, pela companhia nas aulas e na realização dos ensaios.

A Bia, Cássio, Chico, Cleonice meu muito obrigado pelo carinho, apoio e hospedagem durante a realização deste trabalho.

Aos Professores Dr. Antonio Moreira, Dr. Geraldo Lombardi e Dr. Sergio Fontes. Dr. Fernando Milioli. Muito obrigado pelo incentivo e apoio.

Aos colegas de laboratório do NETeF, especialmente ao Marcus Vinícius e Roberta, muito obrigada pelo apoio e companhia.

Aos funcionários que participaram diretamente na realização deste trabalho, Roberto Lourenço, Teodomiro Luchesi, Donizeti Luchesi, Hélio Trebi e Roberto Prata viera.

Aos irmãos em Cristo que oraram pela realização e êxito do meu trabalho, a quem agradeço em nome da família Cruz.

À minha família, especialmente Ivonilde, Geronilda, Selônia, Zilda e Gardenia. Obrigada pelo incentivo e apoio.

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

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

EPÍGRAFE

“Porque o SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem à inteligência e o entendimento. Ele reserva a verdadeira sabedoria para os retos”

(Salmos 2:6-7a).

RESUMO

OLIVEIRA, D.S. **Avaliação comparativa do risco mutagênico dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) e não renováveis (gasolina e diesel) através do bioensaio Trad-SH.** 2010. 89 p. Tese de (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

As emissões veiculares constituem-se em uma das mais graves ameaças a qualidade de vida da população, principalmente nos grandes centros urbanos. Poluentes de origem veicular podem induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, pois nessas emissões, destacam-se entre outros, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), que são substâncias consideradas carcinogênicas e mutagênicas. A utilização de indicadores sensíveis a ação de agentes genotóxicos serve para avaliar a presença destes compostos no ambiente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o risco mutagênico das emissões provenientes da combustão dos combustíveis fósseis (gasolina e diesel) e renováveis (álcool e biodiesel), utilizando o bioensaio Trad-SH. Os ensaios foram realizados utilizando veículos do ciclo Diesel (Citröen JUMPER 2.8 L, 2006) e do ciclo Otto (VW FOX 1.6 Flex, 2005 sem o conversor catalítico), em um dinamômetro de chassi, submetidos a um ciclo de condução urbano padronizado (FTP-75) modificado, para a coleta dos gases de escapamento. Os gases foram misturados com o ar ambiente e homogeneizados para simular o que ocorre no trânsito urbano. As inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* foram expostas a mistura de poluentes, provenientes dos veículos, dentro de uma câmara de fumigação, por duas horas. Para a avaliação do efeito mutagênico foi feita uma comparação entre as inflorescências não expostas aos poluentes (grupo 1) e as inflorescências expostas as emissões do álcool (grupo 2), do biodiesel (grupo 3), da gasolina (grupo 4) e do diesel (grupo 5). Os dados obtidos dos experimentos foram analisados estatisticamente onde se observou que a frequência média das mutações no grupo 1 (controle), foi significativamente mais baixa do que aquela dos grupos 2,

3, 4, e 5. Os resultados indicam que as emissões dos veículos abastecidos com combustíveis fósseis (gasolina e diesel), são mais mutagênicas do que as emissões provenientes da combustão dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel).

Palavras chave: Emissão veicular, combustíveis fósseis e renováveis, mutagenicidade e bioensaio Trad-SH.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D.S. **Assessment and comparison of mutagenic risk of pollutants from combustion from renewable fuels (ethanol and biodiesel) and non-renewable (gasoline and diesel) by Trad-SH assay.** 2010. 89 p. Tese de (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

The vehicle emissions constitute a major serious threat to the population's quality of life, especially in the large urban areas. Pollutants from vehicle origin may lead to changes concerning the genetic material of some organisms that have been exposed to them, and within these emissions it is stood out among others the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's), which are carcinogenic and mutagenic compounds. The use of sensitive indicators to the action of genotoxic agents is useful to prevent and to evaluate the presence of these compounds in the environment. Therefore, this work is aimed at evaluating comparatively the mutagenic risk of emissions from the burning of fossil fuel (gasoline and diesel) and renewable ones (ethanol and biodiesel) by the use of Trad-SH bioassay. The assays were carried out using vehicles from the diesel cycle (Citröen JUMPER 2.8 L, 2006) and the Otto cycle (VW FOX 1.6 Flex, 2005, without a catalytic converter), in a chassis dynamometer, submitted to a standard urban driving cycle (FTP-75) in order to collect the gases of exhaust. The gases were mixed up to the atmosphere air and homogenized to simulate what happens in urban traffic. The inflorescences of KU-20 clone of *Tradescantia* were exposed to a mixture of pollutants from vehicles, in a fumigation chamber for two hours. To evaluate the mutagenic effect it was necessary to establish a comparison between the inflorescences which were not exposed to pollutants (group 1) and inflorescences exposed to emissions of alcohol (group 2), biodiesel (group 3), gasoline (group 4) and diesel (group 5). Data obtained from experiments were statistically analyzed in which appears that the average frequency of mutations in group 1 (control) was significantly lower than that of groups 2, 3, 4 and 5. The results indicate that emissions from vehicles fueled by fossil fuels (petrol and diesel) are more mutagenic than emissions from the combustion of renewable fuels (ethanol and biodiesel).

Keywords: vehicular emission, fossil and renewable fuels, and mutagenicity bioassay

Trad-SH

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 – Ciclo de condução urbano FTP-75 (fonte: Silva. M (2007)).....	45
Figura 4.2 – Área de ensaio (Foto: Hirai, 2009).....	46
Figura 4.3 – Veículo FOX sem o catalisador.....	47
Figura 4.4 – Veículo JUMPER.....	48
Figura 4.5 – Câmara contendo as inflorescências da KU-20.....	49
Figura 4.6 – Clone KU-20 da <i>Tradescantia</i>	51
Figura 4.7 – Esquema geral do sistema de amostragem e análise dos poluentes no laboratório.....	52
Figura 4.8 – Motor Diesel 2.0.....	54
Figura 4.9 – Misturador de gases.....	55
Figura 4.10 – Analisadores de Gases (Horiba).....	56
Figura 4.11 – Antera com seus pêlos estaminais (a) e, em destaque, pêlo estaminal com evento de mutação (células de cor rosa) (b).....	58
Figura 5.1 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos às emissões provenientes do álcool e da gasolina.....	61
Figura 5.2 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas a exaustão de um veículo Fox 1.6 Flex abastecido com álcool e gasolina, em relação ao tratamento controle (grupo 1).....	61
Figura 5.3 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor a biodiesel e a diesel.....	63
Figura 5.4 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas a exaustão de motor diesel abastecido com biodiesel e diesel, em relação ao tratamento controle (grupo 1).....	63
Figura 5.5 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão dos veículos abastecidos com álcool, biodiesel, gasolina e diesel.....	65
Figura 5.6 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidos à exaustão dos veículos abastecidos com combustível álcool, biodiesel, gasolina e diesel, em relação ao tratamento controle (grupo 1).....	66

Figura 5.7 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.....	68
Figura 5.8 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas à exaustão de motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel em relação ao tratamento controle (grupo 1).....	69

LISTAS DE TABELAS

Tabela 5.1 –	Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes provenientes das emissões provenientes do álcool e da gasolina.....	60
Tabela 5.2 –	Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes presentes nas emissões do álcool e da gasolina.....	60
Tabela 5.3 –	Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> expostas às emissões do álcool e da gasolina.....	61
Tabela 5.4 –	Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes provenientes da exaustão do motor abastecido com biodiesel e diesel.....	62
Tabela 5.5 –	Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes da exaustão do motor a biodiesel e a diesel.....	62
Tabela 5.6 –	Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> expostas à exaustão do motor a diesel.....	63
Tabela 5.7 –	Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) nos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes da exaustão dos veículos abastecidos com álcool, biodiesel, gasolina e a diesel.....	64
Tabela 5.8 –	Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> expostas à exaustão do motor abastecido com os combustíveis a álcool, biodiesel, gasolina e diesel.....	65
Tabela 5.9 –	Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i>	

<p>aos poluentes provenientes da exaustão do motor abastecido com biodiesel (100), Biodiesel (50) - mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.....</p>	67
<p>Tabela 5.10 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> aos poluentes da exaustão do motor abastecido com biodiesel (100), Biodiesel (50) - mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.....</p>	67
<p>Tabela 5.11 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de <i>Tradescantia</i> expostas à exaustão do motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.....</p>	68
<p>Tabela 5.12 – Resultados das emissões em g/Km dos ensaios do veículo FOX sem o conversor catalítico e do veículo JUMPER.....</p>	70
<p>Tabela 5.13 – Resultados das emissões em mg/Km dos ensaios do veículo FOX sem o conversor catalítico e do veículo JUMPER.....</p>	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANP	Agência Nacional de Petróleo
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CO	Monóxido de Carbono
CO ₂	Dióxido de Carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EPA	Environmental Protection Agency”
H ₂ O	Água
HC	Hidrocarbonetos
CPAs	Compostos policíclicos aromáticos
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
MP	Material Particulado
MP ₁₀	Material particulado– com diâmetro acima de 10 µm
NO _x	Óxidos de Nitrogênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAN	Nitrato de Peroxi-Acetila
PROCONVE	Programa de Controle da Poluição do Ar Por Veículos Automotores
SO _x	Óxidos de Enxofre
TSP	Partículas Totais em Suspensão
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1.	POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E VEÍCULOS AUTOMOTORES.....	22
2.2.	CONTROLE DE QUALIDADE DO AR.....	28
2.3.	COMBUSTÍVEIS.....	30
2.4.	BIOINDICADORES.....	36
2.5.	BIOENSAIOS COM ESPÉCIES VEGETAIS.....	38
2.6.	BIOENSAIO Trad-SH.....	39
3.	OBJETIVO.....	43
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1.	ENSAIOS NO LABORÁTORIO DA CETESB.....	44
4.1.1.	VEÍCULOS.....	46
4.1.2.	CÂMARA.....	49
4.1.3.	COMBUSTÍVEIS.....	50
4.1.4.	PLANTA BIOINDICADORA.....	50
4.1.5.	ENSAIOS.....	51
4.1.6.	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	52
4.2.	ENSAIOS NO LABORÁTORIO DE MOTORES DO NÚCLEO DE ENGENHARIA TÉRMICA E FLUÍDOS (NETeF).....	53
4.2.1.	MOTOR DIESEL.....	54
4.2.2.	MISTURADO DE GASES.....	55
4.2.3.	ANALISADORES DE GASES.....	56
4.2.4.	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	57
4.3.	BIOENSAIO Trad-SH.....	57
4.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	59
4.5.	CARACTERIZAÇÃO DOS POLUENTES DE INTERESSE DO “TIRA- TEIMA” DOS VEÍCULOS DO CICLO OTTO E DIESEL.....	59
5.	RESULTADOS.....	60
5.1.	RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS NA CETESB.....	60
5.2.	COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO LABORÁTORIO DE EMISSÃO VEICULAR DA CETESB.....	64

5.3.	RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS NO NETeF.....	66
5.4.	CARACTERIZAÇÃO DOS POLUENTES REALIZADA PELOS OUTROS INTEGRANTES DO PROJETO “TIRA-TEIMA”	69
5.5.	DISCUSSÃO.....	71
6.	CONCLUSÕES.....	78
6.1.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	78
	REFERÊNCIAS.....	79
	ANEXOS.....	86

1. INTRODUÇÃO

Nos grandes centros urbanos, a principal fonte de poluição é a combustão dos combustíveis fósseis, que lançam na atmosfera uma grande quantidade de poluentes, prejudiciais aos seres vivos, constituindo-se em uma das mais graves ameaças à qualidade de vida da população.

Os poluentes provenientes das emissões veiculares estão divididos em compostos regulamentados, sob o ponto de vista de proteção à saúde dos seres vivos, tais como: monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x), hidrocarbonetos (HC), óxidos de enxofre (SO_x) e material particulado (MP) e aqueles que não estão ainda regulamentados, aldeídos¹ (regulamentado apenas para veículos do ciclo Otto), benzeno, acroleína, ácido carboxílico (RCOOH) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA). Esses últimos compostos são precursores de poluentes secundários presentes no smog fotoquímico, como o ozônio (O₃) e o nitrato de peroxi-acetila (PAN), que são comprovadamente tóxicos e acarretam danos, a curto e em longo prazo, à saúde da população e aos ecossistemas (PANDEY; AGRAWAL, 1994; FREEDMAN, 1995).

Os poluentes que causam danos ao DNA são chamados “genotóxicos”. Poluentes de origem veicular podem potencialmente provocar efeitos genotóxicos, isto é, induzir a alterações no material genético de organismos a eles expostos, entre os quais quebras e aberrações cromossômicas e mutações gênicas (MA, 1981; FERREIRA et al., 2006).

A utilização de bioindicadores sensíveis à ação de agentes genotóxicos serve para prevenir e avaliar a presença destes compostos no ambiente. Plantas bioindicadoras podem ser utilizadas para o estudo de mutagênese tanto em laboratório como *in situ*, pois são mais sensíveis à poluição que os animais e podem diferenciar e descrever mudanças ambientais. Além disso, possui relevância ecológica, facilidade de cultivo, e capacidade de responder aos estímulos ambientais rapidamente, entre outros fatores (ARNDT; SCHWEIGER, 1991).

¹ O Programa de Controle de Poluição do ar por Veículos Automotores estabeleceu limites de emissão de aldeídos totais (acetaldeído + formaldeído) para veículos novos do ciclo Otto, movidos a gasolina, etanol hidratado e suas misturas.

Bioensaios de mutagenese têm sido usados para avaliar o potencial tóxico das emissões de diferentes veículos automotores, bem como identificar o potencial carcinogênico de compostos nestas misturas complexas (LEWTAS, 1983). Numa comparação das emissões mutagênicas entre veículos certificados, Claxton e Kohan appud Lewtas, (1983) mostraram que os veículos movidos a diesel emitem de 45 a 800 vezes mais compostos mutagênicos, por distância percorrida, do que os movidos à gasolina. Os veículos a diesel emitem aproximadamente 100 vezes mais elementos do carbono e 20 vezes mais carbono orgânico por milhas quando comparado às emissões de veículos à gasolina (EPA 2002). De acordo com International Agency for Research on Cancer (IARC), as emissões do diesel são carcinogênicas para humanos.

As partículas provenientes da combustão do diesel são mais mutagênicas do que as partículas provenientes da combustão do biodiesel de soja (BUNGUER., et al 2000). Em testes realizados com bioensaios expostos as emissões do diesel e da gasolina, todas as amostras mostraram aumento na frequência de mutação. Contudo, as emissões da combustão do diesel mostraram que são mais mutagênicas do que as da gasolina (SEAGRAVE et al.,2002). No entanto, as emissões da combustão da gasolina não têm sido muito estudadas nos sistemas biológicos ou toxicológicos devido a sua baixa emissão de partículas quando comparadas com as emissões da combustão do diesel (LEWTAS, 2007). Portanto, buscou-se nesta pesquisa avaliar e comparar o risco mutagênico das emissões da combustão dos combustíveis diesel, gasolina, diesel e biodiesel em uma condição mais próxima da realidade, tanto em relação à contribuição dos combustíveis para a poluição atmosférica como para o efeito biológico.

Neste estudo utilizou-se o bioensaio Trad-SH como bioindicador de mutagenicidade das emissões provenientes dos combustíveis, pois ele é muito sensível, mostrando reações em baixos níveis de contaminação ambiental, e responde rapidamente aos agentes genotóxicos (OLIVEIRA, 2005). Esse bioensaio foi padronizado para plantas geneticamente uniformes (clone), o que proporciona reduções na variabilidade das respostas e, conseqüentemente, uma interpretação segura dos resultados. É, ainda, de fácil execução, uma vez que não há necessidade de uso de infra-estrutura complexa de laboratório, e é bastante versátil, podendo ser utilizado para delimitação do potencial genotóxico de poluentes presentes no ar, água e solo (ICHIKAWA, 1992). Considerando o fato de que os

ensaios tanto com o motor como com os veículos são dispendiosos optou-se em usar um bioensaio de curta duração com plantas para avaliar a mutagenicidade das emissões dos combustíveis

Em vista desse cenário, o objetivo deste estudo foi avaliar e comparar o potencial mutagênico das emissões provenientes dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) e não-renováveis (gasolina e diesel) através do bioensaio Trad-SH, em condições experimentais.

Este estudo foi parte de um projeto coordenado pelo prof. Dr. Josmar Davilsom Pagliuso, denominado “Tira-Teima”, cuja finalidade era conhecer e avaliar a realidade das emissões dos veículos do ciclo Otto e do ciclo Diesel, operando com combustíveis fósseis (gasolina e diesel) e renováveis (álcool e biodiesel). Foram realizadas além desta, as seguintes pesquisas:

Caracterização preliminar das emissões de aldeídos e ácidos carboxílicos em motores de combustão interna. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica. (ELPÍDIO NETO, 2009).

Estudo da emissão da frota de veículos diesel e ciclo Otto, sem os conversores catalíticos nos municípios de Sorocaba e Votorantim. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica (OLIVEIRA, 2009).

Estudo comparativo das emissões de aldeídos originados pelo veículo a Diesel com o uso do óleo diesel comercial, biodiesel e suas misturas. Dissertação de Mestrado em Engenharia Mecânica (HIRAI, 2009).

Caracterização dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) com a amostragem de material particulado em filtros de fibra de vidro. Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica, em andamento (Mirian Cilene Spasiani Rinaldi).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA E VEÍCULOS AUTOMOTORES

Atualmente, devido ao crescimento populacional, atividade industrial e a utilização de veículos automotores, a concentração de poluentes no ar tem crescido ocasionando episódios críticos de poluição atmosférica em todo o mundo. Episódios agudos de poluição do ar se caracterizam pela curta duração, de minutos a poucos dias e eles ocorrem devido às condições desfavoráveis de dispersão dos poluentes, como por exemplo, a inversão térmica, ventos calmos, ausência de chuvas, topografia desfavorável, associado à contínua emissão de poluentes. Vários episódios como esses causaram a morte de milhares de pessoas, sendo o mais clássico o que ocorreu em Londres em 1952 com a morte de mais de quatro mil pessoas (BRANCO; MURGEL, 1996).

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. Isso mostra que a poluição do ar tem-se constituído numa das mais graves ameaças à qualidade de vida de seus habitantes, e nos grandes centros urbanos os veículos automotores são os principais responsáveis por essa poluição (BAIRD, 2002).

Os motores de combustão interna transformam a energia química dos combustíveis em energia térmica e nesse processo de combustão, também há geração de ruído, calor, particulado e gases (HEYWOOD, 1998). As emissões produzidas por veículos carregam substâncias tóxicas, que, em contato com o sistema respiratório, podem produzir efeitos negativos sobre a saúde. Mesmo com o aumento nos regulamentos e com o aperfeiçoamento nos controles tecnológicos, as emissões veiculares nas ruas e estradas continuam um problema sério, 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 esse número pudesse exceder um bilhão até 2015 (WARK; WARNER e DAVIS, 1998).

Nos grandes centros urbanos, a poluição atmosférica já pode ser considerada como um caso de saúde pública, pois estudos epidemiológicos mostram uma estreita relação entre a poluição atmosférica e problemas respiratórios e certos tipos de câncer (POPE III et al., 2002; SALDIVA et al., 2002; LI et al., (2003) mortalidade infantil e de idosos (SALDIVA et al., 1992; SALDIVA et al., 1995). Poluentes de origem veicular podem potencialmente provocar efeitos genotóxicos, isto é, induzir alterações no material genético de organismos a eles expostos, entre os quais quebras e aberrações cromossômicas e mutações (MA, 1981; FERREIRA et al., 2006).

Em condições ideais a combustão dos combustíveis resulta em água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2). Estas condições, no entanto, nunca são verificadas, pois o que geralmente ocorre é uma queima parcial dos combustíveis e reações indesejáveis. Quando não há combustão completa, sobram subprodutos tais como material particulado (MP) (que possuem uma composição variada, incluindo, metais pesados) e gases como dióxidos de carbono (CO_2), óxidos de nitrogênio (NO_x), dióxido de enxofre (SO_2) e hidrocarbonetos (HC). Esses gases originam poluentes secundários presentes no smog fotoquímico, como o ozônio (O_3) e o nitrato de peroxi-acetila (PAN), por meio de reações químicas mediadas pela luz solar (MANNING; FEDER, 1980; FREEDMAN, 1995).

Os gases provenientes da exaustão dos veículos automotores estão entre os principais formadores de ozônio. A maioria dos poluentes originados durante o smog fotoquímico, como, O_3 e PAN, são comprovadamente tóxicos e acarretam danos, a curto e longo prazo, à saúde da população e aos ecossistemas (PANDEY; AGRAWAL, 1994).

O material particulado (MP) é uma mistura de partículas sólidas e líquidas em suspensão no ar. Quanto ao tamanho, classificam-se em PM_{10} (partícula grossa $\leq 10 \mu m$), $PM_{2,5}$ (partícula fina $\leq 2,5 \mu m$) e em partículas ultra finas com diâmetros $\leq 0,1 \mu m$ (CETESB, 2006). Vale ressaltar que a determinação da EPA para controle das partículas inaláveis deveu-se ao fato de que estas partículas podem atingir as vias respiratórias. Uma parte do material particulado atmosférico é composta por carbono elementar (carbono negro) e por carbono orgânico (ALVES, 2003). O carbono negro é formado pela combustão de material orgânico afetando a visibilidade da atmosfera, o clima regional e a saúde pública (JIANG, 2005). As partículas do carbono negro possuem uma área superficial grande e porosa e pode absorver uma variedade de

compostos, tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Essa classe de compostos é formada pela combustão incompleta de compostos orgânicos e muitos destes são carcinogênicos e mutagênicos (FINLAYSON-PITTS; PITTS, 1996).

O MP é gerado em grande quantidade pelos motores do ciclo diesel (ignição por compressão), enquanto nos motores do ciclo Otto (Ignição por centelha), sua emissão é insignificante. Em áreas urbanas, devido a sua alta concentração, o MP tem sido alvo de muitos estudos, devido ao seu impacto na saúde, pois os mesmos podem adsorver substâncias tóxicas e mutagênicas em sua superfície e mutagênicas (POPE III et al., 2002; SAN'TANNA, 2003).

O CO é um gás venenoso, inodoro, incolor, tóxico e possui um tempo de residência na atmosfera de dois a quatro meses (WARK; WARNER, 1996). Ele reage com a hemoglobina presente no sangue humano, formando a carboemoglobina e reduzindo o transporte do oxigênio (O_2) para as células. Uma exposição ao CO por um tempo prolongado, dependendo da concentração, pode causar dores de cabeça, tontura e asfixia. Em crianças e idosos pode causar problemas respiratórios e cardíacos. Efeitos no sistema nervoso têm sido associados com altos níveis desse poluente no ar. A emissão de CO varia de acordo com o combustível e a tecnologia empregada (SOTTO PAU, 2003). Os motores do ciclo Diesel (ignição por compressão) apresentam baixa emissão de CO, menor até mesmo que a dos motores a álcool (PAGLIUSO, 2004).

Os óxidos de nitrogênio (NO_x) são compostos de óxidos nítricos (NO) e dióxidos de nitrogênio (NO_2). São decorrentes da reação química entre os gases de temperatura elevada formados na câmara de combustão e o nitrogênio presente no ar atmosférico. São introduzidos no meio ambiente principalmente pelas emissões veiculares. Os motores do ciclo Diesel emitem uma quantidade de NO_x superior aos motores do ciclo Otto, pois operam a maior parte do tempo com mistura pobre (SILVA, 2006).

O NO_x tem impacto na saúde dos seres vivos, pois ele é tóxico e reage com todas as partes do corpo expostos ao ar produzindo ardência nos olhos, no nariz e nas mucosas em geral. O NO_x reage formando ácido nítrico que pode causar problemas respiratórios, contribui para a formação da chuva ácida e é um dos precursores do ozônio (FELEMBERG, 1980).

Os hidrocarbonetos (HC) são compostos formados pela reação incompleta do oxigênio com os combustíveis industriais (óleos combustíveis) ou automotivos (óleo diesel e gasolina) ou vapores de combustíveis não queimados (CETESB, 2008). Podem ser reativos (HC não-metânico), que contribuem para formação do smog fotoquímico e não-reativos (HC metânicos). Os HCs reagem na presença de luz solar e de NO_x, formando ozônio, e ainda contribuem para a formação do smog fotoquímico e da chuva ácida. Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, entre outros compostos orgânicos, são encontrados geralmente na fração fina do material particulado e são os maiores componentes das partículas provenientes da queima do diesel. A exposição a altas concentrações de HC provoca intoxicação crônica, afeta rins e fígado, já a exposição a baixas concentrações provoca incômodos como enjôos, vômitos e dor de cabeça; os HPAs podem causar câncer e alterações genéticas (OLIVEIRA, 2009).

Há uma relação entre mães expostas aos HPAs durante o período de gestação e o nascimento de crianças com anomalias genéticas. De acordo com Miguel (1998), o perfil dessa emissão varia com o tipo de combustível utilizado, ou seja, os motores a diesel são responsáveis por emitir os de alto peso molecular, enquanto motores a gasolina são a principal fonte daqueles de baixo peso molecular, como benzo[a]pireno e dibenzo[a]antraceno.

Os óxidos de enxofre (SO, SO₂ e SO₃) emitidos por veículos automotores, principalmente no óleo diesel, são decorrentes da oxidação do enxofre contido no combustível. As condições de operação do motor e o tipo de catalisador utilizado, bem como a quantidade de enxofre (exemplo: óleo diesel metropolitano) tem contribuído para a redução nos níveis de emissões de SO₂. Em baixas concentrações, o SO₂ provoca espasmos nos bronquíolos pulmonares, Já em concentrações elevadas, provocam inflamação nas vias respiratórias (OLIVEIRA, 2009). O alto conteúdo de enxofre, também está associado ao aumento da mutagenicidade da combustão do diesel (BUNGER et al., 2000).

Os aldeídos mais significativos nas emissões veiculares são o formaldeído e o acetaldeídos, que, somados, podem chegar à média de 90% dos aldeídos totais. Os formaldeídos e acetaldeídos são lançados na atmosfera através da combustão dos veículos automotores, principalmente aqueles sem a utilização de catalisador. Há casos em que os veículos do ciclo diesel emitem mais formaldeído e acetaldeído que os veículos do ciclo Otto (ABRANTES et al., 2002; HIRAI, 2009). Estudos de

caracterização e comparação das emissões da combustão do biodiesel de soja e do diesel metropolitano, bem como a caracterização e comparação das emissões da combustão da gasolina e do álcool (etanol) mostraram uma maior concentração de aldeídos nas emissões provenientes da combustão do biodiesel do que nas emissões do diesel e uma maior concentração de aldeídos totais na exaustão da gasolina do que na exaustão do álcool combustível (etanol) (ELPÍDIO NETO, 2009).

Os aldeídos presentes na atmosfera participam nas reações fotoquímicas de formação do ozônio na troposfera e apresentam riscos para a saúde humana, pois irritam os olhos, as vias aéreas e podem causar dores de cabeça, sensação de desconforto e de irritabilidade (ABRANTES et al., 2005), além de contribuírem para o aumento nas taxas de morbidade e mortalidade da biota (HIRAI, 2009)

A acroleína ou propenal é um composto de aldeído etileno obtido pela desidratação da glicerina. Apresenta-se em forma líquida e, possui odor e sabor amargo. É muito inflamável e é rapidamente evaporável. A acroleína pode também ser formada e entrar no ar quando são queimados combustíveis como o óleo diesel e a gasolina. Ela é tóxica por todas as vias de exposição, é altamente reativa e causam alterações no DNA, problemas respiratórios na pele, gastrointestinais, cardiovasculares, entre outros (FAROON et al., 2008).

A acroleína é uma substância encontrada principalmente nas cidades e áreas industriais como componente da fumaça, e possui efeito tóxico. A Agência Internacional de Pesquisa do Câncer concluiu que não há evidência de carcinogenicidade em animais experimentais. Há evidências, no entanto, de que a acroleína é genotóxica pois causa dano no DNA das células (LI et al., 2008).

Estudos mostram que as concentrações de acroleína encontradas no meio ambiente superam o valor do nível de referência de exposição crônica. A combustão dos combustíveis representa a maior fonte de emissão de acroleína na atmosfera. O metabólito da acroleína, *gliceraldeído epóxido*, é muito reativo, mutagênico e carcinogênico em animais experimentais. Vapor de acroleína causa irritação nos olhos, nariz e no trato respiratório mesmo em baixos níveis de exposição (FAROON et al., 2008).

Em uma caracterização e comparação das emissões resultantes da combustão do biodiesel de soja e diesel metropolitano, os resultados mostraram que as emissões do biodiesel de soja possuem uma maior concentração de acroleína que as emissões do diesel. Vale ressaltar, que a emissão de acroleína representou

16,5% dos aldeídos totais nas emissões do diesel e 17,5% nas emissões do biodiesel de soja (HIRAY, 2009).

Os ácidos carboxílicos são uma classe dominante de compostos orgânicos presentes na atmosfera. Podem ser emitidos direto da fonte ou ser formado através de reações químicas. Uma das fontes antropogênicas dos ácidos carboxílicos é a queima de combustíveis fósseis. Nas áreas urbanas, a combustão de combustíveis por veículos automotores é uma das principais fontes de ácidos carboxílicos na atmosfera. Eles têm despertado interesse dos pesquisadores devido à variedade desses compostos na atmosfera. Em altas concentrações podem provocar problemas oftalmológicos e respiratórios.

O ozônio é um poluente secundário, formado na atmosfera pela reação entre os compostos orgânicos voláteis (COVs) e óxidos de nitrogênio (NOx) em presença de luz solar. Ele forma na estratosfera uma camada protetora contra os efeitos prejudiciais dos raios ultravioletas. No entanto, tem efeitos tóxicos nos seres vivos nas camadas mais baixas da atmosfera (CETESB, 2008).

O dióxido de carbono, até a década de 70 não era considerado como poluente atmosférico. Por isso não era alvo de preocupação por parte das autoridades e não havia controle rigoroso. O CO₂ é o principal produto da combustão completa e um dos responsáveis pelo efeito estufa. No final do século passado percebeu-se uma preocupação global com o meio ambiente, com a degradação causada pelo homem, sendo o efeito estufa o principal alvo dessa preocupação. Vale ressaltar que um dos maiores responsáveis pelo aquecimento global é o CO₂ e que uma considerável contribuição antropogênica, na concentração desse gás no ar, deve-se à queima de combustíveis fósseis (BAIRD, 2002).

Atualmente, devido ao crescimento populacional, a utilização de veículos automotores tem crescido, ocasionando os episódios críticos de poluição do ar. 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, o uso de álcool (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, bem como o uso de outros combustíveis alternativos.

2.2. CONTROLE DE QUALIDADE DO AR

Nos Estados Unidos, na década de 70, foi criada a “Environmental Protection Agency” (EPA), com o objetivo de controlar a qualidade do ar. A Organização Mundial de Saúde (OMS), desde 1975, mantém um programa de apoio técnico aos países em desenvolvimento para a implantação de programas de monitoramento de poluentes lançados na atmosfera (WHO, 1995). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) regulamenta a concentração dos poluentes do ar usando como parâmetros as partículas totais em suspensão (PTS), fumaça, partículas inaláveis (PM10), dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), ozônio (O₃) e dióxido de nitrogênio (NO₂).

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 CONAMA criou em 1986 o Programa de Controle da Poluição do Ar Por Veículos Automotores (PROCONVE), definindo os limites máximos de emissão para todos os veículos novos, leves e pesados, nacionais e importados. 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 (CETESB, 2008).

O PROCONVE exige que os veículos e motores novos atendam a limites máximos de emissão, utilizando combustíveis de referência em ensaios padronizados. O programa impõe também uma autorização especial do órgão ambiental federal para uso de combustíveis alternativos, a certificação de protótipos e de veículos da produção, o recolhimento e reparo dos veículos ou motores encontrados em desconformidade com a produção ou projeto e proíbe, ainda, a comercialização de veículos não homologados de acordo com seu critério.

O órgão técnico para assuntos de homologação de veículos é a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo), que é responsável pela implantação e operacionalização do PROCONVE no Brasil. Portanto, todos os novos modelos de veículos e motores importados e nacionais são obrigatoriamente submetidos à homologação quanto à emissão de poluentes. Por isso, são

analisados os parâmetros de engenharia do veículo e do motor relevantes à emissão de poluentes; também são submetidos a rígidos ensaios de laboratório, em que as emissões reais são quantificadas e comparadas aos limites máximos em vigor.

Desde que foi implantado, o PROCONVE reduziu em cerca de 97%, a emissão de poluentes em veículos novos por meio de uma progressiva limitação da emissão de poluentes com a introdução de tecnologias como catalisador, injeção eletrônica e melhorias nos combustíveis automotivos.

O PROCONVE obteve sucesso com uma redução na emissão de poluentes com a utilização de combustíveis “limpos”, os quais são obtidos com a adição de 22% de álcool à gasolina. Esta mistura possibilitou ao Brasil atingir o mesmo nível tecnológico da Europa, Japão e Estados Unidos em relação ao controle da poluição. No entanto, mesmo com as melhorias nas emissões veiculares obtidas por este programa, os padrões de qualidade do ar indicam um aumento dos poluentes atmosféricos, devido ao aumento da frota de veículos, a existência de veículos com mais de 15 anos em circulação e a consequente baixa frequência e às vezes nenhuma manutenção destes veículos (OLIVEIRA, 2009).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, por meio das Resoluções CONAMA Nº 03, de 15.06.1989 no artigo 1º e CONAMA Nº 015, de 13.12.1995, estabeleceu limites de emissão de aldeídos totais (acetaldeído + formaldeído) apenas para veículos leves de passageiros e comerciais do ciclo Otto. 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 (CETESB, 2008).

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. Os poluentes liberados pelos veículos automotores, além de afetarem a saúde dos seres vivos, também provocam a chuva ácida que deteriora prédios, obra de artes e prejudica os vegetais e os animais, além de aumentarem o buraco na camada de ozônio e a temperatura global, causando o efeito estufa (ROCHA; ROSA; CARDOSO, 2009).

2.3. COMBUSTÍVEIS

Ao longo da história, constata-se que o uso da energia está ligado ao conforto humano e seu uso está relacionado diretamente com o crescimento da população. Desde a revolução industrial, a utilização da energia tem crescido a cada ano devido ao crescimento populacional e ao desenvolvimento econômico (BAIRD, 2002). A matriz energética mundial tem uma participação de 79,6% de fontes de carbono fóssil, sendo 35,3% de petróleo. O sistema de transportes, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento baseia-se em combustíveis derivados do petróleo, pois o petróleo e seus combustíveis derivados, como a gasolina, apresentam a vantagem de serem líquidos de fácil manuseio, de apresentarem alto poder energético e baixo custo de produção (BRASIL, 2005).

No entanto, o problema do uso indiscriminado dos combustíveis fósseis não reside apenas no fato de não ser renovável, mas principalmente no fato de que sua queima contínua produz fumaça e subprodutos gasosos que agem como poluentes do ar, sendo as emissões de CO₂ o principal problema no século 21. O Ministério de Minas e Energia (MME) divide o combustível utilizado para transporte em óleo diesel, gasolina tipo C, álcool hidratado, etanol e gás natural veicular (GNV) (BRASIL, 2005).

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo, constituído predominantemente por hidrocarbonetos parafínicos, oleofínicos e aromáticos, por moléculas constituídas de 8 a 40 átomos de carbono. Ele é formado da mistura de diversas correntes, como diesel leve e pesado, gasóleos, nafta pesada oriundo das

várias etapas de processamento do petróleo bruto e possui um alto teor de enxofre. O óleo diesel é um produto inflamável, volátil, límpido, isento de material em suspensão, medianamente tóxico e com odor característico. Possui características de ignição e de escoamento apropriados ao funcionamento dos motores diesel (MARQUES NETO, 2003).

A composição do diesel comercial varia de acordo com a origem do petróleo usado, como matéria prima e o processo de refino. O parâmetro usado para se referir à qualidade do diesel é o número de cetana. No entanto, desde à sua introdução no mercado a qualidade do diesel tem mudado constantemente. Ele é utilizado em grande escala no país e no mundo corresponde por 57,7% de todo combustível comercializado no Brasil (BAIRD, 2002).

A Agência Nacional de Petróleo (ANP), por meio da portaria de Nº 12 de 22/03/05 estabeleceu dois tipos de óleo diesel: o tipo metropolitano e o tipo interior (BRASIL, 2001). O óleo diesel é o derivado de petróleo de maior demanda no Brasil atualmente. No entanto, ainda é necessária sua importação para suprir a demanda interna. Por isso, parece oportuna a adoção de fontes alternativas sustentáveis a esse derivado de petróleo.

As emissões dos motores a diesel, à gasolina ou de combustíveis mistos são classificadas como as que não são prejudiciais à saúde, tais como, O_2 , CO_2 , H_2O e N_2 e as que são prejudiciais, são o monóxido de carbono (CO), os óxidos de nitrogênio (NOx), os hidrocarbonetos (HC), Os óxidos de enxofre (SOx) e material particulado (MP), (regulamentados por lei) e a amônia, aldeídos, cianetos, benzeno, tolueno e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (não regulamentados) (BRAUN; APPEL e SCHMAL, 2003). Nas emissões do diesel os hidrocarbonetos são, em média, mais pesados que nas emissões da gasolina. No entanto, a quantidade de CO e de THC é geralmente pequena quando comparada a motores leves movidos à gasolina.

Um fator importante na composição das emissões do diesel é o modo de operação do motor e a composição química do combustível. A exaustão do diesel é uma mistura complexa, pois é composta por três fases: sólido, líquido e gasoso, e a condição de operação do motor que contribui para a economia de combustível também são responsáveis pelo odor característico da exaustão do diesel e o baixo nível de temperatura pelos elevados níveis de material particulado (MP). No Brasil, os principais problemas relacionados à emissão de particulados são a idade da frota

nacional, o alto teor de enxofre do diesel comercializado no país e ainda a quantidade de veículos antigos em circulação (BRAUN; APPEL e SCHMAL, 2003).

Nas últimas décadas, em todo o mundo a opinião pública tem pressionado para que haja redução nas emissões dos compostos dos motores diesel, principalmente os óxidos de nitrogênio e fuligem, constituindo, desde então, um desafio tanto no desenvolvimento de motores como para os combustíveis e sistemas de tratamento de exaustão dos motores (BRAUN; APPEL e SCHMAL, 2003).

A exaustão de motores a diesel contribui substancialmente para a poluição do ar ambiente. O material particulado (MP_{10}), o dióxido de enxofre e outros produtos de combustão mostram associações com mortalidade por câncer de pulmão (ABBEY et al., 1999). Além do mais, a exaustão do diesel 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). Estudos epidemiológicos revelaram ainda que existam 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; LOPIPERO e SMITH, 1998).

O efeito carcinogênico da exposição à exaustão do diesel é descrito 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- μ m), a maioria das partículas é facilmente inalável e 10% são depositadas na região alveolar do pulmão (SCHEEPERS; BOS, 1999). Um aumento na concentração de partículas fina foi associado ao aumento em torno de 8% de mortes causadas por câncer de pulmão (POPE III et al., 2002). Extrato de material particulado coletado em centro urbano mostrou um efeito mutagênico significativo (BATALHA et al., 1999). Exposição crônica in situ aos poluentes atmosféricos mostrou um aumento significativo na frequência de mutações em ratos (SOARES et al., 2003) e em plantas (GUIMARÃES et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2004; FERREIRA et al., 2006)

A gasolina é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e é um combustível fóssil muito utilizado nos veículos automotores, portanto grande parte dos problemas de poluição atmosférica nas cidades origina-se da exaustão dos motores a gasolina. A gasolina comum é constituída principalmente de hidrocarbonetos, e para que haja

a partida dos motores em baixas temperaturas, é vital a presença de hidrocarbonetos voláteis. Aquela formada basicamente de alcanos de cadeia linear e cicloalcano não apresenta uma boa combustão quando queimada em motores de combustão interna. Para evitar o problema de detonação, todos os tipos de gasolina são formulados para conter substâncias antidetonantes (ROCHA; ROSA e CARDOSO, 2009).

Os hidrocarbonetos BTX (benzeno, tolueno e xileno), utilizados como antidetonantes, são muito reativos e causa grande poluição fotoquímica do ar, além do mais, o benzeno, quando presente em níveis elevados, tem sido associado com um aumento na incidência de leucemia (BAIRD, 2002).

No Brasil, a gasolina é composta de cerca de 20% de etanol anidro e 78% de gasolina, com o objetivo de aumentar a octanagem da gasolina. Esta mistura é conhecida como gasool. A gasolina reformulada reduziu a presença do componente BTX, do benzeno, do teor de enxofre e dos compostos orgânicos voláteis (COVs), que contribuem significativamente para o problema do ozônio urbano. Mistura de etanol/gasolina tem sido usado em veículos automotores no Brasil, desde 1920 (ROCHA; ROSA e CARDOSO, 2009).

Especialistas em energia acreditam que um combustível substituto para a gasolina em veículos automotores é o álcool. No final de 1800, o etanol foi usado na propulsão de motores a combustão e têm sido usados como aditivos ou como substitutos para a gasolina em veículos automotivos. O metanol e o etanol são líquidos incolores e queimam facilmente no ar produzindo calor (BAIRD, 2002).

Os álcoois podem ser produzidos em pequena quantidade por diferentes reações químicas e bioquímicas. No entanto, para uma produção em larga escala de metanol como combustível, o ponto de partida seria um combustível fóssil, como o gás natural ou o carvão. Já o etanol como combustível é produzido a partir de matéria vegetal. Nos Estados Unidos e Canadá é obtido de grãos de cereais e, no Brasil, da cana-de-açúcar. Um oitavo dos automóveis brasileiros foi projetado com motores que permitem o uso do etanol puro (E₁₀₀) como combustível, correspondendo por cerca de um quarto do combustível utilizado. Uma das vantagens do uso do etanol como combustível é que ele é muito menos tóxico que o metanol e a gasolina (BAIRD, 2002).

O uso dos álcoois para transporte apresenta como vantagens a produção pelos veículos de uma menor emissão de poluentes tais como o monóxido de

carbono, particulados, aromáticos e alquenos, quando comparados ao óleo diesel e à gasolina e, como desvantagem, a grande liberação de aldeídos e alcoóis vaporizados lançados no ar (ROCHA; ROSA e CARDOSO, 2009).

Com o aumento do preço do petróleo, na década de 70, o Brasil lançou o pró-álcool, um programa de incentivo ao uso do álcool como combustível. Com o objetivo de comparar os efeitos tóxicos da emissão veicular do álcool e da gasolina, a faculdade de medicina da USP através do laboratório de poluição atmosférica experimental (LPAE), desenvolveu pesquisas que mostram que o álcool é menos tóxico que a gasolina (SALDIVA et al., 1995).

De acordo com Parente (2003), uma conscientização mundial em relação à produção e consumo de energia, principalmente dos combustíveis fósseis, tem direcionado pesquisas na busca e aperfeiçoamento do uso de combustíveis renováveis como, por exemplo: o álcool e o biodiesel.

O biodiesel é definido pela National Biodiesel Board como monoalquil ester de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente de fontes renováveis, como óleos vegetais ou gordura animal, usado em substituição aos combustíveis fósseis em motores de ignição por compressão, do ciclo diesel (BRASIL, 2004). O processo de obtenção do biodiesel a partir de óleo vegetal e alcoóis consistem na reação de um triglicerídeo (de gordura animal ou de óleo vegetal) e álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador (base ou ácido fortes) resultando em uma mistura de ésteres e glicerol (CRNKOVIC; SANTOS, 2005).

Óleos vegetais e gorduras animais, mesmo antes da crise energética nos anos 70, já foram investigados como combustível para motores do ciclo diesel. E com a crise do petróleo, durante a Segunda Guerra Mundial, houve um incentivo para o desenvolvimento dos biocombustíveis. Com a conscientização em relação ao meio ambiente e consequente demanda por recursos renováveis de energia, o biodiesel produzido de oleaginosas tem despertado interesse. Vários estudos no Brasil e no mundo, apontam-no como uma alternativa para redução dos gases do efeito estufa (BRASIL, 2005).

Dentre as vantagens do uso do biodiesel, além da minimização da emissão de poluentes, destaca-se a semelhança de suas propriedades às do diesel mineral, viabilizando sua substituição sem alterações no motor (SANTOS, 2004). O biodiesel reduz a quantidade de fumaça e isso provavelmente é devido à presença do oxigênio nesse combustível. O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel,

do governo federal, autoriza a adição de 2% deste combustível ao óleo diesel de origem fóssil. Desde janeiro de 2008, esta mistura passou a ser obrigatória e, a partir de 2013, a obrigatoriedade é a adição de 5% (ROCHA; ROSA e CARDOSO, 2009).

O Brasil é o país pioneiro nas pesquisas e utilização dos biocombustíveis. A primeira patente mundial do biodiesel foi desenvolvida pelo professor doutor Expedito Parente da Universidade Federal do Ceará, em 1980. No entanto, a Alemanha é quem mais se destaca nesse empreendimento.

No cenário das economias industrializadas, o Brasil se destaca pela elevada participação das fontes renováveis em sua matriz energética, pois, além de ser o maior país tropical do mundo, com diversidade climática e de ecossistema propiciando uma produção de energia de biomassa, possui uma bacia hidrográfica com rios de planaltos que favorece a produção de eletricidade. O biodiesel representa uma alternativa energética para o Brasil, pois, apresenta várias vantagens, dentre as quais se destacam a substituição de combustível fóssil por combustível renovável, a promoção do desenvolvimento sustentável, a geração de empregos na área rural e a melhoria para a saúde pública (MCCORMICK; ALLEMAN, 2007).

De acordo com a EPA (Environmental Protection Agency), o uso do biodiesel e de misturas proporcional com o diesel promove redução das emissões associadas ao derivado de petróleo, excetuando-se as emissões de óxidos de nitrogênio.

As misturas de óleo diesel e biodiesel são denominados “BXX”, em que “XX” representa a porcentagem de biodiesel contido na mistura. Portanto, uma mistura de B2 indica a presença de 2% de biodiesel na mistura e B100, o biodiesel puro. Vale à pena ressaltar a miscibilidade do biodiesel em óleo diesel a qual permite sua utilização em qualquer proporção.

Análises do comportamento de degradação térmica do óleo diesel, biodiesel de soja, biodiesel de soja e nabo forrageiro e de uma mistura B10 de biodiesel de soja com óleo diesel, através de análises termogravimétricas (TGA) mostraram que o biodiesel de soja e o de soja e nabo forrageiro permaneceu termicamente estável até uma temperatura de 150°C. O óleo diesel mostrou perda de massa a partir de 35°C, volatilizando seus compostos mais leves. A mistura B10 teve um comportamento semelhante ao óleo diesel, ou seja, não alterou de forma significativa sua volatilidade. O estudo mostrou que o B10 tem uma volatilidade

adequada, pois não ocorrem diferenças significativas de funcionamento do motor (CRNKOVIC; SANTOS, 2005).

2.4. BIOINDICADORES

Os poluentes provocam efeitos biológicos no final de uma cadeia de eventos, que tem início com a emissão do poluente, seguida de sua dispersão e termina com os efeitos adversos nos seres vivos. Os efeitos da poluição atmosférica podem ser monitorados através de bioindicadores, pois 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 indicadores de alteração em seu ambiente (ARNDT; SCHWEIZER, 1991).

Indivíduos que possuem algumas dessas características são chamados bioindicadores, e são definidos como organismos, populações ou comunidade de organismos que reagem a mudanças ambientais com alterações em suas funções vitais ou em sua composição química, permitindo, assim, a avaliação da saúde ambiental.

Os bioindicadores, atualmente, têm sido muito utilizados para indicação e monitoramento de fontes de emissões singulares, como redes de monitoramento, estudos de impacto ambiental (EIA), controle de eficiência de medidas técnicas para reduzir emissões, controle de qualidade do ar dentro de instalações industriais e de moradias (KLUMPP, 2004), bem como, para avaliação da mutagenicidade causada pela emissão de poluentes provenientes dos veículos automotores.

Medidas físico-químicas podem ser utilizadas para fornecer dados sobre a qualidade do ar, no entanto, não podem prever os riscos aos quais os seres vivos estão expostos. É interessante, portanto, o uso de bioindicadores vegetais para avaliar a qualidade ambiental, pois as plantas além de outros atributos constituem um registro histórico.

Vários tipos de organismos podem ser utilizados para avaliar a qualidade do ar. Danos provocados por poluentes têm sido identificados em trabalhos realizados com animais (BOHM et al., 1989; SALDIVA et al., 1995; SALDIVA; BOHM, 1998; SALDIVA et al 2002). No entanto, em trabalhos realizados com animais existem

fatores que podem confundir os estudos como, por exemplo, as características genéticas, idade e alimentação (SANT'ANNA, 2003). Portanto, o uso de bioindicadores vegetais parece ser uma alternativa adequada para eliminar esses fatores de confusão e a problemática que envolve os estudos com animais.

Os bioindicadores vegetais têm, a cada dia, maior importância nas pesquisas relacionadas ao controle de poluição atmosférica. Além do mais, são consideradas ideais para o estudo de mutagenese tanto em laboratório como *in situ*. De acordo com Grant (1998), na publicação de uma revisão sobre a ação de substâncias mutagênicas tanto em ambientes internos como externos afirma que a *Tradescantia* é ideal para testes de poluição do ar.

As plantas são mais sensíveis à poluição que os animais, portanto, os estudos dos efeitos da poluição em vegetais podem ser usados como dados para os programas de controle de qualidade do ar nos centros urbanos, com objetivo de proteger os seres vivos (ALVES et al., 2001).

Os bioindicadores vegetais apresentam uma série de vantagens em relação aos métodos convencionais do controle de poluição ambiental, como: as plantas são facilmente cultivadas, mantidas e utilizadas em estudos; muitas plantas possuem ciclos de vida curtos e algumas mostram efeitos que podem ser avaliados em curto período (de horas a poucos dias) pós-exposição, o que torna possível avaliar os efeitos causados por poluição ambiental em curto prazo, entre outros (ARNDT; SCHWEIGER, 1991).

Esforço considerável tem sido devotado para identificação de poluentes que causam mutação genética. A mutação é uma mudança na sequência de DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (RIBEIRO; CARDOSO, 2003).

Desde o início do século passado, a comunidade científica sente a necessidade de entender quais são os agentes ambientais causadores de alteração genética (mutação) no ser humano, por isso começaram a aprimorar as pesquisas a cerca de processos que causam mutação nas células desenvolvendo vários bioensaios toxicológicos (RIBEIRO; CARDOSO, 2003).

Dentre os protocolos de bioensaios sensíveis para detectar poluentes atmosféricos, os mais rápidos e simples de realizar são os bioensaios com plantas que utilizam células germinativas como células-alvo do sistema biológico. Geralmente as plantas vasculares (superiores) possuem em seu botão floral camadas porosas por onde ocorre difusão dos poluentes atmosféricos, de forma

rápida e sem dificuldade. Por isso, as células germinativas são geralmente expostas aos agentes tóxicos presentes na atmosfera (MA, 1994; MANNING, 2002).

2.5. BIOENSAIOS COM ESPÉCIES VEGETAIS

Os bioensaios com plantas funcionam como monitores ambientais, portanto são sensores de risco ambiental. Os bioensaios utilizados para detecção de mutação genética e aberrações cromossômicas foram reconhecidos como seguros e sensíveis somente na década de 70. No entanto, a maioria desses bioensaios já havia sido usada em experimentos com radiação desde 1960 (Sparrow, 1972; Ma, 1979). Bioensaios com espécies vegetais geralmente apresentam alta sensibilidade (baixa ocorrência de falso negativo), por isso são apropriados para avaliar o risco mutagênico da exposição aos agentes genotóxicos (ENNEVER; ANDREANO e ROSENKRANZ, 1988).

Os bioensaios foram recomendados pela Organização Mundial de Saúde e pela Real Academia Sueca de Ciências, Comitê de Mutagenese Ambiental e Sociedade de Mutagenese Ambiental em 1970, para verificar e monitorar as mutações com o objetivo de estudar a genotoxicidade no meio ambiente. As espécies mais utilizadas foram cepa de *Allium*, *Tradescantia*, *Vicia Faba* e *Zea Mays* (SAVAGE, 1990).

Os bioensaios com plantas são eficazes nos estudos de mutagenese de curta duração, nos biomonitoramentos in situ e em laboratório (MA, 1979; MA, 1981; BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al. 2000). Geralmente, os bioensaios com plantas são mais sensíveis do que a maioria dos outros ensaios na detecção da genotoxicidade devido à poluição ambiental (EPA, 1990).

Dentre os bioensaios realizados com plantas, os mais utilizados são os realizados com o gênero *Tradescantia*. Como elas apresentam ciclo de vida curto, quando submetida à stresse, suas respostas biológicas podem ser avaliadas em um curto intervalo de tempo após a exposição (aguda ou crônica).

A *Tradescantia* é uma planta de pequeno porte, muito usada em ornamentação. Possui características que a tornam útil para a realização de experimentos envolvendo danos em seu material genético tanto quando exposta às

baixas como as altas concentrações de poluentes, pois apresentam respostas satisfatórias. Os clones do gênero *Tradescantia* são plantas biosensoras ou biomonitoras de grande importância.

Desde o início dos estudos da atividade genética de agentes físicos e compostos químicos, os clones de *Tradescantia* têm sido utilizados como organismos experimentais no biomonitoramento do potencial genotóxico de substâncias que contaminam o ar, água e solo. Sua utilização é em virtude de uma série de características favoráveis, entre as quais, possuem apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, e as células de quase todas as partes da planta fornecem material excelente para estudos citogenéticos (MA, 1982).

Clones de *Tradescantia* vêm sendo usadas desde 1960 como biomarcadores eficientes na determinação do potencial genotóxico de poluentes atmosféricos (MA, 1982; BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000). Devido a sua intensa utilização em estudos genéticos, a *Tradescantia* mostrou uma série de características que possibilitam detectar os agentes que afetam a estabilidade de seu genoma. Quatro dessas características foram selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação de toxicidade genética. O da mitose em ponta de raiz e o do tubo polínico são ensaios de aberração cromossômica (MA, 1982). O ensaio de mutação em pêlo estaminal (Trad-SH) é um teste de mutação mitótica que se baseia na expressão de um gene recessivo para cor da flor e o teste em que são utilizadas quebras cromossômicas em células mãe de grãos de pólen (Trad-MCN).

2.6. BIOENSAIO Trad-SH

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. Este ensaio detecta mutação mitótica pontual, 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. No bioensaio Trad-SH o gene dominante determina a cor dos filamentos do estame. O que provoca a mutação desse gene e a conseqüente mudança da cor azul do filamento para rosa é a ação do agente tóxico presente na atmosfera. A quantificação do efeito mutagênico é permitida devido ao fato de que essa frequência de mutação é uma função proporcional da toxicidade da exposição (MA, 1994; RODRIGUES, 1997).

A alta sensibilidade do ensaio Trad-SH a agentes químicos mutagênicos foi demonstrada primeiramente de forma acidental após a exposição do clone 02 a vapores que contaminavam o ar de um laboratório em Brookhaven (SPARROW; SCHAIRER, 1974). Mutagenicidade avaliada com o ensaio Trad-SH de fumaças químicas usada pelo exército Norte-Americano foi significativa com “fogoil”, diesel para tanques e suas combinação (SCHAEFFER et al. , 1987 appud RODRIGUES et al., 1999).

De acordo com Ichikawa (1984), o ensaio Trad-SHM exposto *in situ* para monitorar radiação ionizante, em larga escala, nas vizinhanças de usinas nucleares no Japão, mostrou que os aumentos nas frequências de mutação estavam correlacionados tanto com o período de funcionamento efetivo das usinas, como com a direção preferencial dos ventos. Variações na taxa espontânea de mutações também podem ser explicadas pelo fator temperatura, pois quanto mais baixa a temperatura, maior a mutagenicidade (ICHIKAWA et al., 1992).

Em uma série de estudos sobre poluição atmosférica utilizando o ensaio Trad-SH, em um laboratório móvel nos EAU, mostraram que o ar obtido em locais poluídos induziu frequência de mutações maiores que o ar coletado em áreas controle ou ar filtrado das mesmas localidades (Schairer et al., 1982; Schairer et al., 1983). A mutagenicidade de atmosferas poluídas também foi observada nas vizinhanças de complexos petroquímicos e de refinaria de óleos e em incinerador municipal de resíduos sólidos (SPARROW; SCHARIER, 1974; MA, 1994).

Bioensaio do pêlo estaminal realizado com o clone KU-20, bem como testes com outros clones de *Tradescantia* já comprovaram que este gênero vegetal é eficiente para uma avaliação do potencial mutagênico e genotóxico dos poluentes atmosféricos (OLIVEIRA, 2005; MA, 1994 E RODRIGUES et al., 1997). A exposição de *Tradescantia* em áreas com altos níveis de poluição atmosférica aumenta a frequência de mutações somáticas nos pêlos estaminais (SPARROW; SHAIRER, 1974). Baixas concentrações de metais pesados, chumbo, zinco, cobre e cádmio

causaram aumento na frequência de mutações (LOWER; ROSE e DROBNEY, 1978). Da mesma forma, uma avaliação da mutagenicidade dos poluentes atmosféricos como o SO₂, NO₂, N₂O e O₃ com o bioensaio Trad-SH, mostrou que eles aumentam a frequência de mutações (ICHIKAWA, 1992).

Para Oliveira et al., (2009), a eficiência deste bioensaio foi confirmada através de um biomonitoramento em ambiente fechado (indoor) da poluição do ar devido à queima de incenso, detectando um aumento significativo na frequência de mutações em pêlos estaminais do clone KU-20. Segundo Oliveira (2005) bioensaio Trad-SH com o clone KU-20 de *Tradescantia* mostrou-se capaz de reconhecer, embora de forma não linear, os diferentes níveis de concentração dos poluentes provenientes do motor diesel, concluindo, assim que, o uso desses bioensaio é interessante para se avaliar o potencial de risco mutagênico aos organismos vivos expostos à exaustão dos veículos automotores.

Ferreira et al., (2000) confirmaram a eficiência desse bioensaio em condições de campo em São Paulo através da detecção do aumento da mutagenicidade nos pêlos estaminais do clone 4430 devido aos poluentes provenientes de um incinerador de resíduos. Guimarães *et al.*, (2004) avaliaram a toxicidade da poluição atmosférica em São Paulo, principalmente devido ao material particulado (MP), através de um biomonitoramento intensivo de curta duração, e concluíram que o bioensaio Trad-SH com o clone KU-20 é bem adaptado para demonstrar os diferentes níveis de riscos impostos pela poluição do ar em São Paulo (SP) e na zona rural, como Caucaia.

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 um poluente não trouxer nenhum aumento na frequência de mutação na planta, que geralmente é mais sensível, também não aumentará a mutagenicidade no 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, biodiesel, gasolina e álcool se deveu não somente à sua versatilidade e propriedade do bioensaio para testes em laboratório, como também à sua extraordinária sensibilidade.

3. OBJETIVO

Avaliar e comparar o risco mutagênico dos poluentes provenientes da exaustão do motor abastecido com combustíveis fósseis (gasolina e diesel) e renováveis (álcool e biodiesel), através do bioensaio Trad-SH após exposição de curta duração.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados em dois laboratórios de motores. No laboratório de emissões veiculares da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) foram realizados ensaios em veículos abastecidos com os combustíveis: diesel e biodiesel, gasolina e álcool. No laboratório de motores do Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NET e F) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) foram realizados ensaios com um motor abastecido com os combustíveis: diesel e biodiesel e mistura 1/1 de biodiesel e diesel.

4.1. ENSAIOS NO LABORATÓRIO DA CETESB

Para uma avaliação e comparação do risco mutagênico da combustão dos combustíveis fósseis e renováveis os ensaios dos veículos foram realizados em dinamômetro de chassi de modo a simular um percurso urbano e um percurso estrada. O ciclo de condução utilizado foi o FTP-75(Federal Test Procedure) modificado. Este ciclo é utilizado pela norma americana para medir as emissões dos veículos do ciclo Otto e Diesel. Este ciclo de condução consiste em uma seqüência de aceleração e desaceleração do veículo de forma padronizada. O mesmo é dividido em três etapas: A primeira, conhecida como fase fria, dura 505 segundos. A segunda é a fase de estabilização, onde o veículo é desligado por 600 segundos e não há amostragem de poluentes e a terceira é a fase quente, onde o ciclo de condução e intervalo é semelhante à fase fria, como mostra a Figura 4.1.

Figura 4.1 – Ciclo de condução urbano FTP-75 (fonte: Silva, 2006).

O laboratório possui uma área para condicionamento térmico do veículo para que os ensaios sejam realizados em uma temperatura controlada entre 20 e 30 C. Os veículos são ensaiados em um dinamômetro de chassi hidráulico para simulação das condições de carga do veículo em pista. O laboratório possui um amostrador de volume constante (AVC) para captar os gases do tubo de descarga; Sacos para captação do gás diluído do escapamento e para reter o gás do ambiente; um ventilador para resfriar o motor; uma bancada de analisadores de gases para medir CO, CO₂, NOX, HC, entre outros; possui ainda um “auxiliar de motorista” equipamento utilizado para apresentar ao condutor do veículo, em um monitor de vídeo, um gráfico de velocidade em função do tempo, conforme Figura 4.2.

Figura 4.2 – Área de ensaio (Foto: Hirai, 2009).

4.1.1. VEÍCULOS

Os veículos submetidos aos ensaios foram um veículo do ciclo Otto (ignição por centelha) abastecido com os combustíveis: álcool e gasolina. Marca: vw – modelo FOX 1.6 flex- ano/modelo 2005 e um veículo do ciclo diesel (ignição por compressão) abastecido com os combustíveis: diesel e biodiesel. Marca: Citroen – modelo JUMPER 2.8L Diesel – ano/modelo 2006. Figuras – 4.3 e 4.4 respectivamente.

Antes da realização dos ensaios, os veículos foram submetidos a verificações quanto à suas condições gerais de uso, pois não podem apresentar vazamentos, estar desalinhado, ou qualquer outra anomalia que comprometa a segurança da condução do veículo e dinamômetro.

O combustível do veículo foi retirado por meio de um sistema de bombeamento pneumático e substituído pelo combustível a ser utilizado nos ensaios. Após esses procedimentos os veículos foram submetidos ao pré-condicionamento que consiste em realizar um ciclo de condução no dinamômetro de chassi sem a coleta dos gases. Ao término do pré-condicionamento o veículo tem que permanecer desligado em área condicionada com controle de temperatura por um período de no mínimo 12 e no máximo 36 horas conforme estabelecido pela norma da ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS E TÉCNICAS – ABNT NBR 6601(2005). Este procedimento é repetido após o término de cada ensaio.

Figura 4.3 – Veículo FOX sem o catalisador (foto: Hirai, 2009)

A fim de se conhecer a emissão real dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis usados no veículo FOX 1.6, antes da realização do pré-condicionamento e dos ensaios, foi retirado o conversor catalítico (original) do veículo e, substituído por outro catalisador sem o material cerâmico (“colméia”) para não minimizar as emissões de poluentes.

Para a realização dos ensaios, o veículo do ciclo Diesel precisou de algumas adaptações, pois o sistema de coleta e análise de gases do laboratório de veículos da CETESB, não está adequado para a realização de ensaios com este tipo de motor. Então, foram instaladas na saída do escapamento do veículo, um “misturador” e um “duto homogeneizador” (Figura 4.4). Esse sistema foi instalado para assegurar que não ocorresse condensação na linha e para promover a homogeneização do gás, de maneira semelhante ao que ocorre na atmosfera.

Figura 4.4 – Veículo JUMPER

4.1.2. CÂMARA

As câmaras usadas para a intoxicação das plantas com a mistura de poluentes provenientes dos ensaiados foram montadas com recipientes de vidros, fechados com tampa rosqueável onde há dois orifícios, sendo um para entrada e outro para saída das emissões. Estas câmaras têm 12 cm de diâmetro, 19 cm de altura, conferindo um volume de 1,8 litros, como mostrado na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Câmara contendo as inflorescências da KU-20.

4.1.3. COMBUSTÍVEIS

Para a realização dos ensaios com o veículo do ciclo Otto, foi utilizado o álcool etílico hidratado combustível (AEHC) e a gasolina padrão da Petrobras. Os combustíveis foram adquiridos nas bases de distribuição de refinarias. Para a realização dos ensaios com o veículo do ciclo Diesel, foi utilizado o óleo diesel metropolitano com 2% de biodiesel (B2), adquirido em um posto de combustível de São Paulo e o biodiesel de soja (B100) fornecido pela Escola de Engenharia de São Carlos (EESC).

4.1.4. PLANTA BIOINDICADORA

A planta bioindicadora utilizada nos experimentos foi o clone KU-20 de *Tradescantia* (Figura 4.6). Esse clone foi desenvolvido na universidade de Kyoto-Japão (ICHIKAWA, 1984). Esse clone possui origem exata desconhecida, contudo, apresenta parte das características de *T. Ohiensis*, parecendo originar-se de um híbrido entre essa espécie e 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) e na Casa de Vegetação da Seção de Ecologia do Jardim Botânico de São Paulo.

Para a realização dos ensaios as inflorescências são colocadas em Becker com água e introduzidas na câmara de fumigação para a intoxicação com os poluentes provenientes da combustão dos combustíveis fósseis e renováveis.

Figura 4.6 – Clone KU-20 da *Tradescantia* usado como bioindicar de poluição.

4.1.5 ENSAIOS

Para a realização dos ensaios os veículos do ciclo Diesel e Otto, em um dinamômetro de chassi, foram submetidos a um ciclo de condução padronizado modificado, para a coleta dos gases de escapamento. Os gases foram misturados com o ar ambiente e homogeneizados para simular o que ocorre no trânsito urbano. Após a homogeneização, uma parte do gás foi coletada para intoxicar as inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia*, outra parte do gás foi coletado para análise de aldeídos, de acordo com a norma ABNT NBR 12026 (2002) e de acordo com a norma da ABNT NBR 6601 (2005) para análise de HC, CO, NO_x, CO₂ e MP dentre outros, como mostrado na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Esquema geral do sistema de amostragem e análise dos poluentes no laboratório. (Fonte:Hirai, 2009.)

4.1.6. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos três grupos experimentais para os ensaios realizados no laboratório de emissões veiculares da CETESB, utilizando o motor do ciclo Otto abastecido com gasolina e álcool:

- Grupo 1 (controle): inflorescências inseridas na câmara por duas horas e não submetidas à exaustão do motor do ciclo Otto;
- Grupo 2: inflorescências intoxicadas com as emissões provenientes do veículo abastecido com álcool;
- Grupo 3: inflorescências intoxicadas com as emissões provenientes do veículo abastecido com gasolina.

Foram estabelecidos 3 grupos experimentais para os ensaios realizados no laboratório da CETESB, utilizando o motor do ciclo Diesel, conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 (controle): inflorescências inseridas na câmara por duas horas e não submetidas à exaustão do motor do ciclo Diesel;
- Grupo 2: inflorescências intoxicadas com as emissões da exaustão do veículo abastecido com biodiesel (B100);
- Grupo 3: inflorescências intoxicadas com as emissões da exaustão do veículo abastecido com óleo diesel.

Nos ensaios, as inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* foram expostas às emissões resultantes da combustão dos motores do ciclo diesel e ciclo Otto por 2 horas, pois esse bioindicador apresenta uma resposta satisfatória neste intervalo de tempo. A escolha de um período de apenas duas horas e exposição do bioindicador foi resultado de estudos anteriores onde se testou várias horas de exposição com o objetivo de encontrar resposta satisfatória no menor tempo de ensaios do motor. Este procedimento foi denominado intoxicação neste trabalho. Vale ressaltar que esta metodologia foi empregada para todos os ensaios.

Os ensaios foram realizados de 23 a 26 de outubro de 2007 e repetido no período de 27 a 30 de maio de 2008.

4.2. ENSAIOS NO LABORATÓRIO DE MOTORES DO NÚCLEO DE ENGENHARIA TÉRMICA E FLUIDOS (NETeF)

A bancada utilizada nos ensaios foi composta de um motor diesel acoplado a um dinamômetro hidráulico que, controlado por computador, permite a variação das condições de carga e rotação para a realização de diversos tipos de testes para motores de combustão interna.

O dinamômetro hidráulico Shenck Dynabar D360 é constituído por um rotor com câmaras que gira no interior de uma carcaça com câmaras estáticas. A potência fornecida pelo motor ensaiado é absorvido pela água que atravessa as duas câmaras e sai pela parte inferior do dinamômetro. A capacidade de frenagem do dinamômetro é tanto maior quanto maior for a quantidade de água mantida no interior das câmaras. O controle de frenagem é feito através de um computador que adquire o sinal de rotação e Momento de força e age controlando a água no

dinamômetro por meio de um servo motor que abre e fecha uma válvula de descarga.

4.2.1. MOTOR DIESEL

A mistura de poluentes à qual as plantas foram expostas é proveniente da exaustão de um motor de combustão interna aspirado, volume de 2.0 L, diesel como mostrado na Figura 4.8. Este motor está em operação no laboratório de motores do Núcleo de Engenharia Térmica e Fluidos (NET e F). Durante os experimentos, o motor foi submetido a uma carga leve e rotação constante (2500 rpm), por um período de 2 horas para cada combustível.

Figura 4.8 – Motor Diesel 2.0 usado no experimento.

4.2.2. MISTURADOR DE GASES

Para a simulação do gradiente de concentração de poluentes proveniente do motor Diesel, as emissões foram coletadas diretamente do escapamento do motor utilizando-se uma mangueira e posteriormente misturadas com ar atmosférico, na proporção de 10/1 por intermédio de um misturador de gases, com o objetivo de simular uma atmosfera urbana poluída como mostra a Figura 4.9.

Figura 4.9 – Misturador de gases.

4.2.3. ANALISADORES DE GASES

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 THC. Os analisadores de gases são mostrados na Figura 4.10.

Figura 4.10 – 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 77 ou 80% do fundo de escala nas várias faixas de calibração. O procedimento de calibração foi repetido várias vezes antecedendo aos experimentos.

4.2.4. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram estabelecidos quatro grupos para os testes realizados no laboratório do NETeF da EESC, para o motor abastecido com biodiesel, mistura(1/1) de diesel e biodiesel e diesel conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 (controle): inflorescências inseridas na câmara por duas horas e não submetidas à exaustão do motor do ciclo diesel;
- Grupo 2: inflorescências intoxicadas com as emissões da exaustão do motor do ciclo diesel abastecido com biodiesel (B100);
- Grupo 3: inflorescências intoxicadas com as emissões do motor do ciclo diesel abastecido com mistura de diesel e biodiesel na proporção 1/1 (B50);
- Grupo 4: inflorescências intoxicadas com as emissões do motor do ciclo diesel abastecido com óleo diesel;

As câmaras usadas para a intoxicação das plantas com os poluentes provenientes da emissão do motor foram as mesmas descritas no item 4.1.2 e mostrado na Figura 4.5. A planta bioindicadora utilizada nos experimentos foi a mesma descrita no item 4.1.4 e mostrada na figura 4.6.

Este experimento foi feito em parceria, ou seja, para o mesmo ensaio do motor, além da avaliação da mutagenicidade foi feito também coleta de Material particulado para caracterização dos HPAs por uma integrante de projeto “Tira-Teima” como parte do seu doutorado que está em andamento. Os ensaios foram realizados no período de 02 de março a 02 de junho e de 02 de agosto a 02 de outubro de 2007.

4.3. BIOENSAIO Trad-SH

Para fazer a quantificação do efeito mutagênico das emissões provenientes dos combustíveis nas inflorescências do clone KU-20 de *Tradescantia* foram feito o seguinte procedimento: Após a intoxicação, as inflorescências foram retiradas das câmaras e mantidas em Beckeres com água sob um sistema de aeração, por aproximadamente três dias no Instituto de botânica de São Paulo e no NETeF.

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. Quando não era possível analisar as inflorescências no período da manhã, as mesmas eram colocadas na geladeira, dentro de uma placa de petri, com um papel de filtro umedecido no fundo, para criar uma câmara com vapor (saturado) de água para que os pelos estaminais não ficassem emaranhados.

Para se fazer à 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 e no Instituto de Botânica de São Paulo na cessão de ecologia. 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. Na seqüência, foi feita a contagem do número de eventos de mutação em todos os estames. Cada evento mutagênico foi, caracterizada 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 4.11 mostra um conjunto de células de cor rosa mutante entre os pelos estaminais.

Figura 4.11 – Antera com seus pêlos estaminais (a) e, em destaque, pêlo estaminal com evento de mutação (células de cor rosa) (b).

Após a contagem dos eventos de mutação, 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.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise estatística foi feita usando-se o software no programa de estatística (versão 5.5) e o SPSS (versão 17). O nível de significância foi ajustado em 5%. Estes dados por apresentarem igualdade de variância e distribuição normal, foram avaliados por análise de variância, seguida por análise de comparações múltiplas (teste de Turkey e Bonferroni), para verificar se houve diferenças significativas entre as frequências de mutações observadas nos grupos experimentais.

4.5. CARACTERIZAÇÃO DOS POLUENTES DE INTERESSE DO “TIRA-TEIMA” DOS VEÍCULOS DO CICLO OTTO E DIESEL:

Além da avaliação da mutagenicidade das emissões dos veículos do ciclo Otto e do ciclo Diesel, foram feitos coleta de material particulado para a caracterização dos HPAs e a caracterização das emissões de aldeídos totais, formaldeídos, acetaldeídos, acroleína, ácidos carboxílicos, CO, CO₂, NMHC, HC e NO_x, pelos outros integrantes do grupo citados na introdução.

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS NA CETESB

Os dados brutos obtidos nos ensaios referentes às emissões do álcool e gasolina (grupos 1 – controle; grupo 2 – álcool e grupo 3 – gasolina) encontram-se no apêndice (Tabela A). A análise descritiva dos resultados obtidos é mostrada na Tabela 5.1 e o resultado da análise de variância (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, os respectivos erros-padrão e os aumentos percentuais observados nos três grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 5.1 e 5.2.

Tabela 5.1 – Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes provenientes das emissões do álcool e da gasolina.

Grupos	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Variância	Coefficiente de variância
Controle	12,75	4,66	0,76	21,72	0,37
Álcool	18,11	7,84	1,21	61,47	0,43
Gasolina	30,95	8,17	1,19	66,75	0,26

Tabela 5.2 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes presentes nas emissões do álcool e da gasolina.

			Média		
	Soma de quadrados	gl	quadrática	F	Sig.
Intergrupos	6.832,58	2	3416,29	66,19	0,001
Intragrupos	6.400,44	124	51,62		
Total	13.232,92	126			

Tabela 5.3 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas às emissões do álcool e da gasolina.

Grupos	Média	N
Controle	12,75 A	32
Álcool	18,11 B	42
Gasolina	30,95 C	47

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

Figura 5.1 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos às emissões provenientes do álcool e da gasolina.

Figura 5.2 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas a exaustão de um veículo Fox 1.6 Flex abastecido com álcool e gasolina, em relação ao tratamento controle (grupo 1).

A frequência média de mutações foi significativamente mais alta nas inflorescências expostas às emissões do motor movido a gasolina (grupo 3) do que nas expostas às emissões do motor a álcool (grupo 2) e do tratamento controle (grupo 1) ($p < 0,001$). A frequência média das mutações no grupo 2, por sua vez, foi significativamente maior que no grupo 1. Quando se observa o aumento percentual nas mutações em relação ao grupo controle nota-se que há um aumento em média de 40 e 140% para os grupos 3 e 4 respectivamente (Figura 5.2).

Os dados brutos obtidos nos ensaios referentes às emissões do diesel e biodiesel (grupos 1 – controle; grupo 2 – biodiesel e grupo 3 – diesel) encontram-se no apêndice (Tabela B). A análise descritiva dos resultados obtidos é mostrada na Tabela 5.4 e o resultado da análise de variância (ANOVA) na Tabela 5.5. Na Tabela 5.6 foi incluída a comparação das médias, adotando o nível de significância de 5%. Os valores médios dos eventos de mutação, os respectivos erros-padrão e os aumentos percentuais observados nos três grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 5.3 e 5.4.

Tabela 5.4 – Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes provenientes da exaustão do motor abastecido com biodiesel e diesel.

Grupos	Média	Desvio padrão	Erro Padrão da média	Variância	Coeficiente de variância
Controle	17,07	6,06	1,02	36,70	0,35
Biodiesel	23,98	5,40	0,91	29,16	0,22
Diesel	38,02	9,18	1,65	84,36	0,24

Tabela 5.5 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes da exaustão do motor a biodiesel e a diesel.

			Média		
	Soma de quadrados	gl	quadrática	F	Sig.
Intergrupos	7.414,64	2	3.707,32	76,17	0,001
Intragrupos	4.770,07	98	48,67		
Total	12.184,71	100			

Tabela 5.6 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas à exaustão do motor a diesel.

Grupos	Média	N
Controle	17,07 A	35
Biodiesel	23,98 B	35
Diesel	38,02 C	31

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

Figura 5.3 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor a biodiesel e a diesel.

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

A frequência média das mutações foi significativamente mais alta nas inflorescências expostas às emissões do motor movido a óleo diesel (grupo 3) do que nas inflorescências expostas às emissões do motor a biodiesel (grupo 2) e do tratamento controle (grupo 1), ($P < 0,001$). A frequência média das mutações no grupo 2, por sua vez, foi significativamente maior que no grupo 1. Quando se observa o aumento percentual nas mutações em relação ao grupo controle nota-se que há um aumento em média de 40% e 120% para os grupos 2 e 3 respectivamente (Figura 5.4).

5.2. COMPARAÇÃO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NO LABORATÓRIO DE EMISSÃO VEICULAR DA CETESB

Os dados brutos obtidos nos ensaios referentes às emissões do álcool, biodiesel, gasolina e diesel (grupos 1 – controle; grupo 2 – álcool; grupo 3 – biodiesel; grupo 4 – gasolina e grupo 5 – diesel) encontram-se no apêndice (Tabela C). A análise de variância (ANOVA) na Tabela 5.7. Na Tabela 5.8 foi incluída a comparação das médias, adotando o nível de significância de 5%. Os valores médios dos eventos de mutações, os respectivos erros-padrão e os aumentos percentuais observados nos quatro grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 5.5 e 5.6.

Tabela 5.7 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes da exaustão dos veículos abastecidos com álcool, biodiesel, gasolina e a diesel.

	Soma de quadrados	gl	Média quadrática	F	Sig.
Intergrupos	13.313,34	4	3.328,33	67,12	0,001
Intragrupos	9.321,96	188	49,56		
Total	22.635,30	192			

Tabela 5.8 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas à exaustão do motor abastecido com os combustíveis a álcool, biodiesel, gasolina e diesel.

Grupos	Média	N
Controle	13,10 A	36
Álcool	18,11 B	42
Biodiesel	23,98 C	35
Gasolina	29,55 D	49
Diesel	38,02 E	31

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

Figura 5.5 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão dos veículos abastecidos com álcool, biodiesel, gasolina e diesel.

Figura 5.6 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidos à exaustão dos veículos abastecidos com combustível álcool, biodiesel, gasolina e diesel, em relação ao tratamento controle (grupo 1).

A frequência média das mutações foi significativamente mais alta nas inflorescências expostas às emissões dos veículos abastecidos com combustíveis fósseis (grupos 4 e 5) do que nas inflorescências expostas à emissões dos veículos abastecidos com combustíveis renováveis (grupos 2 e 3) e do tratamento controle (grupo 1), ($P < 0,001$). A frequência média das mutações no grupo 2, por sua vez, foi significativamente maior que no grupo 1. A frequência média das mutações no grupo 3, por sua vez, foi significativamente maior que nos grupos 1 e 2. A frequência média das mutações no grupo 4, por sua vez, foi significativamente maior que nos grupos 1, 2 e 3. A frequência média das mutações no grupo 5, por sua vez, foi significativamente maior que nos grupos 1, 2, 3 e 4. Quando se observa o aumento percentual nas mutações em relação ao grupo controle nota-se que há um aumento em média de 40% no álcool; 80% no biodiesel; e 120% na gasolina e em torno de 180% para o diesel, respectivamente (Figura 5.6).

5.3. RESULTADOS DOS ENSAIOS REALIZADOS NO NETeF

Os dados brutos obtidos nos ensaios referentes às emissões do motor abastecido com os combustíveis biodiesel (B 100), mistura na proporção 1/1 de

diesel e biodiesel (B50) e diesel metropolitano (B2) (grupos 1 – controle; grupo 2 – biodiesel (B100); grupo 3 – mistura 1/1 de diesel e biodiesel (B50) e grupo 4 – diesel) encontram-se no apêndice (Tabela D). A análise descritiva dos resultados obtidos é mostrada na Tabela 5.9 e o resultado da análise de variância (ANOVA) na Tabela 5.10. Na Tabela 5.11 foi incluída a comparação das médias, adotando o nível de significância de 5%. Os valores médios dos eventos de mutações, os respectivos erros-padrão e os aumentos percentuais observados nos quatro grupos experimentais também são mostrados nas Figuras 5.7 e 5.8.

Tabela 5.9 – Análise descritiva dos valores de mutações encontradas nos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes provenientes da exaustão do motor abastecido com biodiesel (B100), Biodiesel (B50) - mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.

Grupos	Média	Desvio padrão	Erro padrão da média	Variância	Coefficiente de variância
Controle	7,29	2,81	0,48	7,90	0,39
Biodiesel (B100)	13,74	4,49	0,81	20,16	0,33
Biodiesel (B50)	17,44	8,41	1,56	70,73	0,48
Diesel	21,10	9,56	1,46	91,39	0,45

Tabela 5.10 – Análise de variância (modelo com um fator não-balanceado) dos experimentos de exposição do clone KU-20 de *Tradescantia* aos poluentes da exaustão do motor abastecido com biodiesel (B100), Biodiesel (B50) - mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.

			Média		
	Soma de quadrados	gl	quadrática	F	Sig.
Intergrupos	3.834,75	3	1.278,25	25,43	0,001
Intragrupos	6.684,94	133	50,26		
Total	10.519,69	136			

Tabela 5.11 – Comparações múltiplas entre médias de mutações/1000 pelos estaminais de inflorescência do clone KU-20 de *Tradescantia* expostas à exaustão do motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.

Grupos	Média	N
Controle	7,29 A	34
Biodiesel (B100)	13,74 B	32
Biodiesel (B50)	17,44 BC*	29
Diesel	21,10 C	43

Médias seguidas com letras iguais não diferem entre si, de acordo com o teste HSD de Tukey e o teste de Bonferroni (significância de 5%). *Biodiesel 50 é estatisticamente semelhante ao biodiesel (B100) e diesel, mas biodiesel (B100 e diesel) são significativamente diferentes.

Figura 5.7 – Frequência de mutações nos pêlos estaminais do clone KU-20 submetidos à exaustão de motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel.

Figura 5.8 – Aumento percentual nas mutações em pêlos estaminais de inflorescências do clone KU-20 submetidas à exaustão de motor abastecido com biodiesel, mistura 1/1 de diesel e biodiesel e diesel em relação ao tratamento controle (grupo 1)

A frequência média de mutações foi significativamente mais alta nas inflorescências expostas às emissões do motor movido a diesel (grupo 4) do que nas expostas às emissões do motor movido a biodiesel (grupo 2), do que nas expostas às emissões do motor movido à mistura na proporção 1/1 de biodiesel e diesel (grupo 3) e do tratamento controle (grupo 1) ($p < 0,001$). A frequência média das mutações no grupo 2, por sua vez, foi significativamente maior que no grupo 1. A frequência média das mutações no grupo 3, por sua vez, foi significativamente maior que nos grupos 1 e 2. Quando se observa o aumento percentual nas mutações em relação ao grupo controle nota-se que há um aumento em média de 80%, 140% e 180% para os grupos 2, 3 e 4 respectivamente.

5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS POLUENTES REALIZADA PELOS OUTROS INTEGRANTES DO PROJETO “TIRA-TEIMA”.

Os resultados das médias totais das emissões de todos os ensaios dos veículos do ciclo Otto e do ciclo Diesel caracterizadas por (HIRAI 2009; ELPÍDIO NETO, 2009) são mostrados nas Tabelas 5.12 e 5.13 respectivamente. Observa-se

na Tabela 5.12 que a concentração de hidrocarbonetos liberados na combustão da gasolina é um pouco maior que na combustão do álcool. Vale ressaltar que as concentrações de HC não foram detectadas pelo equipamento (analisador de gases por infravermelho) usado nos ensaios, pois o mesmo não foi sensível a concentração emitida pelo veículo.

Tabela 5.12 – Resultados médio das emissões em g/Km dos ensaios do veículo FOX sem o conversor catalítico e do veículo JUMPER.

Substância	Álcool (g/km)	Gasolina (g/km)	Diesel (g/km)	<i>Biodiesel</i> (g/km)
CO	6,41	6,44	-	-
CO ₂	169,35	175,70	271,60	278,75
HC	0,94	0,95	-	-
NO _x	1,87	2,64	0,84	1,18
NMHC	0,85	0,90	-	-

Na Tabela 5.13 pode ser observado que os resultados dos ensaios realizados com o veículo FOX sem o catalisador que a média dos aldeídos totais é maior no etanol hidratado do que na gasolina padrão. No entanto, os ácidos totais foram maiores na gasolina do que no álcool. Para Elpídio Neto (2009) as emissões de ácidos carboxílicos totais nos veículos do ciclo Otto com os combustíveis utilizados (álcool e gasolina), são maiores do que as emissões de aldeídos totais. Em relação à contribuição dos poluentes aldeídos e ácidos carboxílicos, nos ensaios realizados utilizando os combustíveis fósseis e renováveis, a média dos resultados obtidos indicou valores superiores nas emissões dos combustíveis renováveis (álcool e biodiesel) como fonte de energia. De acordo com Hirai (2009) a emissão de acroleína na combustão do diesel é menor que no biodiesel. Foi verificado também, neste estudo que as emissões de formaldeído, acetaldeído e acroleína representaram 96% dos aldeídos quantificados

Tabela 5.13 – Resultados das emissões em mg/Km dos ensaios do veículo FOX sem o conversor catalítico e do veículo JUMPER.

Substância	Álcool (mg/km)	Gasolina (mg/km)	Diesel (mg/km)	<i>Biodiesel</i> (mg/km)
Formaldeído	65,00	22,00	11,25	19,96
Acetaldeído	19,00	15,00	7,94	7,94
Aldeído totais	255,00	37,00	19,19	27,90
Ácido fórmico	97,00	31,00	4,00	1,00
Ácido acético	334,00	33,00	4,00	2,00
Ácido totais	431,00	554,00	8,00	3,00
Acroleína	-	-	4,25	5,72

5.5. DISCUSSÃO

A principal fonte de poluição atmosférica nas zonas urbanas é a queima dos combustíveis fóssil diesel e gasolina, pelos veículos automotores. Embora as emissões tenham sido reduzidas pelo uso de tecnologias de controle de poluentes, o número de veículos e outras fontes que utilizam como combustíveis o diesel e a gasolina continuam aumentando como indicado pela EPA (LEWTAS, 2007).

Os resultados desta pesquisa mostraram que os combustíveis fósseis (diesel e gasolina) emitem poluentes que causam uma maior frequência de mutação em pelos estaminais do clone KU-20 de *Tradescantia* em relação aos combustíveis renováveis (biodiesel e álcool). A frequência de mutações nas inflorescências expostas às emissões provenientes da combustão dos combustíveis fósseis e renováveis foram maiores que nas inflorescências não expostas aos poluentes (grupo controle). Entre as emissões dos combustíveis estudados neste trabalho, as emissões do diesel foram os que causaram uma maior frequência de mutação no biensaio. A queima do diesel em motores de combustão interna a compressão produz uma quantidade menor de CO₂, CO, NO_x e Hidrocarbonetos, comparado com veículos sem o uso do catalisador. No entanto, a emissão de material particulado, é maior no diesel do que na gasolina, bem como o teor de enxofre. A razão dessa maior emissão de material particulado está associada ao fato dos hidrocarbonetos neste combustível serem mais pesados e possuírem uma maior concentração de HPAs do que na gasolina (BRAUN, 2003).

Portanto, a maior frequência de mutação obtido com as emissões do diesel em nosso trabalho pode estar diretamente relacionada aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e materiais particulados (ou substâncias nele adsorvidas), que são conhecidos como mutagênicos e carcinogênicos (HUISING et al., 1978; BUNGER, et al., 2000; LEWTAS, 2007). O aumento do potencial mutagênico da exaustão do diesel também está relacionado ao alto conteúdo de enxofre nos combustíveis, altas cargas e altas rotações nos motores (BUNGER et al., 2000). Numa comparação das emissões mutagênicas entre veículos certificados, Claxton (1983), mostrou que os veículos movidos a diesel emitem de 45 a 800 vezes mais compostos mutagênicos, por distância percorrida, do que os movidos a gasolina. Veículos a diesel geralmente têm menor emissão de HPA do que veículos a gasolina devido à nitração do HPA para nitro-HPA. No entanto os HPAs são mais pesados (LEWTAS et al., 1983). (1990)

Os resultados positivos de mutagenicidade em bioensaios com plantas são coerentes com estudos anteriores sobre o potencial de risco mutagênico das emissões do diesel empregando o bioensaio trad-SH (OLIVEIRA, 2005). Vale ressaltar que neste trabalho não foram avaliados poluentes específicos e sim a mistura de poluentes presentes na exaustão dos combustíveis analisados diretamente na fonte. Por isso foi importante a utilização de um bioensaio sensível que mostrasse o efeito mutagênico em pouco tempo de exposição aos poluentes, tornando essa análise próxima das condições reais.

Aumento na frequência de mutação em pelos estaminais do clone KU-20 também foi observado por (FERREIRA et al., 2006) em exposição deste clone no Parque do Ibirapuera de São Paulo, indicando que este efeito mutagênico foi devido à poluição causada por emissão veicular. Exposição crônica in situ aos poluentes atmosféricos mostrou um aumento significativo na frequência de mutações em ratos (SOARES et al., 2003) e em plantas (GUIMARÃES et al., 2000; GUIMARÃES et al., 2004;). Para Ferreira et al., (2003) há um maior potencial mutagênico próximo à avenida e associado aos níveis de PM₁₀ na atmosfera do que em locais com pouca circulação de veículos.

Segundo Batalha et al., (1999), as soluções preparadas com amostras de PM₁₀ obtidas do ar do centro de São Paulo e incubaram inflorescências de *Tradescantia pallida* e verificaram que houve um aumento significativo na frequência de micronúcleos em células mães de grãos de pólen (bioensaio Trad – MCN), na

medida em que as soluções tornavam-se mais concentradas. Esses resultados são coerentes com as pesquisas que mostraram o potencial mutagênico das partículas urbanas empregando o bioensaio Trad- MCN (OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2004). Dessa forma 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.

Em testes realizados com ratos e bactérias expostos as emissões do diesel e da gasolina, todas as amostras mostraram mutagenicidade. Para Seagrave et al.,(2002) a mutagenicidade das emissões da exaustão do diesel e da gasolina e mostraram que as emissões do diesel são mais mutagênicas do que as da gasolina. No entanto, as emissões da combustão da gasolina não têm sido muito estudadas nos sistemas biológicos ou toxicológicos devido a sua baixa emissão de partículas quando comparadas com as emissões da combustão do diesel (LEWTAS, 2007).

Além dos poluentes citados acima, o diesel e a gasolina apresentam em suas emissões compostos oxigenados como, por exemplo, aldeídos e ácidos carboxílicos (ALPÍDIO NETO, 2009; HIRAI, 2009). Produtos de combustão incompleta que contêm compostos químicos gasosos que são carcinogênicos, tais como o benzeno, aldeídos, entre outros (LEWTAS, 2007). Pode-se ressaltar que dentre os aldeídos, a acroleína é considerada tóxica por todas as vias de exposição, é altamente reativa e causam alterações no DNA, mutação e problemas respiratórios, gastrointestinais, cardiovasculares e na pele (FAROON et al., 2008).

Hiray (2009), mostrou que as emissões da gasolina possuem uma maior quantidade de NOx, aldeídos totais e ácidos carboxílicos totais, quando comparado com as emissões do diesel. Embora esses compostos estejam relacionados com o efeito mutagênico dos poluentes presentes na exaustão dos combustíveis, o maior efeito mutagênico do diesel provavelmente está relacionado ao tamanho das moléculas de hidrocarbonetos e ao material particulado e substâncias nele adsorvida. Isso explica também uma frequência maior de mutação em pelos estaminais nas inflorescências intoxicadas com os poluentes provenientes das emissões de veículos do ciclo Diesel, em relação ao biodiesel.

Os ensaios realizados no NETeF com diesel e biodiesel mostraram resultados equivalentes aos resultados dos ensaios realizados na CETESB. Foi verificado

nestes ensaios uma maior frequência de mutação causada pelas emissões do diesel do que no biodiesel e na mistura (1/1) de diesel e biodiesel. No entanto, o biodiesel é um combustível renovável que não contém compostos de enxofre em sua composição. Para McCormick; Alleman (2007), a combustão do biodiesel e mistura de diesel e biodiesel reduzem substancialmente o material particulado, monóxido de carbono e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos incluindo compostos tóxicos quando comparados com o diesel.

Estudos com material particulado mostraram que as emissões do diesel são mais mutagênicas do que as do biodiesel (BUNGER et al., 1998; BUNGER et al., 2000). De acordo com estes autores, a menor frequência de mutação no biodiesel está associado a pequena quantidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na combustão deste combustível.

Nos ensaios realizados no NETeF com as emissões da exaustão do diesel, mistura de biodiesel e diesel (1/1) e biodiesel, além da comparação do potencial mutagênico foi feito também a caracterização dos HPAs. A mesma mostrou que os HPAs mais abundantemente contidos na exaustão do diesel, mistura (1/1) de biodiesel e diesel e o biodiesel foram os de baixa e média massa moleculares, como o naftaleno, fluoranteno, fenatreno e pireno. Mostrou também que a concentração dos HPAs, somadas foram respectivamente 1546mg.m^3 , 762mg.m^3 e 254mg.m^3 para as referidas emissões. Assim, comparando a emissão do motor diesel houve uma redução na emissão de HPAs quando se utilizou a mistura ou apenas o biodiesel como combustível (RINALDI et al, 2009).

Neste estudo o biodiesel apresentou um aumento na frequência de mutação em relação ao álcool e ao grupo controle. O efeito adverso do biodiesel de acordo com Bunker et al, (1998) foi devido a grande quantidade de aldeídos tóxicos, especialmente a acroleína, que foram identificados na exaustão do biodiesel. Estudos mostraram que a acroleína é altamente reativa e citotóxica e mostrou ser mutagênica em baixa concentração (FAROON et al., 2008).

A exaustão de um motor a diesel operando com 100% de biodiesel (B100) mostrou um modesto efeito adverso em animais expostos no estudo McCormick; Alleman (2007). Este resultados está de acordo com os estudos de Bunker et al., (2007). Eles compararam os efeitos mutagênicos do diesel, do biodiesel e de outros combustíveis e mostraram que todos os combustíveis mostraram um aumento significativo na frequência de mutação. No entanto, o biodiesel mostrou ser menos

mutagênico que outros combustíveis estudados. Além do mais, o biodiesel é um combustível renovável que não contém compostos de enxofre em sua composição. Segundo McCormick; Alleman (2007), a combustão do biodiesel e mistura de diesel e biodiesel reduzem substancialmente o material particulado, monóxido de carbono e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos incluindo compostos tóxicos quando comparados com o diesel. Esses resultados contraditórios deixam clara a necessidade de estudos adicionais do impacto das emissões do biodiesel.

Os resultados desta pesquisa mostraram ainda que as emissões da combustão da gasolina causam uma maior freqüência de mutação nos pelos estaminais do clone KU-20 de *Tradescantia* do que as emissões provenientes da combustão do álcool (Etanol). Este estudo está de acordo com Clarck et al., (1983). Eles compararam a mutagenicidade da gasolina pura e misturas da gasolina com álcool e mostraram que a combustão das emissões mutagênicas é menor no álcool e nas misturas de álcool e gasolina. A exaustão de veículos a gasolina e a álcool não tem sido muito estudada em sistemas biológicos ou toxicológicos devido a sua baixa emissão de material particulado quando comparado às emissões do diesel (BAIRD, 2002). Para Hirai (2009), a gasolina possui uma quantidade maior de THC, NOx, NMHC e ácidos carboxílicos quando comparados com as emissões provenientes da combustão do álcool. No entanto, o álcool apresentou uma maior quantidade de aldeídos totais (ALPÍDIO NETO, 2009).

Veículos a gasolina sem o conversor catalítico têm maior emissão de HPA comparada à de veículos a gasolina com o uso de catalisador (BOSTROM et al., 2002). Abrantes et al., (2005) mostraram que as emissões de HPAs são maiores na gasool (22% de etanol anidro e 78% de gasolina) do que no etanol. Especialistas em energia acreditam que um combustível substituto para a gasolina é álcool, pois ele libera menos poluente (exceto aldeídos e álcool vaporizado) e é menos tóxico que a gasolina e o metanol (ROCHA; ROSA e CARDOSO, 2009). Vale ressaltar que neste estudo foi retirado o catalisador dos veículos utilizados para se avaliar as emissões dos combustíveis de forma real sem o uso de tecnologia para redução nas emissões e dessa forma compreender o efeito mutagênico da a real contribuição das emissões veiculares nos seres vivos.

Estudos epidemiológicos têm mostrado uma estreita relação entre doenças respiratórias e hospitalização por complicação respiratória em indivíduos expostos a poluição nos centros urbanos (BOHM et al., 1983; SATO et al., 1993; HARRISON;

YIN, 2000; BUCKERIDGE et al., 2002). Associação entre poluentes urbanos e problemas cardiovasculares e certos tipos de câncer tem sido bem documentados (SALDIVA et al., 2002; LIN et al., 2004; POPE III et al., 2002). Emissões veiculares são mutagênicas em muitos ensaios de células mamárias e micróbios. 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.

Bioensaios com espécies vegetais são indicados para estudos de mutagênese de curta duração em laboratório e insitu (RODRIGUES et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000 ;FERREIRA et al., 2000). O bioensaio Trad-SH permite avaliar um grande número de inflorescências em um único ensaio e é muito sensível, mostrando respostas em apenas duas horas de exposição. Vale ressaltar ainda que os níveis de poluição do ar, gerado através de medidas físico-químicas, são dados importantes da qualidade do ar, mas não podem ser usados diretamente para prever os riscos a que os seres vivos estão sujeitos. No entanto, a utilização 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 ao controle de emissão de poluentes; além de fornecer subsídios para o estabelecimento de medidas concretas previstas na legislação (ARDNT, SCHWEIZER, 1991).

Bioensaio de mutagênese usando plantas parece ser uma ferramenta importante na investigação das conseqüências do impacto ambiental devido às emissões veiculares, principalmente na saúde humana. Embora esses efeitos não possam ser extrapolados 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 um poluente não trouxer nenhum aumento na frequência de mutação na planta, que geralmente é mais sensível aos efeitos da poluição que os animais, também não trarão nenhum aumento na mutagenicidade do 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.

Os poluentes considerados responsáveis pelo potencial mutagênico das emissões do diesel são provavelmente as altas concentrações de HPAs, MP e enxofre presentes neste combustível. Nas emissões da combustão da gasolina, provavelmente são os HPAs, ácidos totais e NMHC e NOx. Nas emissões da combustão do biodiesel provavelmente são o NOx e os aldeídos tóxicos, especialmente a acroleína. Em relação às emissões da combustão do álcool (etanol) provavelmente são os ácidos totais e os aldeídos, especialmente o formaldeído. Vale ressaltar que no projeto "Tira-teima" não foi caracterizado, nas emissões da combustão do diesel e do biodiesel, as concentrações de hidrocarbonetos e hidrocarbonetos não metano (NMHC). E nas emissões da combustão do álcool (etanol) e da gasolina não foram caracterizadas as emissões de acroleína. No entanto, este estudo deixa claro a necessidade de se identificar os poluentes específicos de cada combustível responsável pelo risco mutagênico nos seres vivos, por isso o objetivo desta pesquisa além de mostrar que a mistura dos poluentes provenientes da combustão dos combustíveis são mutagênicos tem o objetivo de fazer uma comparação do potencial de risco mutagênico dos poluentes presentes nos combustíveis fósseis (diesel e gasolina) e renováveis (biodiesel e álcool), diretamente da fonte, isto é, diretamente dos motores sem o uso de catalisador. Atualmente existem várias opções de tecnologia para minimizar as emissões dos poluentes dos motores, como por exemplo, o uso de combustíveis renováveis, tais como o álcool e o biodiesel. Por isso, acredita-se que uma avaliação e comparação dos efeitos mutagênicos desses combustíveis são imprescindíveis para uma implementação de políticas de controle das emissões dos veículos automotores

6. CONCLUSÕES

Os poluentes de origem de veicular provocam alterações no material genético do clone KU-20 de *Tradescantia* causando mutação. Os combustíveis fósseis (diesel e gasolina) apresentaram uma frequência de mutação maior nos pelos estaminais do clone KU-20 do que os combustíveis renováveis álcool (etanol) e biodiesel.

As emissões provenientes da combustão dos combustíveis fósseis e renováveis causaram uma frequência de mutação significativamente maior nas inflorescências a elas expostas do que no grupo de inflorescências que não foram expostos às referidas emissões (grupo controle).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos mostraram ter um efeito significativo no desenvolvimento de mutação no clone KU-20 de *Tradescantia*.

Os resultados apresentados nesta pesquisa mostram que a utilização de combustíveis renováveis álcool e biodiesel é mais vantajoso do ponto de vista ambiental e da saúde dos seres vivos.

O bioensaio Trad-SH com pelos estaminais do clone KU-20 de *Tradescantia* mostrou-se capaz de reconhecer os diferentes níveis de genotoxicidade dos poluentes provenientes da combustão dos diferentes combustíveis após exposição de curta duração.

6.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Avaliação e comparação do potencial de risco mutagênico dos poluentes provenientes da exaustão dos veículos com outros tipos de combustíveis usando o bioensaio Trad-SH.
- ✓ Determinação 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 nas cidades onde não há medição da qualidade do ar através de medidas físico-químicas, usando bioensaios de plantas do gênero *Tradescantia*.
- ✓ Avaliar e comparar o potencial de risco mutagênico de diferentes tipos de biodiesel e suas misturas através do bioensaio Trad-SH.

7. REFERÊNCIAS

- ABBEY et al. Long-term inhalable particles and other air pollutants related to mortality in nonsmokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v. 159, n. 2, p. 373-382, fev. 1999.
- ABRANTES, R. **Caracterização preliminar das emissões de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aldeídos de veículos do ciclo diesel**. [Dissertação Mestrado]. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2002.
- ABRANTES et al. Caracterização das emissões de aldeídos de veículos do ciclo diesel. **Revista de Saúde Pública**. v. 39, p. 479-485, 2005.
- ALVES et al. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. **Hoehnea**. v. 30, n. 2, p. 89-94, 2003.
- ALVES et al. 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. 2001.
- ARDNT, U.; SCHWEIZER, B. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical counties. In: ELLENBERG et al. Biological monitoring. **Signals from the environmental**. Ed. Vieweg, Eschborn, p. 199-298, 1991.
- ÁVILA, M. T. **Estudo de um motor regenerativo utilizando etanol vaporizado**. [Tese de doutorado]. Escola de Engenharia de São Carlos-USP, 2003.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. 2 ed. Porto Alegre, Bookman, 2002.
- BATALHA et al. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. **Mutation Research**. v. 426, p. 229-232, 1999.
- BATHIA, R.; LOPIPERO, P.; SMITH, A. H. Diesel exhaust exposure and lung cancer. **Epidemiology**. v. 9, p. 84-91. 1998.
- BOHM et al. Comparative toxicity of alcohol and gasoline fueled automobile exhaust fumes. In: HAYES, A. W.; SCHNELL, R.C.; MIYA, T.S. **Developments in the Science and Practice of Toxicology by Eds**. Ed. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. p. 479-482. 1983.
- BOHM et al. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. **Environment Research**. v. 49, p. 208-216. 1989.
- BRANCO, S.M.; MURGEL, E. **Poluição do ar**. 5ª ed. São Paulo. Ed. Moderna. 1996.

_____. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Programa brasileiro de biocombustíveis. Rede brasileira de biodiesel Probiodiesel.** – Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2005.

_____. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP No. 42, de 24 de novembro de 2004. **Diário Oficial da União.** Brasília – DF, 9 dez. 2004.

_____. Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Resolução ANP No. 310, de 27 de dezembro de 2001. **Diário Oficial da União.** Brasília – DF, 28 dez. 2001.

BRAUN, S.; APPEL, L. G.; SCHMAL. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel- a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. **Química nova.** v. 27, n. 3, p. 472-482, 2003.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M. 2002. Carbon Sequestration in the Rain Forest: Alternatives Using Environmentally Friendly Biotechnology. **Biota Neotropica.** v. 2, n.1, P. 1-5, 2002.

BUNGER et al. Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel. **Mutat. Res.** v. 415, p. 415-413, 1998.

BUNGER et al. Mutagenity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. **Mutagenesis.** v. 15, n. 5, p. 391-397, 2000.

BUNGER et al. Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. **Arch Toxicol.** v. 81. p. 599-603, 2007.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Proconve**, 2006.

CETESB – COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Proconve**, 2008. Efeitos da poluição atmosférica na vegetação. [HTTP://www.cetesb.sp.gov.br/solo/vegetação/poluição.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/solo/vegetação/poluição.asp). Acesso em 28 jan de 2008.

CLARK et al. Influence of Ethanol and Methanol Gasoline Blends on the Mutagenicity of Particulate Exhaust Extracts. **Arch. Environm. Contam. Toxicol.** v. 12, p. 311-317, 1983.

CLAXTON, L. D. Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review. **Environ Mutagen.** v. 5, p. 609-631, 1983.

CRNKOVIC, P.M.; SANTOS, A.M. O Biodiesel e o canavieiro. **Canavieiro Paulista.** v. 94, n. 29, abr, p. 11-12, 2005.

D'AMATO, G.; LICARDI, G. **Pollen-related allergy in the European mediterranean área.** *Clinical and experimental allergy*. v. 24, p-210-219, 1994.

ELPÍDIO NETO, E. **Caracterização preliminar das emissões de aldeídos e ácidos carboxílicos em veículos do ciclo Otto e do ciclo Diesel com uso de combustíveis fósseis e renováveis.** [Dissertação Mestrado]. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

ENNEVER F.K.; ANDREANO G.; ROSENKRANZ H.S., The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. **Mutation Research**. v. 205, p. 99-105, 1988.

EPA – Enviromental Protection Agency. U. S. **Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust.** Office of Research and Development, Nacional Center for Environmental Assessment, Washington, DC, 2002.

EPA - Enviromental Protection Agency. U. S. **Interim methods for development of inhalation reference concentrations.** Office of Health and Environmental Assessment, Washington, DC, 1990.

FAROON et al. Acrolein health effects. **Toxicology and Industrial Health**. v. 24, p. 447–490, 2008.

FELLENBERG, G.. Introdução aos problemas da poluição ambiental. **EPU**, São Paulo, 1980.

FERREIRA et al. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo – SP, Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. **Environmental Pollution**. v. 145, p. 219-224, 2006.

FERREIRA et al. 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. 2000.

FINLAYSON-PITTS, B. J., PITTS, J. J. N. **Atmospheric Chemistry: Fundamentals and Experimental Techniques**. USA: John Willey Sons, 1996.

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

GUIMARÃES et al. Detection of genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the Tradescantia – micronucleus (Trad – MCM) assay. **Environmental and Experimental Botany**. v. 44, p. 1– 8. 2000.

GUIMARÃES et al. Evolutaion of the mutagenic potential of urban air pollution in Sao Paulo, Southeastern Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. **Wiley Periodicals**. *Envirion Toxicol*. v. 19,p. 578-584, 2004.

HIRAI, E. Y. **Estudo comparativo das emissões de aldeídos originados pelo veículo à Diesel com o uso óleo diesel comercial, biodiesel e suas misturas.** [Dissertação Mestrado]. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

HEYWOOD, J.B. Motor vehicle emissions control. In: SHER, R. (ed.). **Handbook on air pollution from internal combustion engines: pollutant formation and control.** San Diego: Academic Press, 1998. Parte I.

HUISING et al. Application of bioassay to the characterization of diesel particle emissions. In: WATERS et al. **Application of short term bioassay in the fractionation and analysis of complex environmental mixtures.** Plenum press, New York, NY, p. 382-418, 1978.

ICHIKAWA, S. 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. 1984.

ICHIKAWA, S. *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. 1992.

JIANG et al. Vehicle fleet emissions of black carbon, polycyclic aromatic hydrocarbons, and other pollutants measured by a mobile laboratory in Mexico City. **Atmospheric Chemistry and Physics**. v. 5, p. 3377-3387, 2005.

KLUMPP et al. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**. Vv. 141, n. 2, p. 142-148, 2004.

LEWTAS, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. **Mutation Research**. v. 636, p. 95-133, 2007.

LEWIS, J. Evaluation of the Mutagenicity and Carcinogenicity of Motor Vehicle Emissions in Short-Term Bioassays. **Environmental Health Perspectives**. v. 47, p. 141-152, 1983.

LI et al, The role of oxidative stress in acrolein-induced DNA damage in HepG2 cells. **Free Radical Research**. v 42(4), p. 354-36, 2008.

LI et al, Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons and their carcinogenic potencies from cooking sources to the urban atmosphere. **Environ. Health Perspect**. v. 111, p. 483-487, 2003.

LIN et al. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 37, p. 756-70, 2004.

LOWER, W. R.; ROSE, P. S.; DROBNEY, V. K. Mutagenic and other effects associated with lead smelting. **Mutat. Res**. v. 54, p. 83-93, 1978.

MA, T.H. 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. 1979.

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

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

MA, T. H. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. **Mutation Research**. v. 310, p. 211-220. 1994.

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

MARQUES NETO, J. A. **Avaliação da utilização do atual diesel (combustível) comercial brasileiro (ano de referência 2003-2004) para motores com gerenciamento eletrônico de combustível e sistema de recirculação de gases de escape (ERG), certificados pela legislação EPA 2004**. [Dissertação Mestrado]. Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá na Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2003.

MARTINS, K. C. R. **Estudo da aplicação de conversores catalíticos platina/paládio como auxiliar no processo de controle das emissões gasosas automotivas**. [Tese de Doutorado]. NET e F da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. 2003.

MCCORMICK, R.; ALLEMAN, T. L. “Eliminações de Exaustão. In: KNOTHE et al. **Manual de Biodiesel**. Ed. Edgard Blucher. Curitiba, 2007. Cap. 7. P. 181-201.

MIGUEL, A. H. On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon gasoline and diesel vehicles. **Environmental science and technology**. v. 32, p. 450-455, 1998.

OLIVEIRA, A. C. S. Estudo da emissão da frota de veículos diesel e ciclo Otto, sem os conversores catalíticos nos municípios de Sorocaba e Votorantim. [Dissertação Mestrado]. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, D. S. **Avaliação do potencial de risco mutagênico dos poluentes presentes na exausto do motor diesel por meio do bioensaio TRAD-SH – 2005**. Dissertação [Mestrado]. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2005.

OLIVEIRA-CARVALHO et al., Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. **Environmental Research**. v. 98, p. 1-7, 2005.

PAGLIUSO, J.D. **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. 1999.

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

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

POPE III et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **JAMA(r) Journal of the American Medical Association.** v. 287, n. 9, p. 1132-1141. 2002.

RODRIGUES, G. S. Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores: Tradescantia (MCN, SHM), milho e soja. **Embrapa, meio ambiente.** Circular técnica 02. Jaguariúna, p. 30, 1999.

RODRIGUES et al. Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis – a review. **Critical Reviews in Plant Sciences.** v. 16, n. 4, p. 325-359. 1997.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à química ambiental.** 2 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

SALDIVA et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.** v. 165, p. 1610-1617, 2002.

SALDIVA et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. **Environmental Research.** v. 57, p. 19-33. 1992.

SALDIVA et al. Air pollution and mortality in elderly people: a times-series in São Paulo. **Archives of Environmental.** v. 50, p. 159-163. 1995.

SALDIVA, P. H. N.; BOHM, G. M. Animal indicator of adverse effects associated with air pollution. **Ecosyst Health.** v. 4, p. 230-235, 1998.

SAN'TANNA, E. T. G. **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. 2003.

SANTOS, I. T. Q. P. Avaliação da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial por meio do bioensaio de micronúcleo com *Tradescantia pallida* cv. Purpúrea. [tese de doutorado]. Universidade de São Paulo (USP), 2004.

SATO et al. Stratospheric aerosol optical depths, 1850-1990. **Journal of geophysical research** v. 98, n. 12, p. 987-22,994, december, 1993.

SCHAEFFER et al. Effects of chemical smokes on flora and fauna under Field and laboratory exposures. **Ecotox. Environ. Saf.** v. 13, p. 301-315, 1987.

SCHEEPERS, P. T. J.; BOS, R. P. 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. 1999.

SEAGRAVE et al. Lung Toxicity of Ambient Particulate Matter from Southeastern U.S. Sites with Different Contributing Sources: Relationships between Composition and Effects Mutagenicity and in vivo toxicity of combined particulate and semivolatile organic fractions of gasoline and diesel engine emissions. **Toxicol Sci.** V. 70, P. 212–226, 2002.

SILVA, M. V. I. **Efeitos do uso do biodiesel sobre propriedades do óleo lubrificante usado em um motor de ignição por compressão.** [Dissertação Mestrado]. Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2006.

SOARES et al. Urbain air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. **Environ. Res.** v. 92, p. 191-196, 2003.

SOTTO PAU, F. **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] Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2003.

SPARROW, A. H.; SCHAIRER, L. A. The effects of chemical mutagens and specific air pollutants (O₃, SO₂, NO₂, N₂O) on somatic mutation rate in *Tradescantia*. In: BUBININ, N.P. **Genetic effects of pollution in the environment.** Institute Obshchei Genetiki, Moscou, 1974.

WARK, K.; WARNER, C. F. **Contaminación del aire: Origen y control.** Ed. Noriega. Limusa. 1996.

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

World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety. **Acetaldehyde.** Geneva, Environmental Health Criteria. v. 167, p 129, 1995.

Apêndice A

Tabela A – Números de eventos de mutação por mil pêlos estaminais analisados em cada flor após a realização do protocolo de exposição do bioensaio Trad-SH à mistura de poluentes provenientes da combustão do álcool e da gasolina e das inflorescências não expostas aos poluentes (controle).

Controle	Álcool	Gasolina	
19,00	19,41	18,48	38,77
12,94	38,83	38,77	38,77
22,65	9,70	29,06	48,44
22,65	9,70	19,37	29,06
9,70	16,18	38,77	29,06
19,41	38,83	38,77	-
19,41	19,41	48,44	-
9,70	9,70	29,06	-
16,18	16,18	29,06	-
19,41	16,18	48,44	-
16,66	25,88	38,77	-
9,70	6,47	29,06	-
16,66	19,41	19,37	-
9,70	25,88	29,06	-
3,23	22,65	13,80	-
9,70	22,65	48,44	-
12,94	19,41	19,37	-
19,41	25,88	38,77	-
19,00	19,41	48,44	-
12,94	38,83	18,48	-
22,65	9,70	38,77	-
22,65	9,70	29,06	-
9,70	16,18	19,37	-
19,41	38,83	38,77	-
19,41	19,41	38,77	-
9,70	9,70	48,44	-
16,18	16,18	29,06	-
19,41	16,18	29,06	-
16,66	25,88	48,44	-
9,70	6,47	38,77	-
16,66	19,41	29,06	-
9,70	25,88	19,37	-
-	22,65	29,06	-
-	22,65	13,80	-
-	19,41	48,44	-
-	25,88	19,37	-
-	19,41	38,77	-
-	38,83	48,44	-
-	9,70	18,48	-
-	9,70	38,77	-
-	16,18	29,06	-
-	38,83	19,37	-

Tabela B– Números de eventos de mutação por mil pêlos estaminais analisados em cada flor após a realização do protocolo de exposição do bioensaio Trad-SH à mistura de poluentes provenientes da combustão do diesel e do biodiesel e das inflorescências não expostas aos poluentes (controle).

Controle	Diesel	Biodiesel
5,50	18,18	18,37
11,00	18,18	18,37
13,00	15,58	20,99
11,00	10,38	20,99
11,00	7,79	20,00
6,00	25,90	20,00
6,00	28,50	20,00
19,41	15,50	11,46
19,41	5,10	8,59
9,70	5,10	14,30
16,18	16,60	11,40
19,41	36,10	8,50
16,66	22,20	14,20
9,70	14,80	11,60
16,66	32,30	14,20
9,70	14,80	8,50
3,23	8,20	8,59
9,70	14,80	8,50
12,94	11,90	14,60
19,41	32,70	22,90
19,00	32,73	17,90
9,00	32,73	14,40
9,00	36,00	11,90
9,00	34,00	7,20
11,00	31,49	10,30
5,50	20,00	10,80
5,50	20,00	10,83
5,50	31,00	14,00
11,00	18,00	11,46
11,00	35,00	11,46
5,50	35,00	10,30
5,50	-	10,80
6,60	-	10,80
5,50	-	14,00
5,50	-	10,80

Tabela C- Números de eventos de mutação por mil pêlos estaminais analisados em cada flor após a realização do protocolo de exposição do bioensaio Trad-SH à mistura de poluentes provenientes da combustão do álcool, biodiesel, gasolina e do diesel e das inflorescências não expostas aos poluentes (controle).

Controle	Álcool	Biodiesel	Gasolina	Diesel
19,00	19,41	18,37	18,48	38,77
12,94	38,83	18,37	38,77	38,77
22,65	9,70	20,99	29,06	48,44
22,65	9,70	20,99	19,37	29,06
9,70	16,18	20,00	38,77	29,06
19,41	38,83	20,00	38,77	19,37
19,41	19,41	20,00	48,44	38,77
9,70	9,70	11,46	29,06	-
16,18	16,18	8,59	29,06	-
19,41	16,18	14,30	48,44	-
16,66	25,88	11,40	38,77	-
9,70	6,47	8,50	29,06	-
16,66	19,41	14,20	19,37	-
9,70	25,88	11,60	29,06	-
3,23	22,65	14,20	13,80	-
9,70	22,65	8,59	48,44	-
12,94	19,41	8,59	19,37	-
19,41	25,88	8,59	38,77	-
19,00	19,41	14,40	48,44	-
12,94	38,83	22,70	18,48	-
22,65	9,70	17,00	38,77	-
22,65	9,70	14,20	29,06	-
9,70	16,18	11,90	19,37	-
19,41	38,83	7,20	38,77	-
19,41	19,41	10,80	38,77	-
9,70	9,70	10,80	48,44	-
16,18	16,18	10,80	29,06	-
19,41	16,18	14,00	29,06	-
16,66	25,88	11,46	48,44	-
9,70	6,47	11,46	38,77	-
16,66	19,41	10,30	29,06	-
9,70	25,88	10,83	19,37	-
16,66	22,65	10,83	29,06	-
9,70	22,65	14,00	13,80	-
16,66	19,41	10,83	48,44	-
9,70	25,88	-	19,37	-
-	19,41	-	38,77	-
-	38,83	-	48,44	-
-	9,70	-	18,48	-
-	9,70	-	38,77	-
-	16,18	-	29,06	-
-	38,83	-	19,37	-
				-
				-

Tabela D- Números de eventos de mutação por mil pêlos estaminais analisados em cada flor após a realização do protocolo de exposição do bioensaio Trad-SH à mistura de poluentes provenientes da combustão do diesel e do biodiesel e mistura 1/1 (diesel e biodiesel) e das inflorescências não expostas aos poluentes (controle).

Controle	Biodiesel (100)	Biodiesel (50)	Diesel
5,50	18,37	9,70	18,18
11,00	18,37	9,70	18,18
13,00	20,99	16,18	15,58
11,00	20,99	38,83	10,38
11,00	20,00	19,41	25,97
6,00	20,00	9,70	28,57
6,00	20,00	16,18	48,44
19,41	11,46	16,18	19,37
19,41	8,59	25,88	38,77
9,70	14,30	19,41	48,44
16,18	11,40	25,88	18,48
19,41	8,50	22,65	38,77
16,66	14,20	22,65	36,10
9,70	11,60	18,18	22,20
16,66	14,20	18,18	14,80
9,70	8,59	15,58	32,70
3,23	8,59	10,38	14,80
9,70	8,59	25,97	32,30
12,94	14,40	28,57	32,70
19,41	22,70	18,48	32,73
19,00	17,00	38,77	36,00
9,00	14,20	36,10	34,00
9,00	11,90	22,20	31,49
9,00	7,20	14,80	20,00
11,00	10,80	32,70	20,00
5,50	10,80	14,80	31,00
5,50	10,80	32,30	18,00
5,50	14,00	32,70	35,00
11,00	11,46	32,73	35,00
11,00	11,46	-	11,00
5,50	10,30	-	32,30
5,50	-	-	32,70
6,60	-	-	32,73
5,50	-	-	36,00
-	-	-	34,00
-	-	-	31,49
-	-	-	20,00
-	-	-	20,00
-	-	-	31,00
-	-	-	18,00
-	-	-	35,00
-	-	-	35,00
-	-	-	48,44