



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR DA CIDADE DE  
UBERLÂNDIA POR MEIO DE ENSAIOS CITOGENÉTICOS COM  
*TRADESCANTIA***

**Aluno:** Boscolli Barbosa Pereira

**Orientador:** Profa. Dra. Sandra Morelli

UBERLÂNDIA - MG  
2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR DA CIDADE DE  
UBERLÂNDIA POR MEIO DE ENSAIOS CITOGENÉTICOS COM  
*TRADESCANTIA***

**Aluno:** Boscolli Barbosa Pereira

**Orientador:** Profa. Dra. Sandra Morelli

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Genética)

**UBERLÂNDIA - MG  
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P436b Pereira, Boscolli Barbosa, 1986-  
2012 Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia  
por meio de ensaios citogenéticos com *Tradescantia* /Boscolli  
Barbosa Pereira. -- 2012.  
100 f. : il

Orientadora: Sandra Morelli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Ar - Qualidade - Uberlândia (MG) -Teses.  
3. Tradescantia - Teses. 4. Ar - Poluição - Uberlândia (MG) - Teses.  
I Morelli, Sandra. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR DA CIDADE DE  
UBERLÂNDIA POR MEIO DE ENSAIOS CITOGENÉTICOS COM  
*TRADESCANTIA***

**ALUNO:** Boscolli Barbosa Pereira

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Profa. Dra. Sandra Morelli (Orientadora)

**Examinadores:**

- Profa. Dra. Ana Maria Bonetti (UFU)
- Prof. Dr. Mário Antônio Spanó (UFU)
- Prof. Dr. Edson Luis Maistro (UNESP)
- Profa. Dra. Denise Crispim Tavares (UNIFRAN)

**Data da Defesa:** 17 / 12 / 2012

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Profa. Dra. Sandra Morelli

*Dedico esse trabalho aos meus pais, ao meu irmão e, em especial, à minha amada esposa.*

## AGRADECIMENTOS

---

Meus sinceros agradecimentos...

À Professora Doutora Sandra Morelli, orientadora sem igual e exemplo de conduta profissional, por oportunizar a realização desse trabalho e por sempre me incentivar profissionalmente.

À Professora Doutora Ana Maria Bonetti, em quem me referencio na construção de minha profissão como docente, pela parceria firmada em nossas “práticas alternativas para o ensino da Genética”.

Ao Professor Doutor Warwick Estevam Kerr, que me orientou desde a iniciação científica até o Mestrado, pelos ensinamentos que transcendem o patamar das Ciências e fazem, daqueles que tiveram a oportunidade de conhecê-lo, serem mais sensatos, mais justos, mais humanos e menos preguiçosos.

À Universidade Federal de Uberlândia e às agências de fomento (CAPES, CNPq e FAPEMIG) pelos recursos disponibilizados.

Aos funcionários da Secretaria de Trânsito e Transporte de Uberlândia e à Prefeitura Municipal por fornecerem os dados relacionados ao tráfego veicular de Uberlândia.

Ao Professor Doutor Euclides Antônio Pereira de Lima, que me apresentou o conceito de biomonitoramento ambiental, por aceitar participar desse trabalho e pelas futuras parcerias que faremos.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio de Oliveira, do Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos da UFU, por compartilhar os dados climatológicos utilizados nesse estudo.

À minha família, em especial à minha mãe, por ser a heroína que possibilitou tudo que conquistei. Devo tudo a ela.

À minha esposa, companheira, parceira, amiga, amante e eterna namorada Fernanda Fernandes por ser essa incansável motivadora e por me fazer tão feliz.

Ao amigo, co-autor, padrinho e irmão Edimar Olegário de Campos Júnior por ser parceiro em todas as empreitadas.

Aos amigos e amigas feitos no Laboratório de Genética e no Laboratório de Citogenética da UFU.

Aos alunos do Curso de Biotecnologia da UFU e do Curso de Ciências Biológicas da FUCAMP – Monte Carmelo.

Aos amigos do Instituto de Genética e Bioquímica.

Aos amigos da Fundação Carmelitana Mário Palmério – Monte Carmelo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica por contribuírem ativamente em meu processo de formação acadêmica.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite e pelas contribuições e considerações feitas.

A todos aqueles que, porventura, não foram aqui elencados, mas que fizeram parte, direta ou indiretamente, dessa conquista.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Efeitos nocivos dos principais poluentes veiculares na atmosfera. Fonte: IPEA (2011).....	06
--	----

<b>Tabela 2.</b> Comparação entre os padrões diários e anuais de MP <sub>2,5</sub> e MP <sub>10</sub> adotados pelo Brasil (CONAMA), Estados Unidos (EPA), União Européia (ECE) e os recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).....	08
--	----

### CAPÍTULO II

<b>Table 1.</b> Daily average percentage of micronucleus (AV), expressed in %, and respective standard errors (SE) in inflorescences of <i>T. pallida</i> cv. Purpurea and percentage of alteration (%A) in the average frequencies of micronucleus daily estimated in inflorescences from monitored site (town center) relative to those from Umuarama Campus (reference site). .....	57
---	----

<b>Table 2.</b> The weather conditions during the 18 hours/day of plant exposure in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The study period lasted from 05-17-2010 to 05-23-2010.....	58
--	----

### CAPÍTULO III

<b>Table 1.</b> The weather conditions during the 18 hours of plant exposure at each location and session (season/year) in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The study period lasted from winter 2006 to summer 2011.....	81
---	----

<b>Table 2.</b> Micronucleus frequency (MN/100 tetrads) for the <i>T. pallida</i> tetrads obtained from locations 1, 2, 3 and 4 and the control location during the biomonitoring sessions indicated.....	82
---	----

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Fig. 1.</b> Etapas do biomonitoramento da qualidade ambiental com utilização de plantas bioindicadores.....	13
<b>Fig.2.</b> Inflorescência de <i>Tradescantia pallida</i> (Rose) D.R. Hunt.....	16
<b>Fig. 3.</b> Botões florais em estágio intermediário (Figura 3A). Folhas modificadas em brácteas com formato de barca (Figura 3B).....	18
<b>Fig. 4.</b> Diagrama da formação de micronúcleos em tétrades de <i>Tradescantia</i> .....	19
<b>Fig. 5.</b> Sistema para exposição de <i>Tradescantia</i> em biomonitoramento <i>in situ</i> .....	21
<b>Fig. 6.</b> Preparação das lâminas para análise citogenética.....	24

### CAPÍTULO II

<b>Fig.1.</b> Frequency of buses passing in the monitored site (town center) per hour (buses/h) in Uberlândia, Brazil, during the strike days, non-strike days and weekend (Saturday and Sunday).....	59
<b>Fig.2.</b> Concentrations of particulate material (PM <sub>10</sub> ) at the monitored site (town center) in Uberlândia, Brazil, during the strike days, non-strike days and weekend (Saturday and Sunday).....	60
<b>Fig. 3.</b> Surface graphic representation of the multiple regression analysis between concentration of particulate matter emitted, bus traffic and the frequency of micronuclei (MN) in inflorescences of <i>Tradescantia pallida</i> obtained during the biomonitoring study.....	61

### CAPÍTULO III

<b>Fig. 1.</b> Map of Uberlândia City showing the monitored locations, control and the Uberlândia weather station.....	83
<b>Fig. 2.</b> Early pollen tetrads of <i>Tradescantia</i> with (a) and without MN (b).....	84
<b>Fig. 3.</b> The number of vehicles registered in the area during the 18 hours of plant exposure for each location and session (season/year). The data were obtained from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil from winter 2006 to summer 2011.....	85

**Fig. 4.** Surface graphic representation of the multiple regression analysis between relative humidity, number of vehicles and the frequency of micronuclei (MCN) in inflorescences of *Tradescantia pallida* obtained during each biomonitoring session..... 86

## **LISTA DE SIGLAS**

**CO** – Monóxido de carbono

**CONAMA** – Conselho Nacional do Meio Ambiente

**ECE** – Comissão Europeia de Meio Ambiente

**EPA** – Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos da América

**HC** – Hidrocarbonetos

**IBAMA** – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IPEA** – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada

**MP** – Material particulado

**MP<sub>10</sub>** – Material particulado inalável cujo diâmetro aerodinâmico é menor que 10 micrômetros

**MP<sub>2,5</sub>** – Material particulado inalável cujo diâmetro aerodinâmico é menor que 2,5 micrômetros

**MP<sub>2,5-10</sub>** – Material particulado inalável cujo diâmetro aerodinâmico está entre 2,5 e 10 micrômetros

**NO<sub>x</sub>** – Óxido de nitrogênio

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PROCONVE** – Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores

**SETTRAN** – Secretaria de Trânsito e Transportes de Uberlândia

**SO<sub>x</sub>** – Óxido de enxofre

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>1. CAPÍTULO I</b>	
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
1.1. Urbanização e poluição atmosférica de origem veicular.....	03
1.2. Dados sobre clima, trânsito e frota veicular em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.....	09
1.3. (Bio)monitoramento dos efeitos da poluição atmosférica.....	11
1.4. Gênero <i>Tradescantia</i> como biomonitor ambiental.....	14
1.5. Teste de micronúcleos com <i>Tradescantia</i> .....	17
1.5.1. Fundamentos do Teste de micronúcleos com <i>Tradescantia</i> .....	17
1.5.2. Cultivo e exposição das plantas.....	20
1.5.3. Análises citogenéticas para observação de micronúcleos.....	23
1.6. Considerações sobre o teste de micronúcleos com <i>Tradescantia</i> aplicado ao monitoramento da poluição atmosférica.....	25
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>
<b>2. CAPÍTULO II</b>	
Biomonitoring air genotoxicity during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.....	40
<b>3. CAPÍTULO III</b>	
<i>In situ</i> biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a <i>Tradescantia</i> micronucleus assay .....	63
<b>Conclusões.....</b>	<b>88</b>

# APRESENTAÇÃO

---

Este trabalho foi escrito conforme as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

O presente estudo teve como objetivo monitorar os efeitos do crescimento contínuo da frota de veículos automotores na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil em relação à qualidade do ar por meio do Teste de Micronúcleos com *Tradescantia*.

Para tanto, o texto dessa tese faz, em seu **Capítulo I**, uma análise conceitual a respeito do trânsito nas grandes cidades, da poluição atmosférica e da necessidade de (bio)monitorar os efeitos genotóxicos dos poluentes presentes na atmosfera.

Fundamentados pelo primeiro capítulo, o **Capítulo II** avalia os resultados de um estudo que biomonitorou a genotoxicidade do ar do centro de Uberlândia, durante e após uma paralização do transporte coletivo público por meio do teste de micronúcleos com *Tradescantia* e o **Capítulo III** discute os resultados de um ensaio *in situ* dos efeitos genotóxicos da poluição veicular em Uberlândia por meio do ensaio de micronúcleos com *Tradescantia* ao longo de cinco anos de monitoramento.

O Capítulo I foi escrito em português e seguiu o mesmo padrão de formatação dos capítulos seguintes. Os Capítulos II e III foram escritos no formato de artigo científico, em língua inglesa, de acordo com as normas dos periódicos aos quais foram submetidos.

# **Capítulo I**

---

## **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

## **1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **1.1 Urbanização e poluição atmosférica de origem veicular**

Fatores sociais, políticos e econômicos são os principais responsáveis por modificar as cidades. De acordo com Andrade et al (2012), o processo de crescimento das cidades sempre esteve ligado ao desenvolvimento e evolução tecnológica dos modos de transporte. Dados do Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2011) informam que o atual sistema de mobilidade urbana no Brasil se caracteriza pelo crescimento do transporte individual motorizado e consequente redução do uso do transporte coletivo.

Os investimentos em infraestrutura viária (que priorizam a fluidez de tráfego) e a expansão da capacidade instalada da indústria automobilística (fruto de uma política industrial que se pautou principalmente pela atração de novas plantas automotivas para o país) incentivam o aumento do fluxo de veículos. Além disso, a abundante oferta de crédito para aquisição de veículos e a política tributária que reduziu impostos de veículos populares contribuíram para ampliar a base de consumidores dos veículos particulares (IPEA, 2011).

Diante desse cenário, a motorização individual tornou-se uma alternativa barata em relação ao custo de se utilizar o transporte público, aumentando a demanda sobre o sistema viário e criando-se condições para que as cidades se espraiem.

De acordo com o Ministério das Cidades (2004), o modelo de planejamento urbano adotado pela maioria das cidades brasileiras privilegia e incentiva o uso do transporte motorizado individual. A ausência de políticas públicas que planejem investimentos no transporte de massa gera problemas urbanos, cuja

complexidade evolui com o crescimento da cidade. Como consequência desse processo, os cidadãos enfrentam congestionamentos, aumento do número de acidentes no trânsito, redução de áreas verdes e, sobretudo, aumento dos níveis de poluição atmosférica.

Considerando que as aglomerações urbanas são responsáveis pela emissão de vários tipos de poluentes em áreas relativamente limitadas é possível entender como os poluentes atmosféricos alcançam concentrações elevadas, representando risco para a saúde humana e para o ambiente (Klumpp et al., 2001).

Conforme já discutido, o crescimento contínuo da frota de veículos automotores no Brasil traz impactos relevantes ao ambiente urbano e, em última análise, à produtividade e qualidade de vida dos cidadãos. Além dos congestionamentos e do decorrente aumento do tempo de deslocamento das pessoas, a elevação da frota gera emissões de substâncias poluentes na atmosfera urbana (IPEA, 2011).

A resolução nº03 publicada em 1990 pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) define poluição atmosférica como resultado da alteração das características físicas, químicas ou biológicas normais da atmosfera, de forma a causar danos ao ser humano, à fauna, à flora, aos materiais ou restringir o pleno uso e gozo da propriedade, ou afetar negativamente o bem-estar da população.

De fato, a combustão dos combustíveis fósseis utilizados nos veículos causa a liberação de substâncias químicas, que tendem a se concentrar na atmosfera, provocando variações na sua composição. Essa alteração atmosférica, potencializada pelas ações humanas, é oriunda de diversas fontes que, segundo

Braga et al. (2005), podem ser classificadas como móveis e estacionárias. São consideradas fontes estacionárias de poluição as indústrias que, através de suas chaminés, emitem poluentes de forma pontual. Os veículos são caracterizados como fontes móveis de emissão de poluentes, produzindo cargas difusas que se espalham mais rapidamente pela atmosfera.

De acordo com dados do IPEA (2011), os principais poluentes provenientes das emissões veiculares locais são o monóxido de carbono (CO); os hidrocarbonetos (HC); os materiais particulados (MP); os óxidos de nitrogênio ( $\text{NO}_x$ ) e os óxidos de enxofre ( $\text{SO}_x$ ). Em geral, eles resultam da queima de combustíveis fósseis. A Tabela 1 descreve os efeitos da alta concentração desses poluentes.

Na tentativa de conter os efeitos da poluição atmosférica, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) criou o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE) em 1986 (IBAMA, 2011). Desde sua fundação, o programa fixa limites para as emissões de poluentes por veículos novos. Contudo, embora os fabricantes forneçam instruções para os consumidores sobre como manter os veículos em condições de baixa emissão de contaminantes, não há nenhuma garantia de que os proprietários de veículos seguirão essas instruções.

A resolução nº03 do CONAMA estabeleceu em 1990 os limites diários para emissão de  $\text{MP}_{10}$ . No entanto, já se passaram mais de vinte anos sem que os limites de emissão sejam revistos e atualizados. Além disso, vários estudos apontam a influência da concentração de material particulado inalável na saúde da população (Andrade et al., 1994; Andrade et al., 2012; Artaxo et al., 1993; Dallarosa et al., 2008; Maenhaut et al., 2002; Mar et al., 2000; Marcilio e Gouveia,

2007; Marques, 2011; Miranda et al., 2012; Poursafa et al., 2011), revelando que é urgente a revisão dos padrões brasileiros para emissão de MP<sub>10</sub>.

Considera-se material particulado inalável (MP<sub>10</sub>) partículas cujo diâmetro aerodinâmico não excede 10 µm, sendo esta subdividida em fração fina do MP<sub>10</sub>, com tamanho de até 2,5 µm (também conhecida como MP<sub>2,5</sub>) e fração grossa do MP<sub>10</sub>, com partículas de tamanho entre 2,5 e 10 µm (ou MP<sub>2,5-10</sub>).

O motivo de o material particulado inalável ter sido alvo de estudos está relacionado ao fato de sua fração MP<sub>2,5</sub> atingir as vias respiratórias inferiores, o que pode causar vários danos à saúde. De acordo com um Relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2006), a maior parte da população européia tem sua saúde afetada pela poluição do ar com material particulado, especialmente pela fração fina (MP<sub>2,5</sub>).

Segundo Amorim (2004), a poluição provocada por material particulado é um problema comprovado nos grandes centros urbanos e cada vez mais se estende para regiões em expansão populacional. É nesse sentido que diversos trabalhos têm monitorado e comprovado que a população brasileira é intensamente afetada pela poluição proveniente das emissões veiculares (Gouveia e Fletcher, 2000; Lin et al., 2003; Saldiva et al. 1995, 2002).

Padrões mais rigorosos em relação à emissão de poluentes provenientes de automóveis têm sido adotados por países como os Estados Unidos e pelos membros da União Europeia, bem como já foram recomendados por um relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) no ano de 2006.

Tabela 1. Efeitos nocivos dos principais poluentes veiculares na atmosfera. Fonte: IPEA (2011).

POLUENTE	SÍMBOLO	IMPACTO
Monóxido de carbono	CO	Atua no sangue, reduzindo sua oxigenação, e pode causar morte após determinado período de exposição à determinada concentração.
Óxidos de nitrogênio	NO <sub>x</sub>	É parte do "smog" fotoquímico e da chuva ácida. É um precursor do ozônio (O <sub>3</sub> ), que causa e/ou piora problemas nas vias respiratórias humanas. Também provoca danos a lavouras.
Hidrocarbonetos	HC	Combustíveis não queimados ou parcialmente queimados formam o "smog" e compostos cancerígenos. É um precursor do ozônio (O <sub>3</sub> ).
Material particulado	MP	Pode penetrar nas defesas do organismo, atingir os alvéolos pulmonares e causar irritações, asma, bronquite e câncer de pulmão. Degrada os imóveis próximos aos corredores de transporte.
Óxidos de enxofre	SO <sub>x</sub>	Forma a chuva ácida e degrada vegetação e imóveis, além de provocar problemas de saúde.

Enquanto estes padrões adotados e recomendados recentemente pela OMS (WHO, 2006), Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos da América (EPA, 2010) e Comissão Européia de Meio Ambiente (ECE, 2008)

apontam para uma maior preocupação com o MP<sub>2,5</sub>, no Brasil, este padrão ainda é inexistente.

Os padrões diários e anuais para emissão de material particulado inalável propostos pela Resolução CONAMA nº 003/1990 podem ser comparados com os padrões estabelecidos pela Agência de Proteção ao Meio Ambiente dos Estados Unidos da América (EPA) e Comissão Européia do Meio Ambiente (ECE), e os recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), conforme pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação entre os padrões diários e anuais de MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub> adotados pelo Brasil (CONAMA), Estados Unidos (EPA), União Européia (ECE) e os recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).

PADRÃO	Concentração ( $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ )	
	MP <sub>2,5</sub>	MP <sub>10</sub>
OMS - 24 h	25	50
OMS – anual	10	20
CONAMA – 24 h	-	150 <sup>(1)</sup>
CONAMA – anual	-	50
EPA – 24 h	35	-
EPA – anual	15	150 <sup>(1)</sup>
ECE – 24 h	-	50 <sup>(2)</sup>
ECE – anual	25	40

<sup>(1)</sup> Este índice não pode ser excedido mais que uma vez ao ano.

<sup>(2)</sup> Este índice não pode ser excedido mais que 35 vezes ao ano.

Desde que o PROCONVE foi criado, a tecnologia de motores à combustão interna com o uso de combustíveis inflamáveis tradicionais, em geral, já passou

pelos maiores ganhos tecnológicos que permitiram fortes reduções nas emissões dos poluentes. Ainda que haja espaço para pequenos ganhos em termos de melhoria dos combustíveis fósseis, com redução do teor de algumas substâncias poluentes, é provável que saltos de eficiência ocorridos nos últimos anos não ocorrerão mais.

Desse modo, ao considerarmos que as tecnologias tradicionais com base na queima de combustíveis fósseis já atingiram um nível de eficiência alto, é um desafio pensar em políticas e medidas que permitam, ao mesmo tempo, lidar com o contínuo aumento da frota veicular e manter/reduzir a emissão de poluentes locais.

Em suma, considerando a evolução tecnológica e as características relacionadas à urbanização e crescimento da frota veicular nas cidades brasileiras, investimentos em sistemas de transporte público baseados em fontes de energia mais limpas devem ser fortemente encorajados.

## **1.2 Dados sobre clima, trânsito e frota veicular em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil**

Uberlândia é um município brasileiro, localizado na região do Triângulo do estado de Minas Gerais, distando 556 quilômetros da cidade de Belo Horizonte, capital do Estado. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), a população de Uberlândia é de 619.536 habitantes, o que torna o município o segundo mais populoso do Estado de Minas Gerais. A cidade de Uberlândia ocupa uma área de 4.115,82 quilômetros quadrados, sendo que 135,34 quilômetros quadrados estão em perímetro urbano (IBGE, 2011).

De acordo com a classificação de Köppen, Uberlândia possui clima caracterizado como tropical de altitude (Cwa) com diminuição de chuvas no inverno e verões chuvosos com temperaturas altas. A temperatura não sofre grandes oscilações ao longo do ano e tem média de 22,3°C (INPE/CPTEC, 2011). Durante o inverno é comum o registro de índices de umidade relativa do ar críticos, algumas vezes abaixo de 20%.

Uberlândia é considerada a capital da logística, por possuir o maior centro atacadista da América Latina. A localização geográfica da cidade contribui para isso, pois sua malha rodoviária faz com que os maiores centros econômicos do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Goiânia e Brasília) contem com Uberlândia como ponto de intersecção.

A rápida urbanização de Uberlândia trouxe como consequência um crescimento significativo no número de veículos que trafegam na cidade nos últimos dez anos. Na realidade, a frota veicular praticamente dobrou no município. De acordo com dados fornecidos pela Secretaria de Trânsito e Transportes (SETTRAN, 2012), enquanto em 2001 circulavam pela cidade 171.829 veículos, em 2011 o número de veículos em Uberlândia atingiu 341.364 unidades. A cidade não possui sistemas de transporte público realizado por trem ou metrô. O sistema de transporte por ônibus é o único meio público de locomoção.

O rápido incremento na frota veicular da cidade, a insuficiência do transporte público e o fato do município não possuir um traçado urbano planejado para comportar os fluxos gerados pelo crescimento acelerado faz com que a circulação, principalmente, na área central, se torne cada vez mais conflituosa, tanto para pedestres como para condutores. O trânsito na área urbana de Uberlândia torna-se a cada dia mais desorganizado e inseguro, comprometendo a

qualidade de vida da população e afetando a segurança e a saúde das pessoas, devido aos diversos conflitos e às emissões de poluentes oriundos do elevado tráfego de automóveis.

### **1.3 (Bio)monitoramento dos efeitos da poluição atmosférica**

Com o aumento das populações em áreas urbanas, a atmosfera passou a conter doses maiores de complexas misturas de poluentes provenientes da atividade industrial e especialmente da queima de combustíveis fósseis por veículos automotores, incluindo substâncias mutagênicas e carcinogênicas, o que requer métodos de avaliação regulares para monitorar a qualidade ambiental (EEA, 2003; WHO, 2006).

Embora tenha sido alcançado considerável progresso nas tecnologias de redução de emissão de poluentes atmosféricos durante os últimos anos, a poluição do ar nos centros urbanos ainda representa um grande problema ambiental e de saúde (Molina e Molina, 2004).

Métodos físico-químicos, associados a modelos matemáticos permitem medir as concentrações ambientais dos principais poluentes atmosféricos. Essas medidas servem para verificar se valores limites, estabelecidos pelas leis ambientais locais ou recomendados por organizações mundiais, estão sendo respeitados (Klumpp et al., 2006).

Embora a qualidade do ar seja avaliada por meio de estimativas físico-químicas, que estimam com precisão a concentração dos poluentes, na verdade, os resultados dessas medidas não garantem conclusões a respeito do impacto desses contaminantes sobre seres vivos. De fato, os efeitos simultâneos da

associação de outros poluentes que caracterizam a mistura complexa que constitui o ar das grandes cidades sobre a biota não podem ser conhecidos a partir de informações baseadas somente na concentração de cada um desses poluentes.

De acordo com Ma (1994) e Ma et al. (1997), um “alarme natural” precisa ser empregado para detectar e alertar sobre os riscos ambientais que ameaçam o equilíbrio e a saúde dos organismos que vivem em um ecossistema.

Os ensaios de biomonitoramento caracterizam-se geralmente por permitirem o estabelecimento de bases de dados sobre condições ambientais de várias regiões do mundo (Gopalan et al., 1999). Esse inventário de dados coletados sistematicamente por meio de programas de biomonitoramento dos efeitos da poluição atmosférica sobre organismos representa um modelo experimental adicional aos métodos convencionalmente utilizados.

Klumpp et al. (2001) e Carvalho-Oliveira et al. (2005) enfatizam que o emprego de programas de biomonitoramento não pretende (e nem consegue) substituir as informações obtidas pelos parâmetros e modelos físico-químicos, mas consiste em fornecer informações adicionais referentes a efeitos dos poluentes sobre organismos.

Idealmente, deveriam ser utilizados mamíferos para a realização de estudos que buscam avaliar os efeitos de poluentes de forma que os resultados poderiam ser extrapolados para os seres humanos. Contudo, monitoramentos desse tipo são de difícil execução, pois requerem amostras populacionais grandes e não garantem isonomia dos resultados por haver inevitável variabilidade entre os indivíduos testados.

A partir da década de 1960, vários testes que utilizavam plantas para detecção de agentes com potencial genotóxico começaram a ser aplicados em estudos de biomonitoramento (Grant, 1982; Ma, 1981; Schairer, 1978).

Fatores como baixo custo operacional, alta eficiência e sensibilidade fazem das plantas bioindicadores ideais para monitoramento e investigações realizadas em laboratório ou *in situ* (Alves et al., 2001; Guimarães et al., 2000). Contudo, para que os ensaios sejam válidos e seus resultados confiáveis, a utilização de plantas bioindicadoras no monitoramento da qualidade do ar deve seguir etapas definidas, conforme pode ser visto na Figura 1, adaptada de Klumpp et al. 2001.



Figura. 1. Etapas do biomonitoramento da qualidade ambiental com utilização de plantas bioindicadores.

Ensaios para detecção de efeitos genotóxico utilizando plantas baseiam-se na alteração fenotípica de uma variedade de espécies sensíveis à ação de mutágenos. Biomonitoramentos utilizando espécies como *Zea mays*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare* e *Arabidopsis thaliana* (Plewa, 1982; Gichner et al., 2004;

Vig, 1982) foram realizados em diversos estudos, mas são atualmente considerados modelos inviáveis devido o longo tempo consumido para o cultivo e reprodução dessas plantas.

Diante da necessidade da proposição de testes rápidos e pouco dispendiosos, outros modelos de bioensaios utilizando plantas de desenvolvimento rápido e fácil propagação, como das espécies *Vicia faba*, *Allium cepa* e do gênero *Tradescantia* foram propostos e se basearam na detecção de aberrações cromossômicas que podem ser visualizadas em análises citológicas (Cotelle et al., 1999; Ma et al., 1995; Minouflet et al., 2005; Monarca et al., 2003).

Monitorar a qualidade do ar é essencial e, diante do exposto, o uso de ensaios biológicos capazes de detectar danos causados por poluentes em organismos bioindicadores contribui para a construção de parâmetros que avaliam os efeitos aditivos e sinergistas dos poluentes atmosféricos (Cohen et al., 2002; Wada et al., 2001).

#### **1.4 Genêro *Tradescantia* como biomonitor ambiental**

Bioensaios que utilizam plantas do gênero *Tradescantia* são considerados ferramentas importantes para detecção e monitoramento dos efeitos de contaminantes ambientais.

Pertencente à família Commelinaceae, o gênero *Tradescantia* comprehende aproximadamente 500 espécies que são encontradas principalmente em áreas tropicais e subtropicais do planeta (Watson e Dallwitz, 1992).

Em 1960 Sparrow produziu o clone mais frequentemente utilizado para estudos de genotoxicidade. Trata-se do clone #4430, obtido pela hibridação entre

*Tradescantia hirsutiflora*, que possui flores azuis e *Tradescantia subacaulis*, com flor rosa (Sparrow e Sparrow, 1976). Graças à sua versatilidade e sensibilidade, o clone #4430 foi empregado em biomonitoramentos da qualidade do ar em diversas cidades europeias (Isidori et al., 2003; Klumpp et al., 2006; Ma et al., 1996).

O fato de ser um híbrido estéril, garante aos ensaios que utilizam #4430 isogenicidade, uma vez que essas plantas só podem ser propagadas vegetativamente em condições peculiares de cultivo, especialmente, em relação às condições climáticas, visto que são plantas adaptadas ao clima temperado, típico dos países europeus.

O clone #03 de *Tradescantia paludosa* foi produzido ainda na década de 1940 por K. Sax e utilizado em estudos de aberrações cromossômicas (Ma, 1981). Recentemente, grupos de pesquisa brasileiros têm empregado a espécie *Tradescantia pallida* em ensaios de biomonitoramento ambiental (Alves et al., 2008; Batalha et al., 1999; De Souza Lima et al., 2009; Suyama et al., 2002).

*Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt (Figura 2) tem em média de 15 a 25cm de comprimento, é herbácea e possui características anatômicas que lhe permitem ser facilmente distinguida, como suas folhas suculentas e com epiderme rica em pigmentos do tipo antocianina, que confere coloração púrpura à planta (Joly, 2005; Lorenzi e Souza, 2008). Além disso, a espécie floresce ao longo de todo ano, é facilmente cultivada e pode ser propagada vegetativamente.



Figura.2. Inflorescência de *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt

Estudos compararam e confirmaram que a espécie *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt utilizada para biomonitoramento dos efeitos de mutágenos de origem ambiental é tão sensível quanto os clones #4430 e #03 (Andrade Junior et al., 2008; Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000; Meireles et al., 2009; Suyama et al., 2002).

A ampla utilização de *T. pallida* em estudos conduzidos no Brasil e em outros países da América do Sul em substituição aos clones produzidos e empregados nos ensaios europeus se deve às diferenças climáticas entre os dois continentes. Clones #4430 e #03 são difíceis de serem cultivados no clima tropical enquanto, *T. pallida*, de acordo com Rodrigues et al (1997), se desenvolve com facilidade nas condições climáticas tropicais, dado que essa espécie é naturalmente adaptada ao ambiente encontrado nos países latino-americanos.

Os dados e achados obtidos em experimentos com a *Tradescantia* são, em geral, consistentes, precisos e confiáveis. Em especial, a resposta a baixos níveis de contaminação e mutágenos químicos raramente é obtida com outros ensaios biológicos. Sobretudo, este tipo de estudo apresenta uma série de vantagens que o torna ideal para ser utilizado em países em desenvolvimento, pois é um sistema pouco dispendioso e versátil, podendo servir como teste para uma grande variedade de pesquisas (GRANT, 1994).

## 1.5 Teste de micronúcleos com *Tradescantia*

### 1.5.1. Fundamentos do Teste de micronúcleos com *Tradescantia*

O teste de micronúcleos com *Tradescantia* é um dos ensaios mais comumente utilizados para a detecção de efeitos clastogênicos e/ou aneugênicos em organismos superiores. Um estudo proposto por Misík et al (2011) revisou 100 artigos que foram publicados desde 1995, revelando que cerca de 160 agentes químicos já foram testados isoladamente ou em misturas complexas presentes no ambiente por meio do teste de micronúcleos com *Tradescantia*.

O teste de micronúcleos com *Tradescantia* foi primeiramente proposto por Ma et al (1978). Esse estudo comparou a frequência de micronúcleos nas tétrades com a frequência de células mutantes nos filamentos de estames em clones #4430 após a exposição das plantas a 1,2-dibromoetano (DBE). Os resultados do estudo de Ma e seus colegas revelaram que o teste de micronúcleos foi 30 vezes mais sensível que o teste utilizando os estames de *Tradescantia*. Posteriormente, outros estudos compararam e confirmaram a maior

sensibilidade do teste de micronúcleos em relação ao teste do filamento de estame no clone #4430 (Gichner e Velemínnský, 1999; Minouflet et al., 2005).

Fundamentalmente, o teste de micronúcleos com o gênero *Tradescantia* consiste em uma série de procedimentos e padronizações para exposição (no laboratório ou *in situ*) das plantas a agentes contaminantes, seguida da análise e estimativa da frequência de micronúcleos em células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrades.

O estágio de tétrades das células-mãe de grãos de pólen é ideal para a observação dos micronúcleos, pois nesse período as células encontram-se em interfase, que no gênero *Tradescantia* tem duração de 36 a 48 horas. Células em estágio de tétrade são obtidas em inflorescências jovens, que podem ser identificadas por apresentarem botões florais em estágio intermediário (Figura 3A), protegidos por folhas modificadas em brácteas que têm formato de barca (Figura 3B).

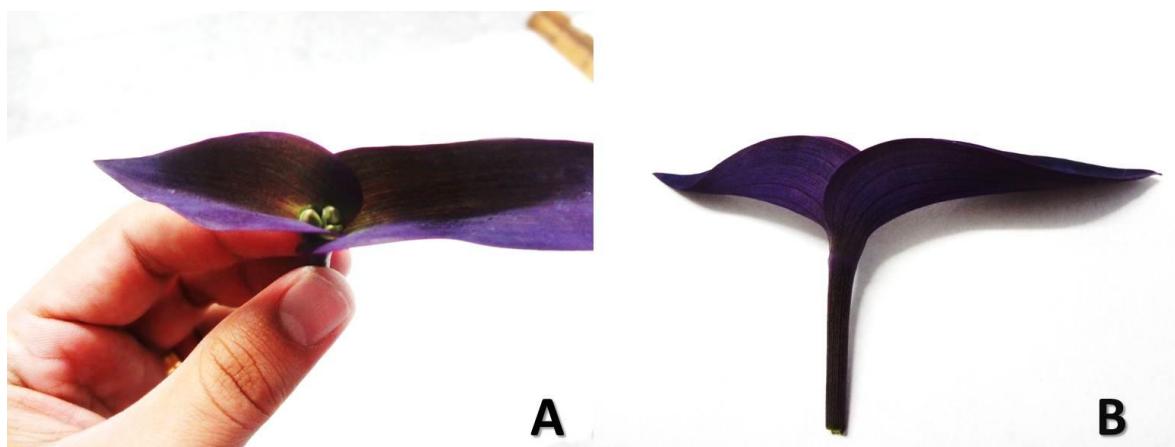


Figura. 3. Botões florais em estágio intermediário (Fig. 3A). Folhas modificadas em brácteas com formato de barca (Fig. 3B).

Micronúcleos são estruturas que resultam de fragmentos cromossômicos (efeitos clastogênico que pode ocorrer em qualquer fase do ciclo celular) ou cromossomos inteiros (efeito aneugênico que pode ocorrer na meiose I e/ou meiose II) que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos no núcleo das células filhas (Figura 4). No citoplasma interfásico, as estruturas que não se incorporaram ao núcleo podem ser visualizadas como corpúsculos não aderidos a ele, com diâmetro que pode variar de 1/5 a 1/3 do tamanho do núcleo e com mesma coloração dele, sendo classificadas como micronúcleos, refletindo, portanto, a ocorrência de efeitos genotóxicos causados por mutágenos que têm ação clastogênica ou aneugênica (Holland et al., 2008).

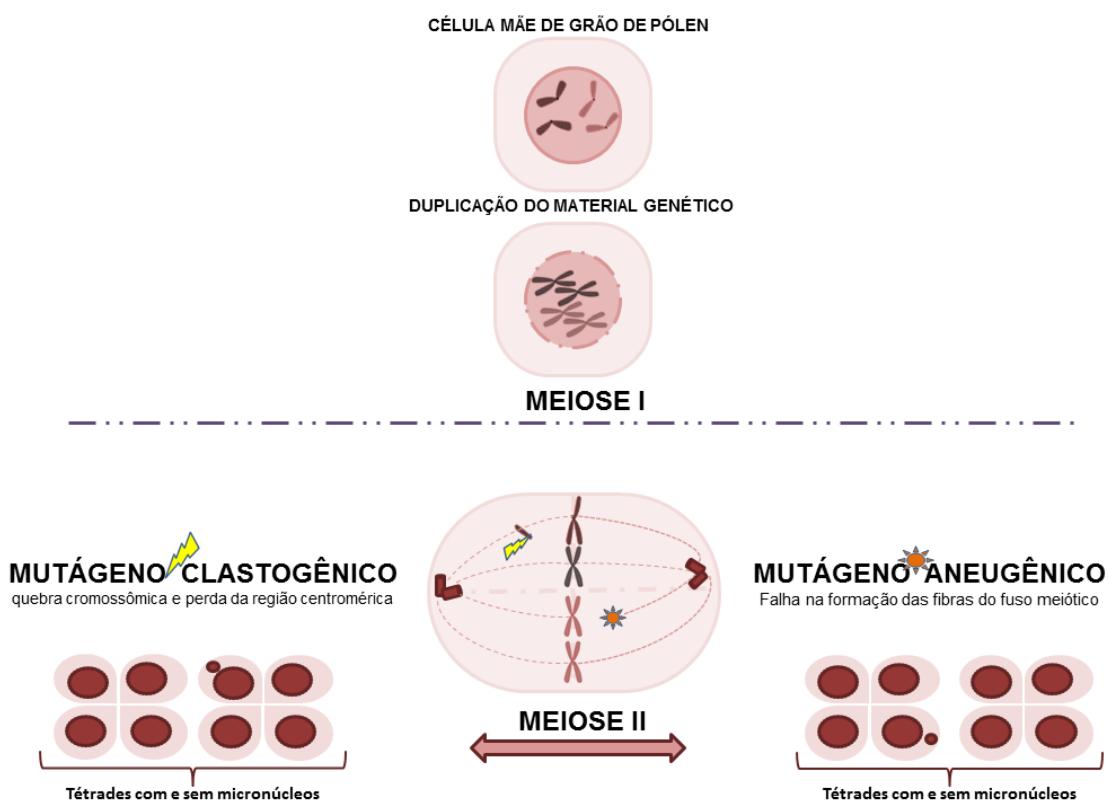


Figura. 4. Diagrama da formação de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia*.

### 1.5.2. Cultivo e exposição das plantas

Para o cultivo e manutenção adequados de *Tradescantia* primeiramente deve-se levar em consideração as condições climáticas sob as quais o estudo será desenvolvido. O cultivo em casas de vegetação é opcional em países de clima temperado e obrigatório em regiões de invernos rigorosos. Na América do Sul é comum encontrarmos a espécie *Tradescantia pallida* ornamentando jardins e canteiros urbanos.

Uma pesquisa realizada por Klumpp et al (2004) investigou a influência das condições climáticas sobre a frequência de micronúcleos e avaliou implicações para o Teste de Micronúcleos com *Tradescantia*, especialmente em relação ao cultivo e exposição das espécies da planta. De acordo com o estudo, o controle da ventilação, umidade relativa e temperatura do ar são essenciais para garantir a viabilidade dos ensaios feitos com *Tradescantia*.

De acordo com Klumpp et al (2004; 2006), à temperatura de 11°C, a frequência de mutações espontâneas que formam micronúcleos aumenta 100 vezes. No outro extremo, temperaturas de 42°C são incompatíveis com o desenvolvimento das células mãe de grãos de pólen, inviabilizando o teste de micronúcleos. Variações na umidade relativa também exercem influência na frequência espontânea de micronúcleos e podem alterar os resultados de ensaios que testem o potencial genotóxico de substâncias ou do ambiente. Baixa umidade do ar e temperaturas elevadas estimulam a abertura dos estômatos, aumentando a absorção e o transporte de substâncias com potencial mutagênico às células alvo.

Desse modo, o cultivo ideal consiste em condições controladas de temperatura, luminosidade e umidade relativa. Rodrigues (1999) indica que as condições ideais para o cultivo de *T. pallida* consiste em temperaturas de dia/noite de 21/19 °C, fotoperíodo de 17 horas e umidade relativa entre 65 e 70%.

A influência climática deve ser minimizada durante a exposição das plantas em ensaios de biomonitoramento *in situ* da atmosfera. Klumpp et al., (2006) sugeriram que a exposição à atmosfera seguisse um padrão. De acordo com esses pesquisadores, um tipo especial de caixa deve ser construído para abrigar as plantas durante o período de exposição. As caixas devem ser construídas seguindo dimensões predeterminadas (25cm X 25cm X 35cm) e devem ser cobertas (na parte superior) com tela de sombreamento (50% de permeabilidade luminosa), conforme mostrado na Figura 5. Além disso, no momento da exposição, as caixas devem ser fixadas em suportes de modo que fiquem cerca de 2,0m de altura para evitar contato com contaminantes presentes no solo.



Figura. 5. Sistema para exposição de *Tradescantia* em biomonitoramento *in situ*.

Embora exista a possibilidade de realizar um biomonitoramento passivo, ou seja, utilizando plantas que cresceram naturalmente em jardins ou canteiros urbanos, a maioria dos ensaios realizados consiste no cultivo das plantas bioindicadoras sob as condições previamente descritas e, em seguida, é realizado o transporte e exposição ao ambiente a ser monitorado.

Geralmente, 15 a 20 plantas são expostas por ponto monitorado. Além disso, é recomendável que um local de referência (com ausência ou nível baixo de poluição) seja adotado para estabelecimento de um padrão de comparação e realização de testes estatísticos de hipóteses. O tempo de exposição das plantas durante os ensaios de biomonitoramento deve ser considerado atentamente, pois segundo Fomim e Hafner (1998) exposições realizadas por um período de seis horas foram insuficientes para detectar efeitos genotóxicos. Desse modo, é recomendado que as exposições tenham duração média de 24 horas (Ma et al., 1996).

Em estudos que biomonitoraram a atmosfera os testes devem ocorrer ao longo de pelo menos 12 meses para garantir que as variações nos índices de poluentes durante as mudanças climáticas das diferentes estações possam ser consideradas, aumentando a confiabilidade dos ensaios (Klumpp et al., 2004).

Ainda que, diante do exposto, seja possível verificar a existência de uma série de procedimentos que buscam padronizar os métodos de cultivo e exposição de *Tradescantia*, os objetivos e características peculiares de cada investigação podem modificar esses protocolos sem comprometer a validade do teste (Misík et al., 2011).

### 1.5.3 Análises citogenéticas para observação de micronúcleos

A seleção, fixação e conservação das inflorescências utilizadas no teste de micronúcleos com *Tradescantia* é realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Ma (1981). Em estudos de biomonitoramento atmosférico, esse protocolo propõe que as inflorescências jovens das plantas expostas sejam coletadas e fixadas em solução de ácido acético e etanol na proporção 1:3 por 24 horas. Após a fixação, as inflorescências devem ser transferidas para etanol 70% e mantidas refrigeradas (6°C) até o momento das análises citogenéticas.

As etapas da preparação das lâminas para análise citogenética são apresentadas na Figura 6, proposta por Misík et al (2011).

O primeiro passo para o preparo das lâminas consiste na seleção e dissecação das inflorescências para isolamento dos botões florais. Para aumentar as chances de visualização de botões florais com células-mãe de grãos de pólen no estágio de tétrade, deve-se utilizar primeiramente os botões de tamanho intermediário em cada inflorescência dissecada. O botão floral selecionado é transferido para uma lâmina e dissecado com um estilete histológico para exposição das anteras. Após os fragmentos celulares resultantes da dissecação do botão floral serem retirados e descartados, as anteras podem ser maceradas.

A maceração das anteras é realizada pela adição de uma gota de carmim acético 2% e cobertura da lâmina com lamínula, pressionando suavemente as anteras para liberação das células. A fixação do corante nas células é garantida pelo aquecimento rápido (5 segundos) da lâmina à temperatura média de 60°C, utilizando lamparina com álcool.

Antes de analisar a lâmina, é sugerido que o pesquisador verifique a existência de células-mãe de grãos de pólen no estágio de tétrades em quantidade suficiente. De acordo com o protocolo padronizado por Ma (1981), pelo menos 300 tétrades devem ser avaliadas por inflorescência analisada. O número de micronúcleos presentes nas tétrades precisa ser estimado em cinco inflorescências, no mínimo, por local ou situação monitorada. As lâminas são observadas em microscópio óptico com magnificação de 400 vezes.

É importante que as lâminas sejam codificadas e que as análises sejam realizadas em um estudo cego. São considerados micronúcleos as estruturas que medem cerca de 1/3 a 1/5 do núcleo principal, que apresentam coloração e distribuição de cromatina semelhante ao núcleo e estão desconectadas deste.

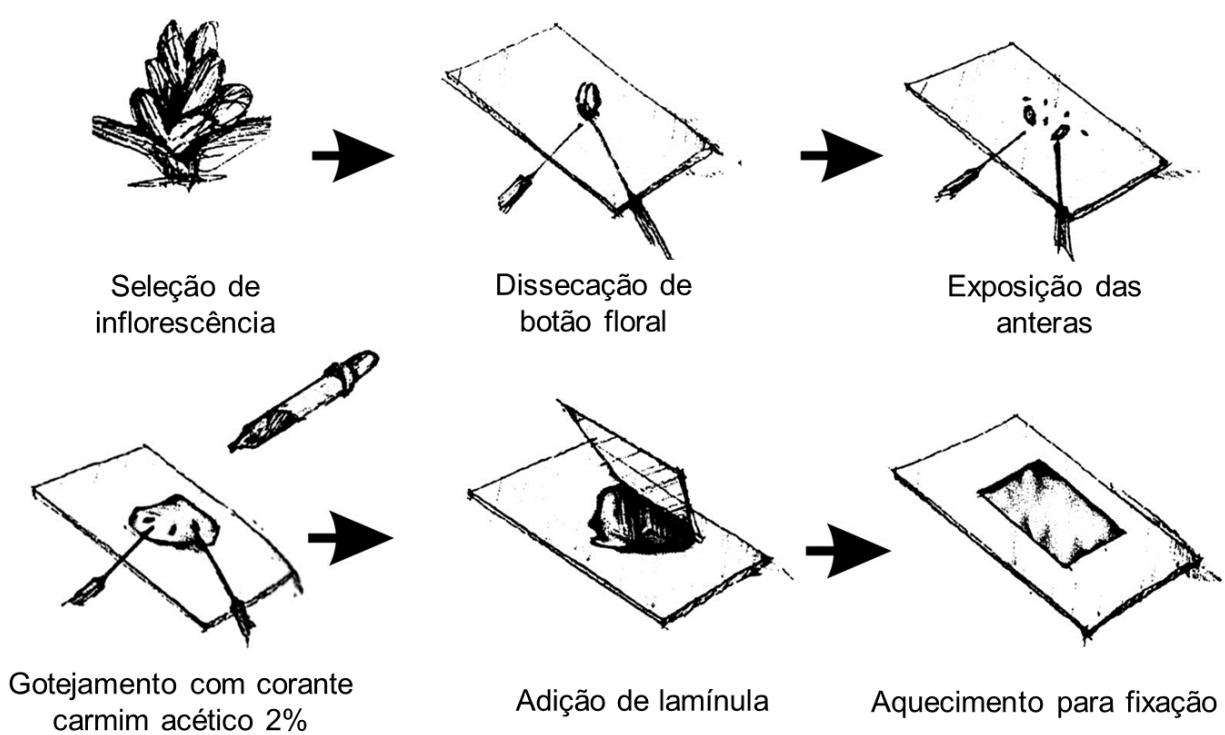


Figura. 6. Preparação das lâminas para análise citogenética.

## **1.6. Considerações sobre o teste de micronúcleos com *Tradescantia* aplicado ao monitoramento da poluição atmosférica**

Espécies e clones de *Tradescantia* são sensíveis aos efeitos de mutágenos presentes na atmosfera e, por essa razão, biomonitoramentos que avaliam a ocorrência de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia* foram conduzidos em várias localidades que apresentam tráfego intenso de veículos.

Um estudo proposto por Klumpp et al. (2006) utilizou o teste de micronúcleos com *Tradescantia* para monitorar 65 locais com diferentes níveis de tráfego veicular em 10 cidades europeias. Os resultados deste estudo revelaram o elevado potencial genotóxico das localidades com intenso tráfego de veículos em que as plantas foram expostas.

A cidade de Caserta, localizada no sul da Itália teve 17 localidades monitoradas em um estudo proposto por Isidori et al. (2003). Os autores monitoraram os efeitos genotóxicos da atmosfera da cidade ao longo do verão e inverno do mesmo ano, comparando os resultados entre localidades com diferentes níveis de tráfego de veículos. Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que as plantas expostas durante o inverno em locais com tráfego mais intenso apresentaram frequências de micronúcleos significativamente maiores que as demais localidades.

Villarini et al. (2009) monitorou os efeitos genotóxicos de poluentes atmosféricos na cidade de Perugia, localizada na região central da Itália. Coadunando com os ensaios já descritos, conduzidos na Europa, esses autores confirmaram que as plantas expostas em áreas com altos índices de poluição apresentaram as maiores frequências de micronúcleos.

Estudos realizados na América do Sul e, inclusive no Brasil, empregaram o teste de micronúcleos com *Tradescantia pallida* na avaliação da qualidade do ar de grandes centros urbanos. Os trabalhos de Batalha et al. (1999); Guimarães et al. (2000) e Carvalho-Oliveira et al. (2005) avaliaram os efeitos da poluição atmosférica da cidade de São Paulo, que possui uma das maiores frotas veiculares do mundo. Todos esses autores confirmaram a sensibilidade de *T. pallida* aos efeitos genotóxicos dos contaminantes produzidos pelo intenso tráfego de veículos.

Outras cidades no Brasil, com tráfego de veículos menor que São Paulo, mas com intensa urbanização também foram monitoradas em relação aos efeitos da contaminação atmosférica derivada da utilização de automóveis. Recentes estudos de monitoramento da qualidade do ar, utilizando o teste de micronúcleo com *T. pallida* foram conduzidos nas cidades baianas de Senhor do Bonfim (Andrade Júnior et al., 2008) e Feira de Santana (Meireles et al., 2009) e na cidade mato-grossense de Dourados (Crispim et al., 2011). Em todos esses estudos a ocorrência de micronúcleos foi proporcional ao fluxo de veículos nos locais monitorados.

Embora esse referencial teórico tenha exposto informações sobre as aplicações dos ensaios de biomonitoramento, algumas das vantagens da utilização do teste de micronúcleo com *Tradescantia* merecem serem ressaltadas. Trata-se de um ensaio rápido, simples e de baixo custo que apresenta resultados que podem ser observados diretamente em microscópio óptico. A espécie *T. pallida* pode ser propagada vegetativamente, garantindo a uniformidade genética e, além disso, floresce o ano todo, possibilitando ensaios em longo prazo.

Contudo, o teste de micronúcleos com *Tradescantia* apresenta algumas limitações. Como o teste é altamente sensível, fatores como as variações climáticas podem influenciar a taxa de mutações espontâneas. Além disso, algumas mutações estruturais cromossômicas como translocações e inversões não podem ser detectadas pelo teste. Ainda que esse bioensaio apresente certas restrições, é consenso entre os vários estudos aqui apresentados que a combinação de parâmetros físico-químicos e dos dados obtidos com o teste de micronúcleos com *Tradescantia* contribuem com a qualidade dos estudos que monitoram os impactos da poluição atmosférica.

## **Referências**

Alves, E., Giusti, P., Domingos, M., Saldiva, P., Guimarães, E., Lobo D. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de Tradescantia: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. Rev. Bras. Bot. 24 (2001) 567-576.

Alves, E. S., de Souza, S. R., Pedroso, A. N. V. and Domingos, M. Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'Purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene, Ecotoxicol. Environ. Saf., 71 (2008) 717–721.

Amorim, W. B. Monitoramento da Concentração e caracterização de Material Particulado Suspenso na Atmosfera. Campinas, SP. 2004 (Tese, Doutorado) 165 p.

Andrade, M.F., Miranda, R.M., Fornaro, A., Kerr, A., Oyama, B., Andre, P.A., Saldiva, P. Vehicle emissions and PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in six Brazilian cities, Air Qual Atmos Health. 5 (2012) 79-88.

Andrade, M.F., Orsini, C., Maenhaut, W. Relation between aerosol sources and meteorological parameters for inhalable atmospheric particles in São Paulo City, Brazil, Atmosph. Env. 28 (1994) 2307-2315.

Andrade Júnior, S., Santos Júnior, J., Oliveira, J., Cerqueira, E., Meireles, J. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea

Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana, Acta Scientiarum: Biological Sciences. 30 (2008) 295-30.

Artaxo, P., Cerab, F., Rabello, M.L.C. Elemental composition of aerosol particles from two atmospheric monitoring stations in the Amazon Basin, Nucl. Instr. Met. Phys. Res. 75 (1993) 277-281.

Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S., Saldiva, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay, Mutat. Res. 426 (1999) 229-232.

Braga, B., Hespanhol, I., Conejo, J. G. L., Mierzwa, J. C., Barros, M. T., Spencer, M., Porto, M., Nucci, N., Juliano, N., Eiger, S. Introdução à Engenharia Ambiental. 2º Edição. São Paulo: Pearson Prentice Hall. 2005. 318p.

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva, P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil, Environ. Res. 98 (2005) 1-7.

Cohen, J., Carlson, G., Charnley, G., Coggon, D., Delzell, E., Graham, J., Greim, H., Krewski, D., Medinsky, M., Monson, R., Paustenbach, D., Petersen, B., Rappaport, S., Rhomberg, L., Ryan, P., Thompson, K. A comprehensive

evaluation of the potential health risks associated with occupational and environmental exposure to styrene, J. Toxicol. Environ. Health. 5 (2002) 1-265.

CONAMA. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Resolução CONAMA nº 003, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre o estabelecimento de padrões nacionais de qualidade do ar determinando as concentrações de poluentes atmosféricos. In: MMA. Livro das Resoluções do CONAMA. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano>>. Acesso em: 07/05/2012.

Cotelle, S., Masfaraud, J. F. and Ferard, J. F. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays, Mutat. Res. 426 (1999) 167–171.

Crispim, B.A., Vaini, J.O., Grisolia, A.B., Teixeira, T.Z., Mussury, R.M., Seno, L.O. Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 718-723.

De Souza Lima, E., De Souza, S. R., Domingos, M. Sensitivity of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. 'Purpurea' Boom to genotoxicity induced by ozone, Mutat. Res. 675 (2009) 41–45.

EPA - Environmental Protection Agency of United States. Air pollution standards. 2010. Disponível em: [www.epa.gov](http://www.epa.gov). Acesso em: 01/09/2011.

European Commission of Environment - ECE. Comparison of EU and US approaches towards control of Particulate Matter: case study 4. Milieu Ltd, Danish National Environmental Research Institute and Center for Clean Air Policy, Copenhagen, 2008. Disponível em:  
[http://ec.europa.eu/environment/archives/cafe/activities/pdf/case\\_study4.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/cafe/activities/pdf/case_study4.pdf).>  
Acesso em: 01/09/2011.

Fomin, A., Hafner, C. Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN), Mutat. Res. 414 (1998) 139-148.

Gichner, T., Badayev, S. A., Demchenko, S. I., Relichova, J., Sandhu, S. S., Usmanov, P. D., Usanova, O. and Veleminsky, J. (1994) Arabidopsis assay for mutagenicity. Mutat. Res., 310, 249–256.

Gichner, T., Velemínský, J. Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays, Mutat. Res. 426 (1999) 163-166.

Gouveia, N., Fletcher, T. Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status, J. Epidemiol. Com. Health. 54 (2000) 750–755.

Grant, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat.

Res. 99 (1982) 273–291.

Grant, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens, Mutat. Res. 310 (1994) 175-185.

Guimarães, E., Domingos, M., Alves, E., Caldini, N., Lobo, D., Lichtenfels, A., Saldíva, P. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay, Environ. Exp. Bot. 44 (2000) 1-8.

Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., Knasmüller, S., Fenech, M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps, Mutat. Res. 659 (2008) 93-108.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Air Pollution Control Program by Motor Vehicles. 2011. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/programa-proconve>> Acesso em: 20/08/2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística Estimativas da população residente nos municípios brasileiros com data referência em 1º de julho de 2012. Disponível em:  
[ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas\\_Projecoes\\_Populacao/Estimativas\\_2012/estimativa\\_2012\\_municipios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_Projecoes_Populacao/Estimativas_2012/estimativa_2012_municipios.pdf). Acesso em: 31/08/2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades, MG, Uberlândia.  
Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Acesso em:  
22/08/2011.

INPE/CPTEC - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais / Centro de Previsão de  
Tempo e Estudos Climáticos. Bancos de dados climatológicos. Disponível em  
<<http://bancodedados.cptec.inpe.br>> Acesso em 18/05/2011.

IPEA. Comunicados do IPEA. Comunicado nº 103. Poluição veicular atmosférica.  
2011. Disponível em: <<http://www.ipea.gov.br>> Acesso em: 22/05/2012.

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. *In situ* monitoring of  
urbana ir in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and  
semipermeable membrane devices (SPMDs), Chemosphere 52 (2003) 121-126.

Joly, A.B. Botânica : introdução à taxonomia vegetal. 13.ed. Companhia Editora  
Nacional. 2005. 777p.

Klumpp, A., Ansel, W., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C. Influence of climatic  
conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and  
implications for the Trad-MCN bioassay protocol, Hereditas 141 (2004) 142-148.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomin, A. Um novo conceito de  
monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da

qualidade do ar usando plantas bioindicadores (EuroBionet), Rev. Bras. Bot. 24 (2001) 511-518.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J.P., He, S., Peñuelas, J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M.J., Vergne, P.

*Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities, Environ. Pollut. 139 (2006) 515-22.

Lin, C.A., Pereira, L.A.A., de Souza, C.G.M., Kishi, H.S., Milani, R., Braga, A.L.F., Saldiva, P.H.N. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits, Environ. Res. 92 (2003) 57–63.

Lorenzi, H., Souza, HM. Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 4 ed. Instituto Plantarum. 2008. 1130p.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay, Mutat. Res. 310 (1994) 221-230.

Ma, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening, Environ. Health Perspect., 37 (1981) 85–90.

Ma, T., Sparrow, A., Schairer, L., Nauman, A. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. Mutat. Res. 58 (1978) 251-258.

Ma, T., Xu, C., Liao, S., McConnell, H., Jeong, B., Won, C. In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator, *Mutat. Res.* 359 (1996) 39-52.

Ma, T. H., Xu, Z., Xu, C., McConnell, H., Rabago, E. V., Arreola, G. A., Zhang, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, *Mutat. Res.* 334 (1995) 185–195.

Maenhaut, W., Fernández-Jiménez, M.T., Rajta, I., Artaxo, P. Two-year study of atmospheric aerosols in Alta Floresta, Brazil: Multielemental composition and source apportionment, *Nucl. Instr. Met. Phys. Res.* 189 (2002) 243–248.

Mar, T. F., Norris, G.A., Koenig, J. Q., Larson, T. V. Associations between Air Pollution and Mortality in Phoenix, *Env. Health Persp.* 108 (2000) 1995-1997.

Marcilio, I., Gouveia, N. Quantifying the impact of air pollution on the urban population of Brazil, *Cad. Saúde Públ.* 23 (2007) 529-536.

Marques, R. Avaliação temporal da composição química das águas de chuva e do material particulado inalável: um estudo aplicado a Cuiabá. (Tese de Doutorado). São Paulo: IAG, 2011, 131p.

Meireles, J., Rocha, R., Neto, A.C., Cerqueira, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN), Mutat. Res. 675 (2009) 46-50.

Ministério Das Cidades. Política nacional de mobilidade urbana sustentável. Brasília, DF. 2004. 67 p.

Minouflet, M., Ayrault, S., Badot, P. M., Cotelle, S. and Ferard, J. F. Assessment of the genotoxicity of <sup>137</sup>Cs radiation using *Vicia* micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays, J. Environ. Radioact., 81 (2005) 143–153.

Miranda, R.M., Andrade, M.F., Fornaro, A., Astolfo, R., Andre, P.A., Saldiva, P. Urban air pollution: a representative survey of PM<sub>2.5</sub> mass concentrations in six Brazilian cities, Air Qual. Atmos. Health. 5 (2012) 63–77.

Misik, M., Ma, T.H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J.K., Knasmueller, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update, Mutagenesis 26 (2011) 215–221.

Monarca, S., Rizzoni, M., Gustavino, B., Zani, C., Alberti, A., Feretti, D. and Zerbini, I. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using in situ plant tests, Environ. Mol. Mutagen., 41(2003) 353–359.

Plewa, M. J. Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat. Res. 99 (1982) 317–337.

Poursafa, P., Kelishadi, R., Amini, A., Amini, A., Amin, M.M., Lahijanzadeh, M., Modaresi, M. Associação da poluição atmosférica com parâmetros hematológicos em crianças e adolescentes, J. Pediatr. 87 (2011) 350-356.

Rodrigues, G., Ma, T., Pimentel, D., Weinstein, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review, Crit. Rev. Plant Sciences, 16 (1997) 325-359.

Rodrigues, G.S. Bioensaios de toxicidade genética com *Tradescantia*. 1ed. Embrapa Meio Ambiente. 1999. 56p.

Saldiva, P.H.N., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G., Diaz, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A., Godleski, J.J. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 165 (2002) 1610–1617

Saldiva, P.H.N., Pope, C.A., 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. Env. Health. 50 (1995) 159–163.

Schainer, L. A., Van't Hof, J., Hayes, C. G., Burton, R. M., de Serres, F. J. Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the *Tradescantia* stamen hair system, Environ. Health Perspect., 27 (1978) 51–60.

SETTRAN – Secretaria de Trânsito e Transportes. Prefeitura de Uberlândia. Dados estatísticos – 2012. Disponível em<  
[http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms\\_b\\_arquivos/1536.pdf](http://www.uberlandia.mg.gov.br/uploads/cms_b_arquivos/1536.pdf)> Acesso em 29/09/2012.

Sparrow, A.H., Sparrow, R.C. Spontaneous somatic mutation frequencies for flower in several *Tradescantia* species and hybrids, Env. Exp. Botany. 16 (1976) 23-43.

Suyama, F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.S., 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 effects of X-rays, Braz. J. Med. Biol. Res. 35 (2002) 127-129.

Vig, B. K. Soybean (*Glycine max* [L.] merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutat. Res. 99 (1982) 339–347.

Villarini, M., Fatigoni, C., Dominici, L., Maestri, S., Ederli, L., Pasqualini, S., Monarca, S., Moretti, M. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two *in situ* plant bioassays, Environ. Pollut. 157 (2009) 3354-3356.

Wada, M., Kido, H., Kishikawa, N., Tou, T., Tanaka, M., Tsubokura, J., Shironita, M., Matsui, M., Kuroda, N., Nakashim, K. Assessment of air pollution in Nagasaki city: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives, and some metals, Environ. Pol. 115 (2001) 139-147.

Watson, L., Dallwitz, M. J. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. (1992). Disponível em: <<http://delta-intkey.com>> Acesso em 10/08/2010.

WHO-World Health Organization. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide Global updated 2005. 2006. Disponível em:

<[http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_SDE\\_PHE\\_OEH\\_06.02\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf)> Acesso em 01/09/2011.

# **Capítulo II**

---

## **ARTIGO CIENTÍFICO**

**Título:**

Biomonitoring air genotoxicity during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

**Periódico:**

Environmental Pollution

**Fator de impacto do periódico:** 3.746

**Biomonitoring air genotoxicity during and after a public transportation strike  
in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil**

Boscolli Barbosa Pereira<sup>1\*</sup>, Edimar Olegário de Campos Júnior<sup>1</sup>, Euclides Antônio Pereira de Lima<sup>2</sup>, Marcos Antonio Souza Barrozo<sup>3</sup>, Sandra Morelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Uberlândia, Department of Genetics and Biochemistry,  
Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Umuarama Campus, Avenida Pará,  
1720, 38.400-902 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Sociedade Educacional Uberabense, Department of Environmental Engineering,  
Avenida Rondon Pacheco, 2000, 38.408-343 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

<sup>3</sup>Federal University of Uberlândia, Science and Technology Center, School of  
Chemical Engineering, Santa Mônica Campus, Avenida João Naves de Ávila,  
2121, 38.400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author. Phone +55 34 3218 2489.

E-mail address:

boscolli86@hotmail.com (B. B. Pereira)  
edimarcampos@yahoo.com.br (E. O. Campos Júnior)  
euclidesapl@yahoo.com.br (E. A. P. Lima)  
masbarrozo@ufu.br (M. A. S. Barrozo)  
morelli@ufu.br (S. Morelli)

## **Resumo:**

Diante da carência de informações sobre a qualidade do ar da cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil e da possibilidade da realização de um experimento inédito, o presente estudo revela os resultados de um biomonitoramento in situ da genotoxicidade do ar do centro da cidade durante e após uma paralização do transporte coletivo público por meio do teste de micronúcleos com *Tradescantia*. A frequência de micronúcleos foi significativamente maior (Mann-Whitney,  $p<0.05$ ) na região central da cidade em comparação com o local de referência utilizado, sendo que os maiores níveis de MN foram observados nos dias de paralisação do transporte coletivo (Kruskal-Wallis; Dunn,  $p< 0.01$ ). Adicionalmente, uma regressão linear múltipla revelou que a frequência de MN foi influenciada positivamente pela baixa circulação de ônibus durante os dias de paralisação do transporte coletivo e pelo incremento na concentração de material particulado, resultante do aumento do fluxo de veículos no centro da cidade durante a greve.

**Palavras-chave:** Clastogenicidade, Aneugenicidade, Genotoxicidade, Poluição veicular, Teste de micronúcleos com *Tradescantia*.

**Abstract:**

The aim of this study was to address the lack of information concerning the air quality in the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. In this study, we conducted an unprecedented experiment involving the *in situ* biomonitoring of air genotoxicity in the city center during and after a public transportation strike using the *Tradescantia* micronucleus test. The frequency of micronuclei was significantly higher in the city center compared with the reference site (Mann-Whitney test,  $p<0.05$ ), with the highest MN levels being observed during public transport stoppage (Kruskal-Wallis, Dunn  $p<0.01$ ). In addition, the multiple linear regression analyses revealed that the low circulation of buses during public transport stoppage and the increase in the concentration of particulate matter from the increased flow of vehicles in the city center during the strike positively influenced the MN frequency.

**Keywords:** Clastogenicity, aneugenicity, urban air genotoxicity, vehicle pollution, *Tradescantia*-micronuclei test

## **1. Introduction**

The economic development, increasing rates of urbanization, political and fiscal incentives for the production and purchase of vehicles and, particularly, the lack of public policies encouraging and modernizing public transportation have all been cited as causal factors for the significant increase in individual motorization in Brazil.

The city of Uberlândia in southeast Brazil contained 313,950 vehicles in 2010, representing the second largest fleet in the state of Minas Gerais. Data from the National Traffic Department (Departamento Nacional de Trânsito - DENATRAN, 2010) show that the motorization rate in the city of Uberlândia in 2010 was 52 vehicles per 100 inhabitants, while the national average was 34 vehicles per 100 inhabitants.

In Uberlândia, as in any other large urban center, increasing numbers of vehicles have intensified traffic, causing congestion and inconvenience. Additionally, the combustion of fuel for automotive engines contaminates the urban atmosphere with ozone, sulfur and nitrogen oxides, heavy metals, organic compounds and particulate matter, causing damage to the environment and, consequently, to human health (Kampa and Castanas, 2008).

Public transportation in Uberlândia essentially consists of buses, as there are no trains or subways in the city. On weekdays, approximately 240 buses pass through the city center every hour (SETTRAN, 2011). On May 17<sup>th</sup>, 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> in 2010, the public transport workers of Uberlândia went on strike, reducing the bus traffic to approximately 50% of the normal amount observed on working days. As there is a lack of information concerning the air quality in the city, and the

occurrence of the strike presented an opportunity to conduct a natural experiment, we attempted to biomonitor air genotoxicity in the city center during and after the public transportation strike using a *Tradescantia* micronucleus test.

According to Misik et al. (2011), many studies have used plants to biomonitor the effects of genotoxic agents on the environment. The simplicity, low cost and high sensitivity of the *Tradescantia* micronucleus test (TRAD-MN) has contributed to the popular use of this technique for detecting the clastogenic effects of vehicular emissions in Brazil (Batalha et al., 1999; Carvalho-Oliveira et al., 2005; Guimarães et al., 2000; Meireles et al., 2009; Savóia et al., 2009; Umbuzeiro et al., 2008) and other countries (Carreras et al., 2006; Klumpp et al., 2006; Misik et al., 2006; Prajapati and Tripathi, 2008; Villarini et al., 2009).

Therefore, the aim of this unprecedented experiment was to provide evidence demonstrating the importance of monitoring/controlling pollutant emissions in high-traffic areas and of investing in public transport as an option to reduce pollutant emissions from automobiles.

## **2. Material and Methods**

### *2.1. Monitoring and reference sites*

The area outside the central transportation terminal in the city center of Uberlândia ( $18^{\circ} 54'47.37"S$ ,  $48^{\circ}16'31.83"W$ ) was selected as the monitoring site because this area typically has the highest frequency of bus traffic. To ensure the absence of vehicular traffic, the orchard at the Institute of Biology, Federal

University of Uberlândia ( $18^{\circ}53'08.85''S$ ,  $48^{\circ}15'34.64''W$ ) was used as a reference site (control).

Both study locations (monitoring and reference) were located near the city's Climatological Station ( $18^{\circ}55'01.63''S$ ,  $48^{\circ}15'20.60''W$ ), which provided information concerning the daily climatic conditions during the testing period. The Municipal Traffic and Transportation Department (Secretaria Municipal de Trânsito e Transportes - SETTRAN) estimated and reported the number of buses that passed through the monitored site. The data for the particulate matter ( $PM_{10}$ ) were obtained using a high volume sampler (Hi-Vol, Energética, Brazil) installed in the area outside the Central Public Transport Terminal.

## *2.2. Cultivation and exhibition of plants*

The plant species *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom was used for this study. The plants were derived and propagated from the same parent and grown in a greenhouse at the Federal University of Uberlândia under controlled temperature, humidity and lighting conditions. The growing conditions consisted of the use of the reference soil type ED73, commercial liquid fertilizer NPK (10:10:10), weekly irrigation and temperature and relative humidity variations between day and night at  $26/19^{\circ}C$  and 64/70%, respectively. A photoperiod of 16 hours was used for flowering induction.

Twenty inflorescences were exposed daily from May 17<sup>th</sup> through May 23<sup>rd</sup> in 2010 in the city center and at the reference site. The inflorescences were exposed each day during the same daily public transportation circulation period in the city at each site between 06:00 am and 11:59 pm, totaling 18 hours of

exposure per day during the three-day transportation stoppage and for four days after the stoppage.

In accordance with the suggestions of Klumpp et al. (2006), boxes were built to house the plants (25 cm X 25 cm X 35 cm) and to reduce the influence of external factors on the responses obtained. The tops and sides of the boxes were covered with shading fabric (50%) to protect the plants from excessive heat and sunlight. The plant boxes were placed on supports at 2 m off the ground to prevent the pollutants in the soil from reaching the plants.

### *2.3.Trad-MCN assay*

According to the protocol of Ma et al. (1994), five young inflorescences were collected from each site during every day of the testing period. The inflorescences were immediately fixed in an absolute ethyl alcohol and 45% acetic acid (3:1) solution. After 24 hours of fixation, the inflorescences were transferred to a 70% alcohol solution and stored at 6°C until further preparation.

For the slide preparation, the young inflorescences were dissected to expose the anthers. After the disposal of the flower bud fragments, a drop of acetic carmine dye (2%) was applied to the anthers, and the samples were carefully covered and pressed underneath a coverslip. Five slides were prepared from each site during every day of the monitoring period. The number of micronuclei in 300 tetrads per slide was counted using an optical microscope at 400x magnification, and the results were expressed as a percentage (frequency of micronuclei in 100 tetrads). The slides were coded during analysis and decoded at the end of the cytogenetic testing period.

#### *2.4. Statistical analysis*

The Mann-Whitney test was used to compare the frequency of micronuclei between the monitored site (town center) and the reference site (Umuarama campus). Additionally, the Kruskal-Wallis test and multiple comparisons (Dunn test) were used to identify the monitored events with the highest frequency of micronuclei.

A multiple linear regression analysis was used to evaluate the relationship between the frequency of micronuclei, the concentration of particulate matter emitted, bus traffic and the influence of climatic conditions (air temperature, relative humidity, solar radiation and precipitation) in the monitored locations. The regression equation obtained showed only the factors that contributed significantly to the variations in MN frequency.

### **3. Results and Discussion**

According to DENATRAN (2010), Uberlândia has one of the largest automotive fleets in Brazil. A reduction in the number of circulating buses during the three days of the strike, as shown in Figure 1, was reflected in the intensification of traffic in the city center due to the increased use of private cars, taxis and vans, thus raising the level of pollutant emissions.

According to the results of the study, which was conducted over a 7-day evaluation period, higher levels of particulate matter were observed on days when

there was a public transport stoppage, and the four days after the strike showed the lowest concentrations (Figure 2).

Although the PM<sub>10</sub> levels in the city center of Uberlândia during the evaluation period did not exceed the recommended daily limit of 50 µg/m<sup>3</sup> in accordance with the “Conselho Nacional de Meio Ambiente” - CONAMA Resolution No. 003/1990 (CONAMA, 2005). This study revealed that the monitored environment (center of Uberlândia) was associated with the occurrence of genotoxic events, as observed from the TRAD-MN test.

As shown in Table 1, the MN frequency was significantly higher in the city center area (monitored site) than in the reference location, and according to the Dunn test, the highest MN levels were observed on the public transport stoppage days.

The relationships among the MN frequency, PM<sub>10</sub> concentrations, bus traffic and climatic conditions of the monitored events were determined using a multiple regression analysis (Figure 3). The mathematical model that best represents the prediction of micronuclei frequency (Y) includes only the variables concerning the PM<sub>10</sub> daily concentration ( $X_1$ ) and bus fleet in circulation ( $X_2$ ) and is represented with the following equation:

$$[\log_{10}MN=0.8145 + 0.0685X_1 + (-0.0032X_2), R^2=0.72, F=18.01, p<0.001].$$

According to the data obtained from the multiple linear regression analysis, the variables  $X_1$  and  $X_2$  accounted for 73,27% and 3,33% of the coefficient of determination ( $R^2$ ), respectively. The air temperature ( $X_3$ ), relative humidity ( $X_4$ ), sunshine ( $X_5$ ) and rainfall ( $X_6$ ) variables were not considered in the regression curve analysis because they accounted for only 3,2% of the  $R^2$ .

As observed in Table 2, the climatic factors did not change during the biomonitoring period, reflecting the fact that climatic factors did not influence the MN frequency according to the multiple linear regression analysis. However, the long-term biomonitoring performed during different seasons using the TRAD-MN test have shown the direct influence of environmental factors, particularly those derived from changes in the relative humidity. Low relative air humidity promotes stomatal opening and thereby increases the absorption and transport of mutagenic substances in these cells (Klumpp et al. 2006).

The data provided of the Kruskal-Wallis test and multiple linear regression analysis revealed that the low bus circulation during the public transport stoppage and the increase in particulate matter concentration (a consequence of the increased flow of vehicles in the city center during the strike) were factors that influenced MN frequency in the *T. pallida* tetrads.

Although the results obtained from monitoring the urban environment in a specific situation are difficult to reproduce, other studies in Brazil and other countries corroborate these results, reinforcing the idea that the air in regions with intense vehicular traffic show the greatest genotoxic potential (Isidori et al., 2003; Meireles et al., 2009, Crispim et al., 2012), even in situations with PM<sub>10</sub> concentrations of less than 50 µg/m<sup>3</sup> (Isidori et al. 2003; Guimaraes et al. 2004).

Twenty years ago, it would have been reasonable to argue that during a citywide public transport stoppage, there would be a reduction in the overall levels of vehicle emissions. However, the current trend in urban mobility in Brazil is characterized by the growth of individual motorized transport and a reduction in the use of public transportation (IPEA, 2011).

From an environmental standpoint, the increase in the numbers of individual vehicles leads to an increase in air pollution levels in large cities (Carvalho-Oliveira et al., 2005). Solutions to this problem might include changes in automotive technologies, such as the use of hybrid or electric cars, the investment in public policies that prioritize the use of public transport and the adoption of air quality monitoring programs in major cities.

Thus, the development of parameters to estimate the effects of air pollution on human health and the environment has become a global challenge. Given the impact that particulate matter can have on the health of an individual, the World Health Organization (WHO) has established standards for monitoring air pollution (WHO, 2006).

Despite the existence of these recommendations, the CONAMA Resolution No. 003/1990 has established Brazil's current air quality standards, which only includes standards for inhalable particulate matter ( $PM_{10}$ ).

As this resolution was established in 1990, the Brazilian standard regarding  $PM_{10}$  requires discussion and update. In comparison, other countries have adopted more stringent standards. While daily emissions of  $PM_{10}$  are limited to 50  $\mu g/m^3$  in Brazil, the WHO and the European Commission of Environment (ECE) have recommended maximum daily emissions of 20 and 40  $\mu g/m^3$ , respectively (ECE, 2004).

According to SETTRAN (2011), the city of Uberlândia has one of the newest and most modern transportation systems in the country, which satisfies the requirements for reducing pollutant emissions in accordance with the Air Pollution Control Program for Motor Vehicles of the Brazilian Institute for the Environment and Renewable Natural Resources (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos

Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, PROCONVE, 2011). While the age and engine technology of the buses are pre-determined during the bidding process for the provision of public transport in the city, the only air quality monitoring parameter is a high-volume sampler at the city's Central Public Transport Terminal, which provides data on inhalable particulate matter ( $PM_{10}$ ).

According to Monarch et al. 1999; Isidori et al. 2003 and Misik et al. 2006, air pollution results from a complex mixture of metals, organic compounds and secondary compounds generated from photochemical reactions. Only certain substances are detected in towns where there are air quality chemical monitoring stations, and although the components have been identified, this analysis alone cannot establish the genotoxic potential of air (Villarini et al. 2009).

This study is therefore important because the chemical standard for particulate matter ( $PM_{10}$ ) is integrated with *in situ* biomonitoring using the TRAD-MN test as a biological parameter to analyze the air genotoxicity of central Uberlândia during and after a public transportation stoppage.

Thus, we propose that our results not only demonstrate that vehicle emissions contain mutagenic substances but also provide substantiated evidence that investments in public transport contribute directly to air quality through reductions in the flow of vehicles, thereby reducing the mutagenic potential of the air in large cities.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

The authors are grateful to SETTRAN for providing information associated with traffic at the monitored site and to Prof. Dr. Luiz Antônio de Oliveira of the Laboratory of Climatology and Water Resources (Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos) for sharing the climatological data used in this study.

## References

Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S., Saldiva, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay, *Mutat. Res.* 426 (1999) 229-232.

Carreras, H.A., Pignata, M.L., Saldiva, P.H.N. *In situ* monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 7824-7830.

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustillo, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva, P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil, *Environ. Res.* 98 (2005) 1-7.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 003, de 28 de junho de 1990. Dispõe sobre o estabelecimento de padrões nacionais de qualidade do ar determinando as

concentrações de poluentes atmosféricos. In: MMA. Livro das Resoluções do CONAMA. Brasília, 2005. Available from:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano> (accessed 07/05/2012).

Crispim, B.A., Vaini, J.O., Grisolia, A.B., Teixeira, T.Z., Mussury, R.M., Seno, L.O. Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil, Environ. Sci. Pollut. Res. 19 (2012) 718-723.

DENATRAN - Departamento Nacional de Trânsito. Frota veicular – Estatística de Dezembro de 2010. Available from: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm> (accessed 02/01/2012).

European Commission of Environment - ECE. Comparison of EU and US approaches towards control of Particulate Matter: case study 4. Milieu Ltd, Danish National Environmental Research Institute and Center for Clean Air Policy, Copenhagen, 2004. Available from:  
[http://ec.europa.eu/environment/archives/cafe/activities/pdf/case\\_study4.pdf](http://ec.europa.eu/environment/archives/cafe/activities/pdf/case_study4.pdf) (accessed 01/09/2011).

Guimarães, E.T., Domingos, M., Alves, E.S., Caldini, N., Lobo, D.J., Lichtenfels, A.J., Saldiva, P.H. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay, Environ. Exp. Bot. 44 (2000) 1-8.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Programa de Controle de Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE). 2011. Available from: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/programa-proconve>> (accessed 20/08/2012).

IPEA. Comunicados do IPEA. Comunicado nº 103. Poluição veicular atmosférica. 2011. Available from: <<http://www.ipea.gov.br>> (accessed 22/05/2012).

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. *In situ* monitoring of urbana ir in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and semipermeable membrane devices (SPMDs), Chemosphere 52 (2003) 121-126.

Kampa, M., Castanas, E. Human health effects of air pollution, Environmental Pollution 151 (2008) 362–367.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J.P., He, S., Peñuelas, J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M.J., Vergne, P. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities, Environ. Pollut. 139 (2006) 515-22.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay, Mutat. Res. 310 (1994) 221-230.

Meireles, J., Rocha, R., Neto, A.C., Cerqueira, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN), Mutat. Res. 675 (2009) 46-50.

Misík, M., Ma, T.H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J.K., Knasmueller, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update, Mutagenesis 26 (2011) 215–221.

Misík, M., Solenská, M., Micieta, K., Misikova, K., Knasmüller, S. *In situ* monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays, Mutat. Res. 605 (2006) 1-6.

Monarca, S., Ferreti, D., Zanardini, A., Falistocco, E., Nardi, G. Monitoring of mutagens in urban air samples. Mutat. Res. 426 (1999) 189-192.

Prajapati, S.K., Tripathi, B.D. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay, Environ. Int. 34 (2008) 1092-1096.

Savóia, E.J.L., Domingos, M., Guimarães, E.T., Brumati, F., Saldiva, P.H.N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay, Ecotoxicol. Environ. Saf. 72 (2009) 255-260.

SETTRAN – Secretaria de Trânsito e Transportes. Prefeitura de Uberlândia.

Dados estatísticos – 2011. Available from:

<<http://www.uberlandia.mg.gov.br/?pagina=secretariasOrgaos&s=78>> (accessed 29/09/2011).

Umbuzeiro, G.A., Franco, A., Martins, M.H., Kummrowa, F., Carvalho, L., Schmeiserd, H.H., Leykaufd, J., Stiborovae, M., Claxtonf, L.D. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil, *Mutat. Res.* 652 (2008) 72-80.

Villarini, M., Fatigoni, C., Dominici, L., Maestri, S., Ederli, L., Pasqualini, S., Monarca, S., Moretti, M. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two *in situ* plant bioassays, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3354-3356.

WHO-World Health Organization. WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide Global updated 2005. 2006.

Available from:

<[http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO\\_SDE\\_PHE\\_OEH\\_06.02\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf)> (acessed 01/09/2011).

**Table 1**

Daily average percentage of micronucleus (AV), expressed in %, and respective standard errors (SE) in inflorescences of *T. pallida* cv. Purpurea and percentage of alteration (%A) in the average frequencies of micronucleus daily estimated in inflorescences from monitored site (town center) relative to those from Umuarama Campus (reference site).

DAY	Umuarama Campus (reference site)		town center (monitored site)		
	AV	SE	AV	SE	%A
05-17-2010	0.8	0.1	2.4	0.2	201*†
05-18-2010	1.0	0.2	4.4	0.5	361*†
05-19-2010	0.7	0.1	2.5	0.3	278*†
05-20-2010	0.9	0.1	1.9	0.2	109*
05-21-2010	0.9	0.1	2.0	0.1	127*
05-22-2010	0.8	0.1	1.5	0.1	80*
05-23-2010	0.8	0.1	1.3	0.1	62*

\*Significant increase (Mann-Whitney rank sum - test;  $p<0.05$ )

†Monitored events (days) with significantly higher average frequencies of micronucleus (Dunn test;  $p<0.01$ ).

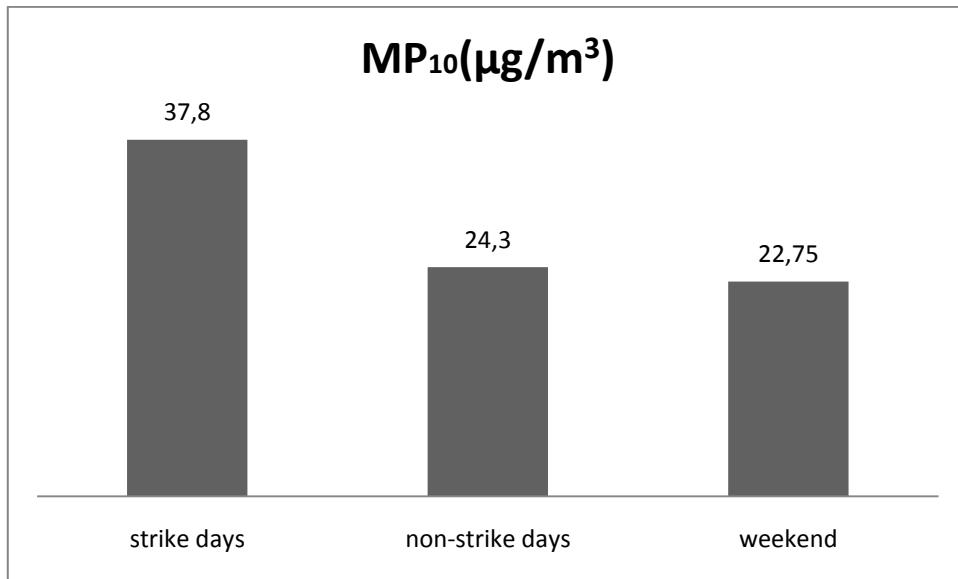
**Table 2**

The weather conditions during the 18 hours/day of plant exposure in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The study period lasted from 05-17-2010 to 05-23-2010.

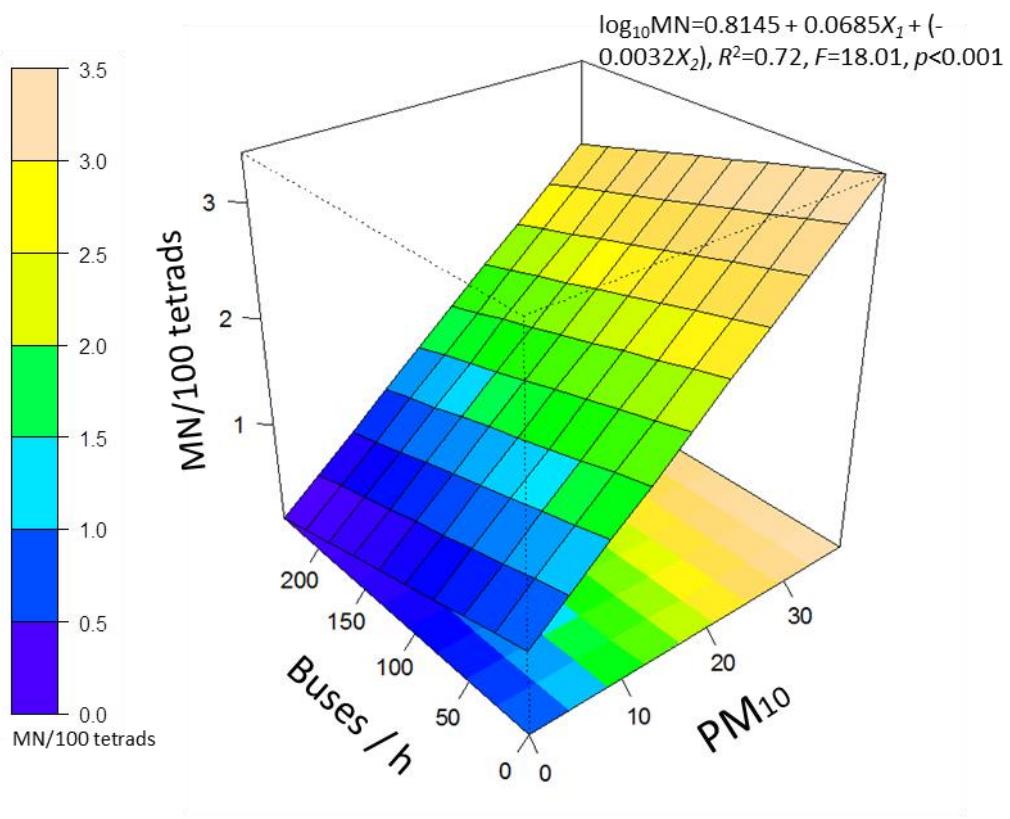
Weather conditions				
Day	Temperature (min-max °C)	Relative humidity (%)	Insolation (h)	Rainfall (mm)
05-17-2010	23.0-31.2	42-71	9.9	0
05-18-2010	23.0-26.9	61-73	6.3	0
05-19-2010	18.0-26.2	67-96	5.0	2.7
05-20-2010	17.0-24.8	81-83	9.8	0.5
05-21-2010	16.8-25.0	58-77	9.7	0
05-22-2010	20.2-26.4	50-63	9.6	0
05-23-2010	21.0-30.0	44-71	6.4	0



**Fig.1.** Frequency of buses passing in the monitored site (town center) per hour (buses/h) in Uberlândia, Brazil, during the strike days, non-strike days and weekend (Saturday and Sunday).



**Fig.2.** Concentrations of particulate material (PM<sub>10</sub>) at the monitored site (town center) in Uberlândia, Brazil, during the strike days, non-strike days and weekend (Saturday and Sunday).



**Fig. 3.** Surface graphic representation of the multiple regression analysis between concentration of particulate matter emitted, bus traffic and the frequency of micronuclei (MN) in inflorescences of *Tradescantia pallida* obtained during the biomonitoring study.

# Capítulo III

---

## ARTIGO CIENTÍFICO

**Título:**

*In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay

**Periódico:**

Ecotoxicology and Environmental Safety | Volume 87, 1 January 2013, Pages 17–22

**Fator de impacto do periódico:** 2.294

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.003>

***In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in  
Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay**

Boscolli Barbosa Pereira<sup>1\*</sup>, Edimar Olegário de Campos Júnior<sup>1</sup>, Sandra Morelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of Uberlândia, Department of Genetics and Biochemistry,  
Laboratory of Cytogenetics and Mutagenesis, Umuarama Campus, Avenida Pará,  
1720, 38.400-902 Uberlândia, Minas Gerais, Brazil.

\*Corresponding author. Phone +55 34 3218 2489.

E-mail address:

boscolli86@hotmail.com (B. B. Pereira)

edimarcampos@yahoo.com.br (E. O. Campos Júnior)

morelli@ufu.br (S. Morelli)

## **Resumo:**

O crescimento da frota veicular em grandes cidades está diretamente associado à mudança na composição química da atmosfera urbana, que passa a apresentar elevadas concentrações de substâncias com potencial genotóxico. Desse modo, conhecer e monitorar os riscos da exposição aos poluentes atmosféricos torna-se ação indispensável na prevenção de problemas ambientais e de saúde.

Considerando a inexistência de informações confiáveis sobre a qualidade do ar na cidade de Uberlândia, o presente estudo pretendeu avaliar se os riscos genotóxicos de áreas com diferentes intensidades de tráfego veicular poderiam ser discriminados pelo ensaio de micronúcleos com *Tradescantia* (Trad-MN). Para tanto, do inverno de 2006 ao verão de 2010, pelo menos vinte inflorescências foram expostas, duas vezes ao ano, em locais com diferentes índices de fluxo veicular, e avaliadas quanto à frequência de micronúcleos. Adicionalmente, procuramos determinar a influência de fatores associados ao clima da cidade nas frequências de micronúcleos encontradas em cada local monitorado. Os resultados obtidos revelam que, embora a baixa umidade relativa do ar tenha exercido influência positiva na formação de micronúcleos nas tétrades de *T.pallida*, o principal fator determinante para os efeitos genotóxicos observados foi a elevação do fluxo de veículos nos locais monitorados ao longo de cinco anos de estudo.

**Palavras-chave:** Genotoxicidade, poluição veicular, *Tradescantia pallida*.

**Abstract:**

The growing number of cars in large cities is directly linked to changes in the chemical composition of urban air, which increasingly has high concentrations of potentially genotoxic chemicals. Therefore, discovering and monitoring the risks associated with exposure to atmospheric pollutants is indispensable for preventing environmental and health problems. Because of the lack of reliable data regarding the air quality in the city of Uberlândia, the present study sought to test whether the genotoxic risks in areas with different levels of vehicular traffic can be measured using the *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MN). Therefore, more than 20 inflorescences were exposed to locations with different amounts of vehicular traffic twice per year from the winter of 2006 to the summer of 2011. The inflorescences were then analysed to determine the micronucleus (MN) frequency. In addition, we sought to determine the influence of factors linked to city climate on the MN frequencies obtained at each monitored location. Our results show that, although low relative humidity positively influenced MN formation in *T. pallida* tetrads, the major determining factor for genotoxic events was the level of vehicular traffic at the locations monitored over the five-year study.

**Keywords:** Genotoxicity, vehicle pollution, *Tradescantia pallida*

## **1. Introduction**

The current dilemma between economic growth and environmental quality in developing countries is exemplified by the growth of vehicular traffic in Brazil.

According to the Brazilian Department of Transportation (2011), the country has approximately 70 million automobiles. The country's southeastern region accounts for 50.9% of this total, and the state of Minas Gerais alone has 7.6 million vehicles. Uberlândia has the second highest vehicular fleet in the state of Minas Gerais. However, no studies have investigated the potential biological risks caused by the increase in air pollution in the city.

The air in large cities is usually contaminated by pollutants generated from the fuel burning that occurs in automobile engines. Among these contaminants, heavy metals, organic compounds, particulates and sulphur oxides all have serious environmental (Isidori et al., 2003; Umbuzeiro et al., 2008) and health (Mariani et al., 2009) risks.

Due to the growing need to monitor air quality, numerous studies have used plants as biomonitoring tools (Misik et al., 2011). Factors such as simplicity, low cost and high sensitivity make the *Tradescantia* micronucleus assay (Trad-MN) a key tool for detecting the clastogenic effects caused by vehicle emissions (Batalha et al., 1999; Carreras et al., 2006; Carvalho-Oliveira et al., 2005; Guimarães et al., 2000; Klumpp et al., 2006; Meireles et al., 2009; Misik et al., 2006; Prajapati and Tripathi, 2008; Savóia et al., 2009; Umbuzeiro et al., 2008; Villarini et al., 2009). The assay consists of detecting the micronuclei arising from breaks that occur in the chromosomes of pollen grains during meiosis.

The present study used the Trad-MN assay as part of an air quality biomonitoring program in the city of Uberlândia. The relationship between micronucleus (MN) formation in *Tradescantia pallida* (purple queen) tetrads and vehicular traffic was examined over five years, with consideration given to the effects that climatic factors had on the assays at each monitoring location.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Monitored locations*

According to the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE, 2011), the city of Uberlândia is located in southeastern Brazil, covers 4,115 km<sup>2</sup> and has an estimated population of 611,903 inhabitants. Uberlândia has a high-altitude tropical (Cwa) climate (Peel, 2007) with dry winters and rainy summers. The average temperature does not change greatly throughout the year, averaging 22.3°C (INPE/CPTEC, 2011).

The monitored locations (Figure 1) were required to meet four criteria: different rates of vehicular traffic, similar proportions of bus and truck traffic, the daily monitoring of traffic flow by the Uberlândia City Secretary of Transit and Transportation (Secretaria Municipal de Trânsito e Transportes de Uberlândia, SETTRAN) and close proximity to the Uberlândia weather station (18°55'01.63" S, 48°15'20.60 W). Four locations were chosen for biomonitoring based on these criteria: (Location 1) the intersection of Rondon Pacheco and Paraná Avenues (18°53'58.42" S, 48°15'31.76" W), (Location 2) the intersection of João Naves de

Ávila and Cesário Alvin Avenues ( $18^{\circ}54'58.42''$  S,  $48^{\circ}16'21.37''$  W), (Location 3) the intersection of Floriano Peixoto and João Naves de Ávila Avenues ( $18^{\circ}54'57.59''$  S,  $48^{\circ}16'27.70''$  W) and (Location 4) the intersection of Rondon Pacheco and João Naves de Ávila Avenues ( $18^{\circ}54'40.92''$  S,  $48^{\circ}15'45.49''$  W). The garden at the Federal University of Uberlândia, Institute of Biology ( $18^{\circ} 53' 08.85''$  S,  $48^{\circ} 15' 34.64''$  W) was used as a control, as it does not have any vehicular traffic.

The Climatology and Water Resources Laboratory at the Federal University of Uberlândia is responsible for the city's weather station, and collected all of the data indicating the meteorological conditions (air temperature, relative humidity, insolation and rainfall) that the plants were exposed to during each biomonitoring period. Locations close to the weather station were chosen to ensure the weather conditions were similar and known. The number of vehicles that drove through the monitored locations during the plant exposure times was estimated and given to us by SETTRAN.

## 2.2. Plant growth and exposure

Plants from the species *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom were grown in the Federal University of Uberlândia greenhouse. The plants were cultivated in flowerpots using standardised commercial soil ED73, weekly irrigated and fertilised with a commercial liquid NPK (10:10:10) fertiliser. The temperature and relative humidity inside greenhouse were controlled. The cultivation conditions consisted of day/night temperatures of 26/19, day/night relative humidity of 65/70% and a day light cycle of 16h to induce flowering. All of

the plants were derived from the same individual by vegetative propagation. The spontaneous mutation rates for the plants in the greenhouse were regularly tested and did not exceed 2 MN/100 tetrads. These data, however, were not included in the between-exposure comparisons at the different monitored locations.

Twenty inflorescences were exposed to each monitored location during the winter (dry season) and summer (rainy season), for a total of 10 exposures per location over the course of five years (winter 2006 to the summer of 2011). The inflorescences were exposed to the monitored locations on workdays between 6:00 am and 11:59 pm, for a total of 18 hours of exposure.

For exposure, exposure boxes (25 cm X 25 cm X 35 cm) with a hole to accommodate the plastic container with the plants, and a shading fabric (50%) to cover the upper part of the boxes were used to protect the plants from excessive heat and insolation, according to the Klumpp et al (2006). To avoid contamination by soil pollutants, the boxes containing the plants should be kept on stands at a height of 2m above ground.

### *2.3. Trad-MN assay*

The micronucleus frequency was measured for a minimum of 5 inflorescences from each monitoring location. After fixation in a 1:3 acetic acid to 70% ethanol solution for 24 h and preservation in 70% ethanol, the Trad-MN assay protocol developed by Ma et al. (1994) was used. Five slides were prepared for each monitoring session at each location to detect the presence of micronuclei. The analyses were performed using an optical microscope at 400x magnification. Three hundred tetrads on each slide were analysed. Figure 2 shows a

photomicrography of early pollen tetrads of *Tradescantia* with (Figure 2.a) and without MN (Figure 2.b).

#### *2.4. Statistical Analysis*

The differences between the MN frequencies measured during the experiments were tested using one way Analysis of Variance (ANOVA) and then compared using the Dunnett's test at a 1% significance level.

A multiple regression analysis was performed to test for a relationship between MN frequency, vehicular traffic and weather conditions (air temperature, relative humidity, insolation and rainfall) at the monitoring locations. The regression curve was successively adjusted so that only the factors that significantly contributed to the MN variances remained in the model.

### **3. Results and Discussion**

The number of vehicles being used in the city increased from 205,510 in 2006 to 338,328 in 2011—a significant increase of nearly 65%, according *t*- test ( $P < 0.01$ ). These data obtained from SETTRAN showed that the number of vehicles at the monitoring locations increased during every period evaluated (Figure 3). The control location is not shown in the graph, as it represents no vehicles.

Weather conditions typical for the Cwa climate were found in the monitored region during the plant exposure times (Table 1). The air temperature ranged from 17.0°C to 28.9°C, while the relative humidity oscillated between 37% and 73% during the dry seasons and 75% and 93% during the rainy seasons. There was no

rainfall during the dry season, and the rainfall ranged from 0 to 4.5 mm during the rainy season. The insolation periods ranged from 1.5 h to 9.8 h for the different monitoring sessions (season/year).

As shown in Table 2, both the location and the season/year of exposure had a significant effect on the MN rates measured in the study (ANOVA,  $p<0.01$ ). The MN frequencies obtained during each biomonitoring session were significantly higher (Dunnett,  $p<0.01$ ) at locations 2, 3 and 4 compared to the control location. Of the 10 monitoring sessions for each location, the MN levels were the highest (Dunnett,  $p<0.005$ ) during the winters of 2007, 2008 and 2010 and the summer of 2011. Together, these results show that the observed MN frequencies are proportional to the number of vehicles in the monitored area. It is worth noting that the highest MN rate occurred during the winter of 2010 (Table 2), when the lowest relative humidity was also found (Table 1).

The MN rates for the control location did not differ between the monitoring sessions and were not higher than the spontaneous mutation rates observed when the plants were kept in the greenhouse.

The multiple regression analysis of the results showed that variable  $X_1$  (the number of vehicles) was responsible for 83.92% of the coefficient of determination ( $R^2$ ), while variable  $X_2$  (the average relative humidity) added 4.09% to this coefficient. Therefore, 88.01% of the inflorescence MN frequency was predicted by the linear combination of these two variables. Variables  $X_3$  (air temperature),  $X_4$  (rainfall) and  $X_5$  (insolation) added 1.65% to the coefficient of determination and, therefore, did not contribute significantly to the  $R^2$  value.

Thus, the linear model that best predicts Y from variables  $X_1$  and  $X_2$  is represented by the following equation:  $[\log_{10}MN=0.4618 + 0.0001X_1 + (-0.0231X_2)]$ ,

$R^2=0.88$ ,  $F=121.01$ ,  $p<0.0001$ ]. The results of the multiple regression analysis are shown graphically (Figure 4).

The results of the present study indicate that *in situ* biomonitoring using the Trad-MN assay is a viable option for estimating the genotoxic risk in areas with high vehicular traffic. However, before we discuss the genotoxicity at the monitored locations, let us address some methodological considerations.

The species *T. pallida* is as sensitive as #4430 and other clones that have already been established and used in European studies, but is better adapted for the weather conditions found in South America (Mielli et al., 2009; Suyama et al., 2002), thus justifying its use in the present study.

Fomin and Hafner (1998), Helma et al. (1994) and Klumpp et al. (2002) suggested a plant exposure time of 24 to 30 hours. However, the present study demonstrated that 18 hours of exposure was sufficient for inducing genotoxic effects in the inflorescences. In addition, the vehicular traffic between 12:00 am and 6:00 am was considered to be low, resulting in a break in plant exposure to vehicular emissions. Reducing the exposure time of the biomonitor has also been suggested in other studies (Klumpp et al., 2005; 2006).

Even with the possibility of decreasing plant exposure times, the bioassays that use plants to monitor genotoxicity *in situ* are vulnerable to the effects of weather-related factors, which may affect spontaneous mutations rates and, therefore, should not be underestimated (Isidori et al., 2003). The present study's experimental design sought to account for these effects by observing not only the weather in the studied region but also the spontaneous mutation rates and morphophysiological characteristics of the biomonitor.

ANOVA and multiple regression analysis of the genotoxicity of the air at the monitored locations showed that the growing vehicular traffic positively influenced the MN frequency and high relative humidity levels negatively affected the MN frequency.

The present study showed that changes in humidity do not have clear effects on spontaneous mutation rates. The MN frequencies in the tetrads obtained from plants positioned at the control location were similar to the basal values for the experimental controls of other studies using the same species (Batalha et al., 1999; Suyama et al., 2002). However, when the plants were exposed to environments with high vehicular traffic and contaminants, the number of micronuclei was negatively correlated with the relative humidity.

In fact, the MN rates were elevated at the locations with the most vehicular traffic (locations 2, 3 and 4) when low humidity conditions predominated (the winters of 2007, 2008 and 2010). Isidori et al. (2003) found similar results when they used the Trad-MN assay to monitor the genotoxicity of airborne compounds in Caserta, southern Italy, during two seasons of the year. Klumpp et al. (2004) propose that low humidity levels may stimulate the opening of stomata, thereby increasing the absorption and transport of mutagenic substances to target cells.

The small influence of the air temperature variable on MN rates may be due to the meteorological characteristics of the city where the study was performed. As previously shown, the climate in Uberlândia has two seasons that differ by the presence or absence of rainfall, with little to no change in temperature throughout the year. In fact, all of the exposures occurred at similar temperatures, as shown in Table 1.

However, temperature changes should be accounted for in cities or regions that do have variable temperatures. Very low or very high temperatures could confound the results by increasing the number of spontaneous micronuclei in the negative control and favouring the entrance and transport of mutagens by stimulating the opening of stomata (Klumpp et al., 2004).

Although the influence that weather conditions such as relative humidity, temperature and rainfall have on MN generation as a result of exposure to genotoxic agents has already been considered by other studies (Isidori et al., 2003; Klumpp et al., 2004; Savóia et al., 2009), none of these studies have considered climatic variables and increasing vehicular traffic for biomonitoring periods of longer than one year.

Because the weather conditions in the city of Uberlândia were generally constant, it was possible to attribute the main cause of the genotoxic events of the present study to increased vehicular traffic (and increased air pollution).

In summary, the Trad-MN assays used during five years of biomonitoring in the city of Uberlândia showed that the highest genotoxicity levels were found in the areas with the highest vehicular traffic. Brazilian (Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000; Meireles et al., 2009; Savóia et al., 2009) and European (Isidori et al., 2003; Klumpp et al., 2006) studies have linked high MN rates in *Tradescantia* sp. inflorescences to high vehicle emission levels in high traffic areas.

The results of the present lead us to conclude that, although climate factors such low relative humidity had a small positive influence on the response of *T. pallida* tetrads to genotoxins in the air, the determining factor for the genotoxicity levels was the increase in vehicular traffic in the monitored locations, which occurred as a consequence of the increase in traffic in Uberlândia. These results

show that the *T. pallida* Trad-MN assay is a viable option for the biomonitoring of environmental genotoxicity *in situ*. However, one must design a consistent and accurate biomonitoring model that will identify and account for the possible meteorological interferences of the studied location.

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they do not have any conflicts of interest.

### **Acknowledgements**

The authors would like to thank SETTRAN for the vehicular traffic data and information for the monitored locations and Prof. Dr. Luiz Antônio de Oliveira of the Climate and Water Resources Laboratory (Laboratório de Climatologia e Recursos Hídricos) for sharing the meteorological data used in this study.

### **References**

Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S., Saldiva, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay, *Mutat. Res.* 426 (1999) 229-232.

Carreras, H.A., Pignata, M.L., Saldiva, P.H.N. *In situ* monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay, Atmos. Environ. 40 (2006) 7824-7830.

Carvalho-Oliveira, R., Pozo, R.M.K., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Martins-Junior, H.A., Bustilho, J.O.W.V., Saiki, M., Sato, I.M., Saldiva, P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil, Environ. Res. 98 (2005) 1-7.

DENATRAN - Departamento Nacional de Trânsito . Frota veicular – Estatística de Novembro de 2011. Available in <<http://www.denatran.gov.br/frota.htm>> Accessed on 02/01/2012.

Fomin, A., Hafner, C. Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with *Tradescantia*-micronucleus bioassay (Trad-MCN), Mutat. Res. 414 (1998) 139-148.

Guimarães, E.T., Domingos, M., Alves, E.S., Caldini, N., Lobo, D.J., Lichtenfels, A.J., Saldiva, P.H. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay, Environ. Exp. Bot. 44 (2000) 1-8.

Helma, C., Sommer, R., Schulte-Hermann, R., Knasmüller, S. Enhanced clastogenicity of contaminated groundwater following UV irradiation detected by the *Tradescantia* micronucleus assay, Mutat. Res. 323 (1994) 93-98.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades, MG, Uberlândia.  
Available in <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>> Accessed on  
22/08/2011.

INPE/CPTEC - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais / Centro de Previsão de  
Tempo e Estudos Climáticos. Bancos de dados climatológicos. Available in  
<<http://bancodedados.cptec.inpe.br>> Accessed on 18/05/2011.

Isidori, M., Ferrara, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A. *In situ* monitoring of  
urbana ir in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassays and  
semipermeable membrane devices (SPMDs), Chemosphere 52 (2003) 121-126.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Garrec, J.P., He, S., Peñuelas,  
J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M.J., Vergne, P.  
*Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in  
European cities, Environ. Pollut. 139 (2006) 515-22.

Klumpp, A., Ansel, W., Fomin, A., Schnirring, S., Pickl, C. Influence of climatic  
conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and  
implications for the Trad-MCN bioassay protocol, Hereditas 141 (2004) 142-148.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Belluzzo, N., Calatayud, V., Chaplin, N.,  
Garrec, J.P., Gutsche, H.J., Hayes, M., Hentze, H.W., Kambezidis, H., Laurent,  
O., Peñuelas, J., Rasmussen, S., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rossi, S., Sanz, M.J.,

Shang, H., Sifakis, N., Vergne, P. EuroBionet: A Pan-European Biomonitoring Network for Urban Air Quality Assessment, Environ. Sci. Pollut. Res. 9 (2002) 199-203.

Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F. *Tradescantia* micronucleus bioassay, Mutat. Res. 310 (1994) 221-230.

Mariani, R.L., Jorge, M.P.M., Pereira, S.S., Melione, L.P., Carvalho-Oliveira, R., Ma, T.H., Saldiva, P.H.N. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: A preliminary study in São José dos Campos, Brazil, Environ. Pollut. 157 (2009) 1767-1770.

Meireles, J., Rocha, R., Neto, A.C., Cerqueira, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN), Mutat. Res. 675 (2009) 46-50.

Mielli, A.C., Matta, M.E.M., Nersesyan, A., Saldiva, P.H.N., Umbuzeiro, G.A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay, Mutat. Res. 672 (2009) 51-54.

Misik, M., Ma, T.H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J.K., Knasmueller, S. Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: an update, Mutagenesis 26 (2011) 215–221.

Misik, M., Solenská, M., Micieta, K., Misikova, K., Knasmüller, S. *In situ* monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays, Mutat. Res. 605 (2006) 1-6.

Peel, M.C., Finlayson, B.L., McMahon, T.A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification, Hydrol. Earth Syst. Sci. Discuss. 4 (2007) 439–473.

Prajapati, S.K., Tripathi, B.D. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay, Environ. Int. 34 (2008) 1092-1096.

Savóia, E.J.L., Domingos, M., Guimarães, E.T., Brumati, F., Saldiva, P.H.N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay, Ecotoxicol. Environ. Saf. 72 (2009) 255-260.

Suyama, F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.S., 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 effects of X-rays, Braz. J. Med. Biol. Res. 35 (2002) 127-129.

Umbuzeiro, G.A., Franco, A., Martins, M.H., Kummrowa, F., Carvalho, L., Schmeiser, H.H., Leykauf, J., Stiborovae, M., Claxton, L.D. Mutagenicity and

DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil, Mutat. Res. 652 (2008) 72-80.

Villarini, M., Fatigoni, C., Dominici, L., Maestri, S., Ederli, L., Pasqualini, S., Monarca, S., Moretti, M. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants using two *in situ* plant bioassays, Environ. Pollut. 157 (2009) 3354-3356.

**Table 1**

The weather conditions during the 18 hours of plant exposure at each location and session (season/year) in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. The study period lasted from winter 2006 to summer 2011.

Weather Conditions					
Year	Season	Temperature (min-max °C)	Relative Humidity (%)	Insolation (h)	Rainfall (mm)
2006	Winter	18.8-23.8	45-73	7.9	0
2007	Summer	21.9-27.3	75-86	1.5	0.5
	Winter	20.6-26.2	42-62	9.8	0
2008	Summer	21.0-26.1	72-93	2.4	4.5
	Winter	17.0-27.1	50-67	9.3	0
2009	Summer	24.2-27.2	68-81	6.2	0
	Winter	20.0-25.8	46-72	6.6	0
2010	Summer	24.2-25.8	64-85	9.5	1.7
	Winter	23.6-28.9	37-57	8.8	0
2011	Summer	23.0-28.2	61-85	5.2	1.2

**Table 2**

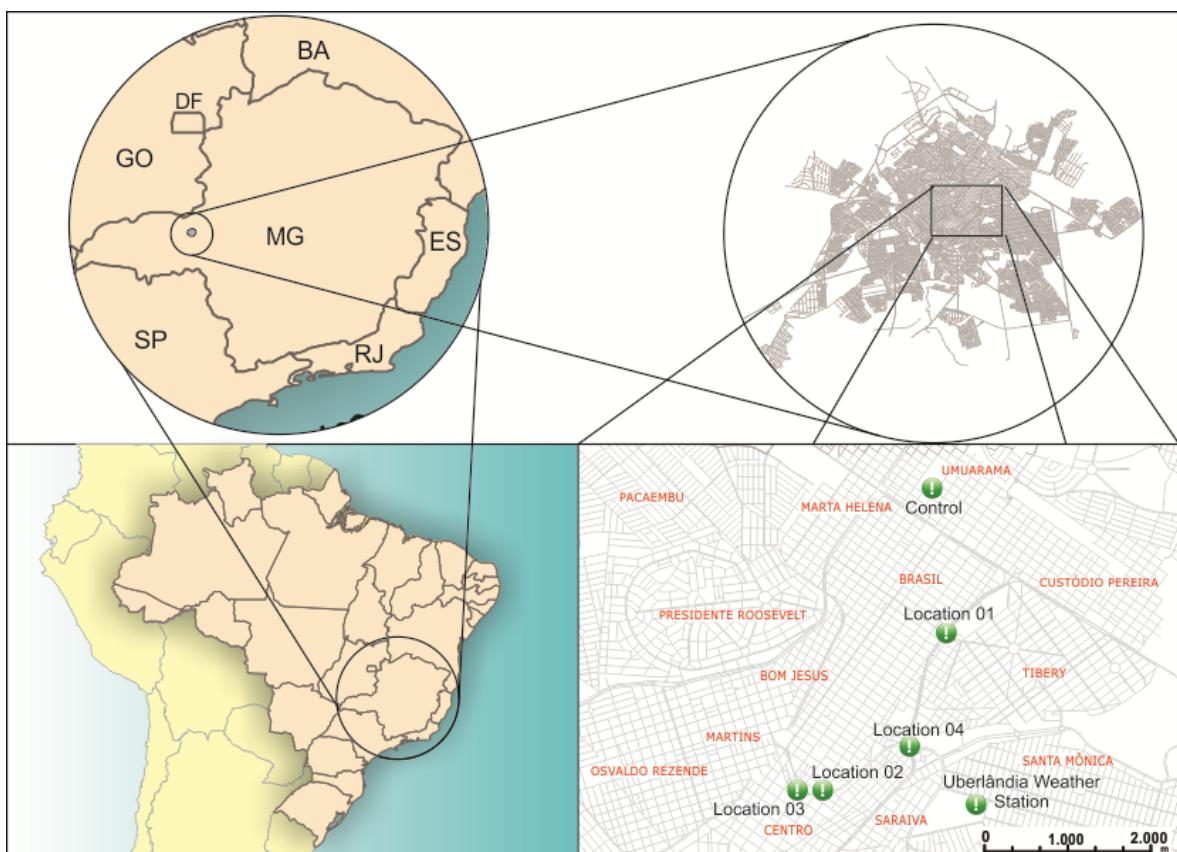
Micronucleus frequency (MN/100 tetrads) for the *T. pallida* tetrads obtained from locations 1, 2, 3 and 4 and the control location during the biomonitoring sessions indicated.

Location	Year	Summer MCN frequency (mean ± SD)	Winter MCN frequency (mean ± SD)
Control	2006	ND	0.72 ± 0.12
	2007	0.73 ± 0.09	0.88 ± 0.15
	2008	0.77 ± 0.16	0.88 ± 0.19
	2009	0.81 ± 0.17	0.87 ± 0.21
	2010	0.83 ± 0.15	0.96 ± 0.26
	2011	0.93 ± 0.13	ND
Location 1	2006	ND	1.04 ± 0.16
	2007	1.03 ± 0.18	1.85 ± 0.23
	2008	1.29 ± 0.19	2.29 ± 0.28
	2009	1.47 ± 0.23	2.03 ± 0.20
	2010	1.63 ± 0.17	2.84 ± 0.23
	2011	2.56 ± 0.16	ND
Location 2	2006	ND	1.36 ± 0.21*
	2007	1.59 ± 0.21*	2.23 ± 0.22*
	2008	2.30 ± 0.25*	2.60 ± 0.22*
	2009	2.33 ± 0.22*	2.50 ± 0.11*
	2010	2.27 ± 0.23*	4.01 ± 0.19*
	2011	3.25 ± 0.19*	ND
Location 3	2006	ND	2.54 ± 0.13*
	2007	2.28 ± 0.19*	3.28 ± 0.17*
	2008	3.07 ± 0.22*	4.01 ± 0.19**
	2009	2.95 ± 0.22*	4.03 ± 0.22**
	2010	3.17 ± 0.35*	4.32 ± 0.15**
	2011	4.24 ± 0.12**	ND
Location 4	2006	ND	3.05 ± 0.21*
	2007	2.99 ± 0.18*	3.72 ± 0.18*
	2008	3.36 ± 0.20*	4.40 ± 0.29**
	2009	3.35 ± 0.21*	3.96 ± 0.24**
	2010	3.47 ± 0.19*	5.02 ± 0.20**
	2011	4.42 ± 0.34**	ND

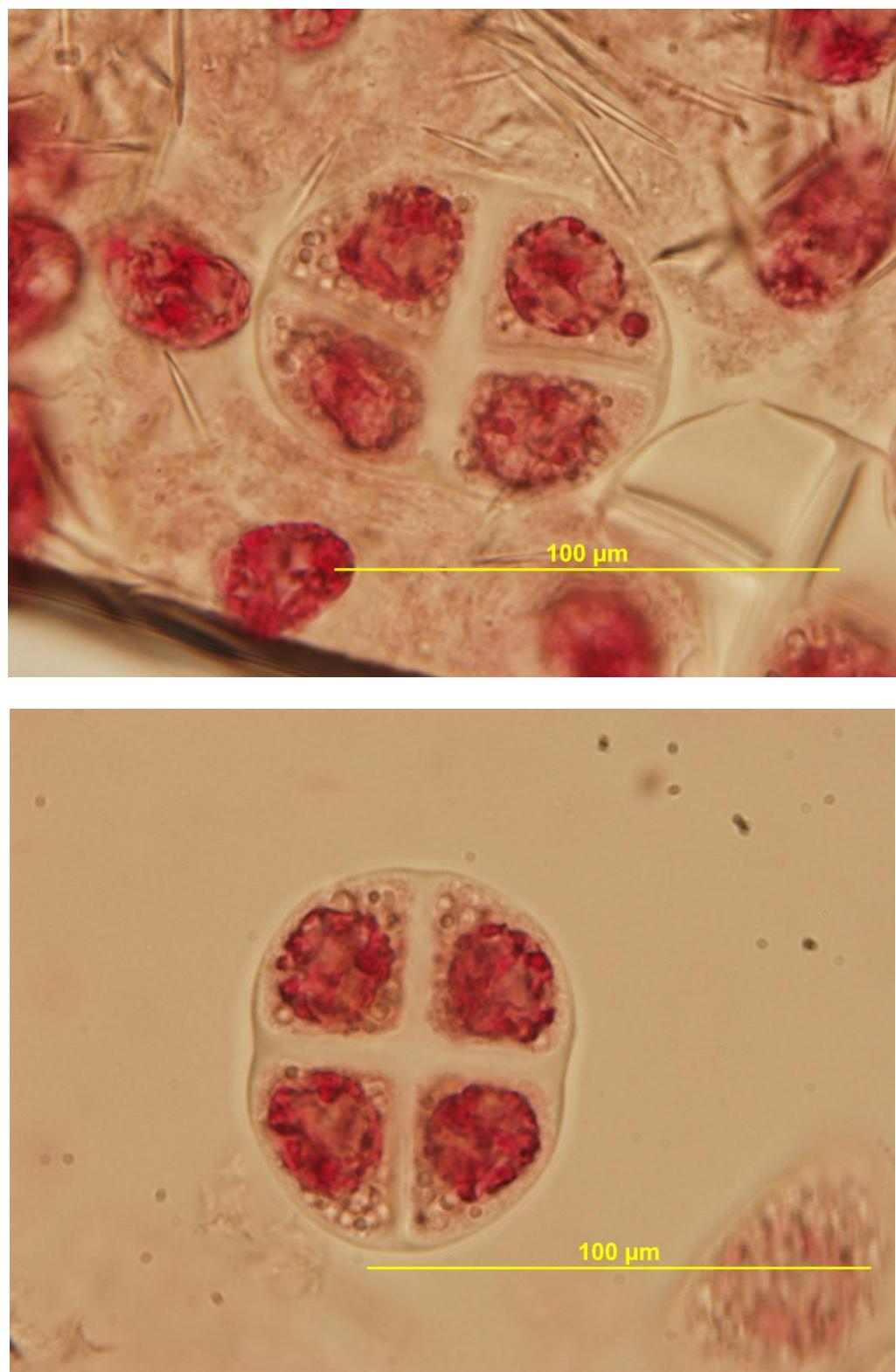
Positive response according to Dunnett's test (\* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.005$ ).

ND= not determined

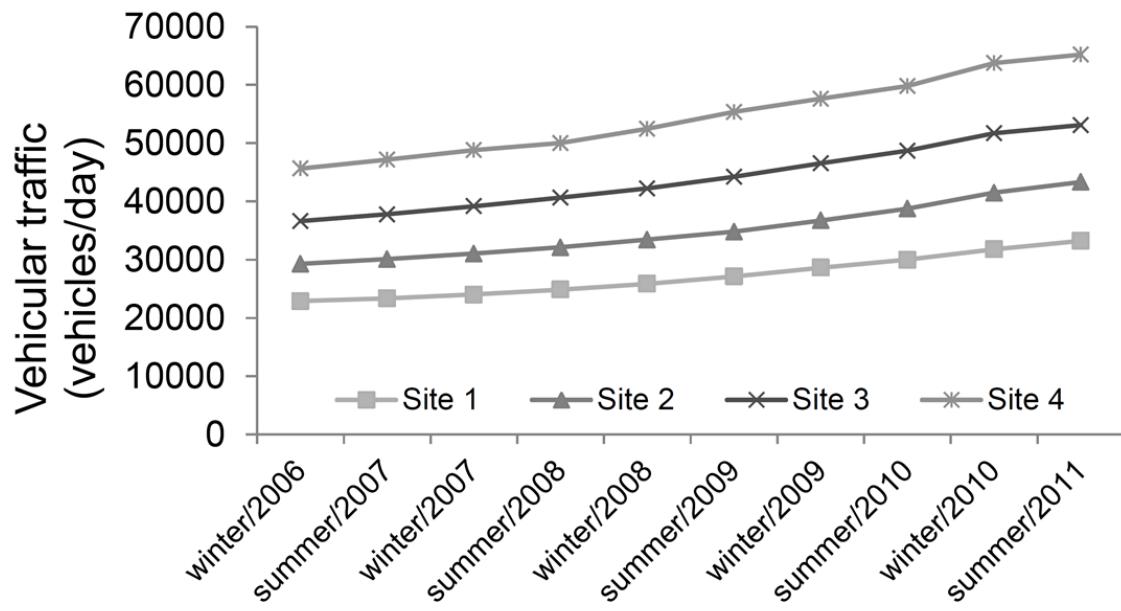
**Fig. 1.** Map of Uberlândia City showing the monitored locations, control and the Uberlândia weather station.



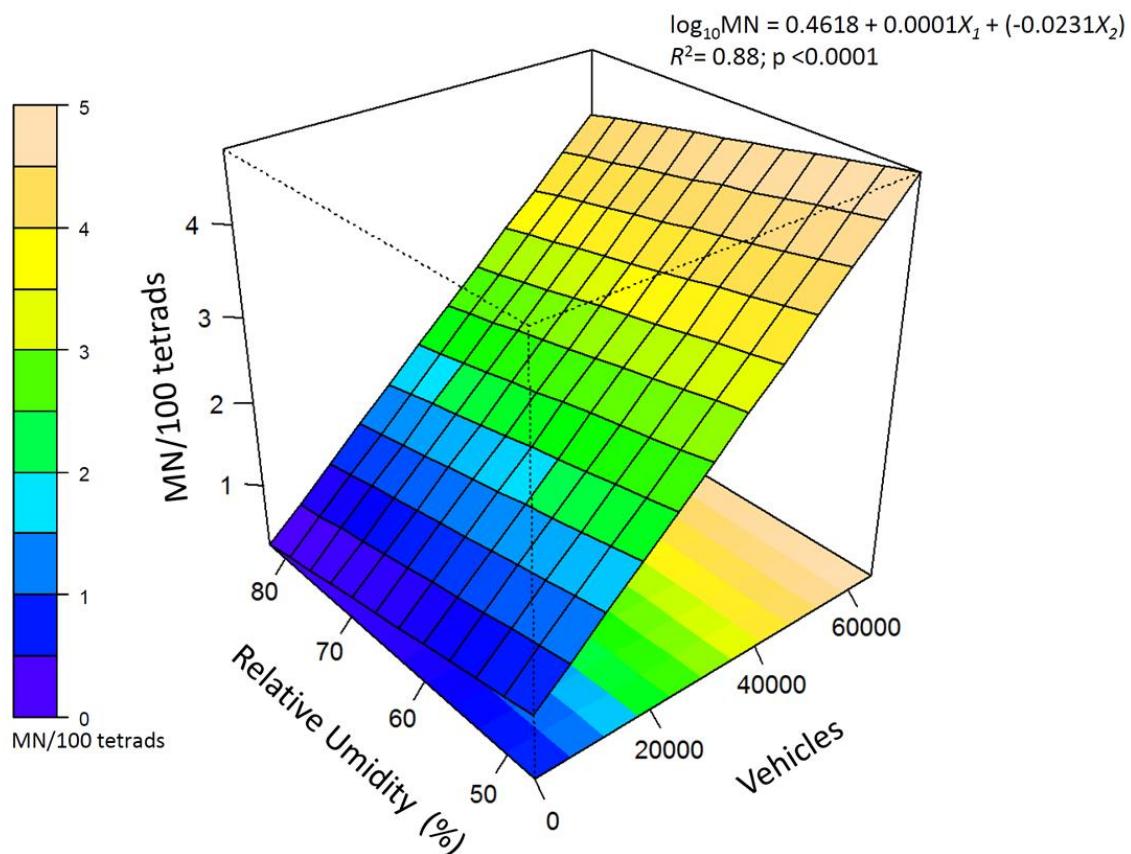
**Fig. 2.** Early pollen tetrads of *Tradescantia* with (a) and without MN (b).



**Fig. 3.** The number of vehicles registered in the area during the 18 hours of plant exposure for each location and session (season/year). The data were obtained from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil from winter 2006 to summer 2011.



**Fig. 4.** Surface graphic representation of the multiple regression analysis between relative humidity, number of vehicles and the frequency of micronuclei (MCN) in inflorescences of *Tradescantia pallida* obtained during each biomonitoring session.



# CONCLUSÕES

---

Os resultados do biomonitoramento *in situ* da genotoxicidade do ar do centro da cidade durante e após uma paralização do transporte coletivo público por meio do teste de micronúcleos com *Tradescantia* revelaram que a frequência de micronúcleos foi significativamente maior na região central da cidade em comparação com o local de referência utilizado, sendo que os maiores níveis de MN foram observados nos dias de paralisação do transporte coletivo.

A frequência de MN foi influenciada positivamente pela baixa circulação de ônibus durante os dias de paralisação do transporte coletivo e pelo incremento na concentração de material particulado, resultante do aumento do fluxo de veículos no centro da cidade durante a greve. Não houve influencia significativa das condições climáticas nos resultados observados.

Os resultados do biomonitoramento *in situ* dos efeitos genotóxicos da poluição veicular em Uberlândia revelaram que embora a baixa umidade relativa do ar tenha exercido influência positiva na formação de micronúcleos nas tétrades de *T.pallida*, o principal fator determinante para os efeitos genotóxicos observados foi a elevação do fluxo de veículos nos locais monitorados ao longo de cinco anos de estudo.