IARA TEREZINHA QUEIROZ PEREIRA DOS SANTOS

Avaliação da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleos com *Tradescantia pallida* cv. Purpurea

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciência

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Marisa Domingos

São Paulo

2004

A Messias, Livia e Junior
dedico esta
Tese

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e determinação para atingir esta meta, mostrando-me com sabedoria sempre novos caminhos.

A meus pais por sempre me incentivarem em todas as minhas conquistas.

A amiga Izildinha por sempre me ouvir e aconselhar no andamento desse trabalho.

A bióloga Dra. Marisa Domingos, do Instituto de Botânica pela participação e sugestões na elaboração desse trabalho.

A química Dra. Mitiko Saiki, do IPEN pelas análises químicas e participação nesse trabalho.

A empresa Polibrasil e em especial a Fadigas, Ana Virginia, Cláudio Evaristo e sua equipe do laboratório, pela ajuda na troca de conhecimentos e caracterização do resíduo catalítico.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela credibilidade e incentivo, à Débora Lobo e à Ana Julia pela dedicação a este trabalho.

A Messias, Livia e Junior meus agradecimentos pela compreensão de minha ausência nos momentos que seriam dedicados a vocês.

SUMÁRIO

RESUMO

SUMMARY

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	2
<u>1.1. Crescimento industrial, poluição ambiental e efeitos na saúde humana</u>	2
<u>1.2. Bioindicadores vegetais de clastogenicidade</u>	4
<u>1.3. Processo industrial de produção de polipropileno e geração dos resíduos catalíticos na forma de pasta e de licor</u>	22
<u>1.4. Objetivos e Justificativas</u>	42
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	46
<u>2.1 Características químicas dos resíduos catalíticos na forma de pastas e de licor</u>	46
<u>2.1.1. Concentrações de metais e álcool séc-butílico</u>	46
<u>2.1.2 Análises do potencial iônico</u>	48
<u>2.2. Avaliação do potencial clastogênico dos resíduos catalíticos com inflorescências de <i>Tradescantia pallida</i> cv. Purpúrea (Bioensaio Trad-MCN)</u>	49
<u>2.2.1. Preparação das soluções aquosas com os resíduos catalíticos na forma de pasta e licor</u>	49
<u>2.2.2. Bioensaio Trad-MCN</u>	50
<u>2.3. Análise estatística</u>	57
<u>3. RESULTADOS</u>	59

<u>3.1 Características químicas dos resíduos catalíticos na forma de pasta e de licor</u>	59
3.1.1 Concentrações de metais e álcool séc-butílico	59
3.1.2 Análises do potencial iônico	62
<u>3.2. Bioensaios Trad-MCN realizados com as soluções preparadas com os resíduos catalíticos</u>	68
<u>3.3. Comparações entre pH e frequência de micronúcleos</u>	76
<u>4. DISCUSSÃO</u>	80
<u>5. CONCLUSÕES</u>	93
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	97

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1. Processo de obtenção dos resíduos catalíticos tipo ZN- Zigler Natta , na forma de pasta e de licor.</u>	<u>25</u>
<u>Figura 2. Estágios da meiose durante a qual ocorre a formação de micronúcleos (MA, 1981).</u>	<u>55</u>
<u>Figura 3. Procedimentos de preparo de lâminas para a contagem dos micronúcleos (MA, 1981).</u>	<u>56</u>
<u>Figura 4. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).</u>	<u>63</u>
<u>Figura 5. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com o licor, nas diferentes diluições utilizadas no bioensaio e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas (por diferença mínima significativa $p < 0,05\%$).</u>	<u>65</u>
<u>Figura 6. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.</u>	<u>67</u>
<u>Figura 7. Perfis médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.</u>	<u>68</u>
<u>Figura 8. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grão de pólen de inflorescências mantidas nas diferentes soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).</u>	<u>69</u>
<u>Figura 9. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas diferentes soluções preparadas com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).</u>	<u>71</u>
<u>Figura 10. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas soluções -controle negativo e positivo e nas diferentes soluções preparadas com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.</u>	<u>74</u>
<u>Figura 11. Perfis médios de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas soluções controle negativo e positivo e nas diferentes soluções preparadas com pasta e licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas($p < 0,05\%$).</u>	<u>75</u>
<u>Figura 12. Valores médios de pH nas soluções com diferentes diluições preparadas com a pasta e de frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências expostas às mesmas.</u>	<u>76</u>
<u>Figura 13. Valores médios de pH nas soluções com diferentes diluições preparadas com o licor e de frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências expostas às mesmas.</u>	<u>78</u>

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1. Concentrações dos elementos obtidos nos resíduos catalíticos na forma de pasta (base seca) e de licor pelo método da análise por ativação com nêutrons.</u>	61
<u>Tabela 2. Concentrações dos elementos obtidos nos resíduos catalíticos na forma de pasta (base seca) e de licor pelo método da análise por espectrofotometria de absorção atômica.</u>	61
<u>Tabela 3. Análise descritiva dos dados de pH das soluções preparadas com a pasta.</u>	63
<u>Tabela 4. Análise descritiva dos dados de pH das soluções preparadas com o licor.</u>	66
<u>Tabela 5. Análise descritiva dos dados obtidos no bioensaio Trad-MCN realizado com as diferentes soluções da pasta.</u>	70
<u>Tabela 6. Análise descritiva dos dados obtidos no bioensaio Trad-MCN realizado com as diferentes soluções do licor.</u>	72

RESUMO

SANTOS, I.T.Q.P. Avaliação da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleos com *Tradescantia pallida* cv. Purpurea. São Paulo, 2004. 102 p. Tese (Doutorado)-Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Este trabalho apresenta uma série de experimentos para avaliação do potencial clastogênico de resíduos de indústria de polipropileno, na forma de licor e de pasta, utilizando o bioensaio de micronúcleos (Trad-MCN; mutações em células-mãe de grãos de pólen) com inflorescências de *Tradescantia pallida* cv. Purpurea. Inflorescências jovens foram parcialmente mergulhadas, por 8 horas, em soluções aquosas dos resíduos catalíticos na forma de licor e de pasta, com crescentes diluições. Utilizou-se como controle positivo solução de formaldeído 0,1% e como controle negativo água deionizada. As frequências de micronúcleos obtidas para ambos os resíduos foram, em grande parte, similares às observadas nas inflorescências do controle negativo, indicando que estes têm baixa toxicidade genética. Comparativamente, a pasta apresentou, embora baixo, maior potencial clastogênico que o licor, estando esses efeitos relacionados, provavelmente, com a concentração, solubilidade e biodisponibilidade das espécies químicas nas diferentes soluções, características determinadas pelo potencial iônico nas soluções (pH). Os metais Ti e Al, presentes em altas concentrações na forma de óxidos no resíduo pastoso, não proporcionaram mudanças significativas da frequência de micronúcleos, por estarem na forma química não tóxica às plantas. A diminuição do pH

nas soluções com as diluições crescentes da pasta pareceu não ter sido suficiente para solubilizar e/ou decompor esses óxidos metálicos. As mudanças no perfil da curva de pH das soluções com as diluições crescentes do licor foram acompanhadas por mudanças no perfil da curva de frequência de micronúcleos, indicando que componentes presentes em soluções mais ácidas e diluídas tenderam a se tornar mais tóxicos do que os de soluções mais concentradas e menos ácidas. Sugerimos que Ti e Al iônicos também não induziram a formação de micronúcleos, uma vez que os valores de pH das soluções mais diluídas do licor foram sempre iguais ou superiores a 5,8.

SUMMARY

SANTOS, I.T.Q.P. Clastogenicity evaluation of industrial catalytic waste using the micronucleus bioassay with *Tradescantia pallida* cv. Purpurea. São Paulo, 2004. 102 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

This work presents a series of experiments to evaluate the clastogenicity potential of the liquid and solid wastes produced by a polypropylene industry, named liquor and cake respectively, using the Trad-MCN bioassay (mutations in pollen mother cells) with inflorescences of *Tradescantia pallida* cv. Purpurea. Young Inflorescences were partially exposed “in vivo”, for 8 hour, in solutions with increasing dilutions of both catalytic wastes. Formaldehyde solution 0.1% and deionized water were used as positive and negative controls. The micronucleus occurrences for both wastes were similar to those observed in the inflorescences of the negative control, showing that these wastes have low genotoxicity. Comparing both residues wastes, the cake showed low, but higher clastogenic potential than the liquor, being this effect probably related to the concentrations, solubility and biodisponibility of chemical species present in each solution, which are determined by the ionic potential in the solution (pH). Ti and Al oxides, present in high concentrations in the cake waste did not cause significant changes in micronucleus frequency due to their low toxicity to the plants. The pH reduction of the cake solutions with increasing dilutions seemed not to be sufficient to solubilize and decompose these metallic oxides. Changes

in pH curve of the liquor solutions were followed by changes in micronucleus curve, indicating that some components present in the more acidic and diluted solutions showed higher toxicity than in the more concentrated and less acidic ones. We suppose that ionic Ti and Al did not induce the micronucleus formation, considering that the pH values of the more diluted solutions were equal or superior than 5.8.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Crescimento industrial, poluição ambiental e efeitos na saúde humana

No último século, tem se assistido ao apogeu da intervenção do homem sobre o planeta, com a crescente industrialização e o aumento do crescimento populacional. O surgimento das indústrias de produtos químicos não foi acompanhado da análise de impacto ambiental, da avaliação de suas emissões e do direcionamento adequado da disposição dos resíduos gerados durante a operação e após o término de uma planta industrial. Por isso, nos últimos 70 anos, temos observado resultados desastrosos desse processo desordenado e lutado para entender quais são

os efeitos dessa corrida pelo desenvolvimento ao planeta e a seus habitantes.

O aumento dos contaminantes na água, solo e ar têm despertado a atenção da população para os efeitos danosos na biosfera. Associações entre a poluição atmosférica e a morte causada por danos respiratórios em seres humanos em São Paulo, preferencialmente em crianças e idosos, foram relatados por SALDIVA et al (1994 e 1995). Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de correlacionar o efeito da poluição do ar com a saúde humana, verificando que esses episódios de mortalidade ocorrem em regiões de grande concentração de poluentes, principalmente em períodos desfavoráveis para a sua dispersão. Ratos, quando expostos a poluição urbana, também mostraram alta reação pulmonar que, no entanto, pôde ser revertida quando os animais foram removidos para uma área não poluída (PEREIRA et al 1995).

Talvez o mais notório episódio da relação entre poluição e saúde tenha acontecido em Londres em 1952, no qual uma nuvem de poluentes permaneceu estacionada sobre a cidade devido a condições

meteorológicas desfavoráveis à sua dispersão, ocorrendo um aumento significativo da mortalidade (LOGAN, 1953).

Uma grande variedade de contaminantes em reservatórios de água surgiu devido ao excessivo uso de pesticidas, fertilizantes, resíduos químicos e biológicos. O efeito danoso desses poluentes em corpos d'água ainda é pouco conhecido. TUTHILL; CALABRESE (1979) apud MA et al, (1984a) e BRENNIMAN (1981) apud RUIZ, et al (1992) relacionaram o aumento da pressão arterial com o aumento dos íons sódio e bário na água potável. Altas concentrações de nitrato na água potável têm sido associadas à elevada taxa de mortalidade infantil, devido a formação de meta-hemoglobina, conforme relatado por GELPERIN (1975) apud RUIZ, et al, (1992). Devido ao desenvolvimento industrial, os metais pesados também estão presentes em concentrações elevadas em corpos d'água, representando um risco potencial aos seres humanos e plantas, devido a sua toxicidade aguda.

1.2.Bioindicadores vegetais de clastogenicidade

Geralmente, muitas substâncias que poluem ar, água e solo podem potencialmente exercer algum efeito clastogênico sobre os seres vivos, o

qual pode ser delimitado por métodos biológicos. Porém, no caso de águas naturais, a presença de agentes mutagênicos é mascarada pelo grau de diluição que estes agentes sofrem ao serem adicionados na água, não querendo dizer que estes agentes não afetem o ecossistema. Assim, para identificar a toxicidade crônica induzida por baixas concentrações desses agentes na água, é preciso escolher a ferramenta de monitoramento mais adequada. Isso é igualmente verdadeiro para avaliação da toxicidade crônica de contaminantes do ar e do solo. Nesse sentido, bioensaios vegetais são muito úteis, pois tem a capacidade de detectar baixo nível de clastogenicidade, tanto em períodos curtos de exposição *in situ* quanto em condições experimentais (FANG, 1981).

Os efeitos dos poluentes sobre as plantas podem ocorrer em diversos níveis, sendo que muitas dessas reações podem ser utilizadas como critérios de avaliação das mudanças ambientais em estudos de biomonitoramento. Estas plantas, usadas para tal finalidade, são denominadas bioindicadoras.

Macroscopicamente, podem ser observadas necroses, cloroses e descolorações em folhas ou outras partes da planta, além da queda de folhas e diminuição no seu crescimento. Em nível de ultra-estrutura,

observam-se alterações na estrutura fina dos componentes celulares, como o desarranjo de organelas e paredes celulares. Efeitos fisiológicos e bioquímicos são também detectáveis, tais como alterações nas trocas gasosas, bem como em outras etapas do processo fotossintético e atividades enzimáticas. Pode, ainda, ocorrer a formação de espécies ativas de oxigênio, que têm alto poder oxidativo e são extremamente tóxicas e, finalmente, o acúmulo do poluente nos tecidos vegetais (MUDD; KOZLOWSKI, 1975; MANNING; FEDER, 1980; DÄSSLER; BORTITZ, 1988). Os poluentes podem ser potencialmente mutagênicos, provocando um aumento na taxa de ocorrência de mutações e outros efeitos genotóxicos, em comparação ao nível espontâneo (CONSTANTIN, 1982; ENNEVER et al., 1988; RODRIGUES et al., 1997).

Bioindicadores podem ser definidos, assim, como organismos ou conjunto de organismos que reagem a perturbações ambientais, por meio de alterações nas suas funções vitais ou composição química, podendo ser, assim, usados para avaliação da extensão das mudanças em seu ambiente (ARNDT; SCHWEIZER, 1991).

Várias espécies vegetais podem ser utilizadas como bioindicadoras da presença de substâncias poluentes. Estas substâncias vêm causando grandes distúrbios ambientais há muito tempo, especialmente nos países das regiões temperadas. Nesses países, o emprego sistemático de plantas para tal finalidade remonta ao início da década de 20, quando as alterações na composição em espécies e o grau de agressões observadas nas plantas que integravam o ecossistema, forneciam índices do impacto da poluição em áreas sob a influência de fumaça proveniente da queima de carvão. Desde então, essa abordagem tem sido sistematicamente utilizada nesses países, empregando-se espécies nativas locais ou de interesse agrícola.

A utilização das plantas como bioindicadoras da qualidade do ar, da água e do solo, com vistas ao prognóstico de riscos à saúde humana, apresenta uma série de vantagens, destacando-se as seguintes:

- As plantas superiores são organismos eucarióticos cuja complexidade genética (em termos de quantidade total de DNA por núcleo, genes estruturais, organelas, morfologia cromossômica, etc.) é similar à do homem; são multicelulares com complexa estrutura orgânica; possuem desenvolvimento embrionário onde, também, ocorrem determinação,

competência e hereditariedade celular (CONSTANTIN, 1982).

- A manutenção de plantas é de fácil execução e acessível, quando comparado à criação e manutenção de animais.
- As plantas podem ser regeneradas a partir de células mutantes, o que facilita o desenvolvimento e o estudo de linhagens mutantes e mais sensíveis aos agentes modificadores do ambiente.
- Possuem ciclos de vida curtos, podendo ser empregadas em curto período.
- As plantas podem ser expostas a uma gama de condições ambientais, sendo possível realizar experimentos “in situ” e testes “in vivo”, permitindo a avaliação de contaminantes de solos, águas, atmosfera e de substâncias específicas.
- Apresenta alta sensibilidade (baixa ocorrência de resultados falso-negativos), sendo, por exemplo, apropriada para avaliações de risco à exposição a agentes mutagênicos químicos e físicos (ENNEVER et al., 1988).
- Os vegetais não são tão mais sensíveis do que os humanos a ponto de não poderem ser utilizados como bioindicadores,

para avaliação da situação de risco imposta pela poluição urbana e industrial à população humana.

O uso de bioindicadores vegetais de genotoxicidade representa uma alternativa simples, eficiente, rápida e de baixo custo para avaliar o potencial genotóxico de agentes contaminantes ambientais, permitindo inclusive a difusão de técnicas de biomonitoramento “in situ” e testes “in vivo” em locais que disponham apenas de condições básicas de investigação. Além disto, os bioensaios vegetais permitem avaliar a genotoxicidade de substâncias químicas simples a misturas complexas, o que é de suma importância na avaliação da poluição ambiental (GRANT, 1994).

Nas regiões tropicais e subtropicais, no entanto, o biomonitoramento dos efeitos de poluentes aéreos com emprego de plantas é pouco difundido, existindo apenas iniciativas isoladas em alguns países (ARNDT; SCHWEIZER, 1991). No entanto, esta metodologia pode ser de grande aplicabilidade e fornecer informações rápidas e seguras visando à avaliação das mudanças nas condições ambientais introduzidas por atividades antrópicas e, ainda, prever riscos de danos à saúde das populações humanas dos grandes centros urbanos e industriais.

Desde os primórdios dos estudos da atividade genética de compostos químicos, vários clones do gênero *Tradescantia* têm sido utilizados como organismos bioindicadores, em virtude de uma série de características genéticas favoráveis. Apresentando apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, células de quase todas as partes da planta, da ponta da raiz ao tubo polínico em desenvolvimento, fornecem material excelente para estudos citogenéticos (MA; GRANT, 1982).

Como consequência do uso intenso de *Tradescantia* em estudos genéticos, encontrou-se uma série de características que permitem a detecção de agentes que afetam a estabilidade do genoma. Pelo menos quatro dessas características foram selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação do potencial clastogênico. Dois desses ensaios, o da mitose em ponta de raiz e o do tubo polínico, são ensaios de aberração cromossômica, nos quais se observam deformações morfológicas visíveis nos cromossomos (MA, 1982). Um terceiro, o ensaio da mutação para célula cor-de-rosa em pêlo estaminal (Trad-SHM) é um teste de mutação mitótica pontual, que se baseia na expressão de um gene recessivo para cor da flor em plantas heterozigotas (UNDERBRINK et al., 1973). O quarto ensaio é um teste citogenético

que se baseia na formação de micronúcleos (Trad-MCN), que resultam da quebra cromossômica nas células-mãe de grãos de pólen, devido a um agente ou perturbação ambiental que afetou o genoma (Ma, 1979). Esses dois últimos bioensaios encontram-se bem desenvolvidos e padronizados para realização de estudos “in situ” (RODRIGUES et al., 1997).

Com o intuito de avaliar a sensibilidade, eficiência e confiabilidade do bioensaio em Trad-MCN, quatro produtos químicos foram testados em cinco laboratórios independentes de cinco países diferentes. Este estudo foi realizado sob responsabilidade do IPCS-“International Programme on Chemical Safety” e todos os participantes utilizaram o protocolo padrão para o bioensaio. Os resultados reportados por todos os laboratórios, embora não fossem iguais, foram bastante concordantes. Com esse estudo, confirmou-se que o bioensaio Trad-MCN é um teste eficiente, confiável e rápido para a avaliação da clastogenicidade. Além disso, é um ensaio adequado para monitoramento “in situ”, em ambientes poluídos (MA et al., 1994).

O ensaio Trad-MCN pode ser efetuado colhendo inflorescências de plantas adultas envasadas ou plantadas em canteiros (testes “in situ”) ou

com suas inflorescências parcialmente imersas na solução a ser investigada (testes “in vivo”). O pequeno porte das plantas adultas de *Tradescantia* possibilita a fácil portabilidade em vasos, para os experimentos “in situ”. Uma vantagem adicional do ensaio é referente ao curto período de exposição necessário para se efetuar um teste (8 horas), seguido de um período de recuperação de cerca de 24 horas, para permitir que as células meióticas, expostas ao agente em estudo durante a prófase, atinjam o estágio de tétrade jovem, apropriado para a contagem de micronúcleos.

Dentre algumas limitações do bioensaio Trad-MCN, destacamos a sua alta sensibilidade, que resulta em consideráveis variações na frequência espontânea de micronúcleos entre diferentes ensaios, implicando, desta forma, na necessidade de um freqüente controle das condições experimentais e da execução simultânea de amostras controle (MA, 1981).

Uma revisão crítica sobre estudos em que foram utilizados os bioensaios protocolados para *Tradescantia*, revelou que o potencial mutagênico de um amplo espectro de agentes químicos já foi avaliado utilizando os bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM, desde pesticidas,

compostos orgânicos, gases de combustão, poluentes do ar, produtos domésticos, águas para consumo provenientes de rios e lagos, bebidas, radiações, medicamentos, despejos industriais e misturas complexas (RODRIGUES et al, 1997; MA et al, 1984b). Abaixo, encontram-se descritos exemplos de estudos realizados com o objetivo de definir o grau de mutagenicidade de diferentes contaminantes de água e solo.

A mutagenicidade de substâncias presentes em água de lago e em água potável foi avaliada durante dois anos consecutivos, em Macomb, Illinois, utilizando o bioensaio de micronúcleos com o clone 03 de *Tradescantia*, observando-se um aumento significativo das mutações em meses mais chuvosos. Dentre os 15 elementos avaliados nas amostras de água, seis apresentaram variação sazonal da concentração, tais como nitrito, amônia, manganês, fosfato e cloreto. Um acentuado aumento na concentração dos íons fosfato e manganês, em meados de julho e outubro respectivamente, foi relacionado com a maior frequência de ocorrência de micronúcleos no bioensaio. Os outros elementos medidos, tais como chumbo, cromo, cádmio, cobre, prata, arsênio, selênio e zinco, mantiveram-se consistentemente em baixas concentrações durante o ano. O valor de pH das amostras de água apresentou algumas flutuações, de 6,5 a 8,4, durante todo o ano (MA et al, 1984a).

A clastogenicidade do 2,4 dinitrotolueno e do 2,6 dinitrotolueno, que são dois dos seis isômeros de dinitrotolueno usados na produção de tolueno, diaminas, diisocianato, corantes, explosivos e propelentes, foi testada com o bioensaio Trad-MCN. Estes produtos têm sido detectados no solo, águas superficiais e profundas, fazendo parte da lista de poluentes prioritários definidos pela Agencia de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA). A agencia internacional de pesquisa de câncer (IARC) determinou que estes compostos são possivelmente carcinogênicos para humanos, mostram efeitos hepatocarcinogênicos em ratos e causam a redução do número de espermatozóides em animais. Estes produtos são altamente tóxicos a organismos aquáticos, incluindo peixes, invertebrados, algas, protozoários e bactérias. O bioensaio foi proposto devido ao fato de haver pouca informação referente a mutagenicidade dessas substâncias, com respeito aos receptores ecológicos no ambiente. Inflorescências do clone 4430 foram expostas durante 6 horas a diferentes soluções dessas substâncias químicas para avaliação da curva dose resposta, após o que a frequência de micronúcleos foi estimada. A dose mínima efetiva foi determinada em 30 mg/l e 135 mg/l para o 2,4 DNT e 2,6 DNT, respectivamente, mostrando resultado positivo em termos de genotoxicidade. Além disso, maior tempo de exposição, cerca de 30h, sem tempo de recuperação a

concentrações de 150mg/l de 2,4 DNT e 180 mg/l de 2,6 DNT não induziram a um aumento significativo na frequência de ocorrência de micronúcleos no bioensaio, provavelmente devido a ausência do tempo de recuperação necessário para mostrar este efeito (GONG et al, 2003).

Um extenso trabalho de revisão sobre a genotoxicidade do formaldeído na forma gasosa e em solução foi realizado por Ma et al (1988), relatando estudos de mutagenicidade, danos no DNA, clastogenicidade (danos em cromossomos), carcinogenicidade e teratogenicidade. Em função dos resultados obtidos nesses estudos, é comum o uso do aldeído fórmico como controle positivo em bioensaios com TRAD-MCN. A alta sensibilidade do cromossomo durante a meiose é atribuída à fácil penetrabilidade do formaldeído na forma gasosa, sendo um contraste com o organismo animal, que possui órgãos, tecidos e etapas metabólicas intermediários, antes que a molécula do formaldeído alcance a célula germinativa (XU; MA, 1997 ; MA; HARRIS, 1988).

A genotoxicidade da lixívia de aterros sanitários da cidade de Queretaro no México foi avaliado pelos bioensaios: TRAD-MCN-mutação em grão de pólen e TRAD-SHM-mutação em pelo estaminal com clone 4430 de *Tradescantia*, e AL-RAA- aberrações em raízes de

alho. Como esperado, as amostras de lixívia coletadas durante a estação seca apresentaram maior genotoxicidade que aquelas coletadas durante a estação chuvosa, devido ao efeito de diluição. Foi confirmada a existência de substâncias na lixívia capazes de induzir a genotoxicidade nos testes com plantas, assim como de verificar as diferenças no grau de sensibilidade dos bioensaios. O ensaio de micronúcleos foi mais sensível que o ensaio de mutação em pelo estaminal (CABRERA; RODRIGUEZ, 1998).

A destinação e deposição de lixívias obtidas de resíduos de mineração são um grande problema, devido ao impacto que causa ao meio ambiente. Com o objetivo de avaliar essas medidas de remediação, simulando o que pode ocorrer na natureza, FOMIN et al (1999) testaram o potencial clastogênico do resíduo *in natura* e em amostras acidificadas a pH = 4, através de dois bioensaios TRAD-MCN e TRAD-SHM, com inflorescências do clone 4430 de *Tradescantia* para verificar a possibilidade de mobilização desses compostos químicos perigosos presentes na lixívia. Esta simulação previu o pior caso de deposição ácida e avaliou a influência do abaixamento do pH na mobilização desses compostos tóxicos para a solução a ser absorvida pela planta, nas diferentes concentrações avaliadas. Este teste foi instrutivo, pois

considerou que estes resíduos dispostos na natureza podem sofrer diferentes diluições em condições naturais de deposição ácida ou quando atingem o lençol freático e corpos d' água. Os autores avaliaram a genotoxicidade dessas soluções de extratos de lixívias provenientes de minas, numa faixa ampla de potencial iônico, de pH = 4 (amostra acidificada) a pH = 8 (lixívia original), com e sem modificação da amostra, respectivamente. Observaram que a concentração de metais pesados foi muito maior na solução acidificada que na solução original da lixívia, intensificando as mutações nas inflorescências de *Tradescantia* e confirmando a mobilização dos metais devido ao ácido nítrico. Além disso, o baixo pH da solução, por si só, não foi responsável pela genotoxicidade observada nos bioensaios, como indicado pela ausência de mutações nas inflorescências mantidas na solução controle de ácido nítrico. O estudo com bioindicadores, especialmente o ensaio com micronúcleos, possui uma importante vantagem sobre os testes mutagênicos tradicionais com bactérias, já que estes testes requerem condições de pH neutro, o que normalmente significa alteração das características da amostra, tais como solubilidade e toxicidade. Além disso, o bioensaio Trad-MCN apresentou maior sensibilidade do que o TRAD-SHM.

Diversos estudos têm avaliado a clastogenicidade em cursos de rios com o bioensaio Trad-MCN e avaliando amostras em diferentes pontos deste curso. A maior frequência de micronúcleos tem sido encontrada nas amostras próximas à descarga da indústria (RUIZ et al., 1992, DUAN et al., 1999).

O bioensaio de micronúcleos com inflorescências do clone 4430 de *Tradescantia* mostrou que não houve indicação de clastogenicidade nas amostras de água para o consumo, nas vizinhanças de Viena e Salzburg, assim como nas dos dois rios principais da região, Danúbio e Salzburg e de um pequeno rio que recebe efluente vindo de uma fábrica de papel. Entretanto, as amostras do rio coletadas na região urbana (rio Donaukanal, um braço do rio Danúbio) e na nascente do rio, próximos ao depósito de resíduos industriais, apresentaram alto potencial mutagênico, que provavelmente deve estar relacionado com a contaminação do lençol freático (STEINKELLNER et al., 1999).

A qualidade das águas mineral natural e carbonatada, engarrafada em recipientes de PET (tereftalato de polietileno), foi avaliada em função do tempo de armazenamento, através do bioensaio de micronúcleos (Trad-MCN) com inflorescências do clone 4430 de *Tradescantia* e do

teste Cometa (danos no DNA em leucócitos humanos). Somente após 9 meses de armazenamento, houve aumento significativo da formação de micronúcleos nas células mães de grão de pólen de *Tradescantia*, que foi associada à presença do plastificante hepato-carcinogênico (DOP- ftalato de dioctila), que provavelmente migra para a água. Amostras retiradas da fonte apresentaram resultado negativo para o teste cometa e Trad-MCN. É sabido que, na formulação de tubulações a base de PVC-policloreto de vinila, utilizava-se o DOP como plastificante, sendo hoje reconhecido como hepato-carcinogênico (BISCARDI et al, 2003).

GILL; SANDHU (1992) avaliaram o potencial tóxico de substâncias químicas tais como trióxido de arsênio, dieldrin e tetraacetato de chumbo, separadas e combinadas, em diferentes proporções (1:1; 1:2 e 2:1), pelo bioensaio Trad-MCN. Este estudo visa avaliar o resultado das amostras preparadas, na proporção desejada, adicionando tanto no solo quanto em solução aquosa. As amostras testes misturadas ao solo apresentaram maior incidência de micronúcleos do que as inflorescências parcialmente imersas em solução, devido ao fato de uma maior absorção do composto tóxico ocorrer via raízes das plantas cultivadas nesse solo. Além disso, foi observado que a clastogenicidade das misturas químicas foi modificada em função da proporção de mistura

usada, não sendo prático predizer o efeito genotóxico de misturas de substâncias químicas a partir de seus componentes separados. O potencial genotóxico pode ser afetado pelo microambiente e efeito sinérgico e antagônico dos diversos componentes, devendo ser testado nas condições e proporções em que essas misturas se encontrem na natureza.

KONG; MA (1999) avaliaram a genotoxicidade de solos contaminados com pesticidas, extraídos por lavagem com água destilada ou com dimetil sulfoxido (DMSO). Diversas concentrações foram preparadas e avaliadas através dos bioensaios Trad-MCN, Trad-SHM e *Allium*-AA-aberrações na raiz do alho, mostrando que o Trad-MCN apresentou a maior eficiência e que as inflorescências mergulhadas nas amostras lavadas com o DMSO apresentaram maior quantidade de micronúcleos do que as mantidas em amostras lavadas com água.

O bioensaio Trad-MCN com o clone 4430 foi usado para verificar o grau de toxicidade de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, antes e após o tratamento com fungos degradadores dos mesmos, para se verificar a eficácia do tratamento de remediação de solos contaminados. Extratos do solo, antes do tratamento

com fungo, a diferentes concentrações, exibiram um forte efeito genotóxico nas células-mãe de grãos de pólen, em comparação com o extrato do solo após tratamento com fungo. Estes resultados indicam que o bioensaio Trad-MCN tem grande potencial para avaliação da eficiência de bioremediação de solos contaminados (BAUD-GRASSET et al., 1993).

Através de estudo experimental comparativo, utilizando raios X como agente mutagênico, comprovou-se que *Tradescantia pallida* cv. Purpurea, uma planta de origem mexicana e amplamente utilizada para fins ornamentais nas cidades brasileiras, tem o mesmo grau de sensibilidade do que o clone 4430 de *Tradescantia*, sendo uma boa alternativa para testes mutagênicos “in situ” em regiões tropicais (SUYAMA et al., 2002).

Estudos experimentais e realizados “in situ” na Cidade de São Paulo, utilizando *T. pallida* como planta bioindicadora e o bioensaio Trad-MCN, demonstraram que a poluição urbana é capaz de promover danos à referida espécie, de forma consistente e reprodutível (BATALHA et al., 1999; GUIMARÃES et al., 2000). Trata-se, portanto, de uma ferramenta importante para monitoramento ambiental. No entanto, um

dos pontos fundamentais que necessita ser explorado é o grau de associação existente entre os achados em bioindicadores com as conseqüentes repercussões para a espécie humana.

1.3. Processo industrial de produção de polipropileno e geração dos resíduos catalíticos na forma de pasta e de licor

O polipropileno é obtido através da polimerização do propeno, utilizando-se catalisador composto de cristais de sal complexo de TiCl_3 e AlCl_3 e cloreto de alquil alumínio, possibilitando incremento no seu rendimento, ou seja, permitindo maior conversão de propeno em polipropileno, por unidade de massa do catalisador consumido.

Este composto complexo possui uma estrutura cristalina definida, regular e homogênea capaz de polimerizar o propeno de maneira específica, formando cadeias de polímero com estrutura molecular estereoespecífica chamada de isotaticidade, que confere regularidade na inserção do iniciador ou catalisador na cadeia polimérica.

A reação de polimerização é composta por uma etapa de iniciação e outra de propagação, na qual o catalisador faz parte da reação.

A etapa de iniciação consiste do seguinte:

A etapa de propagação, por sua vez, é representada pela reação abaixo:

O propeno (C_3H_6) é convertido em polipropileno com o auxílio do catalisador e co-catalisador, sendo a reação desenvolvida em meio constituído por solvente orgânico - isooctano, o qual mantém em suspensão as partículas de polipropileno formadas. Esta suspensão, ou lama, é transformada em pó, após o processo de evaporação do solvente. A seguir, o pó é submetido a processo de secagem. O solvente que foi evaporado, passa por processo de condensação, sendo retornado para a área de tanques, como solvente úmido.

Durante a reação, uma parte do composto catalítico formado, que não reagiu, tem de ser removido do polímero pelo processo de

desativação do catalisador, que consiste na adição de água e SBA – álcool séc-butílico, responsável pela solubilização do TiCl_4 .

A desativação do composto catalítico ocorre de acordo com a seguinte reação:

A reação de desativação do catalisador produz uma pasta branca composta por titânio e alumínio na forma de óxidos, ácido clorídrico, água e etano. Toda esta mistura de catalisador desativado deve ser neutralizada pela adição de Na(OH) ou Na_2CO_3 produzindo o sal NaCl . A etapa de centrifugação é responsável pela separação da mistura de catalisador desativado em duas formas: pasta (“cake”) e efluente líquido, chamado de licor (Figura 1).

Figura 1. Processo de obtenção dos resíduos catalíticos tipo ZN-Zigler Natta , na forma de pasta e de licor.

A pasta é armazenada em caçambas para a disposição em aterro industrial. No Brasil, não existe legislação federal que trata dos resíduos, havendo somente a norma ABNT NBR 10004. Esta norma classifica os resíduos sólidos em classe I - perigoso, classe II – não inerte e classe III – inerte, pela avaliação do extrato solubilizado e lixiviado. A pasta testada nesta tese foi incluída na classe II, por apresentar valores acima do padrão máximo, no teste de solubilização para sódio e cloreto. Este limite máximo no extrato solubilizável é baseado no guia referente à qualidade da água potável da Organização Mundial da Saúde e é atribuída à possibilidade de percolação para o lençol freático durante as

estações chuvosas, que podem incrementar a salinidade da água. Todos os outros parâmetros no teste de lixiviação estão abaixo do limite padrão, conforme a norma ABNT NBR 10004.

O licor ou efluente líquido, a outra parte da mistura do catalisador desativado, após armazenamento no vaso acumulador de licor, é monitorado em termos de pH e, se necessário, é neutralizado. O licor utilizado para realização dos bioensaios neste estudo, após neutralização era direcionado para o Rio Tamanduatei, com as seguintes características: Resíduos sedimentáveis (RS) = 0 ml/l (máximo = 20) , pH = 8 (aceitável entre 6 e 10), Temperatura = 22 a 28⁰C (máximo = 40⁰C), conforme limites definidos pela CETESB (Companhia Tecnologia de Saneamento Ambiental) no licenciamento de operação da planta, baseado no Artigo 19 A do decreto 8468 - lei 997 para disposição em rede de esgoto (Relatório polibrasil – premio fiesp de mérito ambiental 1998).

O Artigo 19 A possui especificação para o pH (6-9), temperatura (< 40 ⁰C), resíduos sedimentáveis (<20ml/l), óleos e graxas (150 mg/l), ausência de solventes, combustíveis e inflamáveis, ausência de substâncias tóxicas para os processos biológicos de tratamento de

esgotos e metais tais como: arsênio (1,5 mg/l), cádmio (1,5 mg/l), chumbo (1,5 mg/l), cianeto (0,20 mg/l), cobre (1,5 mg/l), cromo hexavalente (1,5 mg/l), cromo total (5,0 mg/l), estanho(4,0 mg/l), fenol (5,0 mg/l), ferro solúvel (15,0 mg/l), fluoretos (10,0 mg/l), mercúrio (1,5 mg/l), níquel (2,0 mg/l), prata (1,5 mg/l), selênio (1,5mg/l), sulfato (1000,0 mg/l), sulfeto (1,0 mg/l) e zinco (5 mg/l) que possam causar qualquer tipo de impacto no tratamento de esgoto.

Entre os componentes mais importantes, sob ponto de vista de potencial tóxico, presentes nos resíduos catalíticos citados, especialmente na pasta, encontram-se os metais titânio e alumínio.

A WHO - Word Health Organization, em Genebra, através do órgão americano “Environmental Health Criteria”, em 1982, apresentou uma ampla revisão sobre as características químicas do titânio e seus compostos e sobre seu potencial tóxico, cuja síntese é apresentada a seguir.

O titânio é um metal cinza com número atômico 22 e massa atômica 47,9. É extremamente resistente à corrosão e, na forma de pó ou poeira, é altamente inflamável e explosivo. O estado de oxidação mais

comum é Ti^{+4} , mas também existe com as valências +3 e +2. O Ti ocorre tanto no estado catiônico, na forma de cloreto, fostato e sulfato, como no estado aniônico como titanato de sódio, ferro e cálcio. Titânio metálico, dióxido de titânio e tetracloreto de titânio são os compostos mais amplamente usados na indústria.

O titânio é o nono elemento mais abundante na crosta da terra, sendo amplamente distribuído. O titânio metálico é principalmente usado na indústria de aeronaves e na produção de ligas altamente resistentes a corrosão. É também usado na indústria química como um ligante, devido a sua resistência a corrosão. O TiO_2 é muito usado como pigmento branco em pinturas e coberturas para peças plásticas, cosméticos, assim como corante em alimentos. O TiCl_4 é o intermediário na produção de catalisadores a base de titânio e é, também, usado na síntese de compostos orgânicos a base de titânio.

Devido a sua grande afinidade com o oxigênio e com outros elementos, o titânio não existe no estado metálico na natureza. A concentração média na crosta da terra é 4400mg/Kg. A concentração de titânio no ar urbano é, na maioria das vezes, abaixo de $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$, embora os níveis excedam $1,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, especialmente nas áreas

industrializadas. Na área rural, a concentração é ainda mais baixa. No ambiente de trabalho, a concentração pode alcançar vários mg/m^3 . A concentração de Ti na água potável é geralmente baixa, estando em uma faixa aproximada de 0,5-15 $\mu\text{g/litro}$. Grande variação do nível de titânio, em diferentes tipos de alimentos, tem sido relatada. A dieta típica pode contribuir com 300-400 $\mu\text{g/dia}$, mas têm sido relatadas na literatura maiores ingestões, na faixa de 2 mg/dia .

Informações quantitativas da absorção por inalação do titânio são ausentes. A absorção de Ti no trato intestinal é cerca de 3,0%, assumindo a ingestão diária de 500 μg . A mais alta concentração de titânio tem sido usualmente encontrada nos pulmões, onde é acumulado ao longo de tempo, seguido pelo rim e fígado. Em muitos estudos, as concentrações de Ti no sangue tem sido de 0,02-0,07 mg/l . O titânio atravessa a placenta e atinge o feto. O tempo de meia-vida biológico no homem foi calculado em 320 a 640 dias.

A maioria do titânio ingerido é eliminada, sem ser absorvida. No homem, o titânio é provavelmente excretado com a urina, numa média aproximada de 10 $\mu\text{g/l}$. Excreções por outros meios são desconhecidas.

Estudos experimentais em animais, assim como em humanos, têm mostrado que o titânio em implantes e próteses é extremamente bem tolerado pelo tecido ósseo, não ocorrendo irritação e encapsulamento do metal por tecido fibroso. TiO_2 , silicatos, óxidos e tanatos têm sido usados em várias formulações dermatológicas e cosméticas, sem qualquer conhecimento de efeito adverso.

Estudos de toxicidade aguda e sub-aguda não têm mostrado nenhum efeito danoso do TiO_2 nos pulmões. Trabalhadores expostos a TiO_2 por um longo período, quando autopsiados não apresentaram nenhuma evidência de atividade fibrogênica. Estudos de toxicidade por um longo período mostraram que o titânio, na forma de sal solúvel, quando administrado em camundongos, a concentrações de 5 mg Ti/litro na água de beber não afetou o ciclo de vida.

Uma dose letal foi descrita para nos camundongos expostos aos produtos da hidrólise do TiCl_4 , ou seja, dióxido de titânio e ácido clorídrico, através da inalação por 2h. Exposição acidental a TiCl_4 líquido, após lavagem com água, resultou em queimadura severa da pele, devido à reação exotérmica entre o TiCl_4 e a água.

Vários estudos em animais e humanos têm mostrado que o TiO_2 inalado é biologicamente inerte. Uma pequena fibrose relatada está associada com exposição a vários outros componentes presentes na poeira de TiO_2 . Não há evidência alguma do titânio sendo carcinogênico em humanos.

Neste estudo, necessitamos focar a atenção para os derivados de Ti formados a partir da reação de desativação do catalisador. O TiCl_4 é um produto intermediário da reação de polimerização tipo Ziegler Natta e sua desativação pela adição de água leva a formação do TiO_2 . O TiCl_3 também pode ser usado para formar o complexo catalítico, e é obtido sinteticamente pela redução do TiCl_4 , mas é considerado um produto menos provável, por ser mais instável. Baseando-se nessas informações, podemos supor que o resíduo catalítico deva conter principalmente TiO_2 e quantidades insignificantes de TiCl_3 e TiCl_4 . A presença desses componentes está associada a sua solubilidade na solução. O Ti metálico é solúvel em soluções ácidas diluídas. O TiO_2 é solúvel em soluções alcalinas e em soluções de ácido sulfúrico, enquanto que o TiCl_4 é solúvel em água fria, álcool e soluções diluídas de ácido clorídrico e se decompõe em água quente.

Evidência de atividade mutagênica do titânio e seus compostos é escassa. O composto TiCl_4 tem sido relatado como não mutagênico. Alguns compostos de titânio têm sido testados usando-se um ensaio com *Bacillus subtilis*. Os seguintes compostos foram relatados como negativos neste teste: TiCl_4 , TiCl_3 , TiO_2 , TiB_2 , TiC e TiF_4 .

O alumínio, o outro elemento químico presente em altas concentrações no resíduo pastoso da indústria de polipropileno, é, após o oxigênio, o terceiro elemento mais abundante na crosta da terra (8,1% por peso) e o elemento metálico mais comum. Na natureza, é encontrado somente na forma combinada no solo e em minerais como mica e feldspato, na forma de bauxita e silicatos.

O Al possui número atômico 13 e massa atômica 26,97. O elemento tem um raio iônico pequeno e uma valência de +3. Isto implica num forte caráter polar. O Al^{+3} prefere coordenar com o oxigênio, formando, em presença de água, espécies octaédricas hexahidratadas. Este complexo se mantém estável em condições de baixo pH. Entretanto, à medida que o pH aumenta, reações de polimerização Al - hidróxido ocorrem, resultando em uma série de complexos de Al-OH. O $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$

domina em $\text{pH} < 5$ e o $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ em $\text{pH} > 6,2$, enquanto a mistura de espécies Al-OH existe na faixa de $5 < \text{pH} < 6,2$.

A química do alumínio em águas é complexa, devido às cinco características do alumínio. Primeiro é anfôtero, sendo mais solúvel em soluções ácidas e em soluções básicas do que em solução neutra. Este íon forma complexo solúvel com cloreto, fluoreto, nitrato, fosfato e sulfato. Terceiro, o Al pode formar complexos fortes com ácidos húmicos e fúlvicos. Quarto, íons hidróxidos podem reagir com íons alumínio para formar polímeros solúveis e insolúveis. Quinto, sob determinadas condições, a solução de alumínio em água atinge o equilíbrio muito lentamente.

Literatura sobre alumínio da U.S. EPA (1988) relata diversos trabalhos que citam as toxicidades aguda e crônica com animais aquáticos, toxicidade em plantas aquáticas e bioacumulação, mostrando ser muito difícil definir um nível de toxicidade. Testes agudos foram realizados com alumínio em pH entre 6,5–9,0, com 14 espécies de animais em água doce. Em muitos testes, menos de 50% dos organismos foram afetados na concentração mais alta testada. Tanto a ceriodaphnia quanto a truta foram afetadas em concentrações abaixo de $4000 \mu\text{g/L}$,

entretanto outras espécies de peixes e invertebrados não foram afetadas pela concentração de 45000µg/L. Alguns pesquisadores sugeriram que a toxicidade aguda do alumínio aumentava com o pH, enquanto outros sugeriram que o oposto era verdade. Três estudos foram conduzidos avaliando-se a toxicidade crônica do alumínio a animais aquáticos. O valor crônico para *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubis* foi de 742,2 e 1908 µg/L, respectivamente. A diatomácea *Cyclotella meneghiniana* e a alga verde *Selenastrum capricornutum* foram afetadas pela concentração de alumínio na faixa de 400-900µg/l. Algas unicelulares mostraram-se mais sensíveis a alumínio do que as outras plantas. O crescimento da diatomácea *Cyclotella meneghiniana* foi inibido em concentração de 810µg/L e a espécie morreu em 6480µg/L. A alga verde *Selenastrum capricornutum* foi tão sensível ao alumínio quanto à diatomácea. No entanto, um valor de consenso para grau de toxicidade de Al para organismos aquáticos ainda não pode ser sugerido porque nenhum teste padronizado foi conduzido com uma espécie aquática chave, para a qual uma curva dose resposta tenha sido estabelecida.

O critério estabelecido pela EPA define que a toxicidade do alumínio é mínima em água doce com pH na faixa de 6,5-9,0, protegendo os peixes, os invertebrados e os organismos do efeito do íon

hidrogênio. Nesta faixa de pH, o alumínio ocorre na forma predominantemente monomérica, dimérica, hidróxido polimérica, complexado com ácido húmico, fosfatos, sulfatos e menos na forma de anion. O critério americano de qualidade de água para proteção de organismos aquáticos estabelece o valor médio máximo para o Al em 87µg/L, podendo ser ultrapassada somente uma vez a cada três anos e a concentração média horária de alumínio não pode exceder 780µg/L, podendo ser ultrapassada somente uma vez a cada três anos.

Devido a grande variedade de formas de alumínio em ambiente aquático e a falta de informação definitiva sobre a toxicidade relativa a espécies aquáticas, nenhuma metodologia analítica conhecida é considerada ideal para expressar o critério de toxicidade para a vida aquática em relação ao alumínio. A medida de metais e metalóides em solução acidificada está sendo proposta como a melhor metodologia a ser implementada, até o momento, podendo também ser usada para efluentes aquosos. Esta análise mede o alumínio presente na solução, após filtração em membranas de 0,45µm, e previamente acidificada na faixa de pH 1,5 - 2,0. É utilizada esta faixa de pH para que todas as formas de alumínio, que são tóxicas a vida aquática ou possam ser prontamente convertidas a forma tóxica sob condições naturais, sejam

detectadas. Algumas formas, tais como alumínio adsorvido em minerais, areias ou materiais particulados não podem ser medidas, mas também não são tóxicas e são pouco prováveis de se tornarem tóxicas em condições naturais. Entretanto, complexos solúveis, precipitados, carbonatos e hidróxidos precipitados de alumínio, que podem existir em qualquer efluente ou se dissolverem quando o efluente é diluído com a água, podem ser detectados por esta metodologia (Environmental Protection Agency-U.S. EPA, 1988). Assim, espera-se que haja uma padronização da metodologia analítica para determinação das concentrações de alumínio dissolvido, solúvel e total, para que se possa estabelecer com precisão o potencial tóxico dos resíduos industriais contendo alumínio.

GALVIN (1991) mostrou que as dinâmicas do alumínio, do ferro e do manganês, em reservatórios de água são semelhantes, isto é, há um gradiente de concentrações destes metais com a profundidade. O alumínio é mais concentrado em profundidades maiores, onde o pH é menor.

A quantidade total de Al em uma pessoa sadia é estimada em 30-100 mg. Maiores concentrações são encontradas nos pulmões, esqueleto

e músculos (WILTERS, 1990). Pacientes com overdose de alumínio como, por exemplo, aqueles que passam por diálise crônica, apresentam maior depósito de Al nos ossos e, quando esta capacidade foi esgotada, níveis elevados nos tecidos do cérebro são encontrados. As maiores fontes de Al são a água usada para preparar a diálise e a ingestão de alumínio contido nos ligantes de fosfatos. É evidente o aparecimento de toxicidade clínica quando o Al é acumulado nos tecidos e interfere nos processos bioquímicos essenciais, causando doenças como a osteomalacia, as encefalopatias devido a diálise e a Alzheimer. A toxicidade do Al se tornou especialmente importante devido à alta neurotoxicidade. Porém, o mecanismo de transporte de minerais essenciais devido ao Al ainda necessita de maiores investigações.

A toxicidade do Al adicionada ao meio ácido tem sido bem documentada em termos de estudos fisiológicos e mortalidade com invertebrados e anfíbios. O Al exerce um efeito danoso na maioria dos organismos de águas naturais, em todos os estágios da vida, nas faixas de concentração 100 – 300µg/L, os quais estão próximos ou abaixo dos valores medidos em muitas águas ácidas (WILTERS , 1990).

A toxicidade do Al está fortemente relacionada com o pH, visto que a espécie química se modifica com o pH. Hidróxidos catiônicos ($\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^+$) predominam na faixa de pH 5,0–5,5, mas é substituído pelo íon trivalente Al^{+3} abaixo de pH 4,5. Na faixa de pH 4,0–4,5, alguns autores acharam que o Al se mostrou temporariamente benéfico comparado com a exposição ácida (WILTERS, 1990).

Neste estudo necessitamos focar a atenção para os derivados de Al formados a partir da reação de desativação do catalisador. O Al na forma de óxido ou hidróxido pode estar presente após a desativação do catalisador, pela adição de água, levando a formação do Al_2O_3 e / ou $\text{Al}(\text{OH})_3$. Se o meio estiver fortemente básico, poderá ocorrer a formação de espécies tipo aluminato ($\text{Al}(\text{OH})_4^-$). A presença dessas espécies está associada ao pH da solução.

O Al forma, como mencionado previamente, óxido, hidróxido e uma grande variedade de sais. Sendo o íon de alumínio muito pequeno e de carga elevada, ele é fortemente hidrolisado pela água. A reação pode ser escrita como (RUSELL, 1929):

A adição de quantidade ilimitada de base a uma solução contendo Al^{3+} precipita o hidróxido de alumínio (Al(OH)_3). Este é branco ou incolor e tem praticamente o mesmo índice de refração da água, tornando-o difícil de ser visto. Na análise qualitativa do alumínio, o hidróxido torna-se mais visível pela adição de corante aluminon (o sal de amônio do ácido aurintricarboxílico), que forma uma laca vermelha com o hidróxido. Na verdade, hidróxido de alumínio recentemente precipitado não é bem caracterizado estequiometricamente e é mais corretamente considerado óxido de alumínio hidratado, $\text{Al}_x\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

O hidróxido de alumínio é anfôtero e, portanto, se dissolve em excesso de base: $\text{Al (OH)}_3 \text{ (s)} + \text{OH}^- \rightarrow \text{Al(OH)}_4^-$

O metal se dissolve tanto em meio ácido como em meio básico através das reações:

Quando plantas bioindicadoras são usadas para avaliar o potencial tóxico de soluções contendo metais como Ti e Al, é importante saber em que forma química os mesmos estão disponíveis para absorção das plantas e para causar danos a moléculas vitais como os ácidos nucleicos.

Os processos de absorção de cátions metálicos pelas plantas ainda são pouco conhecidos. Absorção ocorre preferencialmente do solo, via raízes, parecendo ocorrer somente na forma iônica livre, através de processos passivos e ativos de transporte. Quando há disponibilidade de água, a absorção de íons metálicos acompanha a da água, que obedece a forças físicas proporcionadas por diferenças de potencial hídrico. Quando não há disponibilidade de água, a absorção acontece somente por difusão (passiva) ou por mecanismos ativos (proteínas carreadoras em sítios das membranas) e transporte dentro da planta por difusão (STREIT; STUMM, 1993).

A biodisponibilidade para absorção depende das características do solo. O levantamento referente a alumínio mostrou que, em solos ácidos, existe a disponibilidade do alumínio nas seguintes espécies: Al-orgânico, AlF^{2+} e $AlOH^{2+}$. Em solos alcalinos, existe a disponibilidade

do alumínio nas seguintes espécies: Al-orgânico e $\text{Al}(\text{OH})^{4-}$ (STREIT; STUMM, 1993).

Não foram encontradas na literatura informações referentes às espécies mais prováveis para o titânio e, neste caso, o parâmetro mais importante a ser avaliado é o pH final da solução e a solubilidade das espécies na faixa de pH estudada.

Titânio, embora seja abundante na litosfera e no solo, é fracamente absorvido e retido pelas plantas (UNDERWOOD, 1977). Níveis médios foliares de titânio de aproximadamente 1mg/Kg tem sido relatada para uma grande variedade de plantas. Por outro lado, as concentrações de alumínio nas plantas variam muito entre as diferentes espécies, havendo plantas que acumulam mais de 1000mg/Kg em suas folhas, sendo consideradas aluminófilas (CHENERY; SPORNE, 1976).

1.4. Objetivos e Justificativas

Os objetivos deste estudo foram:

- Verificar o potencial clastogênico dos resíduos de indústria de polipropileno, na forma sólida (pasta) e líquida (licor), com bioensaio de micronúcleos (Trad-MCN) realizado com inflorescências de *Tradescantia pallida* cv. Purpurea.
- Comparar os dois resíduos em termos de clastogenicidade.

Em São Paulo, a poluição ambiental presente nas áreas industriais são fontes de emissões fixas, controladas pela Companhia Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB). Baseado no estudo do processo produtivo instalado, os tipos de poluentes emitidos pela indústria são facilmente dedutíveis, os quais podem ser minimizados também pelo uso de equipamentos de controle de poluição, evitando emissões fora dos padrões permissíveis. As concentrações dos poluentes atmosféricos, as emissões dos efluentes e o descarte de resíduos industriais são periodicamente monitorados e fiscalizados em São Paulo pela CETESB.

Durante o processo de obtenção de Licença de Operação, a indústria envia uma previsão das emissões atmosféricas, efluentes e resíduos industriais a serem produzidos, para avaliação do melhor direcionamento do efluente e resíduo, de maneira a não gerar efeitos deletérios ao meio ambiente. Porém, essa atitude somente não garante que o meio ambiente estará livre de agressões dos subprodutos industriais, especialmente devido aos efeitos residuais esperados em médio e longo prazos. Tais efeitos residuais, seja no ambiente terrestre ou no aquático, poderiam ser dimensionados por meio do emprego de plantas bioindicadoras, o que poderia se configurar como uma exigência pelos órgãos ambientais. Esses bioensaios com plantas, apesar de agora reconhecidos como excelentes indicadores de toxicidade citogenética da contaminação ambiental por compostos químicos, necessitam ainda de reconhecimento e recomendação pelas autoridades, como uma alternativa para detecção do possível dano genético causado nos organismos devido à descarga de efluentes em corpos d'água ou depósito de resíduos sólidos em aterros industriais.

Com o desenvolvimento desta tese, pretendeu-se contribuir para o levantamento de dados sobre resíduos industriais, na forma líquida lançados em corpos d'água e na forma sólida depositados em aterros

industriais, cuja toxicidade e efeito residual são, atualmente, de difícil delimitação. Pretendeu-se, assim, introduzir um novo conceito para avaliação da poluição industrial e suas eventuais conseqüências para a saúde humana e para o meio ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Características químicas dos resíduos catalíticos na forma de pastas e de licor

A composição da pasta em base úmida é basicamente resíduo de TiO_2 , Al_2O_3 , NaCl e H_2O e a composição do licor é basicamente água, álcool séc-butílico e pequenas quantidades desses resíduos de óxidos e sais.

2.1.1. Concentrações de metais e álcool séc-butílico

As concentrações dos elementos em ambos os resíduos *in natura* foram determinadas pelos métodos de análise por ativação com nêutrons, no Laboratório de Análise por Ativação com Nêutrons do Instituto de

pesquisas Energéticas e Nucleares e por espectrofotometria de absorção atômica no laboratório da empresa Polibrasil Resinas S.A.

Na primeira metodologia analítica, o núcleo do elemento presente na amostras dos resíduos, com secagem por liofilização, é ativado ao interagir com um nêutron por meio de uma colisão inelástica, formando um núcleo composto em estado altamente excitado. Este núcleo composto possui meia vida muito curta, na ordem de 10^{-16} a 10^{-14} s, e perde sua energia pela emissão dos chamados raios gama prontos, resultando na formação de um novo núcleo, que é radioativo. A medida de energia dos raios gama de decaimento e da meia vida deste núcleo radioativo permite a identificação do elemento que deu origem a este radioisótopo.

Na análise por espectrometria de absorção atômica, a amostra de cada resíduo é inicialmente seca em estufa a 100°C , para remoção da água, passando, a seguir, por queima em mufla a 550°C sob fluxo de nitrogênio, para obtenção das cinzas na forma de óxidos. O óxido remanescente é tratado com ácidos sulfúrico (H_2SO_4) e clorídrico (HCl) concentrados, até surgimento dos fumos de H_2SO_4 . A partir deste resíduo final obtido, preparam-se extratos aquosos, onde as concentrações dos

metais são determinadas em espectrofotômetro de absorção atômica, após o estabelecimento de curvas de calibração para cada elemento. O procedimento analítico consiste na queima do extrato aquoso e nebulização dos átomos presentes em chama de acetileno e óxido nítrico, os quais são detectados por uma fonte de luz específica para cada um dos metais avaliados.

A concentração do SBA- álcool séc-butílico presente na amostra de licor foi analisada por cromatografia gasosa. Esta técnica permite a identificação do pico característico do álcool séc-butílico e sua quantificação através do uso de padrões de calibração deste solvente.

2.1.2 Análises do potencial iônico

O potencial iônico das diferentes soluções aquosas preparadas com os resíduos na forma de pasta e licor, utilizadas nos bioensaios descritos a seguir, foi avaliado por meio da determinação do pH. Quanto maior a concentração de íons hidrogênio na solução menor será o pH conforme expressão abaixo.

$$\text{pH} = - \log (\text{H}^+)$$

Esse cuidado foi adotado, pois é sabido que, a depender do potencial iônico das soluções, teremos maior ou menor disponibilidade de titânio e alumínio para serem absorvidos pelas plantas ao longo do bioensaio e, conseqüentemente, uma possível variável a ser considerada na interpretação dos resultados.

As medidas do potencial iônico nas diferentes soluções foram feitas com eletrodos combinados. A leitura do pH de cada solução foi feita somente após sua estabilização iônica. A calibração do aparelho foi feita a partir de solução eletrolítica de KCl 3 molar saturada com AgCl .

2.2. Avaliação do potencial clastogênico dos resíduos catalíticos com inflorescências de *Tradescantia pallida* cv. Purpúrea (Bioensaio Trad-MCN)

2.2.1. Preparação das soluções aquosas com os resíduos catalíticos na forma de pasta e licor

As coletas da pasta e licor foram efetuadas na empresa Polibrasil Resinas S.A, situada no pólo de Capuava, na cidade de Mauá - SP.

Diferentes proporções de ambos os resíduos foram misturadas em água destilada e deionizada, de modo a serem preparadas soluções cada vez mais diluídas, supondo-se ter sido criado, portanto, um gradiente decrescente de concentrações dos elementos tóxicos presentes nos mesmos. As proporções entre quantidade de resíduo e de água utilizadas para preparar as soluções foram 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 (v/v), para pasta e 1:1, 1:2, 1:4, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 e 1:500000 (v/v), para licor.

2.2.2. Bioensaio Trad-MCN

O bioensaio Trad-MCN consiste em um conjunto de procedimentos de exposição de inflorescências jovens de *Tradescantia* a agentes contaminantes, que culmina com a estimativa da frequência de micronúcleos em células mães de grãos de pólen na forma de tétrades. Sua realização permite, assim, a determinação do potencial clastogênico de meios contaminados por tais agentes (MA, 1981).

Micronúcleos são fragmentos acêntricos de cromossomos lesados na prófase I da meiose, durante a formação de grãos de pólen. Esses fragmentos são expulsos do núcleo e aparecem como pequenos núcleos

visíveis no citoplasma nas tétrades de grãos de pólen. A formação e a visualização de micronúcleos ao longo do processo da meiose estão ilustradas na figura 2.

As inflorescências jovens de *Tradescantia* são as ideais para esse tipo de bioensaio, por conterem, no sétimo ou oitavo botão floral, grãos de pólen ainda na forma de tétrades, ideal para a visualização e contagem dos micronúcleos.

No presente estudo, para a realização dos bioensaios com inflorescências de *Tradescantia pallida* cv. *Purpurea*, seguiu-se o protocolo descrito por MA et al. (1981) para os clones de *Tradescantia*. Isso foi possível uma vez que estudos anteriores realizados em São Paulo, como BATALHA et al. (1999), SUIYAMA et al. (2002), GUIMARÃES et al (2000) e SANT'ANNA (2003), demonstraram que o referido protocolo pode ser satisfatoriamente aplicado nos bioensaios com essa cultivar.

As inflorescências de *T. pallida* “*Purpurea*” utilizadas nos bioensaios foram obtidas nos jardins da Faculdade de Medicina da

Universidade de São Paulo, situada na zona oeste da cidade de São Paulo.

Inflorescências jovens, com cerca de 10 a 15 cm de comprimento e com flores ainda fechadas, foram coletadas 24 horas antes do início dos bioensaios e mantidas parcialmente imersas em frascos tipo béquer de 400 ml contendo água destilada e deionizada, sob constante aeração. Após este período, somente as inflorescências túrgidas foram utilizadas nos experimentos.

Grupos distintos de 20 inflorescências jovens foram mantidos parcialmente imersos por 8 horas nas soluções aquosas com crescentes diluições sob constante aeração. A seguir, as inflorescências foram transferidas para solução nutritiva de Hoagland diluída em água (1:3), por um período de 24 horas, sob constante aeração. Esse tempo, denominado tempo de recuperação, é necessário para que a meiose progrida e as células mães de grãos de pólen atinjam a fase de tétrade nos botões jovens das inflorescências.

Além das exposições das inflorescências às soluções preparadas com os resíduos, estabeleceram-se dois grupos controles, os quais continham 20 inflorescências expostas do mesmo modo já descrito.

Um grupo de plantas do grupo controle negativo foi imerso em água destilada e deionizada, ou seja, o mesmo veículo de diluição para as amostras da pasta e de licor avaliadas.

Para confirmação de que o conjunto de inflorescências utilizado nos bioensaios poderia potencialmente reagir a substâncias mutagênicas presentes nas soluções, fato visualizado por meio do aumento da frequência de micronúcleos, e para a aferição da metodologia empregada, utilizamos como controle positivo uma solução 0,1% de formaldeído (Merck), sendo uma substância conhecida mutagênica (XU; MA, 1997 ; MA; HARRIS, 1988).

Após o período de recuperação de 24 horas, as inflorescências de todos os tratamentos foram removidas e fixadas em solução recém preparada de aceto-etanol 1:3 (v/v) por período de 24 horas e, então, armazenadas em etanol a 70%.

Em cada tratamento, selecionou-se o botão floral de inflorescências que continham grãos de pólen na forma de tétrades. Cada botão era usado para o preparo de uma lâmina de microscópio, seguindo o esquema apresentado na figura 3. As anteras desses botões eram separadas e maceradas sobre a lâmina em solução de corante acetocarmin (preparado por fervura de 0,5 g de carmin em 100 ml de ácido acético a 45 %).

Após eliminar os fragmentos de anteras e outros debris sobre a lâmina, colocou-se uma lamínula e aqueceu-se levemente em lamparina a álcool, a aproximadamente 80 °C para fixar o corante. O excesso de corante foi eliminado com uma leve pressão sob folhas de papel absorvente (MA, 1981).

A seguir, o número de micronúcleos foi contado em um grupo aleatório de 300 tétrades por lâmina, em microscópio óptico, sob aumento de 400 X. Para cada tratamento, contou-se o número de micronúcleos em, no mínimo, 10 lâminas. As frequências de micronúcleos foram obtidas dividindo-se o número de micronúcleos pelo número total de tétrades contadas, sendo expressas em número de micronúcleos para cada 100 tétrades. As lâminas foram rotineiramente

codificadas e analisadas pelo mesmo observador, com o código sendo revelado somente após todos os tratamentos terem sido quantificados.

Figura 2. Estágios da meiose durante a qual ocorre a formação de micronúcleos (MA, 1981).

Figura 3. Procedimentos de preparo de lâminas para a contagem dos micronúcleos (MA, 1981).

2.3. Análise estatística

Para verificar se houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos, foi realizada análise de variância (ANOVA). Para os casos em que havia igualdade de variância aplicou-se a análise paramétrica (teste F) e para os que não se alcançou esse pré-requisito, utilizou-se o teste não paramétrico Kruskal Wallis. As diferenças entre os tratamentos foram localizadas por análises de comparações múltiplas, considerando as diferenças mínimas significativas – LSD. O nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0,05$) utilizando o pacote estatístico SPSS versão 10.

RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Características químicas dos resíduos catalíticos na forma de pasta e de licor

3.1.1 Concentrações de metais e álcool séc-butílico

A Tabela 1 mostra as concentrações dos metais presentes no resíduo catalítico, na forma de pasta e licor, pelo método de análise por ativação de nêutrons. Os resultados mostram que a pasta e o licor apresentam cada elemento analisado em concentrações diferentes, sendo que a pasta é muito mais concentrada do que o licor. Titânio é o metal que se apresenta em maiores concentrações em ambos os resíduos (14,8% na pasta e $121 \times 10^{-6} \text{ g mL}^{-1}$ no licor). Os outros elementos químicos analisados estão em concentrações baixas nos dois resíduos, especialmente no licor.

A Tabela 2 mostra os resultados das concentrações dos elementos obtidos no resíduo catalítico na forma de pasta e no licor pelo método de análise por absorção atômica, reforçando os resultados anteriores de maior concentração desses elementos na pasta do que no licor. O teor de Ti encontrado na pasta (15,7%) foi similar ao obtido com a técnica de ativação por nêutron (14,8%), confirmando que este, de fato, é um elemento importante nesse resíduo. Só não é mais importante do que o Al, que foi analisado somente pela técnica de absorção atômica, apresentando-se em concentrações altas (19,8%) na pasta, mas em quantidades bem desprezíveis no licor (287 ppm). Além disso, as concentrações de Fe e Zn são baixas em ambos os resíduos, especialmente, no licor. Por isso, a técnica por absorção atômica, por possuir capacidade de detecção para valores de concentração mais alto do que a de ativação neutrônica, não mostrou as concentrações desses metais com tanta precisão.

A análise por cromatografia gasosa indicou que a concentração de álcool séc-butílico na parte aquosa do resíduo catalítico, ou seja, no licor, onde é adicionado para desativar o catalisador e solubilizar o TiCl_4 não reagido, foi de $296,0 \pm 5,0$ ppm.

Tabela 1. Concentrações dos elementos obtidos nos resíduos catalíticos na forma de pasta (base seca) e de licor pelo método da análise por ativação com nêutrons.

Elementos	Pasta (%)*	Licor (g mL ⁻¹)*
Br	$0,00019 \pm 0,000002$	$75,7 \times 10^{-9} \pm 0,5 \times 10^{-9}$
Co	$0,0135 \pm 0,0002$	$0,68 \times 10^{-9} \pm 0,02 \times 10^{-9}$
Fe	$0,0541 \pm 0,0003$	$375,9 \times 10^{-9} \pm 8,4 \times 10^{-9}$
Ti	$14,8 \pm 0,1$	$121,2 \times 10^{-6} \pm 1,2 \times 10^{-6}$
Zn	$0,000462 \pm 0,000006$	$98,0 \times 10^{-9} \pm 0,9 \times 10^{-9}$

* Resultados de uma determinação. A incerteza foi avaliada usando a estatística contando o erro do padrão e da amostra.

Tabela 2. Concentrações dos elementos obtidos nos resíduos catalíticos na forma de pasta (base seca) e de licor pelo método da análise por espectrofotometria de absorção atômica.

Elementos	Pasta (%)*	Licor (%)*
Al	$19,8 \pm 2,0$	$0,0287 \pm 5,0 \times 10^{-4}$
Ti	$15,7 \pm 2,0$	$< 1,0 \times 10^{-4}$
Fe	$0,0835 \pm 5,0 \times 10^{-4}$	$< 1,0 \times 10^{-4}$
Zn	ND	ND

ND - não detectado

*Média $\pm$ desvio padrão

3.1.2 Análises do potencial iônico

A figura 4 mostra os valores médios de pH das soluções preparadas com a pasta, nas diferentes diluições utilizadas no bioensaio. A Tabela 3 mostra a análise estatística descritiva do pH da pasta para as diferentes soluções preparadas.

Figura 4. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).

Tabela 3. Análise descritiva dos dados de pH das soluções preparadas com a pasta.

Soluções	N	Média	Erro padrão	Mínimo	Máximo
água	19	6,05	0,03	5,75	6,30
1/100000	5	5,95	0,04	5,88	6,08

1/10000	6	5,98	0,02	5,89	6,05
1/1000	4	6,05	0,06	5,92	6,19
1/100	5	6,20	0,03	6,12	6,27
1/10	5	6,52	0,01	6,50	6,55

A análise estatística identificou 3 grupos distintos de potencial iônico nas soluções preparadas. A solução mais concentrada (1/10) apresentou valor de pH mais alto (6,5) do que as demais. Valor intermediário (pH = 6,2) foi obtido para a solução 1/100 e valores de pH similares ao da água (ao redor de 6,0) foram observados nas soluções mais diluídas.

A figura 5 mostra os valores médios de pH das soluções preparadas com o licor, nas diferentes diluições utilizadas no bioensaio. A Tabela 4 mostra a análise estatística descritiva do pH do licor para as diferentes soluções preparadas.

Figura 5. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com o licor, nas diferentes diluições utilizadas no bioensaio e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas (por diferença mínima significativa $p < 0,05\%$).

Tabela 4. Análise descritiva dos dados de pH das soluções preparadas com o licor.

Soluções	N	Média	Erro padrão	Mínimo	Máximo
água	19	6,05	0,03	5,75	6,30
1/500000	5	5,95	0,04	5,83	6,04
1/100000	4	5,98	0,05	5,90	6,13
1/10000	4	5,95	0,04	5,85	6,04
1/1000	4	5,82	0,07	5,74	6,03
1/100	3	6,26	0,08	6,15	6,42
1/10	3	6,27	0,08	6,14	6,40
1/4	10	6,68	0,03	6,46	6,77
1/2	10	6,58	0,01	6,55	6,66
1/1	10	6,63	0,01	6,59	6,69

A análise estatística também evidenciou 3 grupos distintos de potencial iônico nas soluções preparadas. O pH das soluções menos diluídas (1/1, 1/2 e 1/4) estiveram em torno de 6,6, o das soluções com diluição intermediária, 6,3 e o das soluções mais diluídas (a partir de 1/1000), entre 5,9 e 6,0. A partir da diluição de 1/1000, o pH se torna semelhante ao da água utilizada para preparo das soluções (entre 5,8 e 6,0).

A Figura 6 mostra comparativamente os valores médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e com o licor.

Figura 6. Valores médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.

Para ambos os resíduos, observa-se uma diminuição similar do pH com o aumento da diluição. Porém, nas diluições 1/10 e 1/1000, as soluções preparadas com a pasta pareceram ser menos ácidas do que as do licor preparadas com mesmas diluições.

A figura 7 mostra os perfis médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e com o licor, nas mesmas diluições (1/10, 1/100,

1/1000, 1/10000 e 1/100000) e suas dispersões no intervalo de confiança de 95%. As soluções preparadas com a pasta apresentaram pH médio significativamente maior do que as outras.

Figura 7. Perfis médios de pH da água e das soluções preparadas com a pasta e com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.

3.2. Bioensaios Trad-MCN realizados com as soluções preparadas com os resíduos catalíticos

Nas figuras 8 e 9, são apresentadas, respectivamente, as frequências médias de micronúcleos nas células-mãe de inflorescências

de *T. pallida* que permaneceram em contato com as diferentes soluções preparadas com pasta e licor. As tabelas 5 e 6 mostram a análise estatística descritiva dos resultados mostrados nas figuras 8 e 9, respectivamente.

Figura 8. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grão de pólen de inflorescências mantidas nas diferentes soluções preparadas com a pasta e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).

Tabela 5. Análise descritiva dos dados obtidos no bioensaio Trad-MCN realizado com as diferentes soluções da pasta.

Soluções	N	Frequência média de MCN (%)	Erro padrão	Mínimo	Máximo
negativo	13	2,45	0,52	0,00	6,33
1/100000	10	2,34	0,57	0,03	5,70
1/10000	10	1,65	0,45	0,03	5,00
1/1000	15	2,78	0,58	0,00	9,30
1/100	10	3,37	0,59	1,00	6,60
1/10	17	4,41	0,69	1,30	10,43
positivo	20	5,81	0,78	1,90	13,50

Figura 9. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas diferentes soluções preparadas com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).

Tabela 6. Análise descritiva dos dados obtidos no bioensaio Trad-MCN realizado com as diferentes soluções do licor.

Soluções	N	Frequência média de MCN (%)	Erro padrão	Mínimo	Máximo
negativo	13	2,45	0,52	0,0	6,3
1/500000	10	3,66	0,97	0,7	9,3
1/100000	20	3,19	0,40	0,0	6,3
1/10000	20	3,19	0,40	0,0	6,3
1/1000	19	2,18	0,30	0,0	4,0
1/100	20	2,49	0,59	0,0	13,0
1/10	10	1,50	0,47	0,0	4,0
1/4	5	1,77	0,59	0,3	3,4
1/2	4	2,08	0,63	0,6	3,7
1/1	3	1,45	0,80	0,3	3,0
positivo	20	5,81	0,78	1,9	13,5

As frequências médias de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas soluções-controle negativa (água) e positiva (formaldeído 0,1%) foram, respectivamente, 2,45% e 5,81% (tabelas 5 e 6). No entanto, com a finalidade de evitar um viés matemático, somente foram considerados, nas comparações estatísticas, os resultados obtidos para as inflorescências mergulhadas em água (controle negativo), que foi o veículo de diluição dos resíduos.

A figura 8 mostra que a frequência de micronúcleos foi significativamente maior apenas na solução menos diluída da pasta

(1/10), tanto em relação ao controle negativo quanto às demais soluções. Nas demais soluções, não houve aumento significativo na formação de micronúcleos.

A figura 9 mostra que a frequência de micronúcleos é similar nas inflorescências mantidas na água e em todas soluções do resíduo catalítico na forma de licor.

A Figura 10 mostra comparativamente as frequências médias de micronúcleos nas células-mãe de inflorescências de *T. pallida* que permaneceram em contato com as diferentes soluções preparadas com pasta e licor e com os controles positivo e negativo. A figura 11, por sua vez, mostra o perfil médio da frequência de micronúcleos nas inflorescências mantidas nas soluções preparadas com ambos os resíduos e nas soluções-controle.

Em ambas as figuras, é nítido o fato de que as frequências médias de micronúcleos em inflorescências em contato com as diferentes soluções da pasta e do licor foram similares à obtida no controle negativo (água) e foram menores à obtida no controle positivo (formaldeído).

Figura 10. Frequência média de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas soluções -controle negativo e positivo e nas diferentes soluções preparadas com o licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%.

Figura 11. Perfis médios de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências mantidas nas soluções controle negativo e positivo e nas diferentes soluções preparadas com pasta e licor e sua dispersão dentro do intervalo de confiança de 95%. Médias apontadas com letras iguais não diferem significativamente entre si pelo teste de comparações múltiplas ($p < 0,05\%$).

3.3. Comparações entre pH e frequência de micronúcleos

Nas figuras 12 e 13, os valores médios de pH nas soluções com diferentes diluições, preparadas respectivamente com pasta e licor, e de frequência de micronúcleos nas inflorescências expostas às mesmas, foram plotados em conjunto.

Figura 12. Valores médios de pH nas soluções com diferentes diluições preparadas com a pasta e de frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências expostas às mesmas.

A figura 12 mostra que a diminuição na frequência de MCN à medida que as soluções preparadas com a pasta tornaram-se mais diluídas foi claramente acompanhada pela redução nos valores de pH, ou seja, pelo aumento do potencial iônico da solução.

Para o licor, a relação entre o potencial iônico da solução e respectivo potencial clastogênico é diferente, conforme mostra a figura 13. Primeiramente, avaliando ambas as variáveis independentemente, não se observa uma tendência nítida de relação do tipo dose-resposta. Além disso, enquanto nas soluções mais concentradas do licor, quando o pH foi mais alto, observaram-se frequências de micronúcleos menores, nas soluções mais diluídas (a partir de 1/1000), quando o pH das soluções foi mais ácido, houve a tendência de aumento dos danos aos cromossomos, revelado pela maior frequência de micronúcleos.

Figura 13. Valores médios de pH nas soluções com diferentes diluições preparadas com o licor e de frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências expostas às mesmas.

DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

A nítida diferença na frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen de inflorescências de *T. pallida* “Purpurea” expostas aos controles negativo e positivo indicam que o lote de inflorescências utilizado apresentava a capacidade de indicar, caso houvesse, o potencial clastogênico das soluções preparadas com ambos os resíduos. Sendo assim e considerando que as frequências de micronúcleos obtidas nos bioensaios foram geralmente muito próximas às do controle negativo (ver figuras 8 a 11), pode-se considerar que ambos os resíduos catalíticos mostraram baixo potencial clastogênico, no momento de sua produção e antes de sua deposição no aterro industrial, no caso da pasta, ou de seu despejo no rio, no caso do licor.

A frequência média de micronúcleos encontrada no controle negativo foi, também, similar à encontrada nos tratamentos-controle de outros estudos em que foi empregado o bioensaio Trad-MCN com inflorescências de *T. pallida* cv. Purpurea, com vistas a determinar o potencial clastogênico de poluentes presentes no ar, no ambiente urbano da cidade de São Paulo (BATALHA et al. 1999, GUIMARÃES et al. 2000, SANT'ANNA, 2003) ou em ambientes internos de laboratórios nos quais são manipulados reagentes químicos potencialmente tóxicos (MIYAZATO, 1999, ALVES et al, 2003). Esse aspecto reforça que o potencial tóxico dos resíduos foi, de fato, baixo.

Levando em consideração as altas concentrações de Ti e Al encontradas na pasta (tabelas 1 e 2), seria esperado resultado contrário, ou seja, alta incidência de mutação nas inflorescências mantidas nas soluções com esse resíduo, principalmente no que diz respeito ao alumínio, que é dito na literatura possuir alto potencial tóxico. Os resultados do bioensaio utilizando o resíduo catalítico na forma de licor mostram, a princípio, que os baixos teores de Ti e Al presentes não conferiram ao mesmo risco clastogênico potencial.

Caso houvesse algum efeito tóxico dos resíduos *in natura*, este deveria ser atribuído mais ao Al do que ao Ti. Sabe-se que Ti tem alta afinidade com o oxigênio e com outros elementos, de modo que este não existe no estado metálico na natureza, apresentando, por isso, baixa toxicidade. Enquanto o Ti metálico é solúvel em soluções ácidas diluídas, o TiO_2 é solúvel em soluções alcalinas e em soluções de ácido sulfúrico ($\text{pH} < 5,5$) (WHO, 1982). No presente estudo, provavelmente, o TiO_2 não estava solúvel e, por isso, não disponível de absorção para a planta, uma vez que o pH das soluções esteve acima de 5,5 e abaixo da faixa alcalina.

Além disso, segundo informações isoladas, o titânio usado é bem tolerado pelos tecidos humanos em implantes cirúrgicos, assim como compostos de titânio, tais como TiO_2 , silicilatos e tanatos têm sido usados em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentícios, sem nenhum efeito adverso sendo relatado. O composto TiCl_4 foi relatado como não mutagênico. Alguns compostos de titânio foram testados usando-se um ensaio com o *Bacillus subtilis*, estando relatado na literatura como negativos para os seguintes compostos: TiCl_4 , TiCl_3 , TiO_2 , TiB_2 , TiC e TiF_4 (WHO, 1982).

A toxicidade do Al, por sua vez, tem sido bem documentada em termos de estudos fisiológicos e mortalidade com invertebrados e anfíbios. O Al exerce um efeito danoso na maioria dos organismos em águas naturais em todos os estágios da vida nas faixas de concentração 100–300µg/l (WILTERS , 1990). A extensão da toxicidade do Al é dependente da concentração, e da forma química do Al em solução aquosa. Somente o Al na forma inorgânica é a forma tóxica para peixes (U.S. EPA, 1988).

A toxicidade do Al está fortemente relacionada com o pH, visto que a espécie química se modifica com o pH. Hidróxidos catiônicos ($\text{Al}(\text{OH})_2^{+1}$ e $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$) predominam na faixa de pH 5,0–5,5, mas o Al^{+2} é substituído pelo íon trivalente (Al^{+3}) abaixo de pH 4,5. Na faixa de pH 4,0-4,5, alguns autores acharam que o Al se mostrou temporariamente benéfico comparado com a exposição ácida (U.S. EPA, 1988).

A toxicidade do Al em solos ocorre exclusivamente em solos ácidos de $\text{pH} < 5$ e solos altamente lixiviados; isto se deve ao fato que sais de Al em solução mostram que os produtos hidrolíticos, que são formados dependem do pH, concentração de Al, taxa de hidrólise, temperatura e natureza dos anions (WOOLHOUSE, 1983).

É preciso lembrar ainda que, para que sejam efetivamente tóxicos às plantas, Ti, Al e outros metais devem ser absorvidos na forma iônica (STREIT; STUMM, 1993), geralmente alcançada em soluções acidificadas.

Particularmente em relação às inflorescências utilizadas nos bioensaios realizados no presente estudo, que estiveram mergulhadas em soluções preparadas com os resíduos, a absorção desses compostos metálicos das soluções pode ter acompanhado a da água, que obedece a forças físicas proporcionadas por diferenças de potencial hídrico. Porém, nos resíduos testados no presente estudo, cujo pH é próximo ao da neutralidade, ambos os metais estavam na forma de óxidos. Nesse estado químico, mesmo que tenham sido absorvidos, acompanhando o fluxo da água, e alcançado os botões florais, não seria esperado que houvesse uma agressão acentuada aos ácidos nucléicos e, conseqüentemente, quebras cromossômicas e aumento da frequência de micronúcleos. Essas relações parecem explicar a baixa toxicidade encontrada nas soluções preparadas com os resíduos.

Porém, somente esta interpretação dos resultados não é suficiente para delimitar os riscos ambientais impostos por tais resíduos. É preciso considerar que os mesmos podem interagir quimicamente com os diferentes fatores do ambiente, podendo ter seu potencial tóxico aumentado. Este fato pode acontecer após a destinação do resíduo sólido no aterro industrial e o despejo do efluente no rio. A acidificação da chuva nos aterros industriais e da água do rio onde o licor é despejado pode ocasionar a decomposição ou /e solubilização dos óxidos de Ti e Al, levando-os à forma iônica tóxica. Portanto, devem-se avaliar, também, os efeitos residuais em médio e longo prazos. Os resultados obtidos nos bioensaios realizados, para as soluções mais diluídas dos resíduos, ofereceram indícios de que esses efeitos residuais por acidificação podem eventualmente acontecer.

A diminuição do pH na medida que se aumentou a diluição de ambos os resíduos significa que houve um aumento da concentração de íons H^+ , ocorrendo uma mudança nas relações iônicas na solução e, conseqüentemente, provável intensificação da disponibilização dos metais em solução para absorção. Maiores proporções dos metais na forma iônica nas soluções mais diluídas poderiam ter levado ao aumento de seu potencial tóxico às inflorescências de *T. pallida*, havendo, nesse

caso, um possível aumento de quebras cromossômicas nas células-mãe de grãos de pólen. Daí a importância de se averiguar as mudanças do potencial iônico nas soluções preparadas para o bioensaio.

A relação entre acidificação das soluções e frequência de mutações, no entanto, pareceu ser mais evidente no ensaio com o licor do que com a pasta.

Embora, para ambos os resíduos, tenha sido observada uma diminuição similar do pH com o aumento da diluição (Figura 6), nas diluições 1/10 e 1/1000, o pH médio das soluções preparadas com a pasta pareceram ser menos ácidas do que nas mesmas diluições preparadas com o licor. Esta maior alcalinidade da pasta se deve ao caráter básico e anfôtero dos óxidos de titânio e alumínio, respectivamente, presentes em maiores concentrações nesse resíduo do que no licor, reduzindo a amplitude de variação do pH das soluções com crescentes diluições.

Esse efeito de alcalinização dos altos níveis de óxidos de Ti e de Al na pasta também já foi observado na avaliação de toxicidade microtox no bloco cerâmico enriquecido com 10% desse resíduo pastoso,

realizada na Companhia Tecnologia e Saneamento Ambiental-CETESB. Esta nova composição de bloco cerâmico não proporcionou elevação no grau de toxidez do produto, sendo considerado de baixa toxidez, e tornou-o um pouco mais neutro, com elevação do pH de 5,9 para 6,3.

Na faixa estreita de pH observada nas soluções preparadas com a pasta (entre 5,9 e 6,2; figura 12), tanto Ti quanto Al não deviam estar disponíveis, segundo limites citados por WHO (1982) e USEPA (1988) e acima relacionados. A tendência de relação entre diluição da pasta e diminuição da resposta mutagênica parece ser explicada pelo efeito da diluição de algum componente da pasta não influenciado pelo pH da solução.

Por outro lado, os componentes presentes nas soluções de licor, que podem ter levado à mudança do perfil da curva de danos aos cromossomos (tendência de aumento da formação de micronúcleos a partir da diluição 1/1000; Figura 13) parecem ter sido influenciados por maior amplitude de variação no potencial iônico das soluções (valores de pH entre 5,8 e 6,6). Tomando por base a literatura já citada, os metais não estariam na forma iônica nesta faixa de pH. Portanto, também não poderiam estar entre esses componentes capazes de causar danos

cromossômicos, independentemente de sua concentração. Porém, uma eventual acidificação adicional do resíduo diluído poderia levar ao aumento do potencial tóxico do mesmo, mesmo na presença de concentrações baixas de metais no licor. Isso é possível, pois, além dos metais se acumularem nos tecidos animais ou vegetais vivos, são extremamente tóxicos, especialmente às plantas, de modo que pequenas quantidades dos mesmos já são suficientes para causar danos. Por outro lado, não se pode descartar a influência de outros componentes presentes no licor, dependentes do potencial iônico e supostamente tóxicos às plantas, como possíveis causadores dessa mudança do perfil da curva de micronúcleos nas soluções mais diluídas do licor. De qualquer maneira, o bioensaio com o licor mostrou indícios de que, após seu despejo no rio e sua diluição e acidificação, efeitos clastogênicos residuais poderão acontecer.

Acrescenta-se que efluentes de outras fábricas são adicionadas ao Rio Tamanduatei, podendo potencializar a disponibilidade dos metais e/ou outros componentes, por meio de correntes mais ácidas que o licor *in natura*.

Verifica-se, assim, que, em se tratando metais nas soluções desses resíduos, seu estado químico parece ser tão ou mais importante do que sua concentração e parece depender do grau de acidificação da solução.

FOMIN et al (1999), avaliando a genotoxicidade de duas soluções de resíduos provenientes de jazidas de minério com os bioensaios Trad-MCN e Trad-SHM, numa faixa ampla de pH (entre 4 e 8), verificaram que as soluções acidificadas para $\text{pH} = 4$, com ácido nítrico, apresentaram maior concentração dos metais do que a forma *in natura* do eluato ($\text{pH} = 8$), devido ao efeito de mobilização. Nas soluções acidificadas, houve aumento comprovado da frequência de mutações em *Tradescantia*, que pôde ser atribuído aos íons metálicos presentes em alta concentração, uma vez que, no tratamento controle constituído apenas por solução ácida preparada com o ácido nítrico, não houve aumento do potencial genotóxico.

Por analogia aos resultados de FOMIN et al. (1999), pode-se supor que houve certa biodisponibilização de formas iônicas de Ti e Al nas soluções do licor com diluição a partir de 1/1000 (Figura 13), em função do aumento do potencial iônico, resultando em uma tendência de aumento da frequência de micronúcleos nas inflorescências.

Desse modo, com o objetivo de estimar com precisão um possível efeito residual da disponibilização de Ti e Al na forma iônica para o meio ambiente, em consequência de acidificação da chuva ou da água do rio, sugere-se que sejam realizados bioensaios adicionais com soluções aquosas preparadas com ambos os resíduos da indústria de polipropileno, adotando-se a mesma metodologia empregada no presente estudo, porém tornando as soluções acidificadas e ajustando-se o pH a valores inferiores a 5,0. Para esse estudo sugerido, conforme observado por FOMIN et al. (1999), o bioensaio Trad-MCN com inflorescências de *Tradescantia* é mais apropriado do que os testes mutagênicos com bactérias, já que estes últimos requerem condições de pH neutro para sua realização.

A destinação do resíduo pastoso para o aterro industrial é uma medida adotada pela empresa, baseado nos resultados do extrato lixiviado e solubilizado conforme ABNT NBR 10004. No entanto, esta medida de remediação, pode ser paliativa, visto que, mesmo em aterro controlado, pode haver influência de chuvas ácidas e provocar os mencionados efeitos residuais, como a contaminação do lençol freático. Além disso, outros resíduos depositados no mesmo aterro com

características ácidas e / ou básicas podem influenciar na lavagem da pasta e na solubilização desses metais. A manta separadora, colocada sob os depósitos de pasta, após anos de acondicionamento, pode perder as características de impermeabilização, facilitando a solubilização de metais por acidificação ou alcalinização e o carreamento dos mesmos para o lençol freático.

Assim, para reduzir um possível impacto sobre o meio ambiente, em médio e longo prazos, seria importante dar um destino alternativo para a pasta, evitando-se seu armazenamento nos aterros industriais.

A adição de 10% de pasta na composição de material cerâmico e de tijolos, uma medida adotada por um período curto pela empresa, não só proporcionou um aumento da resistência dos blocos resultantes como também foi uma alternativa viável para reduzir a quantidade do resíduo disposto em aterro pela indústria. Entretanto, apesar de todas essas ações envolverem custos adicionais, as tecnologias limpas são as melhores alternativas para proteção do meio ambiente e já vêm sendo adotadas nas novas fábricas européias e em algumas nacionais.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- Ambos os resíduos, diluídos apenas com água, mostraram ter baixa toxicidade genética, comparando-a com os tratamentos-controle negativo (água deionizada) e positivo (solução de formaldeído 0,1%).
- Comparativamente, o resíduo catalítico na forma de pasta apresentou, embora baixo, maior potencial clastogênico que o licor, estando esses efeitos relacionados, provavelmente, com a concentração, solubilidade e biodisponibilidade das espécies químicas nas diferentes soluções, características determinadas pelo potencial iônico nas soluções (pH).

- Os metais Ti e Al, presentes em altas concentrações na forma de óxidos, no resíduo pastoso, não proporcionaram mudanças significativas da frequência de micronúcleos; a diminuição do pH nas soluções com as diluições crescentes da pasta não foi acompanhada por mudanças no perfil da curva de frequência de mutações nas células-mãe de grãos de pólen; a acidificação das soluções pareceu não ter sido suficiente para dissociar e/ou solubilizar os óxidos desses metais.

- Mudanças no perfil da curva de pH das soluções com as diluições crescentes do licor foram acompanhadas por mudanças no perfil da curva de frequência de mutações nas células-mãe de grãos de pólen, indicando que componentes presentes em soluções mais ácidas e diluídas tenderam a se tornar mais tóxicos do que os de soluções mais concentradas e mais alcalinas; no entanto, em função do pH das soluções mais diluídas não ter sido inferior a 5,8, sugere-se que Ti e Al iônicos também não tenham tido relação com essas mudanças nas tendências da curva de frequência de micronúcleos.

- Embora o licor a ser adicionado in natura no curso d água não apresente potencial clastogênico significativo, este efeito pode eventualmente ser potencializado em médio e longo prazos, devido à maior biodisponibilidade de metais ou de outros componentes em função do efeito da acidificação do mesmo; forte acidificação da pasta armazenada em aterros sanitários pode, também, levar à observação desses efeitos residuais em longo prazo; entretanto, estudos experimentais são necessários para confirmar essas suposições.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, E.S; PEDROSO, A.V.N.; DOMINGOS, M.; SANT'ANNA, E.T.G.; SALDIVA, P.H.N. Biomonitoramento *indor* do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. **Hoehnea**, v.30, n.2:, p. 89-94, 2003.

ARNDT, U.; SCHWEIZER, B. The use of bioindicators for environmental Monitoring in tropical and subtropical countries. In: Ellenberg H., E. **Biological Monitoring Signals from the Environment**. Braunschweig: Vieweg 1991. p.199-260.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; E.S. ; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.H.N. Exploring the Clastogenic Effects of Air Pollutants in São Paulo (Brazil) Using *Tradescantia* Micronuclei Assay; **Mutation Research**. v.426, p.229-32, 1999.

BAUD-GRASSET, S.; BAUD-GRASSET, F.; BIFULCO, J.M.; MEIR, J.R.; MA, T.H. Reduction of genotoxicity of a creosote-contaminated soil after fungal treatment determined by the

Tradescantia-micronucleus test. **Mutation Research**, v. 303, p.77-82, 1993.

BISCARDI, D.; MONARCA, S.; DE FUSCO, R.; SENATORE, F.; POLI, P.; BUSCHINI, A. ; ROSSI, C.; ZANI, C. Evaluation of the migration of mutagens/ carcinogens from PET bottles into mineral water by *Tradescantia*/micronuclei test, Comet assay on leukocytes and GC/MS. **The Science of the total environment**, v. 302, p. 101-8, 2003.

CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. **Mutation Research**, v.426, p. 207-10, 1999.

CHENERY, E.M.; SPORNE, K.R. A note on the evolutionary status of aluminium-accumulators among dicotyledons. **The New Phytologist**, v.76, p.551-54, 1976.

CONSTANTIN, M.J.; OWENS, E.T. Introduction and perspectives of plant genetics and cytogenetics assays. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene- tox Program. **Mutation Research**, v.99, p.1-12, 1982.

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

DUAN, C.; HU, B.; WANG, Z.; WEN, C.; SEN-QI, Y.;JIANG, X.; WANG, D.; LI, Q.; LIANG, X. *Tradescantia* Bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People 's Republic of china. **Mutation Research**, v. 426, p.127- 31, 1999.

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

FANG, T. A report on the studies of effects of environmental pollutants on chromosomes - A Sino-american collaborated research project, 1980 II *Tradescantia* micronucleus bioassay on environmental mutagen in the air and water samples from some industrial area of Qingdao, PRc and on the pesticide DDV. **J Shandong Coll. Oceanol**, v.11, p. 9-11, 1981.

FOMIN, A.; PASCHKE, A.; ARNDT, U. Assessment of genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia*-stamen hair(trad-shm) and the *Tradescantia*-micronucleus(trad-mcn) bioassays. **Mutation Research**, v.426, p.173-81, 1999.

GALVIN, R.M. Study of evolution of aluminium in reservoirs and lakes. **Wat. Res.**, v.25, n 12, p.1465-70, 1991.

GILL, B.S; SANDHU, S.S. Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. **Mutation Research**; v.270, p.65-9, 1992.

GONG, P.; KUPERMAN, R.G.; SUNAHARA, G.I. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Mutation Research**, v.538, p.13-8, 2003.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v.310, p.175-85, 1994.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI, J.R. N.; LOBO, D.J.A; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA, P.H.N. Detection of the Genotoxic Potential of Air Pollution in the City of São Paulo (Brazil) with *Tradescantia pallida* Using *Tradescantia* Micronucleus Assay (Trad-MCN). **Environ. Exp . Botany**, v.44, p.1-8, 2000.

KONG, M.S.; MA, T.H. Genotoxicity of contaminated soil and shallow well water detected by plant bioassays. **Mutation Research**, v. 426, p.221-8, 1999.

LOGAN, W.P.D. Mortality in London fog incident. **Lancet.**, v. 1, p.336-8, 1953.

MA, T.H.; HARRIS, M.M., ANDRESON, V.A.; AHMED, I.; MOHANMAD, K.; BARE, J.L.; LIN., G. *Tradescantia* micronucleous (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. **Mutation Research**, v.138, p.157-67, 1984b.

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

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

Ma, T.H.; Harris, M.M.; NEAS, R.E.; LEE, T.S. Mutagenicity of drinking water detected by *Tradescantia* micronucleus test. **Can. J. Genet. Cytol** , v. 27, p.143-50, 1984a.

MA, T.H.; HARRIS, M.M. Review of the genotoxicity of formaldehyde **Mutational Research**, v.196, p.37-59, 1988.

MA, T.H. *Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens. In: KOLBER, A.R.; WONG, T.K.; GRANT, L.D.; DEWOSKIN.R.S.; HUGHES,T.J. Ed, **In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Current and Future Possibilities. Part A: Survey of Test Systems**, Plenum Press, New York, 1979. p.191-214.

MA, T.H.; CABRERA, G.L.; CHEN, R.; GILL, B.S.; SANDHU, S.S.; VANDENBERG, A.L.; SALAMONE, M.F. *Tradescantia*

- Micronucleus Bioassay. **Mutation Research**, v.310, p.221-30, 1994.
- MA, T.H.; ANDERSON, V.A.; AHMED, I. Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*, In: R.R. Tice, D.L. Costa and K.M. Schaich (Eds), **Genotoxic Effects of Airborne Agents**, Plenum Press, New York, 1982. p.141-57.
- MA, T.H.; GRANT, W.F. The tradescantias-adventorous plants. **The Herbarist**, v.48, p.36-44, 1982.
- MANNING, W.J.; FEDER, W.A. **Biomonitoring air pollutants with plants**. Applied Science Publishers LTD, London. 1980.
- MIYAZATO, C.A. **Avaliação in loco do potencial clastogênico do ambiente de trabalho em um laboratório clínico, através do bioensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida***. São Paulo, 1999. 81p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.
- MUDD, J.B.; KOZLOWSKI, T.T. (EDS.). **Responses of plants to air pollution**. Physiological Ecology. A series of monographs, texts and treatises. Academic Press, New York, 1975.
- PEREIRA, P.M.; SALDIVA, P.H.N.; SAKAE, R.S.; BOHM, G.M.; MARTINS, M.A. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. **Environmental Research**, v.69, p.96-101, 1995.
- RODRIGUES, G.S.; MA, T.H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis - a review, **Critical Review of Plant Science.**, v.16, p.325-59, 1997.
- RUIZ, E.F.; MA, T.H.; VALTIERRA, M.E.; RABAGO, S.U.L.; PEREZ, A.B. *Tradescantia*-micronucleos (Trad-MCN) bioassay on

clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. **Mutation Research**, v.270, p.45-51, 1992.

RUSSEL, J.B. **Química Geral**. São Paulo, 1929. p.693-7.

SALDIVA, P.H.N; LICHTENFELS, A.J.F.C.; PAIVA, P.S.O.; BARONE, I.A.; BOHM, G.M.; MARTINS, M.A.; MASSAD, E.; PEREIRA, J.C.R.; XAVIER, V.P.; SINGER, J.M. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brasil: a preliminary report. **Environmental Research**, v.65, p.218-25, 1994.

SALDIVA, P.H.N; POPE, C.A.III.; SCHWARTZ, J.; DOCKERY, D.W.; LICHTENFELS, A.J. ; SALGE, J.M.; BARONE, I.; BOHM, G.M. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. **Arch Environ Health**, v.50, p.159-63, 1995.

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

STEINKELLNER, H.; KASSIE, F.; KNASMULLER, S. *Tradescantia*-micronucleus assay for the assessment of the clastogenicity of Austrian water. **Mutation Research**, v.426, p.113-6, 1999.

STREIT, B.; STUMM, W. Chemical properties of metals and the process of bioaccumulation in terrestrial plants. In: Markert, B. ed. **Plants as biomonitors. Indicators for heavy metals in the terrestrial environment**. New York, VCH Publishers Inc., 1993. p.35-62.

SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CARVALHO, H.A.; SALDIVA, P.H.N. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effect of x-

rays. **Brazilian. Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p.127-9, 2002.

U.S. EPA - Environmental Protection Agency. Ambient water quality criteria for **Aluminum**. Washington, EPA, 1988.47p.

UNDERBRINK, A.G.; SCHAIRER, L.; SPARROW A.H. *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: **Chemical mutagens principles and methods for their detections**. Hollaender, A. Ed. Plenum Press, New York 1973; p.171-207.

UNDERWOOD, E.J. **Trace elements in human and animal nutrition**, 4th ed., New York, Academic Press, 1977, p.451-2.

WEBER, E.T.; BENTO, J.A.; CHIUMMO, L.; SCHULLING, K.W.; CHRISTIANINI, N.; ALVES, W.J.F. **Prêmio Fiesp de mérito ambiental**. São Paulo, 1998. (Relatório Técnico Polibrasil).

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Titanium. **Environmental Health criteria** N° 24, Geneva, 68p, 1982.

WILTERS, H. **Physiological study on the waterbug, Corixa punctata and the trout, Oncorhynchus mykiss: effects of aluminum in acid water**. Antwerpen, 1990. 210p. Tese- Antwerpen universiteit.

WOOLHOUSE, H.W. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: Lange E.A.ed; **Physiological Plant Ecology III- Responses to the chemical and biological environment**. New York, Springer Verlag, 1983. p.245-300

XU, Z.; MA, T.H. Clastogenicity of formaldehyde fumes and X-rays evaluated by the *Tradescantia*-micronucleus assay. **Environmental and Experimental Botany**, v.39, p.169-75, 1997.