UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização química e biológica das partículas
respiráveis (PM₁₀) do material particulado atmosférico
coletado em um sítio urbano da cidade de São Paulo**

Bruno Spinosa De Martinis

Tese de doutorado

Profa. Dra. Lilian Rothschild Franco de Carvalho
Orientadora

São Paulo
1997

“Caracterização Química e Biológica das Partículas Respiráveis (PM₁₀) do Material Particulado Atmosférico Coletado em um Sítio Urbano da Cidade de São Paulo”

BRUNO SPINOSA DE MARTINIS

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências - Área: Química Analítica.

Aprovado por:

Profa. Dra. LILIAN ROTHSCILD FRANCO DE CARVALHO
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. SÉRGIO MASSARO
IQ - USP

Prof. Dr. ROLF ROLAND WEBER
IO - USP

Prof. Dr. JAILSON BITTENCOURT DE ANDRADE
UFBa

Profa. Dra. GISELA UMBUZEIRO VALENT
CETESB

SÃO PAULO
03 DE NOVEMBRO DE 1997

*Perhaps within my lifetime, the world will go back
to the future rather than forward to the past.*

Marc Reisner

À Deus por tudo...

À Elaine, minha esposa, pelos infinitos momentos de amor, carinho, paciência e incansável dedicação.

Ao filho que está chegando para alegrar ainda mais nossas vidas.

Aos meus pais pelo apoio e incentivo dedicados durante todos esses anos de estudo.

*À profa. Dra. Lilian, minha orientadora e
amiga, por toda sua amizade,
compreensão e constante orientação.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, Sílvia, Denise, Pérola, Maurício, Jorge, Alessandras, Célia, Wilson e todos os amigos do departamento que, com sua amizade tornaram a realização deste trabalho mais agradável.

Ao CNPq e à CAPES pela concessão das bolsas de doutorado sanduíche e doutorado respectivamente.

À CETESB por todo o apoio técnico e instrumental para a realização deste projeto.

À Dra. Lara A. Gundel do "Lawrence Berkeley National Laboratory - University of California, Berkeley" e ao Dr. Norman Y. Kado do "Environmental Toxicology Department - University of California, Davis" pelo trabalho colaborativo durante as análises químicas e testes de mutagenicidade.

A todos os professores e funcionários do Instituto de Química que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho em especial, ao prof. Dr. Jivaldo e à Dra. Miriam pelas análises termogravimétricas e ao prof. Dr. Sérgio Massaro pelos mapas da cidade de São Paulo.

À acolhedora e incomparável cidade de São Paulo pela concessão do material particulado atmosférico, sem este material o trabalho não seria possível.

RESUMO

A região metropolitana de São Paulo apresenta um intenso e desordenado processo de urbanização e industrialização. Devido a estes processos, a região sofre grandes problemas de poluição atmosférica, agravados em certos meses devido às dificuldades de dispersão dos poluentes. Estes poluentes causam efeitos indesejáveis ao meio ambiente e à saúde humana. A caracterização química e a avaliação da atividade mutagênica desses compostos presentes no material particulado atmosférico (MPA) é um grande desafio analítico e, é de extrema importância para o conhecimento das possíveis correlações entre os poluentes, os efeitos deletérios à saúde e as fontes de emissão.

Os objetivos deste trabalho foram caracterizar quimicamente os extratos orgânicos polares e semi-polares do material particulado atmosférico da cidade de São Paulo e avaliar sua atividade mutagênica.

O MPA é uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em diferentes faixas de concentrações. Devido a esta complexidade, o fracionamento químico do extrato orgânico deste material é necessário para isolar classes de compostos ou compostos individuais, permitindo a identificação e quantificação dos mesmos.

Os resultados obtidos pelas diversas técnicas analíticas empregadas mostraram que os extratos em diclorometano e acetona contêm inúmeros compostos orgânicos pertencentes a diferentes classes, tais como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, quinolinas, cetonas, piridinas, furanos, aldeídos, amidas e aminas, sendo que alguns destes compostos são considerados agentes genotóxicos. O extrato em DCM contém a maior massa e sua composição é quase exclusivamente orgânica. Já o extrato em ACE contém além dos orgânicos, espécies inorgânicas.

Testes de mutagenicidade indicaram que o MPA coletado na cidade de São Paulo apresenta uma atividade mutagênica relativamente alta quando comparada a outros centros urbanos.

ABSTRACT

São Paulo metropolitan area presents an intense and chaotic process of urbanization and industrialization. Due to this processes, this region has big atmospheric pollution problem. In certain months of the year, this problem gets worse due to the unfavorable dispersion conditions. The pollutants cause undesirable effects to the environment and to the human health. The chemical characterization and the mutagenic activity evaluation of the compounds present on the atmospheric particulate matter (APM) represents an analytical challenge and it is very important for understanding of the correlation among pollutants, health hazards and emission sources.

The goal of this work was chemically characterize the polar and moderately polar organic extracts from the APM collected in São Paulo city and to evaluate their mutagenic activity.

The APM is a complex mixture of organic and inorganic compounds present in large range of concentration. Due to this complexity, the chemical fractionation of these organic extracts is necessary to isolate classes or individual compounds, to allow their identification and quantification.

The results obtained using different analytical techniques demonstrated that the dichlorometane and acetone extracts has several organic compounds belonging to different classes, such as, polycyclic aromatic hydrocarbons, quinolines, ketones, pyridines, furanes, aldehydes, amides and amines. Some of these compounds are considered carcinogens and/or mutagens. The dichloromethane extract presented the highest mass yield and its composition is almost exclusively organic. The acetone extract has organic and inorganic species.

Mutagenicity tests revealed that the APM from São Paulo city presented a have relatively high mutagenic activity when compared to other urban regions.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	8
1.1.1 POLUENTES ENCONTRADOS NA ATMOSFERA.....	9
1.1.1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	14
1.2 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO (MPA)	17
1.3 A REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO.....	23
1.4 AMOSTRAGEM DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	25
1.5 TRATAMENTO DE AMOSTRAS COMPLEXAS	27
1.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	31
1.7 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	32
2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	33
3. OBJETIVOS.....	34
4. EXPERIMENTAL	35
4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	35
4.1.1 SÍTIO DE AMOSTRAGEM	35
4.1.2 AMOSTRAGEM	37
4.2 EXTRAÇÃO	40
4.3 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO E EM ACETONA	40
4.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.....	41
4.4.1 PREPARAÇÃO DAS COLUNAS PARA O FRACIONAMENTO	41
4.4.2 FRACIONAMENTO DE UMA MISTURA DE PADRÕES	41
4.4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS.....	42
4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	44
4.5.1 DETERMINAÇÃO DE MASSA NAS FRAÇÕES.....	44
4.5.2 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR DOS EXTRATOS NÃO FRACIONADOS	45
4.5.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS NÃO FRACIONADOS.....	45
4.5.4 DISTRIBUIÇÃO DE CORES NAS FRAÇÕES.....	45

4.5.5 MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	46
4.5.6 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS ...	46
4.5.7 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO	48
4.5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS	49
4.5.8.1 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	50
4.5.9 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EI/MS/MS)	51
4.6 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	52
5.1.1 AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO	52
5.1.1.1 MONITORAMENTO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	53
5.1.1.2 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	55
5.1.1.3 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO.....	57
5.1.1.4 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO.....	60
5.1.1.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	61
5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	65
5.2.1 FRACIONAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE MASSA	65

5.2.2 MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA	69
5.2.3 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	72
5.2.4 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE.	76
5.2.5 IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO	79
5.2.5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	87
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	94
5.4 AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC/MS)	106
6. CONCLUSÕES.....	109
7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	110
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: MECANISMO DE REAÇÃO SIMPLIFICADO PARA A FORMAÇÃO DE NITRO DERIVADOS DOS HPAS.....	11
FIGURA 2: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS CONSIDERADOS PRIORITÁRIOS PELA AGÊNCIA DE PROTEÇÃO AMERICANA (EPA).....	16
FIGURA 3: DIAGRAMA DA DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E SUA CLASSIFICAÇÃO COM RELAÇÃO À SUA PRESENÇA NO HOMEM.	19
FIGURA 4: ESTAÇÃO DE AMOSTRAGEM DA CETESB E AMOSTRADOR “HI-VOL” PARA COLETA DE MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO COM ENTRADA SELETIVA PARA PARTÍCULAS (PM ₁₀).26	
FIGURA 5: PROCEDIMENTO ESQUEMÁTICO TÍPICO PARA A ANÁLISE DE COMPOSTOS ORGÂNICOS NO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.	28
FIGURA 6: REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO.	36
FIGURA 7: REGIÃO DO BAIRRO DE CERQUEIRA CÉSAR.....	37
FIGURA 8: DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DA APARELHAGEM UTILIZADA PARA O FRACIONAMENTO ...	43
FIGURA 9: PERFIS CROMATOGRÁFICOS DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	54
FIGURA 10: RESULTADO DA ANÁLISE ELEMENTAR (C, H E N) DOS EXTRATOS NÃO FRACIONADOS EM A) DCM E B) ACE.	59
FIGURA 11: CURVAS TG/DTG DO EXTRATO EM DCM NÃO FRACIONADO OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR COMPRIMIDO E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C/MIN (M = 5,800 MG).....	62
FIGURA 12: CURVAS TG/DTG DO EXTRATO EM ACE NÃO FRACIONADO OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR COMPRIMIDO E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C/MIN (M = 2,137 MG).....	63
FIGURA 13: SOBREPOSIÇÃO DAS CURVAS TG DOS EXTRATOS EM DCM E EM ACE NÃO FRACIONADOS OBTIDAS SOB ATMOSFERA DINÂMICA DE AR COMPRIMIDO E RAZÃO DE AQUECIMENTO DE 10°C/MIN.....	63
FIGURA 14: ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES DO EXTRATO EM DCM DURANTE O PROCESSO DE FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.	66

FIGURA 15: DISTRIBUIÇÃO DE MASSAS E INTENSIDADES DE CORES NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM A) DCM E EM B) ACE.....	68
FIGURA 16: RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS DO FRACIONAMENTO DE UMA MISTURA DE PADRÕES.....	70
FIGURA 17: PERFIS CROMATOGRÁFICOS DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E EM ACE. ..	71
FIGURA 18: CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC/MS DA FRAÇÃO E DO EXTRATO EM DCM.....	82
FIGURA 19: CROMATOGRAMA OBTIDO POR GC/MS DA FRAÇÃO E DO EXTRATO EM ACE.	83
FIGURA 20: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PRESENTES NA FRAÇÃO B DO EXTRATO EM DICLOROMETANO	87
FIGURA 21: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PRESENTES NA FRAÇÃO C DO EXTRATO EM DICLOROMETANO	88
FIGURA 22: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS PRESENTES NA FRAÇÃO D DO EXTRATO EM DICLOROMETANO	89
FIGURA 23: ATIVIDADE MUTAGÊNICA ESPECÍFICA BASEADA NAS MASSAS DAS FRAÇÕES PARA O EXTRATO EM DCM COM E SEM ADIÇÃO DE S9.	96
FIGURA 24: ATIVIDADE MUTAGÊNICA ESPECÍFICA BASEADA NAS MASSAS DAS FRAÇÕES PARA O EXTRATO EM ACE COM E SEM ADIÇÃO DE S9.....	97
FIGURA 25: DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA TOTAL PARA AS FRAÇÕES DO EXTRATO EM DCM COM E SEM ADIÇÃO DE S9.	99
FIGURA 26: DISTRIBUIÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA TOTAL PARA AS FRAÇÕES DO EXTRATO EM ACE COM E SEM ADIÇÃO DE S9.	100
FIGURA 27: COMPARAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS EM DCM E ACE NÃO FRACIONADOS E A SOMA DAS ATIVIDADES MUTAGÊNICAS DAS FRAÇÕES INDIVIDUAIS.	104
FIGURA 28: ESPECTRO DE MASSAS (ELECTROSPRAY/MS/MS) DA FRAÇÃO E DO EXTRATO EM DCM.	107
FIGURA 29: ESPECTRO DE MASSAS (ELECTROSPRAY/MS/MS) DA FRAÇÃO E DO EXTRATO EM ACE.	108

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: DADOS RELATIVOS A AMOSTRAGEM DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	39
TABELA 2: CONCENTRAÇÃO DE CADA PADRÃO NA MISTURA.....	42
TABELA 3: SOLVENTES E VOLUMES UTILIZADOS PARA A ELUIÇÃO DAS FRAÇÕES.....	43
TABELA 4: CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO PARA CADA PAR DE FILTRO EXTRAÍDO.	44
TABELA 5: ÍONS MONITORADOS DURANTE A ANÁLISE DOS HPAs POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO MODO SIM.....	50
TABELA 6: PORCENTAGEM EM MASSA DOS ÂNIONS INORGÂNICOS PRESENTES NOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO E EM ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	56
TABELA 7: PORCENTAGEM EM MASSA DOS ÂNIONS ORGÂNICOS PRESENTES NOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO E EM ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO DETERMINADOS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	57
TABELA 8: VALORES DE ABSORBÂNCIA/MASSA CORRESPONDENTES AOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO.....	61
TABELA 9: DETERMINAÇÃO DA MASSA DOS ÂNIONS E CÁTIONS INORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS (%).	72
TABELA 10: PORCENTAGEM EM MASSA DOS ÂNIONS E CÁTIONS INORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	73
TABELA 11: PORCENTAGEM EM MASSA DOS ÂNIONS ORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.....	74
TABELA 12: DETERMINAÇÃO DA MASSA DOS ÂNIONS ORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO DE ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS (%).	75

TABELA 13: VALORES DE ABSORBÂNCIA/MASSA CORRESPONDENTE AOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO ORGÂNICO EM DICLOROMETANO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO.....	77
TABELA 14: VALORES DE ABSORBÂNCIA/MASSA CORRESPONDENTE AOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO ORGÂNICO EM ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO.....	78
TABELA 15: IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO EXTRATO EM DICLOROMETANO DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	84
TABELA 16: IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO EXTRATO EM ACETONA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	85
TABELA 17: CLASSES DE COMPOSTOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE.	86
TABELA 18: RELAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO ENTRE OS HPAs E SUAS RESPECTIVAS FONTES DE EMISSÃO EM DIFERENTES SÍTIOS DE AMOSTRAGENS.....	93
TABELA 19: ATIVIDADE MUTAGÊNICA BASEADA NO VOLUME DE AR AMOSTRADO.	103

1. INTRODUÇÃO

Nesta introdução, serão apresentados alguns conceitos básicos importantes para o entendimento do trabalho realizado. Inicialmente serão discutidos brevemente a poluição do ar e suas possíveis fontes de emissão, os principais poluentes presentes na atmosfera, os problemas de poluição enfrentados pela região metropolitana da cidade de São Paulo e finalmente, os procedimentos analíticos empregados para a caracterização físico-química e determinação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico provenientes de regiões urbanas.

1.1 POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

Poluição do ar pode ser definida como qualquer condição atmosférica na qual as substâncias presentes estão em concentrações acima do seu nível normal no ambiente, causando um efeito prejudicial ao homem, aos animais e vegetais e, aos materiais. Estes poluentes podem existir na atmosfera como gases, líquidos, ou partículas sólidas e são emitidos para o ar diretamente pelas fontes ou são formados “in-situ” através de reações químicas na atmosfera (Seinfeld, 1975).

A dinâmica dos poluentes no meio ambiente pode ser descrita de uma forma simplificada como um sistema constituído de três componentes básicos:

Os poluentes na atmosfera podem afetar uma variedade muito grande de receptores, como por exemplo seres humanos, animais, plantas, ecossistemas aquáticos e outros. Adicionalmente, esses poluentes afetam propriedades atmosféricas como redução da visibilidade, alteração na taxa de formação de neblina e da precipitação, alterações na radiação solar e na distribuição de temperatura e ventos.

1.1.1 POLUENTES ENCONTRADOS NA ATMOSFERA

Os poluentes encontrados na atmosfera fazem parte de uma mistura complexa contendo milhares de compostos distribuídos em diversas classes orgânicas. Além disso, estes poluentes podem estar na fase gasosa, particulada ou em ambas as fases. Apenas um pequeno número destes compostos são responsáveis pelo efeitos prejudiciais à saúde humana (Sioutas *et al.*, 1995).

Grande parte dos estudos sobre poluentes presentes na atmosfera está voltada para a análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) porém, sabe-se que os compostos mais polares do que os HPAs são os principais responsáveis pelos efeitos de genotoxicidade. Os nitro-HPAs, dinitro-HPAs e hidroxinitro-HPAs são responsáveis por aproximadamente 50% da atividade mutagênica direta (Tancell *et al.*, 1995; Peltonen *et al.*, 1995, Tokiwa *et al.*, 1994). Alguns estudos de laboratório mostraram que o funcionamento de motores em atmosfera controlada sem nitrogênio permite emitir partículas que contém compostos com baixa atividade mutagênica direta, devido a diminuição na formação de nitro compostos (Falcon *et al.*, 1996).

Entre as classes de compostos inorgânicos e orgânicos moderadamente polares identificados em extratos de diclorometano do material particulado atmosférico estão os aldeídos, cetonas, quinonas, nitro-HPAs, hidroxinitro-HPAs, fenóis, anidridos e ácidos carboxílicos (Schuetzle *et al.*, 1990). As classes de compostos apresentadas a seguir, tem sido encontrados no material particulado atmosférico, o que indica a complexidade da amostra em estudo.

Aldeídos - Formaldeído, acetaldeído e acroleína presentes na atmosfera na fase gasosa são os principais aldeídos de interesse com respeito aos efeitos à saúde. Estes aldeídos são eletrófilos reativos que formam adutos com DNA e proteínas. Alguns outros aldeídos tem sido encontrados nas emissões diretas de veículos e na atmosfera porém, seus efeitos tóxicos ainda não foram bem estudados. Alguns compostos encontrados no “smog” fotoquímico como o formaldeído e a acroleína são considerados agentes irritantes prejudiciais à saúde (Schuetzle *et al.*, 1990).

Alcenos e alcadienos - Alcenos e alcadienos são produzidos em processos de combustão incompletos e naturalmente, por microorganismos, plantas e animais. Os

alcenos e alcadienos de interesse toxicológico estão na fase gasosa e são compostos de cadeias pequenas de carbono C₂-C₄. O eteno é metabolizado para óxido de etileno no organismo humano se transformando em agente mutagênico e carcinogênico.

Em testes realizados em bactérias (*Salmonella*), o 1,3-butadieno se mostrou mutagênico por se transformar em um epóxido após ativação metabólica. Em testes realizados com ratos de laboratório, o 1,3-butadieno se mostrou carcinogênico (Schuetzle *et al.*, 1990).

Nitroalcanos - Os nitroalcanos são formados no ar, via reações químicas. Estes compostos são razoavelmente estáveis na atmosfera e portanto, são considerados produtos finais da reação entre NO_x e hidrocarboneto. A toxicidade desta classe de compostos ainda não é conhecida (Schuetzle *et al.*, 1990).

Epóxidos - Os epóxidos são potentes agentes mutagênicos diretos e carcinogênicos. Estudos indicaram que baixos níveis de benzo[a]pireno colocados em presença de ozônio podem formar óxido de 4,5-Benzo[a]pireno, um agente carcinogênico potente. Entretanto, tais epóxidos ainda não foram identificados na atmosfera devido sua alta reatividade (Schuetzle *et al.*, 1990).

Muitos compostos orgânicos halogenados são tóxicos ou genotóxicos. A maioria destes compostos identificados na atmosfera resultam de emissões de fontes estacionárias. Dicloroetano, clorofórmio e tetracloreto de carbono são os mais comuns encontrados na fase gasosa. Dioxinas, pesticidas halogenados e PCBs tem sido identificados na fase particulada. As dioxinas são formadas basicamente da combustão de compostos orgânicos clorados (Schuetzle *et al.*, 1990).

Nitroarenos - Os nitroarenos são formados da queima de combustíveis e outros materiais orgânicos. Muitos destes compostos são altamente mutagênicos e carcinogênicos. Os principais nitroarenos formados na atmosfera são 2-nitronaftaleno e 4-nitrobifenila. Estes compostos podem se biotransformar no corpo humano em 2-aminonaftaleno e 4-aminobifenila e ligar ao DNA e às proteínas (Schuetzle *et al.*, 1990).

Os nitro derivados dos HPAs podem ser formados a partir dos HPAs através de reações entre radicais, por reações de nitração ou podem estar presentes nas emissões primárias. Um nitro-HPA característico em emissões primárias é o 1-nitropireno (Ciccioli

et al., 1995). A Figura 1 mostra o mecanismo de reação simplificado para a formação de nitro derivados dos HPAS.

X representa os radicais OH ou NO₃

Figura 1: Mecanismo de reação simplificado para a formação de nitro derivados dos HPAS.

Em geral, a concentração dos nitro derivados dos HPAs na atmosfera estão em uma ordem de magnitude menor do que seu correspondente HPA (Pyysalo *et al.*, 1987).

Nitrobenzenos e derivados - Nitrobenzenos e seus derivados são produzidos na atmosfera pela transformação de alquilbenzenos e alquilfenóis. Os nitrofenóis podem afetar as células do metabolismo humano mesmo em baixas concentrações (Schuetzle *et al.*, 1990).

Nitrosaminas - Nitrosaminas, incluindo dimetilnitrosamina e dietilnitrosamina são considerados agentes carcinogênicos potentes em animais (Schuetzle *et al.*, 1990).

Peróxidos e hidroxiperóxidos - Estes compostos são também considerados agentes genotóxicos. O peróxido de benzoíla mostrou ser um promotor de tumores em ratos de laboratório. Estes compostos são formados através de reações na atmosfera. Os únicos peróxidos determinados até o momento foram o nitrato de peroxiacetila (PAN), o nitrato de propionila (PPN) e o peróxido de hidrogênio (Schuetzle *et al.*, 1990).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) - Os HPAs são formados pela combustão de material orgânico à altas temperaturas e são considerados importantes agentes mutagênicos e carcinogênicos. Devido à sua importância à saúde humana e ao meio ambiente, esta classe de compostos foi estudada com detalhes neste trabalho como pode ser visto posteriormente (item 1.1.1.1.).

Radicais livres - Os radicais livres orgânicos estão presentes em partículas geradas por fontes de combustão. Estes radicais são suspeitos de causarem efeitos nocivos à saúde, especialmente problemas pulmonares como enfisemas e tumores. Estes radicais livres, como por exemplo o radical hidroxila, reagem com o DNA, causando danos irreparáveis (Schuetzle *et al.*, 1990).

Oxidantes fotoquímicos - Oxidantes fotoquímicos são poluentes secundários formados na atmosfera pelas reações envolvendo hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio quando ativados pela luz solar. Estes poluentes formam o chamado “smog” fotoquímico, responsável pela redução da visibilidade na atmosfera. Os efeitos prejudiciais mais comumente encontrados pelos dos agentes fotoquímicos à saúde humana são a redução da capacidade respiratória dos pulmões, a diminuição da resistência às infecções, aumento dos índices de tosse, asma, e irritações no trato respiratório e nos olhos (Seinfeld, 1975).

Alguns agentes oxidantes ou precursores desses agentes estão presentes em atmosferas urbanas em altas concentrações trazendo problemas à saúde humana.

O principal oxidante fotoquímico é o ozônio. O ozônio tem origem natural nas camadas superiores da atmosfera, onde exerce importante função absorvendo as radiações ultravioleta do sol, reduzindo sua incidência direta na Terra. Por outro lado,

nas camadas mais baixas da atmosfera, exerce ação nociva sobre os vegetais, animais, materiais e sobre o homem mesmo em concentrações baixas. Em geral, níveis de concentração de ozônio próximos a 1 ppm produz um estreitamento das vias respiratórias nos pulmões, dificultando o processo de respiração. A exposição à baixos níveis de ozônio aceleram o envelhecimento dos tecidos dos pulmões por processos de oxidação. Nas plantas, os agentes fotoquímicos atuam como inibidores da fotossíntese produzindo lesões nas folhas (Seinfeld, 1975).

Monóxido de carbono (CO) - O CO é emitido na atmosfera por veículos automotores. É considerado um dos compostos mais tóxicos presente na atmosfera. Devido à sua afinidade pela hemoglobina do sangue, ele tende a combinar-se com esta, ocupando o espaço que era destinado ao oxigênio, podendo causar morte por asfixia. Em baixas concentrações pode ocasionar a diminuição da velocidade dos reflexos e a redução da sensibilidade visual durante à noite (Seinfeld, 1975).

Óxidos de enxofre - O dióxido de enxofre (SO_2) é altamente solúvel e é facilmente absorvido pelo corpo humano, causando problemas nas vias respiratórias como o aumento de secreção e inflamações das mucosas, redução do movimento ciliar responsável pela remoção do muco e partículas estranhas e, aumento da incidência de rinite, faringite e bronquite. Sua presença está associada às altas concentrações de material particulado (Seinfeld, 1975).

Óxidos de nitrogênio - Os óxidos de nitrogênio são os precursores dos agentes fotoquímicos. Não há estudos que comprovem que o NO é prejudicial à saúde nos níveis encontrados na atmosfera urbana. Porém, em dias de intensa radiação solar, o NO é oxidado a NO_2 que por sua vez é transformado nos pulmões a nitrosaminas, algumas delas consideradas carcinogênicas. Além disso, o NO_2 pode ser transferido para o sangue trazendo prejuízos à saúde. NO_2 é também considerado irritante dos alvéolos dos pulmões, provocando enfisemas (Seinfeld, 1975).

Íons orgânicos e inorgânicos - Alguns íons orgânicos e inorgânicos são de grande importância ambiental pois participam de reações químicas na atmosfera dando origem a produtos que são, muitas vezes, indesejáveis e nocivos à saúde provocando irritações na pele, no sistema respiratório e nos olhos (Seinfeld, 1975).

Os íons inorgânicos mais comumente encontrados são, NO_3^- , NO_2^- , Cl^- , SO_4^{2-} , NH_4^+ , K^+ , Na^+ e os orgânicos são acetato, formiato, oxalato e glicolato. Em geral, estes íons são emitidos para a atmosfera devido à combustão de matéria orgânica como madeiras, plantas, carvão, tabaco, combustíveis (em especial o álcool anidro) e, através do aerossol marinho (Allen *et al.* 1995).

Alguns ânions orgânicos como formiato e acetato estão largamente distribuídos na atmosfera de grandes centros urbanos e podem ser responsáveis por irritações na pele, no sistema respiratório e nos olhos, assim como causar corrosão aos materiais metálicos expostos ao ar atmosférico. As fontes de emissão destes ânions ainda não estão bem definidas. Esses ânions podem ser formados por reações fotoquímicas através da fragmentação de hidrocarbonetos. Em especial, a foto-oxidação do isopreno, emitido por vegetais, parece ser uma fonte de emissão importante de ácido fórmico. Estudos mostram que a reação em fase gasosa do ozônio com olefinas na atmosfera é um processo de formação significativo de ácidos orgânicos. Estes compostos podem ser também produzidos pela reação de aldeídos e HO_2 (Pacyna, 1995).

1.1.1.1 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

A população humana e o meio ambiente estão constantemente expostos à uma quantidade muito grande de substâncias químicas presentes no ar, na água e nos alimentos. Dentre estes inúmeros compostos, substancial ênfase tem sido dada à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (Eskinja *et al.*, 1996; Nielsen *et al.*, 1983; Kelly *et al.*, 1993; Khesina, 1994; Kang *et al.*, 1993).

Os HPAs são formados pela combustão incompleta de processos biogênicos e antropogênicos à altas temperaturas e estão distribuídos amplamente no meio ambiente. Dentre as atividades antropogênicas estão os veículos leves e pesados, as indústrias, os sistemas de aquecimento doméstico, incineração de lixo, fumaça de cigarro e

algumas fontes naturais como queima de florestas e erupções vulcânicas (Kelly *et al.*, 1993).

Em geral, todos os compostos orgânicos contendo carbono e hidrogênio podem servir como precursores dos HPAs. Porém, os HPAs são formados mais facilmente quando compostos orgânicos contendo estruturas cíclicas são queimados (Lee *et al.*, 1981).

O interesse nos HPAs começou no século XVIII quando em 1775 Pott sugeriu uma correlação entre a incidência de câncer em limpadores de chaminés e os HPAs presentes na fuligem a qual eles eram expostos (Lee, 1995). Na última década, estudos demonstraram que os HPAs tem uma contribuição significativa na atividade mutagênica encontrada no material particulado atmosférico (Atkinson *et al.*, 1994). Os HPAs são considerados agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos em animais de laboratório. Estudos realizados em áreas urbanas mostraram que a poluição atmosférica pode ser responsável pelos altos índices na taxa de mortalidade por câncer nos pulmões (Adonis *et al.*, 1993).

As estruturas de 16 HPAs, considerados os mais importantes no ambiente pela agência de proteção ambiental americana (EPA), estão mostradas na Figura 2. 1) Naftaleno, 2) Antraceno, 3) Fenantreno, 4) Criseno, 5) Benzo[a]antraceno, 6) Pireno, 7) Dibenzo[ah]antraceno, 8) Benzo[a]pireno, 9) Acenaftileno, 10) Acenafteno, 11) Fluoreno, 12) Fluoranteno, 13) Benzo[k]fluoranteno, 14) Benzo[b]fluoranteno, 15) Benzo[ghi]perileno, 16) indeno[1,2,3-cd]pireno. Alguns HPAs tais como, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[k]fluoranteno, benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno tem sido classificados como possíveis agentes carcinogênicos (Kelly *et al.*, 1993; Peltonen *et al.*, 1995).

Figura 2: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela agência de proteção americana (EPA).

A maioria dos HPAs estão presentes nas partículas de tamanho respirável, tipicamente $0,5 \mu\text{m}$ ou menores. Partículas maiores que $10 \mu\text{m}$ contribuem significativamente com a massa do material particulado mas não são enriquecidos com os HPAs (Lee *et al.*, 1995).

Veículos movidos a gasolina e a diesel contribuem de forma apreciável para o aumento na quantidade das partículas respiráveis do material particulado em áreas urbanas (Eskinja *et al.*, 1996). Os HPAs podem ser transportados por longas distâncias e conseqüentemente podem se depositar longe das suas fontes de emissão (Valerio *et al.*, 1991).

Muitos dos HPAs são potencialmente reativos em condições ambientais na presença de luz ultra-violeta, óxidos de nitrogênio, ozônio e radicais hidroxilas. O

aspecto mais importante da reatividade dos HPAs é a formação de derivados que são, na maioria das vezes, compostos mutagênicos. Portanto, embora o pireno não apresente carcinogenicidade e nem mutagenicidade, o 1-nitropireno, que também é encontrado no ambiente, é um composto carcinogênico e um mutagênico direto (Schuetzle, 1983).

1.2 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO (MPA)

O material particulado atmosférico ou aerossol atmosférico, o material que fica em suspensão na atmosfera, é um dos mais importantes parâmetros relacionados com os estudos da poluição do ar, devido ao seu impacto nocivo à saúde humana e ao meio ambiente.

Embora estudos globais mostrem que a produção de partículas na atmosfera seja dominada por fontes naturais, sob condições urbanas, o aerossol atmosférico pode ser totalmente dominado por atividades humanas (Pacyna *et al.*, 1995).

Muitos estudos mostram que os compostos orgânicos presentes no material particulado atmosférico são os principais responsáveis pelos danos causados ao meio ambiente e à saúde humana (Schauer *et al.*, 1996; Adonis *et al.*, 1993).

O material particulado pode ser diferenciado não só pela sua composição química mas também com respeito ao tamanho das partículas que o compõem. Estas propriedades são importantes na determinação dos efeitos na atmosfera e na saúde humana. Por exemplo, os efeitos na saúde humana relacionados com as partículas inaláveis dependem da região do trato respiratório onde ocorrem as deposições e da composição química da partícula. Partículas menores penetram mais profundamente no trato respiratório, podendo até atingir os alvéolos dos pulmões. Partículas contendo compostos orgânicos apolares apresentam um caráter lipossolúvel e são facilmente absorvidos pelos tecidos do trato respiratório (Daisey *et al.*, 1987).

Outros efeitos nos quais o tamanho das partículas e sua composição química também estão relacionados, são o fenômeno de espalhamento de luz e redução da visibilidade no ambiente (Seinfeld, 1975).

As fontes de material particulado podem ser classificadas como primárias e secundárias. Aerossóis primários são aqueles emitidos na forma de partículas diretamente da fonte de emissão, tais como poeiras trazidas pelos ventos ou partículas de fumaça emitidas por chaminés. Aerossóis secundários referem-se às partículas produzidas na atmosfera por reações químicas na fase gasosa, gerando espécies capazes de se condensarem formando partículas. Mecanismos secundários são responsáveis pela formação em maiores quantidades de material particulado, quando comparado com as fontes primárias. Entretanto, fontes primárias geram partículas de todos os tamanhos enquanto que, as fontes secundárias geram principalmente partículas de diâmetros menores.

Processos de condensação e transformações químicas ocorrem durante a formação e transporte dos aerossóis dentro das massas de ar. Foi encontrado que os aerossóis com tamanho de partícula na faixa de 0,01 μm até 1,0 μm de diâmetro crescem principalmente pela conversão gás/partícula, que é o processo pelo qual moléculas se difundem para a superfície de uma partícula e conseqüentemente são incorporadas (Seinfeld, 1975).

O tamanho das partículas é um dos mais importantes parâmetros que afetam o transporte dos aerossóis, sua deposição e migração através do meio ambiente, e conseqüentemente, seus efeitos no ambiente e na saúde humana. Portanto, o tamanho das partículas é o principal determinante do comportamento de um aerossol e é usualmente apresentado em termos de diâmetro aerodinâmico.

Ainda, em termos de tamanho de partícula é possível classificar o material particulado como material particulado em suspensão, partículas totais em suspensão e partículas iguais ou menores que 10 μm de diâmetro aerodinâmico (PM_{10}). Nesta classificação estão incluídas as partículas inaláveis e respiráveis, que são as partículas que penetram na região do aparelho respiratório. Um diagrama da distribuição do tamanho de partícula e sua classificação pode ser visto na Figura 3.

Figura 3: Diagrama da distribuição do tamanho de partícula e sua classificação com relação à sua presença no homem.

A quantidade de aerossol transportado dentro das massas de ar dependem do tamanho e da composição química das partículas geradas por várias atividades antropogênicas e fontes de emissão naturais. Esta quantidade pode ser também modificada no ambiente pelas condições meteorológicas.

O material particulado em áreas urbanas é resultado não apenas das emissões direta de partículas (aerossol primário) mas também das reações que ocorrem na fase gasosa seguida pela condensação dos produtos.

A fração orgânica do material particulado geralmente é constituída de carbono elementar e carbono orgânico. O carbono elementar, também chamado de carbono grafítico, tem sua estrutura química similar ao grafite impuro e, é emitido diretamente na atmosfera predominantemente durante combustões. O carbono orgânico pode ser também emitido diretamente (carbono orgânico primário) ou pode ser formado *in-situ* pela condensação dos produtos de baixa volatilidade durante a foto-oxidação de hidrocarbonetos (carbono orgânico secundário).

A fração orgânica do aerossol atmosférico contém centenas ou milhares de compostos químicos, de origem biogênica, tais como n-alcanos de cadeias longas, álcoois e ácidos graxos, sais de ácidos graxos de origem marinha e, compostos orgânicos de origem antropogênica, muitos dos quais são de grande interesse devido às suas propriedades tóxicas, mutagênicas e carcinogênicas. Dentre estes compostos inclui-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados, pesticidas clorados, bifenilas policloradas (PCBs), dioxinas policloradas (PCDDs) e dibenzofuranos (PCDFs).

A maioria dos compostos orgânicos de interesse ambiental contidos no MPA são compostos semi-voláteis, que estão principalmente associados com o material particulado em suspensão, mas também existem na atmosfera como vapores. A partição gás/partícula é governada pela pressão de vapor dos compostos e pela temperatura ambiente. Esta partição tem uma importante influência na remoção dos compostos da atmosfera por chuvas e pela deposição a seco.

As partículas na troposfera são, de modo geral, caracterizadas pela suas fontes de emissão. O aerossol natural continental é constituído de poeiras resuspensas pelo vento, com partículas de tamanho de aproximadamente $0,5\ \mu\text{m}$ de diâmetro. Este aerossol é resultado das reações fotoquímicas entre ozônio e os hidrocarbonetos emitidos por vegetais e, outras reações fotoquímicas envolvendo gases como, SO_2 , H_2S , NH_3 e O_3 ; e partículas provenientes de erupções vulcânicas. O aerossol natural marinho, resultado da evaporação do "spray" do mar, é formado essencialmente por sal (NaCl) com tamanho de partícula de $D > 0,5\ \mu\text{m}$. Finalmente, aerossóis de origem antropogênica são constituídos de partículas sólidas formadas nos processos de combustão (partículas na faixa de tamanho de $D < 0,5\ \mu\text{m}$) as quais resultam das reações fotoquímicas envolvendo combustão incompleta de hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio (Seinfeld, 1975).

As principais fontes de emissão naturais do aerossol atmosférico são:

- Solo (poeiras) e superfície do oceano (sais marinhos)
- Produtos de reações químicas na fase gasosa que ocorrem na atmosfera, com os gases precursores originados da combustão ou da atividade biológica (conversão de gases para partículas).
- Erupções vulcânicas, as quais injetam gases de enxofre na atmosfera, com a subsequente formação de ácido sulfúrico.
- Fuligem de queimadas naturais
- Vapor de água na atmosfera

As fontes antropogênicas de emissões primárias e secundárias de aerossóis são inúmeras. Em geral, emissões antropogênicas contribuem com aproximadamente 60% do aerossol total emitido na atmosfera (Seinfeld, 1975).

Existem dois grupos principais de fontes de emissões antropogênicas primárias: fontes estacionárias e móveis.

Um grande número de processos mecânicos, como moagem, trituração e nebulização geram partículas com diâmetros maiores que alguns micrômetros. Por outro lado, vários processos realizados a altas temperaturas, tais como combustão de carvão e óleo para a geração de energia, operações industriais e incineração de lixo emitem grande quantidade de partículas finas na atmosfera.

As partículas são também emitidas durante os processos de combustão de gasolina, álcool e óleo diesel e, este último é o principal responsável pela emissão de fumaça preta (CETESB, 1994). Tais partículas são compostas em grande parte, por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos com alto peso molecular e seu tamanho varia de 0,2 a 0,3 μm de diâmetro. Muitos parâmetros, tais como, composição do combustível, tipo e manutenção dos motores e condições de uso dos veículos podem influenciar nas características físicas das partículas emitidas (Daisey *et al.*, 1987).

A concentração de partículas menores associadas ao material particulado ($D < 0,1 \mu\text{m}$) diminui com o aumento da altitude, indicando que este material tem origem

terrestre. Portanto, a concentração das partículas na faixa de 0,1 até 1 μm atingem a altitude máxima de aproximadamente 18 quilômetros. Estas partículas, basicamente sulfatos e nitratos, são formadas na estratosfera pela oxidação de gases SO_2 . Estudos indicam que os gases SO_2 , a esta altitude, são emitidos por erupções vulcânicas. Apesar destas altas altitudes, o aerossol estratosférico é apenas uma pequena fração da massa total do aerossol na atmosfera. O aerossol da troposfera (situado entre 3 a 10 Km) e o aerossol continental (incluindo o marinho) participam com aproximadamente 25% e 70% da massa, respectivamente (Seinfeld, 1975).

Em uma típica atmosfera urbana, a maioria das partículas, são menores do que 0,1 μm de diâmetro. A distribuição de massa das partículas (ou volume) considerando diferentes faixas de tamanho exibe dois pontos de máximos, um entre 0,1 e 1 μm de diâmetro e outro entre 1 e 30 μm . Estes dois máximos são resultados de dois tipos diferentes de processos de formação do aerossol. Praticamente toda a fração envolvendo as partículas menores é resultado da condensação de vapores, enquanto que as partículas maiores são formadas por poeiras, cinzas e pelo aerossol gerado mecanicamente.

A remoção das partículas é, inicialmente, o resultado da lavagem pelas chuvas. Pequenas partículas são capturadas por gotas de água nas nuvens e nas chuvas. Partículas grandes podem também ser removidas pelo mesmo processo. A vida média das partículas na troposfera depende, portanto da quantidade de precipitação em uma determinada área. Normalmente, o tempo de residência na troposfera varia desde alguns dias até muitas semanas. Um estudo determinou que as partículas na estratosfera podem permanecer de seis meses até um ano, dependendo da latitude (o tempo de residência sobre os polos será menor) (Daisey *et al.*, 1987).

1.3 A REGIÃO METROPOLITANA DE SÃO PAULO

A frota veicular da região metropolitana de São Paulo é da ordem de 5,3 milhões de veículos sendo que 28,83% são movidos a álcool, 64,18% movidos a gasolina e 6,98% a diesel. Metade desta frota (aproximadamente 46%) é de veículos com mais de dez anos de idade. Praticamente todos os dias são movidos às ruas entre 2,5 a 2,8 milhões de veículos, esgotando a capacidade viária da cidade de São Paulo. A cidade apresenta uma razão de 2,18 habitantes por veículos, equivalente a de países desenvolvidos como Bélgica e Suécia. O transporte individual vem aumentando sua participação no total de viagens motorizadas, passando de 32% em 1967 para 45% em 1995. Em contrapartida, diminuiu a participação do transporte coletivo passando de 68% em 1976 para 55% em 1995. A estabilização da economia e a manutenção do preço dos combustíveis a níveis relativamente baixos tem estimulado o uso de automóveis, bem como o crescimento contínuo da frota veicular. São vendidos cinco mil veículos novos por dia em todo o País e pelo menos mil são destinados à região metropolitana de São Paulo. A taxa de ocupação média de veículos particulares que circulam na cidade de São Paulo é baixa, cerca de 1,51 ocupantes por veículos tarde (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997).

Desta forma, vem crescendo exageradamente os congestionamentos de tráfego. Estimativas da Companhia do Metropolitano de São Paulo mostram que cerca de 6 bilhões de dólares são gastos com congestionamentos em São Paulo, que periodicamente batem recordes de extensão atingindo até 200 Km nos picos da tarde (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997).

Em 1996, a média de congestionamento encontrado na cidade de São Paulo, exceto nos meses de férias escolares, atingiu picos matinais de 85,1 Km de extensão que à tarde chegaram a 123,8 Km. Neste mesmo ano, em dias distintos foram registrados picos máximos recordes de 163,6 Km e 242 Km. Estima-se que na região metropolitana de São Paulo, sejam desperdiçadas milhões de horas por dia nos deslocamentos (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997).

Com esses números, é possível se ter uma dimensão do impacto ambiental dessa frota na cidade. A análise de 14 anos de medições de poluentes pela CETESB indicou que os padrões aceitáveis à saúde humana foram ultrapassados várias vezes.

Para se ter uma idéia das implicações relacionadas ao aumento da frota, dados oficiais do governo americano indicam que os prejuízos ambientais resultantes do trânsito de veículos se situam entre US\$ 50 a US\$ 256 bilhões por ano.

Estudos do Ministério do Trabalho Brasileiro mostraram que, cada dez minutos adicionais gastos no trajeto entre a casa e o trabalho representam uma redução de 4% na produtividade do funcionário.

Outro estudo realizado para 11 distritos de São Paulo, onde vivem cerca de 2 milhões de habitantes, tomando por base o ano de 1989, estimou em US\$ 785 mil os gastos hospitalares associados à poluição, à morbidade em US\$ 351 mil e à mortalidade em mais de US\$ 1 milhão. Ainda em relação aos efeitos à saúde, estudos indicam um aumento do número de internações e doenças, especialmente aquelas relacionadas ao aparelho respiratório, quando há agravamento da poluição atmosférica (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997).

Os poluentes emitidos, principalmente pelos veículos automotores, geram mal-estar, diminuem os reflexos e a acuidade visual provocando desde sintomas leves de dor de cabeça até o agravamento de doenças respiratórias e cardio-vasculares que, em casos extremos, podem resultar em morte, além de serem apontados como prováveis agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos. Os efeitos provocados à saúde pelos poluentes lançados no ar, são mais prejudiciais, na população de baixa renda que apresentam quadros de desnutrição (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997). Em São Paulo, a Secretaria de Estado da Saúde apontou que 2,1% dos enfartos do miocárdio são devidos à poluição do ar.

Estudos no município de São Paulo demonstram haver um aumento de mortalidade em cerca de 13% entre as crianças com menos de 5 anos e idosos com mais de 65 anos, quando ocorrem altas concentrações de partículas respiráveis (PM₁₀). Outro estudo realizado no mesmo município no período de 1981 a 1990, sugere que uma redução do nível médio de poluição por partículas respiráveis na atmosfera até o

patamar de $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$, previsto na legislação, permitiria evitar a morte de 6,7% dos pacientes que hoje morrem por doenças respiratórias. Ou ainda, a redução de 1% na concentração de ozônio resultaria em uma redução de cerca de 0,23% na incidência de mortalidade por doenças do aparelho respiratório (São Paulo, Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 1997).

1.4 AMOSTRAGEM DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Os procedimentos de amostragem para as análises dos compostos orgânicos presentes no material particulado dependem principalmente do tipo de filtro, tempo de amostragem, fluxo de ar, etc.

Uma metodologia comumente empregada para amostragem do MPA inclui filtro de fibra de vidro e amostrador de grande volume - o chamado "Hi-vol" (Figura 4). Entretanto, o uso de amostradores de grande volume para coleta de compostos orgânicos semi-voláteis tem sido muitas vezes criticado devido a possibilidade de evaporação dos compostos mais voláteis. A dificuldade em amostrar quantitativamente compostos orgânicos semi-voláteis, tais como HPAs e outros, é a eventual perda que pode ocorrer por evaporação ou sublimação (Daisey *et al.*, 1995).

Figura 4: Estação de amostragem da CETESB e amostrador “Hi-vol” para coleta de material particulado atmosférico com entrada seletiva para partículas (PM10).

Vários materiais são utilizados para filtro de coleta de MPA tais como, fibra de vidro recoberto com Teflon, quartzo, polícarbamato e ésteres de celulose. Filtros de fibra de vidro recobertos com Teflon tem sido considerados mais apropriados para amostragem com “Hi-vol” devido a baixa reatividade de sua superfície, pequena quantidade de impurezas (baixos valores de brancos) e, pequena afinidade com a umidade do ar. Esta última característica é bastante importante, uma vez que a presença de água pode levar à formação de artefatos de amostragem (Daisey *et al.*, 1986; Appel *et al.*, 1984).

As coletas do material particulado em amostradores de grande volume por um período de 24 horas ou, no mínimo 12 horas, é conveniente, para que quantidades suficientes de MPA possam ser conseguidas, e a concentração dos compostos orgânicos de interesse atinjam valores acima do limite de detecção do procedimento analítico.

1.5 TRATAMENTO DE AMOSTRAS COMPLEXAS

O material particulado atmosférico coletado sobre filtros, contém inúmeros compostos orgânicos e inorgânicos em diferentes níveis de concentração. A forma com que este material está adsorvido nos filtros e a sua complexidade, exigem que os compostos de interesse sejam respectivamente, removidos dos filtros por processos de extração e, em seguida fracionados por metodologias apropriadas. A Figura 5 mostra esquematicamente um típico procedimento para a análise de compostos orgânicos no material particulado atmosférico.

Figura 5: Procedimento esquemático típico para a análise de compostos orgânicos no material particulado atmosférico.

O processo de extração é uma etapa crítica na análise e tem que ser cuidadosamente planejada, uma vez que muitas variáveis precisam ser consideradas.

O objetivo do procedimento de extração é recuperar qualitativa e quantitativamente os poluentes orgânicos coletados. Nesta etapa, os compostos que estão adsorvidos no material particulado atmosférico são extraídos com solventes apropriados, passando para uma fase líquida onde serão concentrados e analisados. A metodologia de extração empregada deve manter a integridade da amostra evitando sua degradação e contaminação, proporcionar a maior porcentagem de recuperação e, ser a mais seletiva possível, extraindo apenas os compostos de interesse e deixando os possíveis interferentes adsorvidos na matriz. Para isso, alguns fatores devem ser levados em consideração tais como, natureza da amostra, técnica de extração, natureza do solvente, razão entre quantidade de material particulado e o volume de solvente, tempo de extração, etc.

Vários procedimentos tem sido citados na literatura para a extração dos compostos orgânicos presentes no MPA porém, a utilização do sistema de Soxhlet utilizando uma variedade de solventes orgânicos tais como acetona, benzeno, tolueno, diclorometano, etc., tem sido a metodologia mais empregada (Eskinja *et al.*, 1996; Niles *et al.*, 1989; Barale *et al.*, 1989; Crebelli *et al.*, 1991).

O longo tempo de extração do sistema Soxhlet (8h a 24h), a possibilidade da decomposição de alguns compostos devido ao aquecimento (35°C a 80°C) e o grande volume de solvente utilizado (100 mL a 1000 mL), fez com que procedimentos alternativos de extração fossem desenvolvidos. Um desses métodos alternativos de extração emprega o uso de ultra-som à temperatura ambiente. Este método combina alta eficiência de extração com simplicidade de operação e economia de tempo (Savard *et al.*, 1992; Hayakawa *et al.*, 1995; Adonis *et al.*, 1993). Porém, alguns trabalhos mostraram que o uso de ultra-som para a extração de compostos, modificam a integridade da amostra, decompondo algumas espécies e formando outras (Carvalho *et al.*, 1995).

Outra técnica de extração, pouco empregada na extração de espécies orgânicas do MPA mas com muitas vantagens, é a extração com fluido supercrítico. Algumas

vantagens desta técnica com relação ao sistema Soxhlet são: menor tempo de extração (5 min a 30 min), pequeno volume de solvente (5 mL a 50 mL), uso de solvente não tóxico (CO₂), baixa temperatura (25°C a 50°C), seletividade, e maior eficiência na transferência de massa, propiciando maior porcentagem de recuperação (Bowadt *et al.*, 1995; Snyder *et al.*, 1992; Barnabas *et al.*, 1994; Paschke *et al.*, 1992; Janda *et al.*, 1993; Camel *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1991). A extração com fluido supercrítico ainda é uma técnica pouco explorada apesar de promissora. A partir de 1980, o número de publicações mostrando a potencialidade da técnica tem aumentado sensivelmente. Entre as principais aplicações estão a extração de aromas e princípios ativos de plantas e na análise de resíduos de pesticidas e compostos orgânicos em matrizes de alimentos, solos e água (Lanças *et al.*, 1990; Van der Velde *et al.*, 1994; Barnabas *et al.*, 1994; Van der Velde *et al.*, 1992).

O fracionamento dos extratos é outra etapa muito importante no tratamento de amostras complexas. O objetivo desta etapa é separar a amostra em frações, diminuindo a quantidade de classes de compostos dentro de cada fração. A metodologia de fracionamento deve assegurar, como na etapa de extração, a integridade da amostra, evitando reações químicas da amostra com os materiais usados no fracionamento, a degradação e a sua contaminação, preservando a atividade biológica das frações e, proporcionando suficiente massa para a caracterização química e determinação da atividade mutagênica com o máximo de recuperação e seletividade.

A cromatografia é o método de fracionamento mais utilizado para o isolamento de compostos ou classes de compostos em amostras complexas. Esses fracionamentos se baseiam na utilização de colunas preparativas com fases estacionárias polares (cromatografia em fase normal) e fases apolares (cromatografia em fase reversa).

Outra técnica empregada para o fracionamento de amostras complexas baseia-se na utilização de cartuchos para extração em fase sólida (SPE). Esta técnica foi introduzida no final dos anos 70 e desde então tem sido utilizada como uma técnica de isolamento e concentração de compostos presentes em diversas matrizes. Além de ser uma técnica rápida, eficiente e de fácil aplicação, a SPE pode ser também considerada uma técnica analítica de “limpeza” de amostra. Na SPE, o extratante é um sólido

particulado poroso com grande área superficial disponível, onde ocorrem as interações com os componentes da amostra (Fritz *et al.*, 1995; Shreedhara *et al.*, 1991; Mayer *et al.*, 1994)

Propostas recentes (Zinbo *et al.*, 1992; Sicherer-Roetman *et al.*, 1988; Ciccioli *et al.*, 1993; Greenberg *et al.*, 1990; Casellas *et al.*, 1995) apresentam metodologias onde se busca o isolamento de classes de compostos para a posterior análise dos compostos individuais porém, a escolha do procedimento de extração e fracionamento depende do analito de interesse presente no material particulado atmosférico.

Um dos grandes problemas relacionados com o tratamentos de amostras complexas, em especial o tratamento de amostras ambientais, é a ocorrência de interações químicas entre os inúmeros compostos presentes na mistura. Estas interações, além de alterarem a identidade química de algumas espécies, podem também alterar a atividade biológica de toda a amostra devido aos efeitos sinérgicos e antagônicos que podem estar operando (Crebelli *et al.*, 1988; Hermann *et al.*, 1981; Chrisp *et al.*, 1980).

Apesar da etapa de fracionamento ser considerada necessária e importante na análise de misturas complexas, uma desvantagem é que durante o procedimento de separação dos componentes da amostra em frações, poderá haver a perda de componentes e consequentemente alterações na atividade biológica da amostra (Pietrini *et al.*, 1995).

1.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

As técnicas analíticas empregada para a identificação e quantificação de espécies químicas em amostras atmosféricas tem avançado muito durante os últimos anos. É sabido que existem milhares de compostos individuais presentes na atmosfera urbana de grandes cidades, provenientes de fontes biogênicas e antropogênicas. Desde o início dos anos 80, procedimentos de fracionamento químico e análises por diferentes técnicas analíticas, tem sido empregados para a caracterização do material particulado atmosférico.

Dentre os métodos de fracionamento, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas. Estes métodos utilizam colunas de separação preparativas contendo fases estacionárias com características apolares, semi-polares e polares e procedimentos para extração em fase sólida (SPE) utilizando diferentes suportes sólidos. Tais fracionamentos se baseiam em mecanismos de separação, adsorção, afinidade, partição, separações ácido/base e outros.

Para as análises dos extratos do material particulado atmosférico, as técnicas empregadas são a espectrometria de massas, a espectrofotometria na região do ultra-violeta/visível e fluorescência, espectroscopia na região do infra-vermelho e, as técnicas cromatográficas (cromatografia a gás e a líquido) que, além de separarem os compostos de forma eficiente, identificam e quantificam, utilizando detectores apropriados e padrões certificados. A grande maioria dos estudos realizados na caracterização química de amostras ambientais empregam os métodos cromatográficos de análise por proporcionarem a separação e análise dos analitos simultaneamente (Sicherer-Roetman *et al.*, 1988; Ciccioli *et al.*, 1993; Casellas *et al.*, 1995; Alsberg *et al.*, 1985; Hayakawa *et al.*, 1995; Niles *et al.*, 1989).

1.7 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Muitos estudos sobre a mutagenicidade do material particulado atmosférico tem sido realizados em diferentes sítios urbanos para a avaliação da exposição aos compostos mutagênicos em grandes cidades (Pyysalo *et al.*, 1987; Bloemen *et al.*, 1988; Miguel *et al.*, 1990; Barale *et al.*, 1991; Matsushita *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1993; Vellosi *et al.*, 1994). Estudos que correlacionam as fontes de emissão e os compostos mutagênicos na atmosfera contribuem significativamente para a identificação das principais fontes responsáveis pela emissão de tais compostos (Cass *et al.*, 1994).

A identificação dos compostos mutagênicos é limitada devido a extrema complexidade do material orgânico presente na atmosfera urbana. Os extratos orgânicos são separados em frações menos complexas para facilitar a identificação dos

compostos mutagênicos (Crebelli *et al.*, 1991). Metodologias de fracionamento químico, seguidas de estudos de mutagenicidade tem sido utilizadas para a identificação de compostos genotóxicos em misturas ambientais complexas (Hughes *et al.*, 1980; Claxton *et al.*, 1983; Moller *et al.*, 1983; Pyysalo *et al.*, 1987; Ball *et al.*, 1992; Chuang *et al.*, 1992; Savard *et al.*, 1992; DeMarini *et al.*, 1996;).

O teste de Ames utilizando *Salmonella typhimurium* (Ames *et al.*, 1975; Maron *et al.*, 1983) tem sido uma importante metodologia para a avaliação de mutagenicidade em poluentes ambientais. Testes biológicos com *Salmonella* linhagem TA98 tem sido utilizados para a caracterização de compostos mutagênicos presentes em extratos orgânicos do material particulado devido à sua alta sensibilidade e especificidade do método (Hughes *et al.*, 1980; Claxton, 1983; Adonis *et al.*, 1993). Outro procedimento, adaptado do teste de Ames (Kado *et al.*, 1983), o qual é aproximadamente 10 vezes mais sensível do que o teste de Ames, quando aplicado em compostos puros, tem sido usado para a caracterização de misturas complexas de extratos orgânicos do material particulado atmosférico.

2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

As atividades industriais do homem tem proporcionado uma nova dimensão à química ambiental. Até o momento, foram sintetizados e catalogados mais de 5 milhões de compostos químicos, sendo que a indústria química produz aproximadamente 150 milhões de toneladas de compostos anualmente. Cidades e áreas metropolitanas com até 15 milhões de habitantes produzem grandes quantidades de lixo confinados em áreas relativamente pequenas. Muitos produtos químicos e o lixo gerado pela sociedade moderna são lançados no meio ambiente durante o processo de produção, estocagem, transporte, uso e descarte. Estes materiais participam dos ciclos naturais e, frequentemente interferem e desequilibram o sistema natural (Seinfeld, 1975).

A região metropolitana de São Paulo e, em especial a região central da cidade, enfrenta graves problemas de poluição atmosférica devido ao crescimento desordenado, ao intenso tráfego de veículos, à localização geográfica que favorece o acúmulo dos

poluentes e ainda em determinados períodos do ano (principalmente no inverno), às condições climáticas adversas que desfavorecem a dispersão da camada de poluentes formada na atmosfera (Andrade *et al.*, 1994; CETESB, 1993). A temperatura é um importante fator associado com os poluentes na atmosfera e seus efeitos ao ser humano, causando modificações significativas na mutagenicidade do material particulado. Em temperaturas mais altas, a volatilização e dispersão dos compostos orgânicos é favorecida. Por outro lado, no inverno, as baixas temperaturas, dificultam esta dispersão, concentrando os poluentes mais próximos ao solo e contribuindo para o aumento da mutagenicidade (Barale *et al.*, 1994).

Alguns estudos foram realizados para a caracterização dos poluentes presentes na atmosfera da região metropolitana de São Paulo (Bohm *et al.*, 1989; Kretzschmar, 1994; Andrade *et al.*, 1994; Sato *et al.*, 1995). Porém, poucos trabalhos relatam a identificação de compostos orgânicos presentes no material particulado na atmosfera de São Paulo e a atividade mutagênica deste material (De Martinis *et al.* 1997; Sato *et al.*, 1995). Gundel *et al.*, (1993) afirmaram que os compostos orgânicos polares presentes no material particulado atmosférico constitui aproximadamente 30-60% da massa do material particulado e 30-50% da mutagenicidade direta ou seja, a mutagenicidade do material que não necessita ser ativado metabolicamente.

A correlação entre a identidade físico-química e o efeito biológico dos compostos químicos dispersos em uma atmosfera urbana poluída ainda não está bem elucidada. Consequentemente, os efeitos prejudiciais à saúde humana causados pelos poluentes atmosféricos são alvo de interesse dos pesquisadores.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é a caracterização química e a determinação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico coletado em um sítio urbano da cidade de São Paulo. Os objetivos específicos são reconhecer classes de compostos químicos e identificar compostos individuais nos extratos orgânicos polares e moderadamente polares provenientes do material particulado atmosférico. Avaliar a

atividade mutagênica dos extratos orgânicos polares e moderadamente polares. Correlacionar a composição química e a atividade mutagênica dos extratos orgânicos.

4. EXPERIMENTAL

Este trabalho foi desenvolvido em três instituições de pesquisa diferentes.

As etapas de amostragens do material particulado, extração e algumas análises químicas como, as análises elementar e termogravimétricas, foram realizadas no Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O fracionamento dos extratos, e as análises por infra-vermelho, cromatografia a líquido, cromatografia de íons foram realizadas no "Lawrence Berkeley National Laboratory - University of California, Berkeley - USA" sob a co-orientação da Dra. Lara A. Gundel. Os testes de mutagenicidade e as análises por cromatografia a gás/espectrometria de massas foram realizadas no "Environmental Toxicology Department - University of California, Davis - USA" sob a co-orientação do Dr. Norman Y. Kado.

4.1 AMOSTRAGEM DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

4.1.1 SÍTIO DE AMOSTRAGEM

A região metropolitana de São Paulo, com extensão de 8.050 km² (Figura 6), está localizada na linha do trópico de Capricórnio à 800 metros acima do nível do mar. É uma região altamente urbanizada com uma população de cerca de 16 milhões de habitantes. Esta região é contornada por uma topografia complexa com unidades topográficas que variam entre 650 a 1200 m de altura, como a serra do Mar e da Cantareira.

Concentrando quase 6 milhões de empregos, constitui a mais importante região econômica do Brasil, gerando cerca de 20% do Produto Interno Bruto Nacional.

Figura 6: Região metropolitana de São Paulo.

A escolha do sítio de amostragem é de fundamental importância para a caracterização do material particulado atmosférico. Nesta escolha deve-se levar em consideração as características topográficas, demográficas, atividades sócio-econômicas, tráfego veicular e condições climáticas para que seja possível correlacionar espécies encontradas com as fontes prováveis de emissão.

As amostras de material particulado atmosférico foram coletadas na região metropolitana da cidade de São Paulo em uma estação de amostragem da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). A estação de amostragem está localizada na região central da cidade de São Paulo no bairro de Cerqueira César e faz parte da rede automática de monitoramento de poluentes do ar.

A região do bairro de Cerqueira César (Figura 7), é contornada por importantes avenidas e corredores de ônibus onde o tráfego de veículos movidos a gasolina, álcool e diesel é intenso e constante.

Figura 7: Região do bairro de Cerqueira César

4.1.2 AMOSTRAGEM

As amostras do material particulado atmosférico foram coletadas por um período de 24 horas utilizando um amostrador de grande volume - "Hi-vol" (Sierra Andersen) (Figura 4), equipado com entrada seletiva para amostragens de partículas com diâmetro aerodinâmico menor que 10 micrômetros - PM_{10} (partículas respiráveis), a uma vazão de $40,0 \text{ m}^3/\text{h}$.

O material foi coletado em filtros de fibra de vidro recobertos com Teflon (Pallflex), previamente tratados empregando sistema de refluxo Soxhlet com 500 mL de diclorometano e, em seguida com 500 mL de acetona, ambos com grau cromatográfico (Merck), por um período de 8 horas em cada solvente. Estudos mostraram que filtros de

fibra de vidro apresentam a tendência de absorver maiores quantidades de ácido nítrico do que os filtros de fibra de vidro recobertos com Teflon (Daisey *et al.*, 1986).

Os filtros devem ser pré-tratados antes do uso para a remoção de impurezas. Procedimentos básicos de pré-tratamento envolvem refluxo ou extração em Soxhlet com solvente orgânico.

Foram coletados 22 filtros durante os meses de fevereiro a maio de 1994 em dias aleatórios.

O volume total de ar amostrado foi de 29.683 m³. Após cada amostragem, os filtros foram envolvidos em papel alumínio e colocados em congelador à -20°C e extraídos no dia seguinte.

A quantidade de massa e a concentração do material coletado em mg por volume de ar de cada filtro amostrado estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Dados relativos a amostragem do material particulado atmosférico.

Filtro	Cronograma de amostragem	Volume de ar amostrado (m³)	Massa de material coletado (mg)	Concentração do material (mg/m³)
1	9/2/94, 9:15	1348,8	153,50	0,113
2	22/2/94, 8:55	1443,8	139,91	0,097
3	25/2/94, 9:12	1333,3	84,05	0,063
4	16/3/94, 9:00	1315,0	16,76	0,012
5	19/3/94, 12:35	1399,8	50,21	0,036
6	20/3/94, 12:40	1372,5	74,67	0,054
7	22/3/94, 9:09	1213,1	69,75	0,057
8	24/3/94, 9:15	1340,3	165,68	0,123
9	5/4/94, 8:30	1323,1	133,35	0,100
10	6/4/94, 9:00	1386,4	54,00	0,038
11	7/4/94, 9:05	1289,3	95,98	0,074
12	11/4/94, 8:30	1386,4	76,87	0,055
13	12/4/94, 8:35	1394,5	50,77	0,036
14	13/4/94, 9:30	1386,4	54,06	0,039
15	16/4/94, 15:00	1224,9	61,03	0,049
16	20/4/94, 9:30	1309,7	86,92	0,066
17	25/4/94, 8:30	1435,3	108,23	0,075
18	26/4/94, 8:40	1401,4	73,74	0,052
19	28/4/94, 9:00	1386,4	87,74	0,063
20	4/5/94, 9:40	1169,0	60,68	0,052
21	5/5/94, 9:40	1355,8	66,88	0,049
22	12/5/94, 8:00	1467,9	87,82	0,059

4.2 EXTRAÇÃO

Os filtros contendo o material coletado foram extraídos aos pares em aparelho de Soxhlet sequencialmente com 500 mL de diclorometano e 500 mL de acetona (grau cromatográfico - Merck) por 8 horas com cada solvente.

Após a extração com cada solvente, o volume dos extratos foi reduzido para 6 mL em evaporador rotatório e os concentrados foram filtrados em membrana de PTFE de 0,2 μ m (Millipore) diretamente em frascos de vidro de 10 mL com tampa revestida com Teflon (Wheaton).

Os frascos foram recobertos com folha de papel alumínio e estocados em congelador.

A massa dos extratos foi determinada de acordo com a metodologia descrita no item 4.5.1.

4.3 COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS EM DICLOROMETANO E EM ACETONA

Os onze frascos contendo os extratos do material particulado atmosférico foram combinados em um mesmo recipiente considerando o solvente utilizado para a extração, diclorometano ou acetona. Desta forma, foi obtido o extrato combinado. Extratos combinados em diclorometano e o extrato combinado em acetona. O volume dos extratos foi ajustado para 40 mL e, a massa total e a concentração dos extratos combinados foram determinados.

4.4 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

4.4.1 PREPARAÇÃO DAS COLUNAS PARA O FRACIONAMENTO

As colunas para extração em fase sólida foram preparadas utilizando-se 15 g de sílica quimicamente ligada a grupos cianopropil com diâmetro de partícula de 40 µm (J.T. Baker), como pode ser visto na Figura 8. Esta fase foi colocada em uma coluna de vidro de aproximadamente 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Na parte inferior da coluna foi colocada uma placa porosa de vidro sinterizado para suportar a fase sólida e uma saída lateral para o vácuo que manteve o fluxo da coluna em torno de 2 mL/min.

A coluna preparada foi limpa com 50 mL de uma sequência de solventes: n-hexano, acetato de etila, diclorometano e metanol.

Após a eluição de todo o metanol, a coluna foi deixada secar.

Antes da utilização da coluna para o fracionamento, 50 mL de n-hexano foram passados pela coluna para a ativação da fase.

4.4.2 FRACIONAMENTO DE UMA MISTURA DE PADRÕES

Para testar o procedimento de fracionamento, uma mistura de padrões de compostos orgânicos de diferentes polaridades com diferentes grupos funcionais, foi submetida ao fracionamento.

Os padrões escolhidos foram: o-nitrobenzaldeído, fenantreno, 2-nitronaftaleno, 6-nitro-3,4-benzocumarina, 1-pirenocarboxaldeído, 5,6-benzoquinolina, 5-nitroquinolina, vanilina.

Os padrões foram dissolvidos em acetonitrila (grau cromatográfico - Merck) e fracionados seguindo o procedimento descrito no item 4.4.3. A Tabela 2 mostra a concentração de cada padrão na mistura.

Tabela 2: Concentração de cada padrão na mistura.

Padrão	Concentração (mg/mL)
2-nitronaftaleno	0,021
fenantreno	0,017
1-pirenocarboxaldeído	0,030
o-nitrobenzaldeído	0,041
5,6-benzoquinolina	0,026
5-nitroquinolina	0,005
6-nitro-3,4-benzocumarina	0,012
vanilina	0,007

4.4.3 FRACIONAMENTO DOS EXTRATOS

O procedimento utilizado para o fracionamento foi baseado na metodologia descrita por Gundel *et al.* (1993), com pequenas modificações.

Uma alíquota da amostra de concentração conhecida foi misturada com a sílica modificada com grupos de cianopropil, aproximadamente 10% da massa adicionada na coluna e, agitada sob exaustão até a evaporação completa do solvente da amostra e homogeneização da fase com o extrato.

Esta mistura foi adicionada no topo de uma coluna de sílica modificada com cianopropil preparada como descrito no item 4.4.1. Antes da aplicação da amostra, a coluna foi umidecida com n-hexano e, mantida com solvente até a eluição da última fração.

O fluxo de eluição foi mantido em 2 mL/min durante todo o processo. As frações foram eluídas da coluna utilizando solventes de polaridade crescente, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Solventes e volumes utilizados para a eluição das frações.

Frações	Eluente	Volume (mL)
A	n-hexano	20,0
B	n-hexano/25%DCM	20,0
C	n-hexano/25%DCM	20,0
D	diclorometano	20,0
E	diclorometano	20,0
F	DCM/2%metanol	15,0
G	DCM/5%metanol	18,0
H	DCM/15%metanol	18,0
I	DCM/40%metanol	20,0
J	metanol	40,0
K	acetona	40,0

Após o fracionamento, os solventes das frações foram evaporados até a secura em evaporador rotatório e as frações foram solubilizadas em um volume conhecido de solvente para a determinação de massa.

Figura 8: Diagrama esquemático da aparelhagem utilizada para o fracionamento

4.5 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

4.5.1 DETERMINAÇÃO DE MASSA NAS FRAÇÕES

A massa dos extratos e das frações foram determinadas seguindo o procedimento descrito por Daisey *et al.* (1993).

Os resíduos foram dissolvidos em 1,0 mL do mesmo solvente utilizado para a extração (diclorometano ou acetona) e, colocados em banho de ultra-som por 20 segundos.

Foi utilizada uma eletrobalança Cahn, onde um pequeno recipiente descartável de alumínio teve sua massa determinada. Esse recipiente foi transferido para uma chapa de aquecimento (30°C) colocada sob exaustão e, 100 µL do extrato foram adicionados no recipiente e o solvente foi evaporado.

O recipiente contendo a amostra foi transferido para a eletrobalança e a massa determinada. As determinações foram feitas em triplicatas.

A Tabela 4 mostra a concentração dos extratos orgânicos do material particulado atmosférico.

Tabela 4: Concentração dos extratos orgânicos do material particulado atmosférico para cada par de filtro extraído.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Extrato	Concentração (mg/mL)
1 DCM	8,27	1 ACE	3,89
2 DCM	4,38	2 ACE	1,99
3 DCM	4,56	3 ACE	1,69
4 DCM	9,12	4 ACE	3,17
5 DCM	3,94	5 ACE	3,90
6 DCM	4,54	6 ACE	2,25
7 DCM	3,99	7 ACE	1,47
8 DCM	7,01	8 ACE	2,33
9 DCM	9,08	9 ACE	3,06
10 DCM	5,99	10 ACE	2,49
11 DCM	7,18	11 ACE	2,46

DCM = Extrato em diclorometano

ACE = Extrato em acetona

4.5.2 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR DOS EXTRATOS NÃO FRACIONADOS

A composição elementar dos extratos em DCM e ACE não fracionados foi determinada considerando os elementos C, H e N. Esta determinação foi realizada por um analisador elementar Perkin Elmer - 2400 CHN.

4.5.3 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS NÃO FRACIONADOS

As análises foram feitas para os extratos em DCM e ACE não fracionados, utilizando um analisador termogravimétrico Shimadzu - TGA 50. As amostras dos extratos foram analisadas sob atmosfera de ar comprimido (50 mL/min) nas seguinte condição:

Temperatura inicial: 22°C

Aquecimento: 10°C/min

Temperatura final: 900°C

4.5.4 DISTRIBUIÇÃO DE CORES NAS FRAÇÕES

Através da coloração das frações dos extratos em DCM e ACE, foi possível estabelecer algumas correlações entre as intensidades de cores das frações e a porcentagem de massa correspondente.

4.5.5 MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

O monitoramento dos compostos eluídos foi feito utilizando um detector espectrofotométrico de absorção na região do UV-Vis, em três comprimentos de onda diferentes: 205, 230 e 254 nm.

As análises das frações da mistura de padrões e das frações dos extratos em diclorometano e em acetona foram realizadas por cromatografia a líquido de alta eficiência nas seguintes condições:

Cromatógrafo líquido de alta eficiência HP 1090 M

Detector: UV-Vis (diode array), λ = 205, 230 e 254 nm

Coluna analítica: Vydac 201 TP 52 C18, 15 cm x 2.1 mm d.i., 5 μ m

Coluna de proteção: Vydac 201 TP 52 C18, 10 μ m

Programação do gradiente:

<u>t(min)</u>	<u>eluente</u>
0	5% acetonitrila/água
3	5% acetonitrila/água
13	100% acetonitrila
18	100% acetonitrila
25	5% acetonitrila/água

Fluxo do eluente: 0,3 mL/min

Volume injetado: 5 μ L

4.5.6 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS

Ânions e cátions mais comumente encontrados na atmosfera foram identificados e quantificados em todas as frações e nos extratos não fracionados (DCM e ACE) por cromatografia de íons.

Para as análises por cromatografia de íons, foram tomadas alíquotas de cada fração e determinadas a massa como descrito no item 4.5.1. Os recipientes de alumínio contendo as frações sem solvente, foram extraídos com água deionizada em banho de ultra-som por 15 segundos e os extratos analisados.

Os ânions Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , presentes nas frações dos extratos em diclorometano e em acetona foram analisados por cromatografia de íons. Alguns ânions orgânicos provenientes de ácidos carboxílicos, tais como, acetato, formiato, glicolato e oxalato também foram determinados, empregando a mesma técnica.

Misturas padrão contendo cátions, ânions inorgânicos e ânions orgânicos foram utilizadas para a identificação e quantificação das espécies presentes nas frações.

Alíquotas de 100 μL do extrato fracionado e não fracionado (DCM e ACE) foram adicionadas a tubos de ensaio e, concentradas até secura em banho-maria (40°C). Após a evaporação total do solvente orgânico, foi adicionado 1,2 mL de água deionizada em cada tubo e, então, submetidos a banho de ultra-som por 5 minutos. Os ânions foram analisados nas seguintes condições:

Instrumento: cromatógrafo Dionex DX-500

Detector: eletroquímico PED-2

Supressora: supressora auto-regenerativa ASRS

Coluna analítica: IonPac AS5A - 5 μm

Coluna de proteção: IonPac AS5A - 5 μm

Coluna de trapeamento para ânions: ATP-1

Eluente: gradiente, NaOH

inicial	0,75 mM
t (5 min)	0,75 mM
t (30 min)	150 mM
t (45 min)	150 mM

Fluxo: 1,0 mL/min

Pressão: 2500 psi

Volume injetado: 10 μL

Os cátions foram analisados nas condições descritas abaixo:

Instrumento: cromatógrafo Dionex 2010i

Detector: condutividade elétrica

Supressora: micromembrana CMMS-II

Regenerante: NaOH 0,012 M

Coluna analítica: IonPac CS12

Coluna de proteção: IonPac CG12

Eluente: HCl 9 mM

Fluxo: 1,0 mL/min

Volume injetado: 200 µL

4.5.7 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO

Grupos funcionais presentes nas frações e nos extratos não fracionados (DCM e ACE) foram evidenciados por espectroscopia de absorção no infra-vermelho. Através das absorções foi possível sugerir espécies orgânicas e inorgânicas.

Para as análises por espectroscopia no infra-vermelho, foram utilizadas alíquotas de 100 µL de cada fração e o solvente evaporado até a secura em chapa de aquecimento (35°C). A massa do resíduo foi determinada e, em seguida, homogeneizada com 50 mg de KBr seco. As pastilhas foram preparadas utilizando-se uma mini-prensa com diâmetro de 8 mm.

Os espectros de infra-vermelho foram obtidos em espectrofotômetro com Transformada de Fourier da Perkin Elmer modelo 1605.

4.5.8 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A cromatografia a gás com detector seletivo de espectrometria de massas auxilia na identificação de compostos orgânicos em misturas complexas. A presença ou ausência do composto na mistura pode ser confirmada através de padrões certificados e com o auxílio de bibliotecas específicas instaladas no computador acoplado ao equipamento.

Condições de análise:

Instrumento: Hewlett Packard 5890 série II

Detector: detector seletivo de massas HP-5970

Coluna capilar: DB 5 - 30,0 m x 0,250 mm x 0,1 μ m

Gás de arraste: He

Programa de temperatura:

T inicial	35°C
t inicial	10 min
T aquec.	4°C/min
T final	310°C
t final	10 min

Temp. injetor: 250°C

Temp. detector: 280°C

Biblioteca NBS - 54.000 compostos

Todas as frações dos extratos (DCM e ACE) foram analisadas utilizando o detector seletivo de massa no modo "SCAN" onde não há monitoramento de íon específico.

4.5.8.1 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A análise das frações no modo “SCAN” revelou que as frações B, C e D do extrato em DCM apresentaram grande número de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Estas frações contendo HPAs foram, então, analisadas novamente por GC/MS utilizando o modo “SIM” (monitoramento de íons específicos característicos para HPAs). A confirmação da identidade e quantificação destes HPAs foi feita com o auxílio de padrões de HPAs deuterado empregando o método de padronização interna. Os íons monitorados para os diversos compostos estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Íons monitorados durante a análise dos HPAs por cromatografia a gás/espectrometria de massas no modo SIM.

HPAs	Íons, m/z	HPAs	Íons, m/z
Naftaleno (Naf)	128, 129, 127	Fluoranteno (Fla)	202, 203, 101
		Pireno (Pir)	
Acenaftileno (Ace)	152, 153, 151	Criseno (Cri)	228, 227
		Benz[a]antraceno (BeA)	
Acenafteno (Aci)	152, 153, 154	Benz[b]fluoranteno (BeF)	252, 253, 126
		Benz[c]fluoranteno (BeF)	
Fluoreno (Flu)	166, 165, 167	Benz[e]pireno (BeP)	252, 253, 126
		Benz[a]pireno (BaP)	
		Benz[ghi]perileno (BghiP)	
Antraceno (Ant)	178, 177, 179	Indeno[123cd]pireno (Ind)	276, 275, 138
		Benz[ghi]perileno (BghiP)	
Fenantreno (Fen)	178, 177, 179	Dibenz[ah]antraceno (DiA)	278, 279, 139

4.5.9 ANÁLISE DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR IONIZAÇÃO POR “ELECTROSPRAY” ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EI/MS/MS)

Como técnica complementar foi também empregada ionização por “electrospray” acoplada a espectrometria de massas para analisar frações dos extratos em DCM e ACE. A decomposição térmica e a natureza não volátil de alguns compostos, muitas vezes, prejudicam a identificação dos mesmos por GC/MS. As análises foram feitas introduzindo a amostra na interface por “electrospray” acoplada a um triplo quadrupolo, modelo Quattro-BQ 4000 da Fisons Instruments (Electrospray ionization/MS/MS) e uma bomba Isco LC-500. A injeção da amostra foi feita diretamente no “electrospray”. O volume da amostra foi de 10µL. O solvente utilizado foi metanol 100% em condição isocrática, empregando um fluxo de 5µL/minuto. A voltagem aplicada no capilar do “electrospray” foi de +3,5 KV no modo positivo e -3,0 KV no modo negativo.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Os testes de mutagenicidade foram realizados nos extratos de DCM e ACE não fracionados e nas respectivas frações utilizando o procedimento de microsuspensão com *Salmonella typhimurium*, cepa TA98, na presença e ausência de ativação metabólica ($\pm$ S9) como descrito por Kado *et al.* (1983).

O número de revertantes foi determinado utilizando um contador de colônias automático (MiniCount, Panasonic), após 48 h de incubação à 37°C. Cada amostra foi testada em três diferentes doses com placas duplicadas para cada dose. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como controles negativos e benzo[a]pireno e 2-nitrofluoreno, foram utilizados como controle positivo sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica, respectivamente. Todo o procedimento foi realizado em local contendo luz amarela fluorescente para minimizar a possível foto-oxidação dos compostos. Os resultados estão expressos como número de revertantes totais, número de revertantes

por unidade de massa de extrato (revertantes/mg) e por unidade de volume de ar amostrado (revertantes/m³).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

5.1.1 AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO

Os dados relativos à quantidade de material particulado respirável (PM₁₀) foram obtidos através do programa de monitoramento do ar realizado pela rede automática da CETESB.

Através dos dados de amostragem das partículas respiráveis do material particulado atmosférico (PM₁₀) apresentados na Tabela 1, observa-se uma variação diária da quantidade de partículas coletadas. A massa total de partículas PM₁₀ coletada foi de 1852,60 mg.

Este valor de PM₁₀ coletado resultou em uma concentração média de 62,0 µg/m³ sendo que a faixa de concentração variou entre 12,0 a 123,0 µg/m³. Esses valores correspondem a aproximadamente 80 % das partículas totais presentes na atmosfera. Observa-se que as maiores concentrações de partículas coletadas nos filtros foram encontradas nas amostragens realizadas durante a semana (terças, quartas e quintas-feira) sugerindo que a principal fonte de emissão da região deve ser o intenso tráfego veicular. Como seria esperado, amostragens realizadas um ou dois dias após períodos de precipitação pluviométrica apresentaram quantidades menores de material particulado. A remoção destas partículas durante o período de baixa precipitação pluviométrica (especialmente no inverno) é muito lenta, constituindo, juntamente com a ocorrência da camada de inversão, um fator importante para a concentração das partículas na atmosfera. Outros estudos também mostraram que a presença de

poluentes na atmosfera é altamente influenciada pelas condições meteorológicas (Barale *et al.* 1989, Greenberg *et al.* 1993, Chrisp *et al.* 1980, Tuominen *et al.* 1988).

A metodologia empregada para a extração do material particulado atmosférico resultou em uma quantidade de extrato orgânico total de 569,40 mg ($19,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) sendo que, 378,80 mg ($12,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) para o extrato em DCM e 190,60 mg ($6,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) para o extrato em acetona, correspondendo respectivamente a 20% e 13% do material particulado coletado no filtro.

5.1.1.1 MONITORAMENTO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

Para o monitoramento dos extratos obtidos após a extração do material particulado atmosférico, foi utilizada a cromatografia a líquido de alta eficiência. Este monitoramento pode ser visto nos perfis cromatográficos apresentados na Figura 9.

Através deste monitoramento, pode-se avaliar a distribuição dos picos nos cromatogramas dos extratos em DCM e ACE em função do tempo de eluição e, correlacionar estes picos com as diferenças de polaridades existentes entre os solventes de extração.

Pode ser observado que existe uma nítida diferença de polaridade na distribuição dos compostos ao longo de cada cromatograma, indicando que ocorreu, já na extração, uma separação prévia dos compostos. Considerando a coluna analítica (C_{18} - fase estacionária reversa) e o gradiente de eluição utilizado (água/acetonitrila), observa-se que compostos apolares ou moderadamente polares estão presentes no extrato em DCM enquanto que os compostos polares e muito polares estão presentes no extrato em ACE.

Figura 9: Perfis cromatográficos dos extratos orgânicos em DCM e ACE do material particulado atmosférico.

5.1.1.2 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS

A contribuição das espécies iônicas, em especial as espécies inorgânicas é de grande importância na caracterização química e na determinação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico, uma vez que, os íons inorgânicos contribuem com 9-26% das partículas respiráveis presentes no material particulado (Daisey *et al.*, 1984).

Algumas espécies inorgânicas como os metais pesados (chumbo, mercúrio, cádmio, arsênio, manganês, etc), uma vez na atmosfera, podem provocar prejuízos à saúde humana quando inalados. A concentração desses metais na atmosfera tem aumentado drasticamente desde o momento em que as emissões por veículos automotores e indústria começaram a predominar no meio ambiente. Outros estudos mostraram que a presença dos íons SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^- e NH_4^+ indicam a predominância de fontes de emissão tanto naturais (aerossol marinho) como antropogênicas (resuspensão de poeiras do solo, queima de combustíveis, indústrias de ferro e aço, incineradores e emissão por veículos à diesel).

A presença e concentração das espécies inorgânicas no material particulado é também importante na avaliação dos efeitos genotóxicos. A atividade mutagênica do material particulado atmosférico é devido, principalmente, aos compostos orgânicos (Schuetzle *et al.*, 1990) e a presença de espécies inorgânicas contribui intensamente para o aumento da massa da amostra de interesse, provocando erros na interpretação dos resultados de mutagenicidade.

A Tabela 6 mostra as porcentagens de alguns ânions inorgânicos presentes nos extratos (DCM e ACE) do material particulado atmosférico coletado na cidade de São Paulo.

Tabela 6: Porcentagem em massa dos ânions inorgânicos presentes nos extratos em diclorometano e em acetona do material particulado atmosférico determinados por cromatografia de íons.

Extrato	Massa total dos íons	F ⁻	Br ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
DCM	0,44	-	0,02	-	0,03	0,04	0,32
ACE	3,45	0,01	0,02	0,04	0,14	3,18	0,04
DCM+ACE	3,89	0,01	0,04	0,04	0,17	3,22	0,36

(-): Íons não detectados

Os valores encontrados para o material particulado de São Paulo foram substancialmente menores do que os encontrados por Miguel *et al.* (1992) estudando as partículas respiráveis da cidade do Rio de Janeiro. Este fato pode ser explicado pela grande contribuição do aerosol marinho devido à proximidade com o mar.

Pode ser observado também, na Tabela 6, que os ânions estudados estão em maior concentração no extrato em ACE do que no extrato em DCM. Daisey *et al.* (1984) mostraram que o extrato em ACE do material particulado contém vários íons inorgânicos, em especial, NH₄⁺ e NO₃⁻.

Como seria esperado, as espécies inorgânicas presentes no material particulado atmosférico são preferencialmente extraídas com o solvente mais polar, acetona.

Estes ânions estão preferencialmente associados à fase gasosa porém, podem ser encontrados também no material particulado.

A Tabela 7 apresenta os ânions orgânicos estudados nos extratos orgânicos do material particulado atmosférico.

Tabela 7: Porcentagem em massa dos ânions orgânicos presentes nos extratos em diclorometano e em acetona do material particulado atmosférico determinados por cromatografia de íons.

Extrato	Massa total dos íons	Formiato	Acetato	Oxalato	Glicolato
DCM	0,18	0,05	0,12	0,01	-
ACE	1,48	0,59	0,48	0,27	0,13
DCM+ACE	1,66	0,64	0,60	0,28	0,13

(-): Íon não detectados

Como pode ser visto pela Tabela 7, o extrato que apresenta maior concentração dos ânions é o extrato em acetona.

Outro estudo realizado para a quantificação dos ânions orgânicos presentes no material particulado da cidade de São Paulo (Souza *et al.*, 1997) mostrou que os ânions formiato e acetato estão na mesma faixa de concentração, 0,60% (0,01 - 1,24 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Porém, para o oxalato e glicolato, os valores determinados estão abaixo, 0,02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 0,01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente, enquanto que Souza *et al.* (1997) encontraram 0,65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 0,12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Esta diferença pode ser atribuída aos diferentes métodos de extração e solventes empregados. Certamente, a extração de íons inorgânicos e orgânicos de baixo peso molecular é mais eficiente quando estes são extraídos com água pura (Sioutas, 1995; Souza *et al.*, 1995).

5.1.1.3 DETERMINAÇÃO ELEMENTAR DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO.

A composição elementar de cada extrato foi determinada para a avaliação das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Esta caracterização permite

estabelecer o balanço de massa de material orgânico e inorgânico presente nos extratos em DCM e ACE.

A Figura 10 apresenta os resultados da análise elementar dos extratos em DCM e ACE.

A)

B)

Figura 10: Resultado da análise elemental (C, H e N) dos extratos não fracionados em a) DCM e b) ACE.

Os resultados indicam que a contribuição dos compostos orgânicos é maior no extrato em DCM do que no extrato em ACE. Aproximadamente 90% do extrato em DCM é formado por compostos contendo carbono, hidrogênio e nitrogênio. Por outro lado, o extrato em ACE é composto por apenas 60% de carbono, hidrogênio e nitrogênio sendo que o restante, deve ser devido predominantemente à presença de oxigênio e, em quantidades menores, à enxofre, bromo, cloro e outros.

A alta porcentagem de carbono e hidrogênio sugere que grande parte do extrato em DCM é formado por hidrocarbonetos, compostos apolares e moderadamente polares. Entretanto, compostos contendo oxigênio, nitrogênio, enxofre, cloro e bromo, os quais apresentam maior polaridade, devem estar majoritariamente presentes no extrato em acetona.

A mesma análise elementar realizada com o extrato em ACE do material particulado atmosférico coletado em um sítio urbano de New Jersey - EUA (Gundel *et al.*, 1993), mostrou que o extrato em acetona continha 39,9% de carbono, 5,3% de hidrogênio, 6,4% de nitrogênio e 48,4% de oxigênio. Estes dados são comparáveis com os resultados apresentados pela Figura 10 para o extrato em ACE do material de São Paulo.

5.1.1.4 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS PRESENTES NOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRA-VERMELHO

Os espectros de infra-vermelho dos extratos em DCM e ACE, evidenciaram absorções que podem ser atribuídas a grupos funcionais, tais como $1276-1283\text{ cm}^{-1}$ para $-\text{NO}_2$, $1720-1728\text{ cm}^{-1}$ para $-\text{C}=\text{O}$, $3000-2800\text{ cm}^{-1}$ para $-\text{C}-\text{H}$, $3600, 2600\text{ cm}^{-1}$ para $-\text{OH}$, 1384 cm^{-1} $-\text{NO}_3$ e 1115 cm^{-1} para $-\text{SO}_4$, 1460 cm^{-1} para $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2$. Na Tabela 8 estão apresentados os valores de absorbância correspondentes aos diversos grupos funcionais encontrados nos extratos em DCM e ACE.

Estas análises não resultaram em espectros bem definidos na região de $3000-3700\text{ cm}^{-1}$ devido a presença de água nas amostras. Esta água, incorporada

provavelmente durante a amostragem, é de difícil eliminação durante a preparação para as análises por infra-vermelho. Sua eliminação exigiria um aquecimento à uma temperatura relativamente alta, o que poderia provocar a perda por volatilização ou degradação dos compostos orgânicos de interesse.

Observa-se a presença de grupamentos $-C-H$, $-CH_3-(CH_2)_n-CH_3$, $-C=O$, $-NO_3$, $-NO_2$ e $-OH$ em ambos os extratos DCM e ACE porém, considerando os valores de absorbância/massa, foi encontrado que os maiores valores estão presentes no extrato em ACE. Estes valores indicam que os compostos contendo os grupos funcionais $-C=O$, $-NO_3$, $-NO_2$ e $-OH$ estão em maiores concentrações no extrato em ACE.

Estudos realizados com extratos em DCM do material particulado atmosférico de referência - NBS SRM 1649 (Zinbo *et al.*, 1992), mostraram praticamente o mesmo espectro de absorção que o apresentado neste trabalho.

Tabela 8: Valores de absorbância/massa correspondentes aos grupos funcionais presentes nos extratos orgânicos em DCM e ACE do material particulado atmosférico por espectroscopia no infra-vermelho.

Extrato	$-NO_3$	$-NO_2$	$-OH$	$-C=O$	$-CH$
DCM	-	0,050	0,044	0,058	0,055
ACE	0,428	0,209	0,287	0,334	0,176

(-): Grupo funcional não detectado

5.1.1.5 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Em geral, as curvas termogravimétricas avaliam a composição dos materiais através da estabilidade térmica dos compostos envolvidos. Estas determinações são feitas medindo-se as mudanças na massa da amostra em função da temperatura ou

tempo de aquecimento, em uma atmosfera controlada. Estas mudanças estão relacionadas com as variações de massa existentes em um processo de oxidação térmica e, podem prever a polaridade do material (Gundel *et al.*, 1993).

As curvas TG/DTG estão mostradas nas Figuras 11 e 12 para os extratos em DCM e ACE, respectivamente.

Figura 11: Curvas TG/DTG do extrato em DCM não fracionado obtidas sob atmosfera dinâmica de ar comprimido e razão de aquecimento de 10°C/min (m = 5,800 mg).

Figura 12: Curvas TG/DTG do extrato em ACE não fracionado obtidas sob atmosfera dinâmica de ar comprimido e razão de aquecimento de 10°C/min (m = 2,137 mg).

Figura 13: Sobreposição das curvas TG dos extratos em DCM e em ACE não fracionados obtidas sob atmosfera dinâmica de ar comprimido e razão de aquecimento de 10°C/min.

A análise das curvas TG/DTG mostra que o extrato em DCM perde 99,60% de sua massa por volatilização ou decomposição até a temperatura de 600°C, indicando que o extrato é formado quase que exclusivamente por compostos orgânicos.

Por outro lado, o extrato em ACE perde 87,30% de sua massa até a temperatura de 600°C. Na temperatura de 800°C, o extrato perde mais 3,0%, restando um resíduo de aproximadamente 10% que não é volatilizado ou decomposto. Estes valores indicam que o extrato é formado por 87,30% de compostos orgânicos e aproximadamente 13,0% de compostos inorgânicos. Observa-se também que o extrato em ACE perde massa em várias etapas o que indica ser uma amostra mais complexa do que o extrato em DCM.

A Figura 13 mostra a sobreposição das curvas TG para os extratos em DCM e ACE. Observa-se pelos perfis das curvas que os extratos tem comportamentos muito diferentes com relação à perda de massa frente ao aquecimento, confirmando que os extratos são formados por compostos com diferentes características como volatilidade, estabilidade e polaridade.

Examinando, os resultados obtidos pela análise de íons orgânicos e inorgânicos, avaliação da composição elementar, determinação dos grupos funcionais e avaliação da estabilidade térmica, é possível sugerir que o extrato em DCM é constituído quase que exclusivamente por compostos orgânicos apolares e moderadamente polares, com uma quantidade muito pequena de espécies iônicas. Por outro lado, no extrato em ACE é sugerido uma fração orgânica polar contendo uma fração inorgânica relativamente maior.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS ORGÂNICOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

5.2.1 FRACIONAMENTO E DISTRIBUIÇÃO DE MASSA

O conjunto de resultados obtidos da caracterização química dos extratos em DCM e ACE confirmaram a complexidade das amostras e a necessidade de se proceder o fracionamento. Esses extratos foram então fracionados em cartuchos de extração em fase sólida como descrito na parte experimental deste trabalho.

Neste fracionamento os extratos em DCM e ACE foram separados em 11 frações e em seguida caracterizados química e biologicamente.

A recuperação após o fracionamento dos extratos em diclorometano e em acetona foi de 102% e 104%, respectivamente, com um erro acumulado entre as etapas de solubilização, diluição e transferências de $\pm 6\%$. A Figura 14 mostra as frações sendo eluídas durante o processo de fracionamento do extrato em DCM.

Figura 14: Eluição das frações do extrato em DCM durante o processo de fracionamento por extração em fase sólida.

As massas e intensidades de cores das frações foram avaliadas comparativamente ao longo do processo de fracionamento (Figuras 15a e 15b).

A distribuição de massas nas frações mostra que 43,0% do extrato em DCM está concentrado nas frações apolares (frações A e B). Para o extrato em ACE, 79,7% do extrato está distribuído entre as frações polares e muito polares (frações I e J). Gundel *et al.* (1993) mostraram que o extrato em ACE do material particulado atmosférico contém além dos compostos orgânicos, compostos inorgânicos que, no fracionamento, são eluídos com os solventes mais polares como metanol e acetona resultando no aumento da massa das frações. Estes resultados mostram que a metodologia de extração sequencial, DCM seguida da extração com ACE, foi seletiva separando os extratos em polaridades diferentes.

O fracionamento de cada extrato, DCM e ACE, forneceu frações distintas ao considerar as distribuições de massas, intensidades de cores e polaridades. A metodologia de fracionamento demonstrou ser eficiente, uma vez que ocorreu a separação dos componentes em várias frações.

As diferentes intensidades de cores distribuídas ao longo das frações (Figuras 15a e 15b) indicam que ocorreu um fracionamento dos extratos. Pode-se observar que as frações com alta intensidade de cor apresentam também grande quantidade de massa, exceto as frações apolares (frações A e B) do extrato em DCM. Estas frações são praticamente incolores apesar de apresentarem também uma grande quantidade de massa.

Figura 15: Distribuição de massas e intensidades de cores nas frações dos extratos em a) DCM e em b) ACE.

Estes resultados indicam que a metodologia empregada para a extração e fracionamento dos extratos orgânicos em diclorometano e acetona do material particulado atmosférico, foi adequada para permitir as análises químicas e biológicas nas diversas frações.

5.2.2 MONITORAMENTO DAS FRAÇÕES POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA

O monitoramento das frações por cromatografia a líquido foi feito com a finalidade de observar o perfil das frações e consequentemente avaliar a metodologia empregada para o fracionamento dos extratos em DCM e ACE. Uma mistura de padrões com compostos de diferentes polaridades foi previamente fracionada para avaliar a separação dos componentes padrão na mistura.

A Figura 16 apresenta os cromatogramas das frações da mistura de padrões contendo compostos de polaridades diferentes. Pode-se observar que a metodologia de fracionamento a ser usada para os extratos orgânicos do material particulado mostrou ser adequada uma vez que houve a separação dos componentes da mistura padrão nas diversas frações. Os padrões estão distribuídos pelas frações B, C, D e E sendo que na fração D estão presentes compostos de importância ambiental como o-nitrobenzaldeído, 6-nitro 3,4-benzocumarina e 2-nitronaftaleno devido suas propriedades genotóxicas.

Figura 16: Resultados cromatográficos do fracionamento de uma mistura de padrões.

A Figura 17 mostra os perfis cromatográficos das análises por cromatografia a líquido das frações dos extratos em DCM e ACE. Comparando os cromatogramas das frações para um mesmo extrato (DCM ou ACE), observa-se a distribuição dos compostos nas frações de A a K, indicando que ocorreu um fracionamento dos compostos de acordo com a polaridade dos mesmos. Examinando os cromatogramas é possível observar que os compostos apolares ou moderadamente polares estão presentes em maior proporção nas frações do extrato em DCM e os compostos mais polares nas frações do extrato em ACE.

Figura 17: Perfis cromatográficos das frações dos extratos em DCM e em ACE.

A mesma análise realizada por cromatografia porém, utilizando o detector de fluorescência (resultados não apresentados neste trabalho), indica a presença de espécies fluorescentes, em especial nas frações de maior polaridade em ambos os extratos. Espécies fluorescentes são suspeitas de apresentarem atividade mutagênica (Gundel *et al.* 1993).

5.2.3 DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES IÔNICAS NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE POR CROMATOGRAPHIA DE ÍONS

As frações dos extratos em DCM e ACE foram também analisadas para a avaliação quanto à distribuição das espécies iônicas nestas frações.

As Tabelas 9 e 10 apresentam a porcentagem de massa dos íons (ânions e cátions) presentes nas frações em DCM e ACE.

Tabela 9: Determinação da massa dos ânions e cátions inorgânicos presentes nas frações do extrato de diclorometano do material particulado atmosférico por cromatografia de íons (%).

Fração	Massa total dos íons	F ⁻	Br ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺
A	0,02	-	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-
B	0,05	-	-	-	0,01	-	-	0,01	-	0,03
C	0,06	-	-	-	0,02	-	-	0,02	-	0,02
D	0,06	-	-	-	-	-	-	0,02	-	0,04
E	0,06	-	-	-	-	-	0,02	0,01	-	0,03
F	0,02	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,01
G	0,02	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,01
H	0,18	-	-	-	-	-	0,04	-	-	0,14
I	0,11	-	-	-	0,02	0,04	0,02	0,02	-	0,01
J	0,53	-	-	-	-	0,06	0,18	0,08	-	0,21
K	0,05	-	-	-	-	0,01	0,02	-	0,02	-
Σ íons	1,16	-	-	-	0,06	0,12	0,28	0,18	0,02	0,50

(-): íons não identificados na fração

Tabela 10: Porcentagem em massa dos ânions e cátions inorgânicos presentes nas frações do extrato de acetona do material particulado atmosférico por cromatografia de íons.

Fração	Massa total dos íons	F ⁻	Br ⁻	NO ₂ ⁻	SO ₄ ²⁻	Cl ⁻	NO ₃ ⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺
A	0,25	-	0,09	-	0,01	-	-	0,07	-	0,08
B	0,10	-	-	-	-	0,06	-	0,02	-	0,02
C	0,05	-	0,02	-	-	-	-	0,01	-	0,02
D	0,10	-	0,01	-	0,01	-	-	0,05	-	0,03
E	0,10	-	-	-	-	0,01	0,02	0,03	-	0,04
F	0,06	-	-	-	-	-	-	0,02	0,01	0,03
G	0,05	-	-	-	-	0,01	-	0,02	0,01	0,10
H	0,10	-	0,01	-	-	-	0,03	0,04	-	0,02
I	0,59	0,02	0,16	0,01	0,08	0,20	0,02	0,03	0,01	0,06
J	1,95	-	0,09	0,04	0,03	1,52	-	0,06	0,12	0,09
K	0,04	-	-	-	-	0,02	0,02	-	-	-
Σ íons	3,30	0,02	0,38	0,05	0,13	1,64	0,09	0,35	0,15	0,49

(-): Íons não identificados na fração

Nas Tabelas 11 e 12, pode ser observado que a maior porcentagem, da massa total de íons está presente na fração polar J em ambos os extratos. Comparando a distribuição dos íons entre os dois extratos, observa-se que, em geral, os íons estão presentes em maior concentração no extrato em ACE, extrato mais polar, exceto o íon NO₃⁻ que está em maior porcentagem no extrato em DCM. Com relação à distribuição dos íons nas frações, como seria esperado, estes estão em maior porcentagem nas

frações mais polares (frações H, I e J) tanto no extrato em DCM como no extrato em ACE.

Estes valores de porcentagem de íons estão um pouco abaixo dos valores encontrados para outros sítios urbanos com características similares ao sítio amostrado neste trabalho. Como descrito anteriormente, a comparação dos resultados com outros sítios urbanos é muito difícil, uma vez que as condições ambientais e as metodologias de extração e fracionamento são diferentes.

Tabela 11: Porcentagem em massa dos ânions orgânicos presentes nas frações do extrato de diclorometano do material particulado atmosférico por cromatografia de íons.

Fração	Massa total dos íons	Formiato	Acetato
A	0,04	0,01	0,03
B	0,01	0,01	-
C	0,01	0,01	-
D	0,01	0,01	-
E	0,04	0,02	0,02
F	0,02	0,01	0,01
G	0,02	0,01	0,01
H	0,06	0,03	0,03
I	0,08	0,02	0,06
J	0,03	0,01	0,02
K	-	-	-
Σ total	0,32	0,14	0,18

(-): Íons não identificados na fração

Tabela 12: Determinação da massa dos ânions orgânicos presentes nas frações do extrato de acetona do material particulado atmosférico por cromatografia de íons (%).

Fração	Massa total dos íons	Formiato	Acetato	Oxalato	Glicolato
A	-	-	-	-	-
B	-	-	-	-	-
C	0,01	-	0,01	-	-
D	0,07	0,02	0,05	-	-
E	0,11	0,04	0,07	-	-
F	0,08	0,03	0,05	-	-
G	0,11	0,04	0,07	-	-
H	0,23	0,06	0,10	0,01	0,06
I	0,75	0,20	0,40	0,12	0,03
J	0,29	0,10	0,15	0,04	-
K	0,07	0,02	0,05	-	-
Σ total	1,82	0,53	1,0	0,20	0,09

(-): Íons não identificados na fração

Como pode ser visto nas Tabelas 11 e 12, também os íons orgânicos estão presentes em maior porcentagem no extrato em ACE.

As frações do extrato em DCM contêm apenas os ânions formiato e acetato em praticamente todas as frações.

Com relação a distribuição destes íons pelas frações, observa-se que as frações mais polares (frações H e I) contêm a maior parte da massa total de íons dos extratos. As frações H, I e J do extrato em ACE contêm todos os íons orgânicos encontrados no extrato em DCM, formiato e acetato, além de oxalato e glicolato.

Estes íons orgânicos podem estar presentes no material particulado na forma de sais ou como ácidos carboxílicos.

5.2.4 DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS FUNCIONAIS POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRA-VERMELHO NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE.

Os espectros de infra-vermelho das frações também evidenciaram absorções que podem ser atribuídas a grupos funcionais, tais como 1276-1283 cm^{-1} para $-\text{NO}_2$, 1720-1728 cm^{-1} para $-\text{C}=\text{O}$, 3000-2800 cm^{-1} para $-\text{C}-\text{H}$, 3600, 2600 cm^{-1} para $-\text{OH}$, 1384 cm^{-1} para $-\text{NO}_3$ e 1115 cm^{-1} para $-\text{SO}_4$ e 1460 cm^{-1} para $-\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$. Nas Tabelas 13 e 14 estão apresentados os valores de absorbância correspondentes aos diversos grupos funcionais encontrados nas frações DCM e ACE, respectivamente.

Ao considerar os valores de absorbância/massa nas frações, foi possível obter uma avaliação semi-quantitativa. Grupos alquilas são mais abundantes nas frações apolares e moderadamente polares dos extratos DCM e ACE.

Grupos $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$ e $-\text{NO}_3$ estão presentes em quantidade maior nas frações dos extratos em ACE.

Os espectros de absorção são consistentes com a presença de compostos orgânicos como aldeídos e cetonas (1720 cm^{-1}), álcoois (3600, 2600 cm^{-1}), ácidos carboxílicos (3400 cm^{-1}) e hidrocarbonetos (1460 e 2900 cm^{-1}) em ambos os extratos. Nitro compostos, ácidos dicarboxílicos e outros compostos multifuncionais podem também estar presentes nas frações (Daisey *et al.*, 1986; Allen *et al.*, 1989).

Tabela 13: Valores de absorvência/massa correspondente aos grupos funcionais presentes nas frações do extrato orgânico em diclorometano do material particulado atmosférico por espectroscopia no infra-vermelho.

Fração	-NO₃	-NO₂	-OH	-C=O	-CH	-SO₄	-NH
A	0,003	-	-	-	0,058	-	-
B	0,075	-	-	-	0,172	-	-
C	-	0,040	-	0,064	0,101	-	-
D	-	0,006	-	0,030	0,082	-	-
E	-	0,028	0,021	0,044	0,062	-	-
F	-	0,117	0,123	0,155	0,191	-	-
G	-	0,080	-	0,139	0,172	-	-
H	-	-	0,053	0,093	0,080	0,044	-
I	-	-	0,103	0,132	0,097	0,071	-
J	0,36	-	-	0,164	-	-	0,250
K	-	-	-	-	-	-	-
Σ total	0,439	0,273	0,302	0,825	1,018	0,115	0,250

(-): Grupos funcionais não detectados

Tabela 14: Valores de absorvância/massa correspondente aos grupos funcionais presentes nas frações do extrato orgânico em acetona do material particulado atmosférico por espectroscopia no infra-vermelho.

Fração	-NO ₃	-OH	-C=O	-CH	-SO ₄
A	-	-	-	-	-
B	-	-	-	0,409	-
C	-	-	0,047	0,186	-
D	0,197	-	0,200	0,232	-
E	0,230	0,245	0,307	0,245	-
F	0,062	0,122	0,134	0,112	-
G	0,147	0,164	0,230	0,142	-
H	0,112	0,155	0,208	0,099	-
I	0,212	0,206	0,236	0,166	0,164
J	-	0,513	0,353	-	0,253
K	-	-	-	-	-
Σ total	0,750	1,407	1,718	1,594	0,417

(-): Grupos funcionais não detectados

5.2.5 IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA A GÁS/ESPECTROMETRIA DE MASSAS DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Os estudos descritos na literatura sobre a determinação de compostos orgânicos no material particulado atmosférico estão voltados predominantemente para os compostos apolares. Poucos trabalhos tem sido apresentados sobre a identificação e quantificação de compostos polares ou muito polares (Hawthorne *et al.*, 1992).

Neste trabalho, extratos orgânicos contendo compostos solúveis em DCM e ACE foram estudados.

A determinação de compostos orgânicos polares e muito polares ainda é um desafio analítico, uma vez que, geralmente estes compostos apresentam pouca estabilidade térmica e alto ponto de ebulição.

Até o momento, aproximadamente 2800 compostos individuais já foram identificados na atmosfera. Dentre estes, 25% correspondem aos hidrocarbonetos, 29% aos compostos alifáticos como éteres, álcoois, cetonas, aldeídos e derivados de ácidos, 3% aos compostos heterocíclicos contendo oxigênio, 13% aos compostos contendo nitrogênio e 8% correspondem aos compostos halogenados (Casellas *et al.*, 1995). Grande parte dos estudos sobre compostos orgânicos na atmosfera está voltada para a análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Tokiwa *et al.*, 1980; Tuonimen *et al.*, 1988, Barale *et al.*, 1991). Apesar da grande importância relativa à mutagenicidade, compostos orgânicos polares, principalmente classes de compostos oxigenados tem sido menos explorados (Greenberg *et al.*, 1993; Gundel *et al.*, 1993).

Estudos realizados em uma atmosfera urbana, indicaram que os compostos moderadamente polares e polares são os responsáveis por 50-70% da atividade mutagênica do extrato orgânico do material particulado atmosférico, enquanto que os HPAs, compostos apolares, são responsáveis por apenas 30-50% (Casellas *et al.*, 1995).

As análises das frações por cromatografia a gás/espectrometria de massas indicaram a presença de inúmeros compostos distribuídos ao longo de todas as frações dos extratos em DCM e ACE.

Como seria esperado, os compostos apolares ou menos polares estão presentes nas frações A, B, C e D do extrato em DCM. Já os compostos moderadamente polares e polares estão presentes nas demais frações em ambos os extratos.

Alguns compostos pertencentes à classe dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foram identificados nas frações B, C e D do extrato em DCM. Esta classe de compostos foi sistematicamente analisada nas frações dos extratos através do monitoramento de específicos íons característicos dos HPAs, como pode ser visto no item 5.2.5.1.

As Tabelas 15 e 16 apresentam os compostos identificados nas frações dos extratos em DCM e ACE, respectivamente. Observa-se que foi possível identificar um maior número de compostos nas frações do extrato em DCM do que no extrato em ACE, apesar dos cromatogramas apresentarem inúmeros picos, mostrando que em ambos os extratos devem existir inúmeros compostos. Os compostos orgânicos polares que constituiriam o extrato em ACE podem eventualmente, durante a análise cromatográfica, sofrer decomposição pela baixa estabilidade térmica ou ainda, não ser volatilizado devido ao alto ponto de ebulição. Assim sendo, problemas analíticos podem justificar este número menor de compostos identificados nas frações do extrato em ACE.

De modo geral, foram detectados compostos como eicosano, docosano, heptadecano e outros hidrocarbonetos alifáticos. Estes hidrocarbonetos são emitidos na atmosfera principalmente através de fontes antropogênicas como queima de combustíveis fósseis e madeira e, fontes biogênicas como plantas, microrganismos e insetos (Rogge *et al.*, 1993).

Foram encontrados também alguns ácidos orgânicos como ácido dodecanóico, ácido heptadecanóico e ácido octadecanóico. Estes ácidos são emitidos na atmosfera pelas mesmas fontes de emissão dos hidrocarbonetos alifáticos e, uma vez emitidos, reagem com radicais livres como ozônio e outros oxidantes, dando origem aos aldeídos e ácidos dicarboxílicos (Rogge *et al.*, 1993).

Ácidos dicarboxílicos como o ácido hexanodióico foi identificado em uma das frações do extrato em ACE. Essa classe de compostos pode ser encontrada nas partículas menores do material particulado atmosférico e devido à possibilidade de sua formação através de reações químicas na atmosfera (Rogge *et al.*, 1993), passa a ser uma classe importante.

Alguns compostos de especial interesse ambiental devido aos seus efeitos nocivos à saúde humana foram também identificados como fluoreno, benzo[e]pireno, benzo[fluorantenos, 7H-benz[de]antracen-7-ona, isoquinolina e 2,3-dimetil quinolina considerados agentes carcinogênicos e/ou mutagênicos (Casellas *et al.*, 1995; Nagao *et al.*, 1977; Zeiger *et al.*, 1992).

Os cromatogramas obtidos por GC/MS da fração E (fração mais mutagênica - ver item 5.3) em ambos os extratos DCM e ACE (Figuras 18 e 19) mostraram inúmeros picos indicando a presença de diferentes compostos orgânicos, os quais poderiam ser responsáveis pela alta atividade mutagênica.

A Tabela 17 apresenta um resumo das classes de compostos orgânicos encontradas pela identificação por GC/MS em cada fração dos extratos. Observa-se que foram detectadas as seguintes classes de compostos: hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), compostos oxigenados (cetonas, aldeídos, álcoois, ácidos carboxílicos), compostos nitrogenados (amidas) e heterocíclicos (furanos, tiazóis, quinolinas, piridinas).

Apesar de não terem sido detectados nitro-HPAs, é possível que eles estejam presentes no material, porém em níveis de concentração muito baixos para serem detectados nas condições analíticas empregadas. Algumas tentativas foram feitas no sentido de permitir a detecção de nitro-HPAs. O monitoramento dos íons característicos por GC/MS correspondente à fragmentação dos nitro-HPAs sugere a presença destes compostos porém, não se pode afirmar a presença dos mesmos. Certamente, outros estudos analíticos deverão ser feitos para a confirmação destes compostos.

Figura 19: Cromatograma obtido por GC/MS da fração E do extrato em ACE.

Tabela 15: Identificação por cromatografia a gás/espectrometria de massas dos compostos orgânicos presentes no extrato em diclorometano do material particulado atmosférico

Fração	Composto	Fração	Composto
A	5-Undeceno	F	1-etilpropil heneicosano
	3-Dodeceno		9-Metil nonadecano
	3-Octadeceno		Benzotiazol
	6-Trideceno		4-Metil quinolina
	7-Tetradeceno		2,3-Dimetil quinolina
	Heptadeceno		2,3,4-Trimetil quinolina
	Octadecano		1H-Isoindol-1,3(2H)-diona
	Eicosano		3,4-Dimetil-2-hexanona
	Docosano		Ác. octadecanóico
	Ciclotetradecano	G	Ác. Dodecanóico
	5-Butil nonano		Ác. Tetradecanóico
B	Docosano		Ác. Heptadecanóico
	Heptadecano		Ác. 9,12-Octadecadienóico
	9-Octil heptadecano		Ác. 9-Octadecenóico
	1-Metil-2-octil-ciclopropano	H	2-Metóxi furano
	9-Metil nonadecano		Ác. 2-Etil hexanóico
	7-Tetradeceno		Ác. Hexadecanóico
	Naftaleno		Ác. Octadecanóico
C	9H-Fluoreno	I	-
	Criseno		-
	Benzo[e]pireno		-
	Benzo[k]fluoranteno		-
D	Benzo[ghi]perileno	J	4-Metil-3-penten-2-ona
	1-Octadeceno		N-ciclohexil ciclohexanamina
	7H-Benz[de]antracen-7-ona	K	-
E	1,2-Binaftaleno		-
	3-Hexanona		-
	2-Butanona		-
	1-Fenil etanona		-
	Isobenzofuranona		-
	Nonanal		-
	Isoquinolina		-
	2,3-Dimetil quinolina		-
	N,N-dietil formamida		-
	4-Hidróxi-3-metóxi-benzaldeído		-

(-): Não foram identificados compostos nestas frações

Tabela 16: Identificação por cromatografia a gás/espectrometria de massas dos compostos orgânicos presentes no extrato em acetona do material particulado atmosférico

Fração	Composto	Fração	Composto
A	Docosano Pentacosano Heptacosano 10-Metil eicosano Heptadecano 6-Propil tridecano 9-Octil heptadecano	F	9-Octil heptadecano N,N-Dimetil 9-octadecenamida
B	-	G	3,4-Dimetil 3-penten-2-ona 2-Metóxi furano 3,5-Dimetil piridina 1,2-Ciclohexanediol Ác. Tetradecanóico
C	Ác. Hexanodióico Ác. 1,2-Benzenodicarboxílico	H	9-Octil heptadecano 3,4-Dimetil piridina 2,4,6-Trimetil piridina 4,6-Dimetil-2-pirimidona 1,2-Benzisotiazol-3 (2H)-ona 2,3-Dimetóxi benzaldeído Benzotiazol Ác. Benzóico Ác. Hexadecanóico
D	4,4-Dimetil 2-penteno	I	2-Metóxi furano 4-Metil 2-penteno 2,5-Dimetil piridina 2,4,6-Trimetil piridina 2-Etil-4,6-dimetil piridina 2-Dimetilamino ciclohexanona 3-Metil 2,5-furanodiona 4-Metil 1,3-isobenzofuranodiona Ác. 1,2-Benzenodicarboxílico
E	2,3-Dimetil 2-penteno 2,5-Hexanodiona 2,2,6,6-Tetrametil 4-piperidinona 2,4,6-Heptanotriona Ác. Decanóico	J	4-metil 3-penten-2-ona 3,5-Dimetil piridina 2,4,6-Trimetil piridina 1,1-dimetiletil-1,2-benzenediol
		K	-

(-): Não foram identificados compostos nestas frações

Tabela 17: Classes de compostos presentes nas frações dos extratos em DCM e ACE.

Frações	Extrato em diclorometano	Extrato em acetona
A	Hidroc. alifáticos	Hidroc. alifáticos
B	Hidroc. alifáticos, HPAs	-
C	HPAs	Ácidos carboxílicos
D	Hidroc. alifáticos, HPAs, cetonas	Hidroc. alifáticos
E	Aldeídos, cetonas, quinolinas, amidas	Hidroc. alifáticos, cetonas, ác. carboxílicos
F	Hidroc. alifáticos, quinolinas, cetonas, tiazóis, ác. carboxílicos	Hidroc. alifáticos, amidas
G	Ácidos carboxílicos	Álcoois, piridinas, furanos, cetonas, ác. carboxílicos
H	Furanos, ácidos carboxílicos	Hidroc. alifáticos, piridinas, tiazóis, aldeídos, cetonas, ác. carboxílicos
I	-	Hidroc. alifáticos, furanos, cetonas, ác. carboxílicos, piridinas
J	Cetonas, aminas	Cetonas, piridinas, álcoois
K	-	-

(-): Não foram identificados compostos nestas frações

5.2.5.1 QUANTIFICAÇÃO DOS HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Como seria esperado, os HPAs foram encontrados apenas nas frações menos polares do extrato em DCM, isto é, frações B, C, e D. Estas espécies foram identificadas e quantificadas e os resultados estão apresentados nas Figuras 20, 21 e 22.

Figura 20: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na fração B do extrato em diclorometano

Figura 21: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na fração C do extrato em diclorometano

Figura 22: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na fração D do extrato em diclorometano

Os resultados mostram que 17 HPAs foram determinados no material particulado atmosférico coletado em São Paulo, alguns deles considerados carcinogênicos e/ou mutagênicos (Lee *et al.*, 1995).

Como mostrado nas Figuras 20, 21 e 22, os HPAs foram identificados nas frações B, C e D do extrato em DCM sendo que, na fração B foi encontrado maior concentração dos compostos com menor peso molecular. A fração C apresentou maior concentração dos compostos com maior peso molecular. Na fração D praticamente não foi detectado nenhum HPA, provavelmente devido aos baixos níveis de concentração.

O HPA encontrado em maior concentração foi o benzo[fluoranteno], um importante agente carcinogênico. Outros HPAs também de importância genotóxica, tais como benzo[a]antraceno, criseno, benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, perileno, benzo[ghi]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno estavam presentes também em concentrações maiores do que as encontradas em outros sítios urbanos (Pyysalo *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1996). Estudos indicaram que a presença de HPAs na atmosfera é um fator importante na incidência de câncer nos pulmões em Taiwan (Lee *et al.*, 1995).

Apesar dos HPAs estarem em concentrações relativamente baixas na atmosfera, essas concentrações são suficientes para causarem genotoxicidade. Devido às baixas concentrações e à complexidade da amostra na qual esses HPAs estão presentes, a detecção e identificação desta classe de compostos na atmosfera é uma tarefa difícil sendo necessário condições analíticas criteriosas nas etapas de amostragem, extração, fracionamento e análise como, por exemplo:

- A proteção dos filtros e dos extratos contra incidência de luz, evitando desta forma, a degradação fotoquímica e o armazenamento dos mesmos em freezer evitando perdas por volatilização dos HPAs. Sabe-se que a pressão de vapor dos HPAs com três ou quatro anéis aromáticos é relativamente alta a temperatura ambiente (Sioutas, 1995).
- Outro aspecto a ser mencionado é com relação ao manuseio dos padrões analíticos dos HPAs utilizados para as análises. Esses padrões devem ser preparados e usados em condições adequadas. A utilização de luvas, óculos, vidrarias apropriadas,

capelas de exaustão é fundamental para desenvolver o trabalho com segurança evitando a contaminação do ambiente.

A coleta de quantidades razoáveis de HPAs requer longos períodos de amostragem. Este fato pode afetar a integridade da amostra uma vez que perdas por volatilização e/ou degradação através de reações químicas e fotoquímicas podem ocorrer. A degradação dos HPAs adsorvidos no material particulado pela presença de dióxido de nitrogênio ou ozônio deve ser considerada. Durante amostragens, compostos considerados carcinogênicos como benzo[a]antraceno ou benzo[a]pireno podem ser oxidados quando adsorvidos no filtro produzindo diferentes compostos como: dionas, antraquinonas, diácidos, etc. A formação de cada produto depende das condições em que ocorrem as reações como: intensidade da radiação solar, natureza do substrato, oxidantes presentes, etc. (Lopes *et al.*, 1996).

Benzo[a]pireno, um dos mais importantes HPAs devido sua ação carcinogênica, tem sido utilizado comumente como um indicador da presença dos HPAs em amostras ambientais (Eskinja *et al.*, 1996).

Concentrações médias de HPAs estão na faixa de 0,01 ng/m³ em áreas não poluídas e até 60 ng/m³ em centros urbanos ou próximo a áreas industrializadas. Neste trabalho foi determinado valores de concentração de 95 ng/m³, correspondente à soma das concentrações de todos HPAs identificados (Figuras 20, 21 e 22). A concentração dos HPAs na atmosfera depende principalmente das fontes de emissão, das condições meteorológicas e das possíveis degradações químicas (Eskinja *et al.* 1996).

Estudos tem sugerido que relações de concentração entre alguns HPAs podem ser utilizadas para a identificação das fontes de emissão (Lee *et al.* 1995; Barale *et al.* 1991). Assim, através do perfil dos HPAs presentes em uma atmosfera urbana é possível evidenciar as fontes de emissão. Por exemplo, benzo[ghi]perileno, fluoranteno e pireno são encontrados em emissões por combustão de diferentes produtos e as relações entre eles permitem identificar a possível fonte de emissão (Lee *et al.* 1995).

O etanol anidro adicionado à gasolina e utilizado como combustível na frota veicular no Brasil, introduziu características únicas ao material particulado atmosférico amostrado.

Relações de concentração dos HPAs encontrados em outros estudos (Li *et al.*, 1993) e, os resultados obtidos para os HPAs coletados na cidade de São Paulo estão apresentados na Tabela 18. Pode-se observar que as razões entre os HPAS neste trabalho não são comparáveis com os dados da literatura que relacionam diferentes fontes de emissão (combustão de gasolina, diesel e madeira). Apenas as relações determinadas por Sexton *et al.* (1985) para a queima de madeira se aproximam dos dados obtidos neste trabalho. A presença de fontes de emissão como pizzarias e churrascarias, onde a queima de madeira e carvão vegetal é frequente e contribui para a formação do aerossol atmosférico. Este fato pode justificar a relação entre os HPAs encontradas no sítio de amostragem com os encontradas por Sexton *et al.* (1985). As altas porcentagens de potássio determinadas nas frações dos extratos em DCM e ACE sugerem a contribuição de fontes como combustão de biomassa. Allen *et al.*, (1995), estudando a composição iônica do aerossol gerado a partir das queimadas existentes na floresta Amazônica determinou a presença predominante de potássio.

Tabela 18: Relações de concentração entre os HPAs e suas respectivas fontes de emissão em diferentes sítios de amostragens

Emissão de veículos a gasolina				
	<i>Kamens et al.</i> 1993	<i>Grimer et al.</i> 1977	<i>Stenberg et al.</i> 1983	HPAs coletados em São Paulo
B[ghi]P/Ind	3,5	3,8	3,5	0,9
Cri/BeP	2,5	2,2	1,2	2,4
BaA/BaP	0,5	0,7	3,7	1,6

Emissão de veículos a diesel				
	<i>Kamens et al.</i> 1993	<i>Tong et al.</i> 1984	<i>May et al.</i> 1984	HPAs coletados em São Paulo
B[ghi]P/Ind	1,1	1,1	1,2	0,9
Cri/BeP	1,6	1,6	-	2,4
BaA/BaP	1,0	1,7	0,9	1,6

Emissão de queima de madeira				
	<i>Kamens et al.</i> 1993	<i>Sexton et al.</i> 1985	<i>Ramdahl et al.</i> 1982	HPAs coletados em São Paulo
B[ghi]P/Ind	0,8	0,9	1,1	0,9
Cri/BeP	2,4	2,2	2,4	2,4
BaA/BaP	1,0	1,5	1,2	1,6

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE MUTAGÊNICA DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Como a identificação e quantificação dos compostos mutagênicos presentes na atmosfera é uma tarefa difícil devido ao grande número de compostos e, às baixas concentrações, o fracionamento químico seguido dos testes de mutagenicidade tem sido geralmente aplicado para a identificação de classes de compostos bioativos em amostras ambientais complexas (Salmeen, *et al.*, 1984; Butler *et al.*, 1987; Chuang *et al.*, 1992; Savard *et al.*, 1992). A presença e a natureza de interações existentes entre os compostos nas amostras não fracionadas podem interferir na atividade mutagênica das amostras devido aos efeitos sinérgicos e antagônicos (Hermann, 1991; Savard *et al.*, 1992). Portanto, a aplicação dos testes de mutagenicidade em amostras não fracionadas e em suas frações, é de grande valia e tem sido recomendado para o reconhecimento de amostras complexas.

Através dos resultados obtidos pode-se notar que a atividade mutagênica está distribuída por todas as frações e em ambos os extratos DCM e ACE.

Como mostrado no item 5.2.1, a distribuição de massas no extrato em diclorometano indica que 23,5% e 19,5% da massa total está concentrada nas frações A e B, respectivamente. No extrato em acetona, a maior porcentagem de massa está concentrada nas frações mais polares, fração I (44,0%) e fração J (35,5%).

Apesar da pequena porcentagem de recuperação de massa na fração E em DCM (14,5%), a atividade mutagênica apresentada pela fração foi alta, 54% (-S9) e 58% (+S9). Resultados similares foram encontrados com a fração E em ACE onde a recuperação de massa foi de 4,5%, e a atividade mutagênica 37% (-S9) e 36% (+S9).

Outro ponto de contraste é a significativa contribuição de massa da fração I (44,0%) e J (35,5%) do extrato em ACE em comparação com os valores das atividades mutagênicas 13,36% (-S9), 20,02% (+S9) e 1,04% (-S9), 3,38% (+S9) respectivamente. Nestas frações mais polares, espécies inorgânicas podem ser os responsáveis pela baixa atividade mutagênica observada. Em um trabalho recente realizado também com o material particulado atmosférico em uma cidade americana aproximadamente 20% do material orgânico extraído em ACE é composto por substâncias inorgânicas quando

filtros com material particulado são extraídos inicialmente com diclorometano e em seguida com acetona (Gundel *et al.*, 1993).

Comparando a atividade mutagênica específica de cada fração dos extratos em DCM e em ACE (Figuras 23 e 24), foi observado que as frações C, D, E e F, frações moderadamente polares, apresentaram a maior atividade mutagênica entre as frações do extrato em diclorometano. No extrato em acetona, as frações D, E e H foram as mais mutagênicas.

Para o cálculo da atividade mutagênica específica (revertantes/ μg) não é levado em consideração a recuperação de massa para cada fração, neste caso, apenas a massa de amostra utilizada para o teste é considerada.

Os valores de atividade mutagênica específica podem ser diretamente comparados com outros resultados obtidos pelo mesmo teste de mutagenicidade aplicado em padrões analíticos individuais. Por exemplo, para este trabalho, a atividade mutagênica encontrada para um padrão de benzo[a]pireno e 2-nitrofluoreno (controles positivos) ambos com alto grau de pureza foi de 1218,35 revertantes/ μg e 15716,0 revertantes/ μg , respectivamente. Para o DMSO, que é o solvente utilizado para a solubilização das frações para a realização dos testes (controle negativo), a atividade mutagênica específica foi de 2,62 revertantes/ μg .

Figura 23: Atividade mutagênica específica baseada nas massas das frações para o extrato em DCM com e sem adição de S9.

Figura 24: Atividade mutagênica específica baseada nas massas das frações para o extrato em ACE com e sem adição de S9.

Como pode ser visto nas Figuras 23 e 24, a atividade mutagênica específica para algumas frações do extrato orgânico do material particulado de São Paulo, frações D e E do extrato em DCM, é apenas três vezes menos mutagênica do que o benzo[a]pireno, considerado um agente mutagênico potente.

As Figuras 25 e 26 mostram a mutagenicidade com relação aos revertantes totais considerando a recuperação de massa de cada fração. Pode ser observado que neste caso, as frações mais mutagênicas foram as frações C, D E e F para o extrato em DCM e as frações D, E, H e F para o extrato em ACE. Sendo que as frações E em ambos os extratos, DCM e ACE, foram as mais mutagênicas. Em particular, a fração E do extrato em DCM foi a fração que exibiu a maior atividade mutagênica entre todas as frações em ambos os extratos.

A adição da ativação metabólica (S9), indica se a fração é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica.

Figura 25: Distribuição da atividade mutagênica total para as frações do extrato em DCM com e sem adição de S9.

Figura 26: Distribuição da atividade mutagênica total para as frações do extrato em ACE com e sem adição de S9.

A maioria das frações no extrato em DCM apresentaram maior atividade mutagênica com a adição de S9. Porém, no extrato em ACE, a adição de S9 resultou na diminuição da mutagenicidade, indicando uma possível inativação dos compostos diretamente mutagênicos (Crebelli *et al.*, 1995).

Embora a atividade dos extratos não fracionados tenha sido devido tanto aos compostos diretamente como aos indiretamente mutagênicos, o extrato em ACE não fracionado apresentou uma contribuição similar para os compostos diretamente e indiretamente mutagênicos enquanto que, para o extrato em DCM, os compostos indiretamente mutagênicos foram os que mais contribuíram.

O aumento da atividade mutagênica para o extrato em DCM pela adição de S9 sugere que os compostos não polares e moderadamente polares presentes neste extrato foram metabolicamente ativados a espécies capazes de induzirem mutações. Tais compostos podem estar também presentes no extrato em ACE mas, não em quantidades suficientes para sobrepor a desativação dos compostos diretamente mutagênicos pela adição de S9 (Savard *et al.*, 1992).

Por outro lado, a diminuição da resposta obtida com adição da ativação metabólica no extrato em ACE indica a presença de compostos polares e muito polares que não requerem ativação metabólica para apresentar mutagenicidade, como por exemplo, nitro-HPAs. Portanto, o sistema enzimático S9 pode também desativar compostos diretamente mutagênicos, diminuindo assim, a atividade mutagênica (Savard *et al.*, 1992).

Estes resultados estão de acordo com outros estudos realizados com material particulado atmosférico em sítios com mesmas características, os quais demonstraram que grande parte da mutagenicidade dependente da adição de S9 está presente nas frações que contém os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, enquanto que a atividade mutagênica que não depende da adição de S9 está associada à presença de compostos mais polares (Hughes *et al.*, 1980; Chrisp *et al.*, 1980; Pyysalo *et al.*, 1987; Crebelli *et al.*, 1988; Crebelli *et al.*, 1991; Arey *et al.*, 1992; Greenberg *et al.*, 1993; Hayakawa *et al.*, 1995).

Para avaliar a possível contribuição dos compostos mais polares como nitro- e dinitro-HPAs nas frações polares do extrato orgânico do material particulado, devem ser realizados estudos utilizando outras cepas de *Salmonella*, como as deficientes em nitroreductase TA98NR (May *et al.*, 1992; Sato *et al.*, 1995) e TA98/1,8-DNP6 (Sato *et al.*, 1995). Infelizmente, testes utilizando estas cepas não foram realizados neste trabalho.

A presença dos compostos mutagênicos diretos nas frações indica uma provável contribuição de derivados dos HPAs. Entretanto, nitro-HPAs que poderiam estar contribuindo para esta mutagenicidade direta não foram detectados por cromatografia a gás/espectrometria de massas nos extratos orgânicos do material particulado de São Paulo.

Normalmente, os nitro-HPAs estão em concentrações muito baixas na atmosfera. São compostos muito reativos e podem ser facilmente degradados durante as análises cromatográficas, devido à alta temperatura na qual a amostra entra em contato com o injetor do cromatógrafo a gás. Entretanto, no monitoramento do fracionamento da mistura de padrões com polaridades diferentes por cromatografia a líquido, descrito anteriormente, foi observado que o nitro-composto foi eluído nas frações mais polares como D e E.

Compostos com estruturas mais complexas como hidrocarbonetos aromáticos heterocíclicos contendo oxigênio e nitrogênio podem ser também os responsáveis pela mutagenicidade direta. As análises por GC/MS das frações dos extratos em DCM mostraram a presença de compostos como 4-metil quinolina, 2,3-dimetil quinolina, isoquinolina, isobenzofuranona, benzotiazol e isoindol-1,3-diona.

A Tabela 19 mostra a atividade mutagênica das frações dos extratos em DCM e em ACE e, dos extratos não fracionados baseada no volume de ar amostrado durante a coleta do material particulado atmosférico.

Tabela 19: Atividade mutagênica baseada no volume de ar amostrado.

Frações	Extrato em DCM		Extrato em ACE	
	(Rev/m ³)		(Rev/m ³)	
	-S9	+S9	-S9	+S9
A	0	0	0	0,01
B	0,42	1,43	0,05	0,08
C	1,65	41,86	1,36	1,68
D	27,89	39,32	8,59	3,93
E	148,41	164,58	29,45	16,02
F	11,87	13,66	5,80	3,26
G	6,75	5,94	4,05	3,98
H	37,53	34,21	12,86	9,50
I	7,60	4,63	16,34	6,0
J	0,60	0,58	3,13	0,47
K	0	0	0,02	0
Nf.^a	332,98	417,86	75,19	79,86

(Nf): Extrato não fracionado

Uma comparação entre a atividade mutagênica dos extratos em DCM e em ACE não fracionados e a soma das atividades mutagênicas das frações individuais para cada extrato pode ser vista na Figura 27.

Em geral, observa-se um aumento na atividade mutagênica dos extratos não fracionados em relação à soma das frações individuais. A atividade mutagênica total resultante da soma das atividades das frações é menor do que a atividade mutagênica total dos extratos não fracionados. Isto pode ser justificado pelas possíveis interações entre as centenas ou talvez milhares de compostos presentes no extrato orgânico do material particulado. Um efeito sinérgico pode estar ocorrendo nos extratos não fracionados aumentando desta forma, a mutagenicidade da amostra.

Um comportamento diferente foi encontrado para o extrato em ACE sem a adição da ativação metabólica (-S9). A atividade do extrato não fracionado foi ligeiramente menor do que a soma das atividades mutagênicas das frações individuais. Neste caso, um efeito antagônico poderia ser sugerido (Hermann, 1981; Savard *et al.*, 1992) porém, esta diferença tem um valor tão pequeno que poderia estar dentro do erro experimental das medidas.

Figura 27: Comparação entre a atividade mutagênica dos extratos em DCM e ACE não fracionados e a soma das atividades mutagênicas das frações individuais.

Os resultados mostram que os extratos orgânicos do material particulado atmosférico (PM₁₀) coletado em São Paulo podem ser considerados tanto mutagênicos diretos como indiretos. Porém, é muito difícil a interpretação e a extrapolação destes resultados para a previsão das consequências prejudiciais à saúde humana pois deve-se considerar a composição étnica da população, a dieta, estado nutricional, tensões, infecções, etc., fatores que podem ser relevantes na resposta mutagênica ou carcinogênica (Moller *et al.*, 1994).

Neste trabalho foi constatado que apesar da fração B do extrato em DCM apresentar maior número de HPAs e em maiores concentrações, a fração C apresentou a mais alta mutagenicidade, sendo que as frações D e E, onde não foram identificados HPAs, foram as mais mutagênicas. Provavelmente, derivados de HPAs (nitro-HPAs, oxi-HPAs) e outros compostos mais polares contribuem para o aumento da atividade mutagênica nestas frações.

A adição da ativação metabólica (S9), resultou no aumento da atividade mutagênica da fração C, indicando a presença de compostos diretamente e indiretamente mutagênicos.

Como as análises envolvendo níveis de traços de compostos mutagênicos no ambiente ainda é um desafio muito grande no estudo dos poluentes da atmosfera, o fracionamento químico seguido dos testes de mutagenicidade e análises químicas tem sido muito utilizado para a identificação de classes de compostos bioativas em amostras ambientais complexas (Salmeen, *et al.*, 1984; Butler *et al.*, 1987; Chuang *et al.*, 1992; Savard *et al.*, 1992). Embora a presença e a natureza das interações possam interferir na atividade mutagênica de uma mistura complexa (Hermann, 1991; Savard *et al.*, 1992), os fracionamentos seguidos de bioensaios podem ser usados para isolar compostos mutagênicos em amostras complexas.

É importante ressaltar que procedimentos para fracionamento de compostos orgânicos devem preservar a amostra de reações químicas entre os analitos, a fase sólida e os solventes (Gundel *et al.*, 1993; Hughes *et al.*, 1980; Chrisp *et al.*, 1980) minimizando a formação de artefatos decorrentes de hidrólise e outras reações e preservando a atividade mutagênica das frações.

5.4 AVALIAÇÃO DAS FRAÇÕES DOS EXTRATOS EM DCM E ACE DO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO POR CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC/MS)

Os compostos orgânicos polares pertencentes ao extrato em ACE podem eventualmente, durante a análise por cromatografia a gás/espectrometria de massas, sofrer decomposição devido à baixa estabilidade térmica ou ainda, não serem volatilizados devido ao alto ponto de ebulição.

Devido a estes problemas analíticos, os extratos em DCM e ACE foram submetidos para análise por cromatografia a líquido acoplado à espectrometria de massas utilizando a interface de ionização por “electrospray”. Esta técnica instrumental permite a análise de compostos termicamente instáveis como por exemplo, aminoácidos, proteínas, nitro derivados de compostos orgânicos e espécies com alto peso molecular como polímeros, ácidos orgânicos de cadeias longas, HPAs com maior número de anéis aromáticos, etc.

Alguns estudos descritos na literatura sugerem a utilização da LC/MS em amostras de interesse ambiental contendo compostos termoinstáveis e/ou com alto peso molecular (Zinbo *et al.*, 1992; Galceran *et al.*, 1996).

As frações E dos extratos em DCM e ACE, frações mais mutagênicas, foram submetidas para uma tentativa de análise utilizando a técnica de ionização por “electrospray” acoplado à espectrometria de massas. Devido à complexidade das frações, observadas pelos cromatogramas obtidos das análises por GC/MS, a utilização da cromatografia a líquido para a separação dos compostos antes da introdução no espectrômetro de massas através da interface “electrospray” foi dificultada. Portanto, foi feita apenas a introdução direta das amostras na interface e em seguida no espectrômetro de massas.

Nas Figuras 28 e 29, as quais mostram os espectros de massas das frações DCM-E e ACE-E respectivamente, é possível observar o número grande de compostos evidenciando a complexidade das frações. Os espectros mostram que nas frações existem compostos em uma faixa muito grande de pesos moleculares, tornando difícil a interpretação dos espectros de massas. Assim, o fracionamento realizado previamente através da extração em fase sólida e eluições com solventes de polaridades distintas, não foi suficiente e outros fracionamentos

são necessários para isolar, ainda mais, o número de compostos. Estes testes foram feitos em caráter especulativo e infelizmente a identificação de compostos não foi viável, nestas condições.

Figura 28: Espectro de massas (Electrospray/MS/MS) da fração E do extrato em DCM.

Figura 29: Espectro de massas (Electrospray/MS/MS) da fração E do extrato em ACE.

6. CONCLUSÕES

Poucos estudos sobre a poluição do ar e os efeitos mutagênicos tem sido realizados em áreas urbanas de cidades brasileiras. Até o momento, pouca informação está disponível sobre os compostos mutagênicos presentes nas amostras de ar de regiões urbanas tão poluídas como São Paulo.

O programa de monitoramento da qualidade do ar realizado pela CETESB determina os poluentes ozônio, NO_x, SO_x, monóxido de carbono, hidrocarbonetos totais e partículas respiráveis. Os compostos orgânicos pertencentes a diversas classes químicas tem sido pouco estudados, apesar de serem os maiores responsáveis por danos à saúde e ao meio ambiente.

A caracterização química e a determinação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico (PM₁₀), tema deste trabalho, é de importância para a avaliação da exposição humana aos compostos prejudiciais à saúde presentes na atmosfera. O conjunto de técnicas e metodologias empregadas para a amostragem das partículas respiráveis (PM₁₀), a extração do material orgânico, o fracionamento e, as análises químicas para a identificação e quantificação dos compostos de interesse juntamente com os testes biológicos foram ferramentas fundamentais para a caracterização do material particulado atmosférico.

O fracionamento em fase sólida baseado nas diferenças de polaridade dos solventes apresentou estratégias operacionais vantajosas além de inércia química inerente aos procedimentos.

As avaliações sobre a caracterização química indicaram que diferentes classes de compostos estão distribuídas ao longo das frações de polaridades diferentes, evidenciando um procedimento de fracionamento adequado. Em praticamente todas as frações foi observada a presença de compostos orgânicos oxigenados, hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e outras espécies.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foram detectados nas frações menos polares do extrato em diclorometano do material particulado. Alguns dos HPAs identificados são considerados altamente carcinogênicos e/ou mutagênicos.

As espécies inorgânicas estão concentradas nas frações mais polares em ambos os extratos porém, estão em maior concentração no extrato em acetona.

A atividade mutagênica está distribuída em um grande número de frações evidenciando a presença de compostos mutagênicos diferentes. Algumas frações se mostraram muito mais mutagênicas do que outras.

Compostos mutagênicos diretos e indiretos mutagênicos foram responsáveis pela atividade mutagênica do material.

Os efeitos biológicos das frações individuais, quando somados, são menores do que o efeito da mistura complexa original, mostrando a existência do efeito sinérgico na mistura.

Os estudos indicaram que o material particulado atmosférico coletado em uma determinada região urbana de São Paulo apresenta atividade mutagênica relativamente alta. Sabe-se que a temperatura e as condições climáticas são fatores importantes que podem modificar significativamente a atividade mutagênica do material particulado (Valerio *et al.*, 1991). Assim, estudar o material particulado atmosférico em diferentes períodos do ano e em outros sítios urbanos se faz necessário.

Neste trabalho, a caracterização química do material particulado atmosférico da cidade de São Paulo permitiu o reconhecimento de classes de compostos através de alguns compostos individuais presentes na fase particulada atmosférica.

As frações de interesse, que apresentaram maior mutagenicidade também foram caracterizadas quimicamente.

7. RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Algumas recomendações são apresentadas para a continuidade deste trabalho.

- Amostragem do material particulado atmosférico em outros sítios urbanos e em diferentes períodos do ano. Comparação e interpretação dos resultados para

avaliar a contribuição das fontes de emissão e a influência das condições climáticas.

- Utilização de padrões analíticos para a confirmação dos diferentes compostos orgânicos presentes nas frações utilizando a cromatografia a gás/espectrometria de massas.
- Sub-fracionamento das frações mais mutagênicas dos extratos em DCM e ACE por cromatografia a líquido de alta eficiência seguido de caracterizações dessas sub-frações.
- Aplicação de métodos químicos com alta sensibilidade nas sub-frações para uma melhor caracterização das frações.
- Aplicação dos testes de mutagenicidade nas sub-frações.
- Utilização de cepas de *Salmonella* TA98NR e TA98/1,8-DNP selecionadas para a detecção de compostos diretamente mutagênicos como os nitro-derivados dos HPAs.
- Análise por LC/MS das sub-frações mais polares de ambos os extratos que apresentam atividade mutagênica para a identificação de compostos mais polares que não podem ser analisados por GC/MS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONIS, M. e GIL, L. Mutagenicity of organic extracts from Santiago (Chile) airborne particulate matter. **Mutat. Res.**, 292: 51-61 (1993).
- AGURELL, E. e STENSMAN, C. *Salmonella* mutagenicity of three complex mixtures assayed with the microsuspension technique. A WHO/IPCS/CSCM study. **Mutat. Res.**, 276:87-91 (1992).
- ALLEN, A.G.; MIGUEL, A.H. Biomass burning in the amazon: characterization of the ionic component of aerosols generated from flaming and smouldering rainforest and savannah. **Environ. Sci. Technol.**, 29: 486-493 (1995).
- ALLEN, D.T.; PALEN, E. Recent advances in aerosol analysis by infrared spectrometry. **J. Aerosol Sci.**, 20: 441-455 (1989).
- ALSBERG, T.; STENBERG, U.; WESTERHOLM, R.; STRANDELL, M.; RANNUG, U.; SUNDVALL, A.; ROMERT, L.; BERNSON, V.; PETTERSSON, B.; TOFTGARD, R.; FRANZEN, B.; JANSSON, J.; GUSTAFSSON, J.A.; EGEBAÄCK, K.E.; TEJIE, G. Chemical and biological characterization of organic material from gasoline exhaust particules. **Environ. Sci. Technol.**, 19: 43-50 (1985).
- AMES, B.; MCCANN, J.; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. **Mutat. Res.**, 31: 347-364 (1975).
- ANDRADE, F.; ORSINI, C.; MAENHAUT, W. Relation between aerosol sources and meteorological parameters for inhalable atmospheric particles in São Paulo city, Brazil. **Atmos. Environ.**, 28: 2307-2315 (1994).
- APPEL, B.R.; TOKIWA, Y.; HAIK, M.; KOTHNY, E.L. Artifact particulate sulfate and nitrate formation on filter media. **Atmos. Environ.**, 18 (2): 409-416 (1984).
- AREY, J.; HARGER, W.P.; HELMIG, D.; ATKINSON, R. Bioassay-directed fractionation of mutagenic PAH atmospheric photooxidation products and ambient particulate extracts. **Mutat. Res.**, 281: 67-76 (1992).

- ATKINSON, R. e AREY, J. Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: Formation of atmospheric mutagens. **Environ. Health Perspect.**, 102: 117-126 (1994).
- BAGLEY, S.T.; STOLTZ, S.L.; BECKER, D.M.; KEEN, R.E. Characterization of organic extracts from standard reference materials 1649, "urban dust/organics", and 1650, "diesel particulate matter", using a microsuspension assay. A WHO/IPCS/CSCM study. **Mutat. Res.**, 276: 81-86 (1992).
- BALL, J.C. e YOUNG, W.C. Evidence for a new class of mutagens in diesel particulate extracts. **Environ. Sci. Technol.**, 26: 2181-2186 (1992).
- BARALE, R.; GIROMINI, L.; DEL RY, S.; BARNINI, B.; BULLERI, M.; BARRAI, I.; VALERIO, F.; PALA, M.; H.E., J. Chemical and mutagenic patterns of airborne particulate matter collected in 17 Italian towns. **Environ. Health Perspect.**, 102 (suppl.4): 67-73 (1994).
- BARALE, R.; GIROMINI, L.; GHELARDINI, G.; SCAPOLI, C.; LOPRIENO, N.; PALA, M.; VALERIO, F.; BARRAI, I. Correlations between 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the mutagenicity of the total PAH fraction in ambient air particles in La Spezia (Italy). **Mutat. Res.**, 249: 227-241 (1991).
- BARALE, R.; ZUCCONI, D.; GIORGELLI, CARDUCCI, A.L.; TONELLI, M.; LOPRIENO, N. Mutagenicity of airborne particles from a nonindustrial town in Italy. **Environ. Mol. Mutagen.**, 13: 227-233 (1989).
- BARNABAS, I.J.; DEAN, J.R.; HITCHEN, S.M.; OWEN, S.P. Supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides from an aqueous matrix. **J. Chromatogr. A**, 665: 307-315 (1994).
- BLOEMEN, H.J.T.; VOOGD, C.E.; RAMLAL, M.; SICHERER-ROETMAN, A. The fractionation of extracts of ambient particulate matter for mutagenicity testing. **Atmos. Environ.**, 22: 2803-2808 (1988).
- BOHM, G. M.; SALDIVA, P.H.N.; PASQUALUCCI, C.A.G.; MASSAD, E.; MARTINS, M.A.; ZIN, W.A.; CARDOSO, W.V.; CRIADO, P.M.P.; KOMATSUZAKI, M.; SAKAE, R.S.; NEGRI, E.M.; LEMOS, M.; CAPELOZZI, V.M.; CRESTANA, C.; SILVA, R. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. **Environ. Res.**, 49: 208-216 (1989).
- BOWADT, S. e HAWTHORNE, S.B. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. **J. Chromatogr. A**, 703: 549-571 (1995).

- BUTLER, J.P.; KNEIP, T.J.; DAISEY, J.M. An investigation of interurban variations in the chemical composition and mutagenic activity of airborne particulate organic matter using an integrated chemical class/bioassay system. **Atmos. Environ.**, 21: 883-892 (1987).
- CAMEL, V.; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. Analytical-scale supercritical fluid extraction: a promising technique for the determination of pollutants in environmental matrices. **J. Chromatogr.**, 642: 263-281 (1993).
- CARVALHO, L.R.F.; SOUZA, S.R.; DE MARTINIS, B.S.; KORN, M. Monitoring of the ultrasound irradiation effect on the extraction of airborne particulate matter by ion chromatography. **Anal. Chim. Acta**, 371: 171-179 (1995).
- CASELLAS, M.; FERNANDEZ, P.; BAYONA, J.M.; SOLANAS, A.M. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic componentes in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). **Chemosphere**, 30 (4): 725-740, (1995).
- CASS, G.R. Comments on sources, atmospheric levels, and characterization of airborne particulate matter. **Inhalation Toxicol.**, 7: 765-768 (1995).
- CASS, G.R.; HANNIGAN, M.P.; LAFLEUR, A.L.; LONGWELL, J.P.; THILLY, W.G. Bacterial mutagenicity of urban organic aerosol sources in comparison to atmospheric samples. **Environ. Sci. Technol.**, 28: 2014-2024 (1994).
- CETESB (1993) Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo - 1992, Série Relatórios.
- CETESB (1994) Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo - 1993, Série Relatórios.
- CETESB (1995) Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo - 1994, Série Relatórios.
- CHANG, T.Y. e RUDY, S.J. Ozone-forming potential of organic emissions from alternative-fueled vehicles. **Atmos. Environ.**, 24A (9): 2421-2430 (1990).
- CHEN, B.H.; WANG, C.Y.; CHIU, C.P. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, 44: 2244-2251 (1996).
- CHRISP, C. E. e FISHER, G.L. Mutagenicity of airborne particles. **Mutat. Res.**, 76: 143-164 (1980).
- CHUANG, J.C.; WISE, S.A.; CAO, S.; MUMFORD, J.L. Chemical characterization of mutagenic fractions of particles from indoor coal combustion: A study of lung cancer in Xuan Wei, China. **Environ. Sci. Technol.**, 26: 999-1004 (1992).

- CICCIOLI, P.; BRANCALEONI, E.; CECINATO, A.; SAPRAPANI, R. Identification and determination of biogenic and anthropogenic volatile organic compounds in forest areas of northern and southern Europe and a remote site of the Himalaya region by high-resolution gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, 643: 55-69 (1993).
- CICCIOLI, P.; CECINATO, A.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M.; ZACCHEI, P.; DE CASTRO VASCONCELOS, P. The ubiquitous occurrence of nitro-PAH of photochemical origin in airborne particles. **Ann. Chim. (Roma)**, 85: 455-469 (1995).
- CLAIBORN, C.; MITRA, A.; ADAMS, G.; BAMESBERGER, L.; ALLWINE, G.; KANTAMENENI, R.; LAMB, B.; WESTBERG, H. Evaluation of PM₁₀ emission rates from paved and unpaved roads using tracer techniques. **Atmos. Environ.**, 29: 1075-1089 (1995).
- CLAXTON, L.D. Characterization of automotive emissions by bacterial mutagenesis bioassay: a review. **Environ. Mutagen.**, 5: 609-631 (1983).
- CREBELLI, R.; CONTI, L.; CROCHI, B.; CARERE, A.; BERTOLI, C.; DEL GIACOMO, N. The effect of fuel composition on the mutagenicity of diesel engine exhaust. **Mutat. Res.**, 346: 167-172 (1995).
- CREBELLI, R.; FUSELLI, S.; CONTI, G.; CONTI, L.; CARERE, A. Mutagenicity spectra in bacterial strains of airborne and engine exhaust particulate extracts. **Mutat. Res.**, 261: 237-248 (1991).
- CREBELLI, R.; FUSELLI, S.; MENEGUZ, A.; AQUILINA, G.; CONTI, L.; LEOPARDI, P.; ZIJNO, A.; BARIS, F.; CARERE, A. In vitro and in vivo mutagenicity studies with airborne particulates extracts. **Mutat. Res.**, 204: 565-575 (1988).
- DAISEY, J.M. In: **Toxic air pollution: a comprehensive study of non-criteria air pollutants**. p. 45-65. (LIOY, J.P., DAISEY, J.M., eds) Lewis Publishers, Michigan, (1987).
- DAISEY, J.M.; ALLEN, C.F.; MCGARRITY, G.; ATHERHOLT, T.; LOUIS, J.; MCGEORGE, L.; LIOY, P.J. Effects of filter type on the organic composition and mutagenicity of inhalable particulate matter. **Aerosol Sci. Technol.**, 5: 69-80 (1986).
- DAISEY, J.M.; GUNDEL, L.A. In: **Environmental carcinogens methods of analysis and exposure measurement**. 12, p. 315-325. (Seifert, B.; van de Wiel; Dodet, B. and O'Neil, I.K., eds) IARC Scientific Publications n. 109, Lyon (1993).

- DE FLORA, S. Metabolic deactivation of mutagens in the *Salmonella*-microsome test. **Nature**, (London) 271: 455-456 (1978).
- DE MARTINIS, B.S.; KADO, N.Y.; CARVALHO, L.R.F.; GUNDEL, L.A.; OKAMOTO, R.A. Polar organic compounds and genotoxicity of airborne particulate matter less than 10 μm (PM_{10}) collected from São Paulo, Brazil. **Mutat. Res.**, submetido para publicação.
- DE SERRES, F.J. e SHELBY, M.D. The *Salmonella* mutagenicity assay: recommendations. **Science**, (Washington) 203: 563-564 (1979).
- DEMARINI, D.M., SHELTON, M.L.; BELL, D.A. Mutat. spectra of chemical fractions of a complex mixture: role of nitroarenes in the mutagenic specificity of municipal waste incinerator emissions. **Mutat. Res.**, 349: 1-20 (1996).
- ESKINJA, I.; SOLJIC, Z.; SVEL-CEROVECKI, S.; ESKINJA, M.; SOJAT, V. Sources and fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air of urban and rural croatian sites. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, 63: 251-268 (1996).
- FALCON, M.S.G.; AMIGO, S.G.; YUSTY, M.A.L.; VILLAIZAN, M.J.L.A.; LOZANO, J.S. Enrichment of benzo[a]pyrene in smoked food products and determination by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. **J. Chromatogr. A**, 753: 207-215 (1996).
- FRITZ, J.S.; DUMONT, P.L.; SCHMIDT, L.W. Methods and materials for solid-phase extraction. **J. Chromatogr. A**, 691: 133-140 (1995).
- GALCERAN, M.T.; MOYANO, E. Determination of hydroxy polycyclic hydrocarbons by liquid chromatography-mass spectrometry. Comparison of atmospheric pressure chemical ionization and electrospray. **J. Chromatogr. A**, 731: 75-84 (1996).
- GREENBERG, A., LWO, J.; ATHERHOLT, T.B.; ROSEN, R.; HARTMAN, T.; BUTLER, J.; LOUIS, J. Bioassay-directed fractionation of organic compounds associated with airborne particulate matter: an interseasonal study. **Atmos. Environ.**, 27A: 1609-1626 (1993).
- GREENBERG, A., WANG, Y.; DARACK, F.B.; HARKOV, R.; LOUIS, J.B.; ATHERHOLT, T. Biologically-directed fractionation of four seasonal extracts of airborne particulates and related chemical studies. **Polycyclic Aromat. Compd.**, 1: 233-250 (1990).

- GUNDEL, L.A.; DAISEY, J.M.; CARVALHO, L.R.F.; KADO, N.Y.; SCHUETZLE D. Polar organic matter in airborne particles: Chemical characterization and mutagenic activity. **Environ. Sci. Technol.**, 27: 2112-2119 (1993).
- GUNDEL, L.A.; MAHANAMA, K.R.R.; DAISEY, J.M. Fractionation of polar organic extracts of airborne particulate matter using cyanopropyl-bonded silica in solid-phase extraction. **J. Chromatogr.**, 629: 75-82 (1993).
- HAWTHORNE, S.B.; MILLER, D.J.; LANGENFELD, J.J.; KRIEGER, M.S. PM-10 high-volume collection and quantitation of semi- and nonvolatile phenols, methoxylated phenols, alkanes, and polycyclic aromatic hydrocarbons from winter urban air and their relationship to wood smoke emissions. **Environ. Sci. Technol.**, 26: 2251-2262 (1992).
- HAYAKAWA, K.; KAWAGUCHI, Y.; MURAHASHI, T.; MIYAZAKI, M. Distributions of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler. **Mutat. Res.**, 348: 57-61 (1995).
- HERMANN, M. Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. **Mutat. Res.**, 90: 399-409 (1981).
- HUGHES, T.J.; PELLIZZARI, E.; LITTLE, L.; SPARACINO, C.; KOLBER, A. Ambient air pollutants: collection, chemical characterization and mutagenicity testing. **Mutat. Res.**, 76: 51-83 (1980).
- IWADO, H.; NAITO, M.; HAYATSU, H. Mutagenicity and antimutagenicity of air-borne particulates. **Mutat. Res.**, 246: 93-102 (1991).
- JANDA, V.; BARTLE, K.D.; CLIFFORD, A.A. Supercritical fluid extraction in environmental analysis. **J. Chromatogr.**, 642: 283-299 (1993).
- KADO, N.Y.; COLOME, S.D.; KLEINMAM, M.T.; HSIEH, D.P.H.; JAQUES, P. Indoor-outdoor concentrations and correlations of PM10-associated mutagenic activity in nonsmokers and "asthmatics" homes. **Environ. Sci. Technol.**, 28: 1073-1078 (1994).
- KADO, N.Y.; LANGLEY, D.; EISENSTADT, E. A simple modification of the *Salmonella* liquid-incubation assay: increased sensitivity for detecting mutagens in human urine. **Mutat. Res.**, 121: 23-25 (1983).
- KANG LI, C.; KAMENS, R.M. The use of polycyclic aromatic hydrocarbons as source signatures in receptor modeling. **Atmos. Environ.**, 27A: 523-532 (1993).

- KELLY, G. W.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A.; SCAMMELLS, D. Identification and quantification of polycyclic aromatic compounds in air particulate and diesel exhaust particulate extracts by LC/MS. **J. Chromatogr. Sci.**, 31: 73-76 (1993).
- KHESINA, A. Y. Urban air pollution by carcinogenic and genotoxic polyaromatic hydrocarbons in the former USSR. **Environ. Health Perspect.**, 102: 49-53 (1994).
- KISS, G.; VARGA-PUCHONY, Z.; HLAVAY, J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid-phase extraction and column liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 725: 261-272 (1996).
- KRETZSCHMAR, J.G. Particulate matter levels and trends in Mexico city, São Paulo, Buenos Aires and Rio de Janeiro. **Atmos. Environ.**, 28: 3181-3191 (1994).
- LANÇAS, F.M.; DE MARTINIS, B.S.; MATTA, M.H.R. Supercritical fluid extraction (SFE) using an inexpensive home made system. **J. High Resolut. Chromatogr.**, 13: 838-839 (1990).
- LEE, H.K. Recent application of gas and high-performance liquid chromatographic techniques to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates. **J. Chromatogr. A**, 710: 79-92 (1995).
- LEE, M.L.; NOVOTNY, M.V.; BARTLE, K.D. Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds. Academic Press, New York, (1981). 462 p.
- LEE, W.J.; WANG, Y.F.; LIN, T.C.; CHEN, Y.Y.; LIN, W.C.; KU, C.C.; CHENG, J.T. PAH characteristics in ambient air traffic-source. **Sci. Total Environ.**, 159: 185-200 (1995).
- LI, C.K.; KAMENS, R.M. The use of polycyclic aromatic hydrocarbons as source signatures in receptor modeling. **Atmos. Environ.**, 27A: 523-532 (1993).
- LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. **Química Nova**, 19: 497-516 (1996).
- MARON, D.M. e AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, 113: 173-215 (1983).
- MATSUSHITA, H.; ENDO, O.; GOTO, S.; SHIMIZU, H.; MATSUMOTO, H.; TAMAKAWA, K.; ENDO, T.; SAKABE, Y.; TOKIWA, H.; ANDO, M. Collaborative study using the preincubation *Salmonella typhimurium* mutation assay for airborne particulate matter in Japan. A trial to minimize interlaboratory variation. **Mutat. Res.**, 271: 1-12 (1992).

- MAY, W.E.; BENNER JR., B.A.; WISE, S.A.; SCHUETZLE, D.; LEWTAS J. Standard reference materials for chemical and biological studies of complex environmental samples. **Mutat. Res.**, 276: 11-22 (1992).
- MAYER, M.L. e POOLE, C.F. Identification of the procedural steps that affect recovery of semi-volatile compounds by solid-phase extraction using cartridge and particle-loaded membrane (disk) devices. **Anal. Chim. Acta**, 294: 113-126 (1994).
- MIGUEL, A.G.; DAISEY, J.M.; SOUSA, J.A. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. **Environ. Mol. Mutagen.**, 15: 1-8 (1990).
- MIGUEL, A.H. Poluição atmosférica urbana no Brasil: Uma visão geral. **Química Nova**, 15: 118-125 (1992).
- MOLLER, L.; SCHUETZLE, D.; AUTRUP, H. Future research needs associated with the assessment of potencial human health risks from exposure to toxic ambient air pollutants. **Environ. Health Perspect.**, 102: 193-210 (1994).
- MOLLER, M. e ALFHEIM I. Mutagenicity of air samples from various combustion sources. **Mutat. Res.**, 116: 35-46 (1983).
- MORRIS, W.A.; VERSTEEG, J.K.; BRYANT, D.W.; LEGZDINS, A.E.; MCCARRY, B.E.; MARVIN, C.H. Preliminary comparisons between mutagenicity and magnetic susceptibility of respirable airborne particulate. **Atmos. Environ.**, 23: 3441-3450 (1995).
- NAGAO, M.; YAHAGI, T.; SEINO, Y.; SUGIMURA, T.; ITO, N. Mutagenicities of quinoline and its derivatives. **Mutat. Res.**, 42: 335-342 (1977).
- NIELSEN, T.; RAMDAHL, T.; BJORSETH, A. The fate of airborne polycyclic organic matter. **Environ. Health Perspect.**, 47: 103-114 (1983).
- NILES, R. e TAN, Y.L. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons and mononitrated derivatives in air and diesel particulates. **Anal. Chim. Acta**, 221: 53-63 (1989).
- NISHIOKA, M.L.; CHUANG, C.C.; PETERSEN, B.A.; AUSTIN, A.; LEWTAS, J. Development and quantitative evaluation of a compound class fractionation scheme for bioassay-directed characterization of ambient air particulate matter. **Environ. Int.**, 11: 137-146 (1985).
- OLSON, B.; MCDONALD JR., J.; NOBLITT, T.; LI, Y.; LEY, M. Modifying role of trace elements on the mutagenicity of benzo[a]pireno. **Mutat. Res.**, 335: 21-26 (1995).

- PACYNA, J.M. In: **Aiborne particulate matter**. p. 69-97. (KOUIMITZIS, T. e SAMARA, C., eds) Springer, Berlin, (1995).
- PASCHKE, T.; HAWTHORNE, S.B.; MILLER, D.J.; WENCLAWIAK, B. Supercritical fluid extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel exhaust particulate matter. **J. Chromatogr.**, 609: 333-340 (1992).
- PELTONEN, K. e KULJUKKA, T. Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. **J. Chromatogr. A**, 710: 93-108 (1995).
- PIETRINI, R.V.; BLANCO, S.; ARROYO, S.G. Mutagenicity assesement of airborne particles in Mexico city. **Atmos. Environ.**, 29 (4): 517-524 (1995).
- PYYSALO, H.; TUOMINEN, J.; WICKSTROM, K.; SKYTÄ, E.; TIKKANEN, L.; SALOMAA, S.; SORSA, M.; NURMELA, T.; MATTILA, T.; POHJOLA, V. Polycyclic organic material (POM) in urban air. Fractionation, chemical analysis and genotoxicity of particulate and vapour phases in an industrial town in Finland. **Atmos. Environ.**, 21 (5): 1167-1180 (1987).
- RANADE, M.B.; WOODS, M.C.; CHEN, F-L.; PURDUE, L.J.; REHME, K.A. Wind tunnel evaluation of PM10 samplers. **Aerosol Sci. Technol.**, 13: 54-71 (1990).
- REISS, R.; RYAN, P. B.; TIBBETTS, S.J.; KOUTRAKIS, P. Measurement of organic acids, aldehydes, and ketones in residential environments and their relation to ozone. **J. Air Waste Manage Assoc.**, 44: 811-822 (1995).
- ROGGE, W.F.; MAZUREK, M.A; HILDEMAN, L.M.; CASS, G.R.; SIMONEIT, B.R.T. Quantification of urban organic aerosols at a molecular level: identification, abundance and sazonal variation. **Atmos Environ.**, 27: 1309-1330 (1993).
- SALMEEN, I.T.; PERO, A.M.; ZATOR, R.; SCHUETZLE, D.; RILEY, T.L. Ames assay chromatograms and the identification of mutagens in diesel particles extracts. **Environ. Sci. Technol.**, 18: 375-382 (1984).
- SÃO PAULO. Secretaria de Estado do Meio Ambiente. **Por um transporte sustentável**: diretrizes e proposta preliminar de anteprojeto de lei de política de controle de poluição veicular e transporte sustentável. SMA, São Paulo, 1997. 227 p.
- SATO, M.I.Z.; VALENT, G.U.; COIMBRÃO, C.A.; COELHO, M.C.L.S.; SANCHEZ, P.S.; ALONSO, C.D.; MARTINS, M.T. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. **Mutat. Res.**, 335: 317-330 (1995).

- SAVARD, S., OTSON, R.; DOUGLAS, G.R. Mutagenicity and chemical analysis of sequential organic extracts of airborne particulates. **Mutat. Res.**, 276: 101-115 (1992).
- SCHAUER, J.J.; ROGGE, W.F.; HILDEMAN, L.M.; MAZUREK, M.A.; CASS, G.R.; SIMONEIT, B.R.T. Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers. **Atmos. Environ.** 30: 3837-3855 (1996).
- SCHUETZLE, D. DAISEY, J.M. In: **Genetic Toxicol. of complex mixtures**. p. 11-32. (Waters *et al.*, eds.). Plenum Press, New York (1990).
- SCHUETZLE, D. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. **Environ. Health Perspect.**, 47: 65-80 (1983).
- SEINFELD, J.H. **Air pollution**: physical and chemical fundamentals. McGraw-Hill, New York, (1975).
- SHREEDHARA MURTHY, R.S.; CRANE, L.J.; BRONNIMANN, C.E. Characterization of cyano bonded silica phases from solid-phase extraction columns. Correlation of surface chemistry with chromatographic behavior. **J. Chromatogr.**, 542: 205-220 (1991).
- SICHERER-ROETMAN, A.; RAMLAL, M.; VOOGD, C.E.; BLOEMEN, H.J.T. The fractionation of extracts of ambient particulate matter for mutagenicity testing. **Atmos. Environ.**, 22: 2803-2808 (1988).
- SIOUTAS, C. In: **Airborne particulate matter**. p. 201-231. (KOUIMITZIS, T. e SAMARA, C., eds) Springer, Berlin, (1995).
- SMITH, D.J.T.; HARRISON, R.M.; LUHANA, L.; CASIMIRO, A.P.; CASTRO, L.M.; MOHAMMAD N.T.; HAYAT, S.; QURAISHI, T. Concentrations of particulate airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and metals collected in Lahore, Pakistan. **Atmos. Environ.**, 30: 4031-4040 (1996).
- SNYDER, J.L.; GROB, R.L.; McNALLY M.E.; OOSTDTK, T.S. Comparison of supercritical fluid extraction with classical sonication and Soxhlet extractions for selected pesticides. **Anal. Chem.**, 64: 1940-1946 (1992).
- SOUZA, S.R.; CARVALHO, L.R.F. Determinação de ácidos carboxílicos na atmosfera urbana de São Paulo. Uma abordagem analítica ambiental. **Química Nova**, 20: 245-251 (1997).
- STEVENS, J.B. e SWACKHAMER, D.L. Environmental pollution. **Environ. Sci. Technol.**, 23 (10): 1180-1186 (1989).

- TANCELL, P.J.; RHEAD, M.M.; PEMBERTON, R.D.; BRAVEN, J. Survival of polycyclic aromatic hydrocarbons during diesel combustion. **Environ. Sci. Technol.**, 29: 2871-2876 (1995).
- TOKIWA, H.; NOBUYUKI, S.; NAKASHIMA, A.; NAKASHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; SHIGEMATU, N. Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulate pollutants. **Environ. Health Perspect.**, 102: 107-116 (1994).
- TUOMINEN, J.; SALOMAA, S.; PYYSALO, H.; SKYTTÄ, E.; TIKKANEN, L.; NURMELA, T.; SORSA, M.; POHJOLA, V.; SAURI, M.; HIMBERG, K. Polynuclear aromatic compounds and genotoxicity in particulate and vapor phases of ambient air: effect of traffic, season, and meteorological conditions. **Environ. Sci. Technol.**, 22: 1228-1234 (1988).
- VALERIO, F e PALA, M. Effects of temperature on the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPAs) adsorbed onto airborne particulates. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 339: 777-779 (1991).
- VAN CAUWENBERGHE, K. e VAECK L.V. Toxicological implications of the organic fractions of aerosols: a chemist's view. **Mutat. Res.**, 116: 1-20 (1983).
- VAN DER VELDE, E.G.; DIETVORST, M.; SWART, C.P.; RAMLAL, M.R.; KOOSTSTRA. Optimization of supercritical fluid extraction of organochlorine pesticides from real soil samples. **J. Chromatogr. A**, 683: 167-174 (1994).
- VAN DER VELDE, E.G.; HAAN, W. de; LIEM, K.D. Supercritical fluid extraction of polychlorinated biphenyls and pesticides from soil. Comparison with other extraction methods. **J. Chromatogr.**, 626: 135-143 (1992).
- VELLOSI, R.; VANNUCCHI, C.; BIANCHI, F.; FIORIO, R.; ROSELLINI, D.; CIACCHINI, G.; GIACONI, V.; BRONZETTI, G. Mutagenic activity and chemical analysis of airborne particulates collected in Pisa (Italy). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 52: 465-473 (1994).
- WANG, C-J.; LIN, Y-L.; LIN, J-K. Mutagenicity and cytotoxicity of nitropyrrole compounds derived from the reaction of 2-acetyl pyrrole with nitrite. **Food. Chem. Toxicol.**, 32(9): 839-844 (1994).
- WATANABE, T.; KOHAN, M.J.; WALSH, D.; BALL, L.M.; DeMARINI, D.M.; LEWTAS, J. Mutagenicity of nitrodibenzopyranones in the *Salmonella* plate-incorporation and microsuspension assays. **Mutat. Res.**, 345: 1-9 (1995).

- WONG, J.M.; KADO, N.Y.; KUZMICKY, P.A.; NING, H.-S.; WOODROW, J.E.; HSIEH, D.P.H.; SEIBER, J.N. Determination of volatile and semivolatile mutagens in air using solid adsorbents and supercritical fluid extraction. **Anal. Chem.**, 63: 1644-1650 (1991).
- ZEIGER, E.; ANDERSON, B.; HAWORTH, S.; LAWLOR, T.; MORTELMANS, K. *Salmonella* mutagenicity tests: V. results from the testing of 311 chemicals. **Environ. Mol. Mutagen.**, 19: 2-13 (1992).
- ZINBO, M.; SCHUETZLE, D.; HSIEH, D.P.H.; KADO, N.Y.; DAISEY, J.M.; GUNDEL, L.A. An improved fractionation procedure for the bioassay-directed chemical analysis of ambient air particulate extracts. **Anal. Sci.**, 8 : 461-468 (1992).