



Ambiente & Água - An Interdisciplinary  
Journal of Applied Science  
ISSN: 1980-993X  
ambi-agua@agro.unitau.br  
Universidade de Taubaté  
Brasil

Sposito, Juliana Caroline Vivian; Veiga Francisco, Luiza Flávia; Barufatti Grisolia, Alexeia  
Efetividade do ensaio Trad-MCN para avaliação de contaminantes atmosféricos em  
regiões brasileiras

Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science, vol. 12, núm. 3, mayo-  
junio, 2017, pp. 500-512  
Universidade de Taubaté  
Taubaté, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=92850602013>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc



## Efetividade do ensaio Trad-MCN para avaliação de contaminantes atmosféricos em regiões brasileiras

**doi:10.4136/ambi-agua.2049**

Received: 24 Nov. 2016; Accepted: 20 Mar. 2017

**Juliana Caroline Vivian Sposito; Luiza Flávia Veiga Francisco;  
Alexeia Barufatti Grisolia\***

Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS, Brasil

\*Autor correspondente: e-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br,  
juliana\_sposito@hotmail.com, luizaveiga10@hotmail.com

### RESUMO

A planta *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* tem sido utilizada em diversos modelos experimentais para detecção de danos morfofisiológicos e genéticos, por ser uma planta sensível a poluentes atmosféricos. No entanto, dentre os biotestes utilizados para avaliação do potencial mutagênico de contaminantes ambientais, o bioensaio de micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN) é um dos testes mais utilizados em estudos de monitoramento das condições atmosféricas. Diante do exposto, foi realizada uma revisão de literatura, identificando regiões brasileiras que utilizaram o bioensaio de micronúcleo em *Tradescantia* para monitorar alterações genéticas advindas da contaminação atmosférica. O levantamento de trabalhos indexados foi realizado em bancos de referência, como Portal de Periódicos CAPES, SciELO, ScienceDirect e PubMed, sendo os mesmos investigados quanto às regiões brasileiras biomonitoradas, período, área, exposição, monitoramento ativo ou passivo e planta natural ou clone. Os resultados indicaram que pesquisas baseadas no bioensaio Trad-MCN foram realizadas em diversas regiões brasileiras. Verificou-se que a maioria dos trabalhos são oriundos da região sudeste, especialmente do estado de São Paulo. Esse fato pode ser atribuído ao maior número de indústrias e automóveis em circulação existentes neste estado quando comparado aos demais, podendo interferir diretamente na qualidade do ar, despertando assim o interesse no meio científico. Com base nesta investigação, o bioensaio Trad-MCN revelou eficácia, e a planta *Tradescantia* demonstrou ser importante indicadora biológica de danos genéticos ocasionados pela exposição aos poluentes atmosféricos, e é amplamente utilizada na região sudeste do país.

**Palavras-chave:** bioindicador, micronúcleos, *Tradescantia*.

**Effectiveness of the Trad-MCN assay for the evaluation of atmospheric contaminants in Brazilian regions**

### ABSTRACT

The *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* plant has been used in several experimental models to detect morphophysiological and genetic damage due its susceptibility to atmospheric pollutants. However, among the bioassays used to evaluate the mutagenic potential of environmental contaminants, the *Tradescantia*-Micronucleus (Trad-MCN)

bioassay is one of the most-used tests in studies of atmospheric conditions monitoring. A review of literature was therefore carried out, identifying Brazilian regions where the micronucleus bioassay in *Tradescantia* was used to monitor genetic alterations caused by atmospheric contamination. Reference banks were used to survey the indexed studies, such as portal CAPES, SciELO, ScienceDirect and PubMed, which were investigated regarding the Brazilian biomonitoring region, period, area, exposure, active or passive monitoring and natural plant or clone. The results indicated that research based on the Trad-MCN bioassay was performed in several Brazilian regions. The review verified that the majority of the studies come from the southeast region, especially from the state of São Paulo. This fact can be explained by the greater number of industries and automobiles in circulation in this state as compared to others, which can directly interfere with air quality thus arousing the interest of the scientific community. Based on this review, the Trad-MCN bioassay has been demonstrated to be effective and the *Tradescantia* plant has been shown to be an important biological indicator of genetic damage caused by exposure to air pollutants and is widely used in the southeastern region of the country.

**Keywords:** bioindicator, micronuclei, *Tradescantia*.

## 1. INTRODUÇÃO

O biomonitoramento corresponde a um método experimental que possibilita detectar impactos ocasionados por poluentes nos organismos vivos, conhecidos como bioindicadores (Carneiro e Takayanagi, 2009). Estes organismos fornecem informações sobre alterações morfológicas e/ou fisiológicas que ocorrem nos mesmos, quando expostos a ambientes que passaram por mudanças físico-químicas e se encontram degradados (Klumpp et al., 2004).

As plantas têm sido frequentemente utilizadas por apresentarem vantagens em relação aos métodos convencionais, como: avaliação de efeitos em linhagens germinativas, visualização de danos genéticos em células individuais, sensibilidade, baixo custo operacional, rápida execução, maior número de amostragens, além de fácil adaptação podendo se desenvolver durante todo o ano, apresentando-se como um instrumento favorável para estudos de biomonitoramento (Carvalho, 2005; Catinon et al., 2008; De Souza et al., 2016).

As plantas bioindicadoras possuem sensibilidade às alterações do ambiente, fornecendo informações importantes no monitoramento de poluentes atmosféricos. Essa sensibilidade pode ser atribuída à principal via de entrada de poluentes, os estômatos, por onde são realizadas trocas gasosas, verificando-se danos macroscópicos como aparecimento de cloroses, necroses, queda de folhas ou diminuição no seu crescimento, bem como em nível genético, fisiológico ou bioquímico (Alves et al., 2001; Savóia, 2007).

Algumas plantas do gênero *Tradescantia* são conhecidas como importantes ferramentas em estudo de biomonitoramento, como a *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt var. *purpurea* Boom e o clone 4430 (Meireles e Cerqueira, 2011).

### 1.1. Clone 4430 x *Tradescantia pallida*

Em 1978, Ma e colaboradores padronizaram teste utilizando Clone BNL 4430, um híbrido estéril (*Tradescantia hirsutiflora* × *Tradescantia subcaulis*) do gênero *Tradescantia*, contendo  $2n=12$  cromossomos (todos metacêntricos). Esta esterilidade certifica a homogeneidade genética do clone na ausência de efeitos mutagênicos (White e Claxton, 2004). Desde então, o referido clone tem sido utilizado como bioindicador no monitoramento de poluentes atmosféricos.

Entretanto, o Clone 4430 tem aplicações limitadas em países tropicais, dada sua sensibilidade ao clima (temperatura e umidade do ar elevadas) e aos ataques de insetos quando expostas por períodos prolongados em ambiente aberto, limitando seu uso para estudos de biomonitoramento (Sant'Anna, 2003).

Neste contexto, a espécie *Tradescantia pallida* tem sido largamente usada como planta bioindicadora apresentando resistência natural às intempéries da natureza, além de fácil propagação (Suyama et al., 2002). A *Tradescantia pallida* (Rose) D.R Hunt var. *purpurea* (Commelinaceae), originária do México, corresponde a uma espécie de planta herbácea indicadora biológica, suculenta, de 15-25 cm de altura, anual ou perene, raramente epífita, ereta a decumbente. Planta decorativa de cor roxa, com folhas alternas inteiras, com bainhas envolvendo o caule, pubescentes, possui inflorescência cimosa, racemosa ou capitata, com brácteas pequenas a grandes, frequentemente espatáceas (Ribeiro et al., 1999; Lorenzi e Souza, 2001).

Conhecida popularmente como trapoeraba-roxa, coração-roxo, trapoerabão ou trapoeraba, apresenta ampla distribuição e fácil adaptação, sendo cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Considerando a *Tradescantia* como planta bioindicadora, o seu uso pode levar a identificação dos efeitos diretos sobre os organismos sejam eles anatômicos (Alves et al., 2001; Crispim et al., 2014), ou até mesmo no DNA (Sposito et al., 2017), sob forma de efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos, sendo interpretadas como respostas adaptativas dos vegetais as condições ambientais.

## 1.2. Testes utilizados com *Tradescantia pallida*

### 1.2.1. Testes anatômicos

A concentração de elementos químicos não essenciais nas folhas está diretamente relacionada à deposição de partículas provenientes da poluição atmosférica por emissões veiculares, alterando a composição química foliar natural destas plantas. Sumita et al. (2003) avaliaram a capacidade de acumulação de oligoelementos provenientes da poluição atmosférica em folhas de *T. pallida* e indicaram o uso potencial desta planta no biomonitoramento de ambientes urbanos altamente poluídos. Santos et al. (2015) também mostraram que plantas expostas em áreas de alto fluxo veicular apresentaram maiores concentrações de elementos relacionados às emissões dos veículos, sendo consideradas sensíveis e um instrumento alternativo no biomonitoramento.

A exposição das plantas aos poluentes atmosféricos também pode alterar a frequência estomática, sendo desfavorável ao desenvolvimento fisiológico normal da planta como comprometimento da capacidade fotossintética devido a redução das trocas gasosas. Crispim et al. (2014) observaram que plantas de *T. pallida* situadas em áreas com alto fluxo veicular apresentaram maior número de células epidérmicas e densidade estomática. Estas observações indicaram que alterações estomáticas interferem na quantidade de poluentes gasosos absorvidos pela planta, sendo essencial para sua adaptação em condições adversas.

Segundo Alves et al. (2001) e Crispim et al. (2014) variações anatômicas, como espessura da folha e quantidade de estômatos, representam uma estratégia adaptativa a ambientes poluídos, dificultando o deslocamento dos poluentes para o interior da folha. No entanto, alterações na capacidade de trocas gasosas acarretam no comprometimento da taxa fotossintética e, consequentemente, do crescimento da planta, constituindo uma das formas mais sensíveis de medir o estresse em um organismo. Segundo Zeiger (2006), partículas em suspensão, ao atingirem as folhas, bloqueiam os estômatos, diminuindo a condutância de CO<sub>2</sub>, interferindo na taxa de fotossíntese e, consequentemente, no crescimento das plantas.

### 1.2.2. Testes genéticos

Segundo Ma et al. (1994), o bioensaio de mutação em pelo estaminal (Trad-SHM) é baseado na detecção de mutações mitóticas. As células de pelos estaminais são heterozigotas, com um marcador fenotípico visível que muda a cor dos filamentos do estame de azul (dominante) para rosa (recessivo) quando expostos a poluentes que podem promover mutações baseadas na mudança de coloração nas células de pelos estaminais. De acordo com Patussi e Bündchen (2013), o teste Trad-SHM tem sido empregado na avaliação do risco ambiental para análise de contaminantes ambientais, sendo utilizado como biomarcador da qualidade ambiental.

O ensaio do cometa pode ser utilizado para detectar quebras na dupla fita de DNA em vários tipos de células utilizando eletroforese, com base na migração dos fragmentos de DNA livres resultantes de quebras para fora do núcleo. Desta maneira, o nível de dano genético das células está relacionado com a extensão dos fragmentos de DNA (Collins, 2004; Speit e Hartmann, 2005). Sposito et al. (2017), demonstraram que plantas expostas ao tráfego veicular intenso apresentaram maior número de danos genéticos em relação a plantas não sujeitas ao estresse ambiental por poluentes atmosféricos, indicando a eficácia da técnica na detecção de danos no DNA associados ao tráfego veicular.

Dentre as espécies vegetais, a *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) tem sido amplamente empregada na detecção de danos cromossômicos em células-mãe de grãos de pólen na fase de tétrade. O teste consiste na estimativa da frequência de micronúcleos, sendo o número de micronúcleos proporcional à concentração de poluentes (De Andrade Júnior et al., 2008).

Micronúcleos correspondem a pequenas massas de cromatina derivadas de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou de aberrações cromossômicas numéricas (aneugênese) induzidas por agentes que danificam o cromossomo ou o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros não se ligam às fibras do fuso mitótico e não são incorporados no núcleo das células filhas durante a meiose. Segundo Carvalho (2005) cromossomos em divisão meiótica são mais sensíveis à quebra que os cromossomos em divisão mitótica. Desta forma, essas estruturas permanecem no citoplasma das células interfásicas e formam a própria membrana nuclear, originando micronúcleos, os quais se assemelham ao núcleo principal quanto à forma, estrutura e propriedades de coloração, e podem variar quanto ao tamanho (Ma et al., 1981; Holland et al., 2008; Meireles e Cerqueira, 2011).

O teste tem sido empregado em diversos trabalhos científicos apresentando vantagens como baixo custo financeiro, fácil acesso ao material e alta sensibilidade aos agentes genotóxicos, permitindo a avaliação do dano cromossômico em preparações citológicas simples e de rápida execução, sendo considerado ferramenta fundamental para a detecção de efeitos clastogênicos e aneugênicos (Klumpp et al., 2004; Pereira et al., 2013).

Sposito et al. (2017), em estudo de biomonitoramento passivo realizado em cidades do estado de Mato Grosso do Sul, demonstram que o teste Trad-MCN é uma excelente ferramenta para detecção de estressores ambientais, como os poluentes atmosféricos. Segundo Lima (2001), o monitoramento passivo, é baseado na utilização de organismos existentes naturalmente no local de pesquisa, e o ativo ocorre quando os organismos são introduzidos na área de estudo.

Considerando que o bioensaio Trad-MCN é considerado ferramenta abrangente no sentido biológico e geográfico, o presente estudo teve como objetivo realizar levantamento bibliográfico, aferindo regiões brasileiras monitoradas que utilizaram o teste de micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se levantamento bibliográfico de trabalhos científicos publicados e indexados, em sites de busca como: Portal de Periódicos CAPES, SciELO, ScienceDirect e PubMed, que utilizaram o teste Trad-MCN em *Tradescantia* como organismo bioindicador para monitoramento da qualidade do ar no Brasil. Para tanto, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: poluição atmosférica, biomonitoramento, *Tradescantia* e micronúcleo. Foram incluídos apenas pesquisas de monitoramento em plantas expostas *in situ*.

Os trabalhos foram avaliados quanto ao período de monitoramento, região brasileira monitorada (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e Centro-oeste, e respectivos Estados), área de estudo (urbana/rural), fontes emissoras de poluição atmosférica (tráfego, atividade industrial, material particulado e queima de biomassa), planta utilizada no monitoramento (*Tradescantia pallida* ou clone híbrido 4430) e procedimentos de monitoramento (passivo/ativo). O monitoramento passivo consiste em utilizar plantas existentes naturalmente na área de estudo. O monitoramento ativo, por sua vez, refere-se às plantas introduzidas por determinado período ao local de pesquisa.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do levantamento bibliográfico foram apresentados na Tabela 1.

O levantamento bibliográfico abrangeu diversas regiões do país. No entanto, verificou-se que a maioria dos estudos que utilizaram o bioensaio Trad-MCN como ferramenta de monitoramento da qualidade do ar ocorreram na região sudeste (43%), especialmente no estado de São Paulo. Outro aspecto relevante foi a relação deste teste com o tráfego veicular e atividades industriais.

De acordo com estatísticas fornecidas pelo Departamento Nacional de Trânsito, o Brasil possui 90 milhões de veículos motorizados, dos quais 30% (27.332.101) estão concentrados no Estado de São Paulo (Brasil, 2016), correspondendo a uma parcela significativa da frota veicular do país (Brasil, 2013). Segundo estimativa da CETESB (2004), veículos automotores produzem mais poluição atmosférica que qualquer outra atividade humana. Ambientes urbanos são áreas sob constante atividade humana e, consequentemente, elevada concentração de poluentes atmosféricos, provenientes de fontes móveis (frota de veículos automotores) e estacionárias (atividades industriais). Costa e Droste (2012) verificaram frequências de micronúcleo (MCN) superiores em área urbana com elevada frota veicular em comparação aos resultados observados na área rural.

Nas regiões urbanas, as emissões de poluentes por veículos contribuem para o aumento de partículas, que podem ser inaladas nos pulmões, aumentando os riscos para a saúde (Song e Gao, 2011). Desta forma, o maior número de trabalhos que avaliaram danos genéticos em *T. pallida* expostas ao tráfego veicular demonstraram a preocupação com essas fontes poluidoras e os danos por elas ocasionados à saúde da população. Neste cenário, o biomonitoramento por meio do bioensaio Trad-MCN pode ser utilizado como ferramenta de gestão prática na detecção e avaliação da poluição do ar, complementando métodos físicos e químicos (Sposito et al., 2015).

Apesar das fontes móveis serem responsáveis pela maior taxa de poluição atmosférica, Mariani et al. (2009), Savóia et al. (2009), Costa e Droste (2012), Teixeira e Barbério (2012), Barbério et al. (2013) e Campos et al. (2016) consideraram fontes estacionárias como importantes meios de poluição atmosférica, e que devem ser monitoradas. O Estado de São Paulo representa o principal centro financeiro do país com o maior e mais completo parque industrial do Brasil, aproximadamente 63.708 indústrias (IBGE, 2014)

**Tabela 1.** Trabalhos de monitoramento da qualidade do ar realizados em diferentes regiões brasileiras utilizando o bioensaio Trad-MCN.

Autoria	Período de amostragem	Região/Estado	Área	Fontes emissoras	Ativo ou passivo	<i>T. pallida</i> /clone 4430
Guimarães et al. (2000) <sup>a</sup>	Junho, agosto a dezembro (1998)	Sudeste (SP)	Urbana	Tráfego	Ativo e passivo	<i>T. pallida</i>
de Andrade Júnior et al. (2008) <sup>a</sup>	Maio (2005) a março (2006)	Nordeste (BA)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Mariani et al. (2009) <sup>a</sup>	Maio a outubro (2006)	Sudeste (SP)	Urbana	Tráfego e indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
Meireles et al. (2009) <sup>a</sup>	Fevereiro (2006) a dezembro (2007)	Nordeste (BA)	Urbana	Tráfego	Ativo e passivo	Clone
Savóia et al. (2009) <sup>a</sup>	Setembro (2003) a setembro (2004)	Sudeste (SP)	Urbana	Tráfego e indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
Sisenando et al. (2011) <sup>a</sup>	Maio (2008) a abril (2009)	Centro-Oeste (MT)	Urbana	Queima de biomassa	Ativo e passivo	<i>T. pallida</i>
Costa e Drost (2012) <sup>a</sup>	Um ano (2009/2010)	Sul (RS)	Urbana e rural	Indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
Crispim et al. (2012) <sup>a</sup>	Março a agosto (2010)	Centro-Oeste (MS)	Urbana	Tráfego	Passivo	<i>T. pallida</i>
Teixeira e Barbério (2012) <sup>a</sup>	Setembro (2010) a junho (2011)	Sudeste (SP)	Urbana e rural	Tráfego e indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
Barbério et al. (2013) <sup>a</sup>	Julho (2011) a junho (2012)	Sudeste (SP)	Urbana	Indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
De Brito et al. (2013) <sup>b</sup>	Outubro a dezembro (2010)	Sul (RS)	Urbana	Material particulado	Ativo	<i>T. pallida</i>
Pereira et al. (2013) <sup>a</sup>	Inverno (2006) ao verão (2011)	Sudeste (MG)	Urbana	Tráfego	Passivo	<i>T. pallida</i>
Blume et al. (2014) <sup>a</sup>	Dezembro (2011) a novembro (2012)	Sul (RS)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Crispim et al. (2014) <sup>a</sup>	Abri a setembro (2011)	Centro-Oeste (MS)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Pereira et al. (2014) <sup>a</sup>	Maio (2010)	Sudeste (MG)	Urbana	Tráfego	Passivo	<i>T. pallida</i>
Yaguinuma et al. (2014) <sup>a</sup>	Maio a setembro (*)	Sudeste (SP)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Santos et al. (2015) <sup>a</sup>	Março a junho / agosto (2011)	Sudeste (SP)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Sposito et al. (2015) <sup>a</sup>	Maio a agosto (2010 – 2012)	Centro-Oeste (MS)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Cassanego et al. (2015) <sup>a</sup>	Maio (2012) a março (2013)	Sul (RS)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
da Costa et al. (2015) <sup>a</sup>	Abri (2012) a fevereiro (2014)	Sul (RS)	Urbana	Tráfego	Ativo	<i>T. pallida</i>
Caon et al. (2016) <sup>a</sup>	Novembro (2012) a outubro (2013)	Sul (RS)	Urbana	Tráfego, indústria e agricultura	Ativo	<i>T. pallida</i>
Campos et al. (2016) <sup>a</sup>	Junho (2013) a agosto (2013)	Sudeste (MG)	Urbana	Indústria	Ativo	<i>T. pallida</i>
da Costa et al. (2016) <sup>a</sup>	Maio (2012) a fevereiro (2014)	Sul (RS)	Urbana	Tráfego	Passivo e ativo	<i>T. pallida</i>
Sposito et al. (2017) <sup>a</sup>	Março, maio, julho, setembro e novembro (2014)	Centro-Oeste (MS)	Urbana	Tráfego	Passivo	<i>T. pallida</i>

**Nota:** (\*) Artigo não fornece dados sobre o ano de monitoramento. (<sup>a</sup>) Trabalhos que verificaram associação significativa entre frequência de micronúcleo e contaminação atmosférica. (<sup>b</sup>) Não foi verificado genotoxicidade pelo referido teste em locais com áreas poluídas.

**Fonte:** Guimarães et al., 2000; de Andrade Júnior et al., 2008; Mariani et al., 2009; Meireles et al., 2009; Savóia et al., 2009; Sisenando et al., 2011; Costa e Drost, 2012; Crispim et al., 2012; Teixeira e Barbério, 2012; Barbério et al., 2013; De Brito et al., 2013; Pereira et al., 2013; Blume et al., 2014; Crispim et al., 2014; Pereira et al., 2014; Yaguinuma et al., 2014; Santos et al., 2015; Sposito et al., 2015; Cassanego et al., 2015; da Costa et al., 2015; Caon et al., 2016; Campos et al., 2016; da Costa et al., 2016; Sposito et al., 2017.

O processo de industrialização aumenta significativamente a contaminação atmosférica por misturas complexas de poluentes atmosféricos, como partículas, óxidos de nitrogênio e carbono (Costa e Droste, 2012). Neste contexto, o monitoramento de regiões com intensa concentração industrial, como o estado de São Paulo, constitui ferramenta importante para avaliação dos impactos socioambientais da atividade industrial, além daqueles impactos resultantes da interação com demais atividades antrópicas.

Também foi verificada a relação entre frequência de micronúcleos e exposição a partículas finas oriundas da queima de biomassa. A queima de biomassa é um dos exemplos de atividade da ação humana relacionada ao aumento significativo da concentração de poluentes, causando efeitos adversos à qualidade do ar e consequentemente a saúde da população (Cançado et al., 2006; Magalhães et al., 2007). Sisenando et al. (2011) observaram relação entre o aumento da frequência de micronúcleos e o aumento da exposição a partículas finas ocasionadas pela queima da palha da cana-de-açúcar. Os autores ainda sugerem que *T. pallida* é um importante indicador biológico a ser incluído na avaliação do risco humano à exposição a agentes tóxicos.

O monitoramento pode ser realizado a partir de dois sistemas distintos: passivo, com a utilização de organismos naturalmente existentes em uma área, ou ativo, com exposição de organismos na área a ser avaliada por determinado tempo e em condições controladas (Lima, 2001). Estudos realizados por Meireles et al. (2009) e Guimarães et al. (2000), utilizando os dois sistemas de monitoramento, observaram que o ativo foi mais sensível aos poluentes e demonstrou maior ocorrência de micronúcleos em relação ao passivo. Verificaram que plantas existentes naturalmente no local de estudo, monitoramento passivo, podem se adaptar às condições ambientais as quais estão expostas, considerando assim o monitoramento ativo mais sensível, eficaz e amplamente utilizado nos estudos da qualidade do ar.

Os bioensaios desenvolvidos utilizando plantas e clones do gênero *Tradescantia* são considerados ferramentas valiosas para avaliar os efeitos mutagênicos de contaminantes ambientais. Por esta razão, desde os primórdios da toxicologia genética, várias espécies e clones do gênero *Tradescantia* têm sido utilizados como organismos bioindicadores em estudos e programas de biomonitoramento (Ma e Grant, 1982).

No Brasil, a *Tradescantia pallida* vem sendo utilizada em substituição ao clone 4430, fornecendo resultados satisfatórios. Resultados baseados em estudos comparativos obtidos por Mielli et al. (2009) demonstraram que ambas as plantas apresentaram resultados semelhantes. Desta forma a *T. pallida* pode substituir o clone 4430 no teste de micronúcleo. Considerando que o clone 4430 tem aplicações limitadas em países tropicais quanto ao clima e ataque de insetos, o que limita o seu uso para estudos de biomonitoramento (Sant'Anna, 2003), tais resultados justificam o maior número de trabalhos que utilizam a planta *T. pallida* ao invés do clone.

A *T. pallida* tem sido amplamente utilizada por ser considerada tão eficiente para estudos de biomonitoramento quanto as plantas geneticamente selecionadas. A utilização de plantas naturais oferece vantagens, como redução de custo, desenvolvimento em países com condição climática tropical e subtropical e maior resistência a pragas, já que estão biologicamente adaptadas (Batalha et al., 1999).

Diante do levantamento bibliográfico, verificou-se que todos os trabalhos de monitoramento utilizando o bioensaio Trad-MCN apresentaram relação significativa entre o número/frequência de micronúcleos e a contaminação atmosférica ocasionada por atividade industrial, tráfego veicular e queima de biomassa, com exceção do trabalho de De Brito et al. (2013), no qual não foi detectado genotoxicidade pelo referido ensaio em locais com áreas poluídas.

Segundo Santos et al. (2015), o bioensaio Trad-MCN pode servir como uma metodologia de suporte para a adoção de políticas públicas ambientais mais restritivas no Brasil e extensível a outros países em desenvolvimento. Além do mais, de acordo com Costa e Droste (2012),

Teixeira e Barbério (2012), Crispim et al. (2014), Sposito et al. (2015) e Da Costa et al. (2016), propõe-se, que o ensaio Trad-MCN seja incluído como ferramenta adicional no monitoramento da qualidade do ar e complementar às análises químicas.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O levantamento bibliográfico permitiu concluir que a *Tradescantia* demonstra ser uma planta altamente sensível e um excelente organismo teste, sendo considerada uma ferramenta essencial no biomonitoramento de ambientes degradados.

Os resultados do levantamento referente ao uso do bioensaio Trad-MCN revelaram que poluentes atmosféricos oriundos de atividade industrial, tráfego veicular e queima de biomassa, apresentaram potencial estresse oxidativo em *Tradescantia*. Desta forma, sugere-se que a referida técnica seja utilizada como método complementar às análises químicas.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo seu apoio logístico, à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

#### 6. REFERÊNCIAS

- ALVES, E. S.; GIUSTI, P. M.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. N.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J. A. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n. 4, p. 567-576, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042001000500012>
- BARBÉRIO, A.; VOLTOLINI, J. C.; RIBEIRO, M. C. L. Efeitos mutagênicos da poluição atmosférica em *Tradescantia pallida* no distrito de Moreira César, em Pindamonhangaba, SP. **Revista Biociências**, v. 19, n. 1, p. 69-79, 2013.
- BATALHA, J. R. F.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J. A.; LICHTENFELS, A. J. F. C.; DEUR, T. et al. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 229-232, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00073-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00073-1)
- BLUME, K. K.; COSTA, G. M.; CASSANEGO, M. B. B.; DROSTE, A. Genotoxicidade do ar em área urbana na região metropolitana de Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 3, p. 158-163, 2014.
- BRASIL. Departamento Nacional de Trânsito - DENATRAN. **Frota de veículos no ano de 2013**. 2013. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>. Acesso em: 10 nov. 2014.
- BRASIL. Departamento Nacional de Trânsito - DENATRAN. **Frota de veículos no ano de 2016**. 2016. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>. Acesso em: 10 mar. 2017.

- CAMPOS, C. F.; CAMPOS JR., E. O. D.; SOUTO, H. N.; SOUSA, E. D. F.; PEREIRA, B. B. Biomonitoring of the environmental genotoxic potential of emissions from a complex of ceramic industries in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil, using *Tradescantia pallida*. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 79, p. 123-128, 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15287394.2015.1118714>
- CANÇADO, J. E.; SALDIVA, P. H.; PEREIRA, L. A.; LARA, L. B.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L. A. et al. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. **Environmental health perspectives**, v. 114, n. 5, p. 725-729, 2006. <http://www.jstor.org/stable/3651044>
- CAON, K.; DA COSTA, G. M.; CASSANEGO, M. B. B.; DROSTE, A. *Tradescantia pallida* var. *purpurea* (Commelinaceae) e biomonitoramento da genotoxicidade do ar no município de Caxias do Sul, RS, Brasil. **Pesquisas, Botânica**, n. 69, p. 279-291, 2016.
- CARNEIRO, R. M. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M. Estudos sobre bioindicadores vegetais e poluição atmosférica por meio de revisão sistemática da literatura. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais**, v. 13, p. 26-44, 2009.
- CARVALHO, H. A. The *Tradescantia* as vegetable bioindicator in monitoring clastogenic effects of ionizing radiation. **Radiologia Brasileira**, v. 38, p. 459-462, 2005.
- CASSANEGO, M. B. B.; SASAMORI, M. H.; PETRY, C. T.; DROSTE, A. Biomonitoring the genotoxic potential of the air on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* under climatic conditions in the Sinos River basin, Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 79-87, 2015. <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.05514>
- COLLINS, A. R. O cometa ensaio para danos ao DNA e reparação. **Molecular biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249, 2004.
- CATINON, M.; AYRAULT, S.; DAUDIN, L.; SEVIN, L.; ASTA, J.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. **Atmospheric environment**, v. 42, n. 6, p. 1223-1238, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.10.082>
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Relatório anual de qualidade do ar no estado de São Paulo**. São Paulo, 2004.
- COSTA, G. M.; DROSTE, A. Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 4, p. 801-806, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842012000500004>
- CRISPIM, B. A.; VAINI, J. O.; GRISOLIA, A. B.; TEIXEIRA, T. Z.; MUSSURY, R. M.; SENNO, L. O. Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 3, p. 718-723, 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0612-3>
- CRISPIM, B. A.; SPOSITO, J. C.; MUSSURY, R. M.; SENNO, L. O.; GRISOLIA, A. B. Effects of atmospheric pollutants on somatic and germ cells of *Tradescantia pallida* (Rose) DR HUNT cv. *purpurea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 4, p. 1899-1906, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201420140338>

- DA COSTA, G. M.; CASSANEGO, M. B. B.; PETRY, C. T.; SASAMORI, M. H.; ENDRES-JÚNIOR, D.; DROSTE, A. Avaliação da influência do tempo de exposição de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* para biomonitoramento da genotoxicidade do ar atmosférico. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 13, n. 4, p. 224-230, 2015.
- DA COSTA, G. M.; PETRY, C. T.; DROSTE, A. Active versus passive biomonitoring of air quality: Genetic damage and bioaccumulation of trace elements in flower buds of *Tradescantia pallida*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 7, p. 1-12, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-2923-y>
- DE ANDRADE JR., S. J.; SANTOS JR., J. C. S.; DA LUZ OLIVEIRA, J.; CERQUEIRA, E. D. M. M.; MEIRELES, J. R. C. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 30, n. 3, p. 295-301, 2008.
- DE BRITO, K. C. T.; DE LEMOS, C. T.; ROCHA, J. A. V.; MIELLI, A. C.; MATZENBACHER, C.; VARGAS, V. M. F. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, n. 1, p. 14-20, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.014>
- DE SOUZA, C. P.; DE ANDRADE, G. T.; FONTANETTI, C. S. Evaluation of herbicides action on plant bioindicators by genetic biomarkers: a review. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 12, p. 694, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5702-8>
- GUIMARÃES, E. T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; CALDINI, N.; LOBO, D. J. A.; LICHTENFELS, A. J. F. C. et al. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(00\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00050-2)
- HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 659, n. 1, p. 93-108, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.007>
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa industrial anual: empresa**. 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=piaempresa2014>. Acesso em: 10 mar. 2017.
- KLUMPP, A.; ANSEL, W.; FOMIM, A.; SCHNIRRING, S.; PICKL, C. Influence of climatic condition the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**, v. 141, n. 2, p. 142-148, 2004. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-5223.2004.01806.x>
- LIMA, J. S. A. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. In: MAIA, N. B. M.; MARTOS, H. L.; BARELLA, W. (Org.). **Indicadores ambientais: conceitos e aplicações**. São Paulo: Educ/Comped/Inep, 2001.
- LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil**: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2001.

- MA, T. H.; SPARROW, A. H.; SCHAIRER, L. A.; NAUMAN, A. F. Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 58, n. 2-3, p. 251-258, 1978. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(78\)90016-2](https://doi.org/10.1016/0165-1218(78)90016-2)
- MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, p. 85, 1981.
- MA, T. H.; GRANT, W. F. The Tradescantias: adventurous plants. **Herbarist**, n. 48, p. 36-44, 1982.
- MA, T. H.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B. S.; SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L. et al. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 221-230, 1994. [http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90115-5](http://dx.doi.org/10.1016/0027-5107(94)90115-5)
- MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; VASCONCELLOS, P. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons as sugarcane burning tracers: a statistical approach. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 577-581, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300014>
- MARIANI, R. L.; JORGE, M. P. M.; PEREIRA, S. S.; MELIONE, L. P.; CARVALHO-Oliveira, R.; 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. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 6, p. 1767-1770, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.02.023>
- MEIRELES, J.; ROCHA, R.; COSTA NETO, A.; CERQUEIRA, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 675, n. 1, p. 46-50, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.02.005>
- MEIRELES, J. R. C.; CERQUEIRA, E. M. M. Use of the Micronucleus Test on *Tradescantia* (Trad-MCN) to Evaluate the Genotoxic Effects of Air Pollution. In: MOLDOVEANU, A. M. (Ed.). **Air pollution: new developments**. [S.l.]: InTech, 2011. <http://dx.doi.org/10.5772/17959> MIELLI, A. C.; MATTA, M. E. M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P. H. N.; UMBUZEIRO, G. A. Comparação entre as Respostas do Clone 4430 e *Tradescantia pallida* no Teste de Micronúcleos (Trad-MN). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 4, n. 1-3, 49-54, 2009.
- PATUSSI, C.; BÜNDCHEN, M. Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de *Tradescantia* clone 4430. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 4, p. 1173-1178, 2013.
- PEREIRA, B. B.; DE CAMPOS JÚNIOR, E. O.; MORELLI, S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 87, p. 17-22, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.10.003>

- PEREIRA, B. B.; DE CAMPOS JR, E. O.; DE LIMA, E. A. P.; BARROZO, M. A. S.; MORELLI, S. Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil by *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 5, p. 3680-3685, 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-2335-0>
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M. et al. **Flora da Reserva Ducke**: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central. Manaus: INPA-DFID, 1999.
- SANT'ANNA, E. T. G. **Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia**, 2003. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- SANTOS, A. P. M.; SEGURA-MUÑOZ, S. I.; NADAL, M.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L.; MARTINEZ, C. A. et al. Traffic-related air pollution biomonitoring with *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom in Brazil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 2, p. 1-10, 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-014-4234-3>
- SAVÓIA, E. J. L. **Potencial de Trandescantia pallida cv. purpurea para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André**. 2007. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Experimental) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- 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. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 255-260, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.03.019>
- SISENANDO, H. A.; DE MEDEIROS, S. R. B.; SALDIVA, P. H.; ARTAXO, P.; HACON, S. S. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. **Environmental Health**, v. 10, n. 1, p. 1, 2011. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-069X-10-41>
- SONG, F.; GAO, Y. Size distributions of trace elements associated with ambient particular matter in the affinity of a major highway in the New Jersey–New York metropolitan area. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 37, p. 6714-6723, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.08.031>
- SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Molecular toxicology protocols**, v. 291, p. 85-95, 2005. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-840-4:085>
- SPOSITO, J. C. V.; CRISPIM, B. A.; MUSSURY, R. M.; GRISOLIA, A. B. Genetic instability in plants associated with vehicular traffic and climatic variables. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 120, p. 445-448, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.031>

- SPOSITO, J. C. V.; CRISPIM, B. A.; ROMĀN, A. I.; MUSSURY, R. M.; PEREIRA, J. G.; SENO, L. O. et al. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallida*. **Chemosphere**, v. 175, p. 108-113, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.136>
- SUMITA, N. M.; MENDES, M. E.; MACCHIONE, M.; GUIMARAES, E. T.; LICHTENFELS, A. J. D. F. C.; LOBO, D. J. D. A. et al. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 53, n. 5, p. 574-579, 2003. <http://dx.doi.org/10.1080/10473289.2003.10466197>
- SUYAMA, F.; GUIMARÃES, E. T.; LOBO, D. J.; RODRIGUES, G. S.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S. et al. Pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 127-129, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2002000100018>
- TEIXEIRA, M. C. V.; BARBÉRIO, A. Biomonitoramento do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt var *purpurea* Boom (Commelinaceae). **Revista Ambiente & Água**, v. 7, n. 3, 2012. <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.982>
- WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2, p. 227-345, 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.09.003>
- YAGUINUMA, D. H.; BRITO, L. G. L.; FLUMINHAN, A. Avaliação dos danos genéticos provocados por radiação solar e poluição aérea através da análise de micronúcleos em *Tradescantia pallida* cv *purpurea*. **Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 10, n. 12, p. 255-269, 2014. <http://dx.doi.org/10.17271/1980082710122014919>
- ZEIGER, E. The effect of air pollution on plants. In: TAIZ; L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 5<sup>th</sup> ed. Sunderland: Sinauer, 2006.