PRISCILA IOVINE

**Usando biomonitoramento para avaliar o impacto da
poluição atmosférica no entorno de indústrias**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

2012

PRISCILA IOVINE

**Usando biomonitoramento para avaliar o impacto da
poluição atmosférica no entorno de indústrias**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

(versão corrigida)

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Iovine, Priscila

Usando biomonitoramento para avaliar o impacto da poluição atmosférica no
entorno de indústrias / Iovine Priscila. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Bioensaios 3.Plantas 4.Pólen 5.Abortamento
polínico 6.Monitoramento ambiental 7.Indústrias

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Roberto e Marcia, por me darem a oportunidade da vida, pelos exemplos de persistência e paciência e pelo eterno amor. Sem vocês nada disso seria possível, por isso declaro aqui a minha profunda gratidão por toda a dedicação e apoio durante todos esses anos para que todos os meus sonhos se tornassem realidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Saldiva pela oportunidade incrível, por acreditar em mim e por permitir que, assim como ele, façamos aquilo que amamos. Por toda a ausência que se faz presente nos poucos momentos que temos ao seu lado. E são esses momentos que ele nos traz toda a alegria, a ciência, o conhecimento, o amadurecimento e, principalmente, a força que precisamos para continuar caminhando.

Aos meus avós, Roberto, Pedrina e Joana (*in memorian*) e Vicente, por abrirem os meus caminhos, pelos exemplos de vida compartilhados e pela semente deixada como estímulo para eu continuar seguindo. A minha saudade e o meu orgulho.

À minha amiga e minha irmã, Patrícia Iovine, pelo exemplo de perseverança, pelas risadas e experiências divididas, pelo apoio, pelas ajudas técnicas e pela dedicação a cada ajuda solicitada para que eu pudesse concluir meu trabalho com sucesso.

Ao meu tio e meu padrinho, Ricardo Iovine, as minhas desculpas por não estudar o tão requisitado cultivo das minhocas brancas e o meu agradecimento pelo seu apoio e acompanhamento em cada passo da minha vida, do batismo ao título de Mestre.

Às minhas amigas de infância, Andressa, Fernanda, Larissa, Letícia e Paula, por acreditarem em mim e por me ensinarem a cultivar a semente da amizade durante todos esses anos. A minha alegria.

Ao meu tão querido amigo, Christian Credidio, por fazer da sua ausência uma presença diária em minha vida, por compartilhar de tantas semelhanças, por nunca me deixar desistir e por acreditar em mim sempre. A minha gratidão.

À Fabiana Mendez, por compartilhar por tantos anos cada dificuldade e cada conquista profissional e pessoal, por me incentivar e fazer da minha vida mais iluminada e mais feliz. O meu carinho.

À minha amiga Cláudia Brandão, por importar todas as coisas maravilhosas dessa vida para a minha vida e me apoiar e comemorar cada passo que dei, seja grande ou pequeno. Pela força e pela presença constante mesmo do outro lado do mundo. O meu coração cheio de saudade.

À minha amiga Paula Dondon, por fazer o impossível ser apenas difícil, o desânimo ser ânimo e descrença ser crença. À sua presença angelical, o meu muito obrigada.

À Ana Cristina Gimenes, por todo carinho, toda a luz e atenção que me deu nos últimos momentos de aflição. A minha sincera gratidão.

Ao meu amigo Vinícius de Gusmão Barreto, por me apoiar, me ouvir e me ajudar nos momentos “sem solução” da vida. Por todas as pizzas que ainda lhe devo, o meu muito obrigada.

Ao pesquisador Paulo Afonso de André, por me receber com tanto carinho e por compartilhar tantos ensinamentos do início ao fim deste trabalho. Por todas as correções e considerações enriquecedoras durante a minha caminhada.

Ao pesquisador Marco Antônio Martins, por abrir as portas da sua sala de corpo e alma em todos os momentos de dificuldade, pelas experiências compartilhadas, as infinitas ajudas técnicas e profissionais até altas horas e, além de tudo, por se tornar um amigo. Por todas as trufas que ainda faltam, o meu muito obrigada.

Ao pesquisador Luiz Amador Pereira, por ser meu “co-orientador” por livre e espontânea pressão e mesmo assim abriu mão do seu tempo para tantas correções e orientações sempre esbanjando muita paciência e dedicação. Por todo o apoio e por acreditar no meu trabalho.

Aos meus pequenos, aos meus “aluninhos”, Bruna, Deivid, Miriele, Eduardo e Flávio Pelone pela oportunidade de aprendizado, pois nessa história a aluna sou eu. Por todas as tardes recheadas de trabalho realizado com bom humor, os meus sinceros agradecimentos.

À Profª Ligia Vizeu Barrozo, pelas incríveis aulas sobre geoprocessamento, pela dedicação, orientação e pelas contribuições enriquecedoras que deu ao meu trabalho.

Às pesquisadoras Eliane Tigre e Regiani Carvalho de Oliveira, por todos os ensinamentos, todas as orientações e correções dos trabalhos que realizei. A todos os colegas e funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – LPAE da Faculdade de Medicina da USP.

À Edna Melo, por abrir os meus olhos e por estar presente por tão pouco para ser responsável por tantas coisas boas em minha vida. Pela amizade e dedicação.

Às colegas e amigas que encontrei no LPAE, Ana Paula Martins, Camila Villegas e Letícia Ramires, por todas as aflições, todo o apoio e toda a amizade compartilhados nessa dura caminhada. O meu enorme desejo de sucesso crescente.

Às secretárias do Professor Saldiva, Fátima e Rosana, por tornarem possível o impossível sempre regado a sorrisos e carinhos.

À minha amiga Tina, por fazer a distância ser pequena e o meses serem longos tempos de amizade. Obrigada por todo apoio.

Às secretárias da pós-graduação e do LPAE, por todas as informações e disponibilidade para tornar a nossa caminhada mais fácil.

A todos os professores e colegas que contribuíram para meu crescimento acadêmico. A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

À empresa Samarco Mineração, pela oportunidade e financiamento das atividades essenciais para a realização deste trabalho. Em especial, à Alessandra Santos de Jesus, pelo seu comprometimento e dedicação.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

*"Se não puderes ser o Sol, sê uma estrela.
Não é pelo tamanho que terás êxito ou fracasso...
Mas sê o melhor no que quer que sejas."*

(Pablo Neruda)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA	1
1.2. POLUIÇÃO E SAÚDE	3
1.3. BIOENSAIOS VEGETAIS	6
1.4. BIOENSAIOS VEGETAIS E SAÚDE	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. METODOLOGIA	15
3.1. ÁREAS DE ESTUDO	15
3.1.1. ÁREA DE ESTUDO 1 - INDÚSTRIA DE GRANDE PORTE NO SETOR DE MINERAÇÃO, ANCHIETA, ESPÍRITO SANTO	15
3.1.1.1. CARACTERIZAÇÃO	15
3.1.1.2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS PELOTAS DE MINÉRIO DE FERRO	17
3.1.1.3. EMISSÕES DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS	18
3.1.1.4. DEFINIÇÃO DA ESPÉCIE E LOCAIS DE AMOSTRAGEM	20
3.1.2. ÁREA DE ESTUDO 2 – INDÚSTRIA DE PEQUENO PORTE NA PRODUÇÃO DE FIOS DE LÁTEX, JACAREÍ, SÃO PAULO	23
3.1.2.1. CARACTERIZAÇÃO	23
3.1.2.2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DOS FIOS DE LÁTEX	25
3.1.2.3. DEFINIÇÃO DA ESPÉCIE E LOCAIS DE AMOSTRAGEM	25
3.2. QUANTIFICAÇÃO DE ABORTO EM GRÃOS DE PÓLEN	27
3.3. ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR DISPERSÃO DE ENERGIA (EDXRF)	27
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
3.5. ANÁLISE ESPACIAL – MAPAS DE DISTRIBUIÇÃO	31
4. RESULTADOS	34
4.1. ÁREA DE ESTUDO 1- INDÚSTRIA DE GRANDE PORTE NO SETOR DE MINERAÇÃO, ANCHIETA, ESPÍRITO SANTO	33
4.2. ÁREA DE ESTUDO 2 – INDÚSTRIA DE PEQUENO PORTE NA PRODUÇÃO DE FIOS DE LÁTEX, JACAREÍ, SÃO PAULO	40
5. DISCUSSÃO	47
5.1. LIMITAÇÕES	53
6. CONCLUSÃO	55

7. ANEXOS	56
ANEXO 1 – LÂMINAS DE GRÃOS DE PÓLEN DA CAMPANHA 1 NA ÁREA DE ESTUDO 1	56
ANEXO 2 – LÂMINAS DE GRÃOS DE PÓLEN DA CAMPANHA 2 NA ÁREA DE ESTUDO1	61
ANEXO 3 – LÂMINAS DE GRÃOS DE PÓLEN DA ÁREA DE ESTUDO 2	66
ANEXO 4 – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA CIENTÍFICA	73
ANEXO 5 – REVISÕES SUGERIDAS PELA REVISTA CIENTÍFICA	86
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: SIMULAÇÕES DE HOROWITZ (2006) A - VARIAÇÃO ESTIMADA DA CONCENTRAÇÃO DO OZÔNIO (PPB); B- MÉDIA ANUAL DE $MP_{2,5}$ ($\mu\text{G}/\text{M}^3$)	6
FIGURA 2: MAPA DO OBJETO DE ESTUDO, USINA E SEU ENTORNO. A SETA INDICA A LOCALIZAÇÃO DA USINA, E AS LETRAS A, B E C, AS COMUNIDADES (RECANTO DO SOL, MÃE-BÁ E CONDADOS, RESPECTIVAMENTE). A DIREÇÃO PREDOMINANTE DO VENTO É NORDESTE	16
FIGURA 3: CONTRIBUIÇÃO MÉDIA PERCENTUAL DAS FONTES NAS PTS DA INDÚSTRIA EM UBU, ANCHIETA	18
FIGURA 4: MAPA DA PLUMA DE DISPERSÃO DAS EMISSÕES DE SO_2 . O 1 INDICA A INDÚSTRIA E O B O PORTO DE UBU	19
FIGURA 5: HIBISCUS ROSA SINENSIS	20
FIGURA 6: GRÃOS DE PÓLEN DA HIBISCUS ROSA SINENSIS EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 400X)	20
FIGURA 7: BOUGAINVILLEA SPECTABILIS WILLD	21
FIGURA 8: GRÃOS DE PÓLEN DA BOUGAINVILLEA SPECTABILIS WILLD EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 400X)	21
FIGURA 9: CATHARANTHUS ROSEUS (L.) G. DON	22
FIGURA 10: GRÃOS DE PÓLEN DA CATHARANTHUS ROSEUS (L.) G. DON EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 100X)	22
FIGURA 11: GRÃOS DE PÓLEN NORMAIS E GRÃO DE PÓLEN ABORTADO EM MICROSCÓPIO ÓPTICO (AUMENTO DE 400X)	22
FIGURA 12: MAPA DA ÁREA DE ESTUDO 1 COM OS 17 LOCAIS DE AMOSTRAGEM REPRESENTADOS PELOS PONTOS PRETOS. A SETA INDICA A ÁREA DA INDÚSTRIA	23
FIGURA 13: MAPA DA ÁREA DE ESTUDO 2. O PONTO A REPRESENTA A FÁBRICA DE LÁTEX, B A PRINCIPAL FONTE DE TRÁFEGO LOCAL, E C A ESCOLA. A SETA REPRESENTA A DIREÇÃO PREDOMINANTE DO VENTO	25
FIGURA 14: MAPA DA ÁREA DE ESTUDO 2 COM OS 30 LOCAIS DE AMOSTRAGEM REPRESENTADOS PELOS PONTOS PRETOS	27
FIGURA 15: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FE ($\mu\text{G}/\text{G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS. A ESCALA DE CORES INDICA A ALTITUDE DO RELEVO, A PRETA A CONCENTRAÇÃO DE FE E A MARCAÇÃO EM PRETO OS PONTOS AMOSTRAIS	39
FIGURA 16: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DO ABORTAMENTO POLÍNICO (%) EM CATHARANTHUS ROSEUS. A ESCALA DE CORES INDICA A ALTITUDE DO RELEVO, A PRETA A FREQUÊNCIA DE ABORTAMENTO POLÍNICO E OS PONTOS PRETOS OS PONTOS AMOSTRAIS	40
FIGURA 17: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE S ($\mu\text{G}/\text{G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS. A ESCALA DE CORES INDICA A ALTITUDE DO RELEVO, A PRETA A CONCENTRAÇÃO DE S E A MARCAÇÃO EM PRETO OS PONTOS AMOSTRAIS	41
FIGURA 18: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE AL ($\mu\text{G}/\text{G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS	43

FIGURA 19: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE CU ($\mu\text{G/G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS	43
FIGURA 20: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE S ($\mu\text{G/G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS	44
FIGURA 21: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ZN ($\mu\text{G/G}$) EM CATHARANTHUS ROSEUS	44
FIGURA 22: MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ABORTO POLÍNICO (%) EM CATHARANTHUS ROSEUS	45
FIGURA 23: MAPA DA ÁREA DE ESTUDO COM QUARTIS DE DISTÂNCIA REPRESENTADOS PELAS LINHAS PRETAS. O PONTO A REPRESENTA A FÁBRICA DE LÁTEX, O PONTO B A ÁREA DE ALTO TRÁFEGO VEICULAR E O PONTO C, A ESCOLA. OS PONTOS PRETOS INDICAM OS 30 PONTOS AMOSTRAIS. A ÁREA EM COMUM COM AS MAIORES CONCENTRAÇÕES DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS ESTÁ INDICADA PELO RETÂNGULO VERMELHO.	45
FIGURA 24: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA VARIAÇÃO (MÉDIA $\pm$ ERRO PADRÃO) DO AL (B), CU (C), S (D) E ZN (E) EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA DA ÁREA DE ALTO TRÁFEGO VEICULAR. O GRÁFICO A REPRESENTA OS VALORES MÁXIMOS DA TAXA DE ABORTAMENTO POLÍNICO EM FUNÇÃO DA DISTÂNCIA DO MESMO PONTO.	47
FIGURA 25: REGRESSÃO LINEAR ENTRE A DISTÂNCIA DA ÁREA DE ALTO TRÁFEGO VEICULAR E A CONCENTRAÇÃO DOS ELEMENTOS AL (A), CU (B), S (C), ZN (D) NAS FOLHAS	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONCENTRAÇÕES DOS ELEMENTOS NO MATERIAL DE REFERÊNCIA PEACH LEAVES (NIST 1547)	31
TABELA 2 - MÉDIA DA PORCENTAGEM DE ABORTAMENTO POLÍNICO EM CADA LOCAL E O ACRÉSCIMO PERCENTUAL RELATIVO À MENOR MÉDIA ENTRE OS LOCAIS	34
TABELA 3 – VALOR DE P OBTIDO PELO MÉTODO DE TUKEY PARA COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS REGIÕES DUAS A DUAS	35
TABELA 4 - ANÁLISE DESCRITIVA DOS ELEMENTOS-TRAÇO EM FOLHAS DE MÃE-BÁ	36
TABELA 5 - ANÁLISE DESCRITIVA DOS ELEMENTOS-TRAÇO EM FOLHAS DE RECANTO DO SOL	37
TABELA 6 - ANÁLISE DESCRITIVA DOS ELEMENTOS-TRAÇO EM FOLHAS DE CONDADOS	37
TABELA 7 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS ELEMENTOS-TRAÇO NAS FOLHAS DETECTADOS PELO EDXRF	38
TABELA 8 - CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE A DISTÂNCIA DA AVENIDA, OS ELEMENTOS-TRAÇO E O ABORTAMENTO POLÍNICO	46

IOVINE P. *Usando biomonitoramento para avaliar o impacto da poluição atmosférica no entorno de indústrias* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Resumo

Fontes de poluição atmosférica têm aumentado em países em desenvolvimento, tornando extremamente difícil o acesso aos efeitos da poluição atmosférica na saúde pública. Bioensaios com plantas têm sido extensivamente utilizados para monitorar a poluição atmosférica em áreas desprovidas de sistemas de monitoramento da qualidade do ar convencionais pela sua simplicidade, baixo custo e alta sensibilidade. O presente estudo visa caracterizar a distribuição espacial da concentração de poluentes no entorno de indústrias através de evidências de toxicidade celular e acúmulo foliar utilizando planta local (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). O abortamento polínico foi quantificado em microscópio óptico (400x). O acúmulo de elementos traços foi avaliado em EDXRF (Energy Dispersive X-Ray Fluorescence). Os resultados obtidos para a área de estudo 1 mostram que a taxa de abortamento polínico é maior quanto mais próximo da indústria ($p=0,047$). Para o acúmulo foliar, foram encontrados os elementos S, Fe e Na que se relacionam com produtos de combustão; processo industrial; e aerossol marinho. Para a área de estudo 2, a taxa de abortamento polínico aumenta com a proximidade da área de alto tráfego veicular assim como a concentração dos elementos Al, Cu, S e Zn nas folhas pela Análise de Regressão Linear. Este estudo mostra que as áreas no entorno de fontes emissoras de poluição têm alta concentração de elementos - traço e dano celular o que indica riscos à saúde da população local. Nossos resultados reforçam que o uso de metodologias alternativas e simples como testes de abortamento polínico e bioacumulação em folhas são apropriados para caracterizar gradientes de concentração em áreas desprovidas de sistema de monitoramento da qualidade do ar, em escalas maiores do que as já estudadas. A combinação de técnicas de biomonitoramento e geoprocessamento pode ser utilizada para monitoramento ambiental em áreas com tecnologia limitada.

Descritores: Poluição do ar; Bioensaios; Plantas; Pólen; Abortamento polínico; Monitoramento ambiental; Indústrias

IOVINE P. *Using biomonitoring to evaluate impact of air pollution around industries* [thesis]. Faculty of Medicine University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2012.

Abstract

Developing countries are experiencing increases in air pollution sources, making assessment of air pollution impact on human health extremely difficult. Plant bioassays have been widely employed to monitor air pollution in areas devoid of conventional air pollution monitoring systems because of their simplicity, low cost and high sensitivity. The aim of this study was to determine the area of influence of industries using local flora (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). Abortive pollen tests and the accumulation of toxic elements in leaves were used to detect possible risks to health of the local population. Abortive grains were evaluated through the use of a microscope under 400-fold magnification. The trace elements accumulation was evaluated by using EDXRF (Energy Dispersive X-Ray Fluorescence). Results for study site 1 shown that the closer the distance from the industry, the higher the pollen abortion rate ($p=0,047$). For bioaccumulation test, S, Fe and Na were associated to combustion of fossil fuels, industrial process and marine aerosol. For study site 2, the closer the distance from the major source of traffic, the higher the pollen abortion rate. The same behavior was observed for Al, Cu, S and Zn concentrations in Linear Regression Analyses. The distribution of element concentrations was elaborated in maps with the obtained results. This work showed that the areas surrounding the emission sources had a higher concentration of toxic elements, leading to greater biological damage, which indicates health risks to the local population. Our results reinforce that the use of alternative and simple methods such as pollen abortion rates and bioaccumulation in leaves are appropriate for characterizing air quality gradients in areas devoid of conventional air pollution monitoring systems, even at greater scales than have been tested before. The association of this technique and geographic information system can be used for environmental screening in areas with limited technology.

Descriptors: Air pollution; Bioassays; Plants; Abortive pollen test; Environmental monitoring; Industries

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Atmosférica

A poluição atmosférica atualmente é um dos mais importantes problemas ambientais, pois se concentra principalmente nas cidades associando-se à atividade humana e ao desenvolvimento econômico. A rápida urbanização pode ser a causa de uma série de problemas ambientais, como a poluição atmosférica, a chuva ácida e a poluição do solo e da água (Wang et al., 2008).

São duas as principais fontes de emissão associadas à contaminação do ar urbano: as indústrias, desde o início da revolução industrial até os dias atuais; e os veículos automotores, que vem se transformando na principal fonte de emissão a partir da segunda metade do século XX (Braga et al., 2007) e são responsáveis por contribuir com a presença de alguns metais no ar urbano (Schauer et al., 2006).

O nível de poluição atmosférica é determinado pela quantificação das substâncias poluentes presentes no ar. Conforme a Resolução CONAMA nº 03/90, considera-se poluente atmosférico “qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo a saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, a fauna e a flora ou prejudicial a segurança, ao uso e gozo da propriedade e as atividades normais da comunidade”.

Com relação à sua origem, os poluentes podem ser classificados como:

- Primários: aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão, como os óxidos de nitrogênio e enxofre, monóxido de carbono, compostos orgânicos voláteis e o material particulado;

- Secundários: aqueles formados na atmosfera através das reações químicas, incluindo a fotoquímica entre poluentes e/ou constituintes naturais na atmosfera, sendo o mais conhecido o ozônio.

O material particulado inalável pode ser classificado conforme o seu tamanho em três frações: ultrafina ($MP_{0,1}$ com diâmetro aerodinâmico inferior a $0,1\ \mu m$), fina ($MP_{2,5}$ com diâmetro aerodinâmico inferior a $2,5\ \mu m$) ou grossa ($MP_{2,5} - MP_{10}$, com diâmetro aerodinâmico entre $2,5\ \mu m$ e $10\ \mu m$).

As partículas ultrafinas têm um curto tempo de residência na atmosfera, pois se agregam formando as partículas finas, que são produzidas principalmente nos processos de combustão, a partir da emissão direta e dos gases precursores emitidos como o dióxido de enxofre (SO_2), óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis que reagem na atmosfera. A fração fina é composta tipicamente de nitrato, sulfato, amônio, material carbonáceo e metais. As partículas inaláveis finas penetram mais profundamente no trato respiratório causando maiores danos a saúde humana (WHO, 2006).

As partículas inaláveis grossas são provenientes basicamente de emissão direta dos veículos, de ressuspensão de poeira do solo em vias de tráfego, de material da crosta terrestre ressuspendido, de atividades industriais e de material de origem biológica, como grãos de pólen e fragmentos de bactérias (WHO, 2006).

O SO_2 é o poluente gasoso mais preocupante como precursor primário para acidificação (Bhanarkar et al., 2005). Já dos dois constituintes do NO_x , o NO_2 é o mais importante para a qualidade do ar, pois é o mais relevante para a saúde humana, já que está associado com doenças cardiovasculares e respiratórias (Kraft et al., 2005; Curtis et al., 2002). Considerando o papel do NO_x como um precursor de vários poluentes tóxicos e os efeitos de curta e longa exposição que as concentrações de NO_2 podem induzir, manter as concentrações de NO_2 baixas poderá proporcionar benefícios para a saúde da população (Mavroidis et al., 2011).

Os metais são componentes da crosta terrestre, mas também podem ser lançados ao meio ambiente através da queima de combustíveis fósseis e

atividades industriais (Kampa e Castanas, 2008). Estes elementos podem ser transportados pelo ar e contaminar os alimentos, a água e a saúde dos seres vivos. Alguns metais são comumente chamados de “elementos-traço”, por ocorrerem em concentrações da ordem de parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb) (Martins, 2009).

Cidades metropolitanas são ambientes onde poluentes atmosféricos podem estar presentes em níveis elevados, e podem, portanto, afetar a saúde da população (Ozcan, 2012). Exposição a emissões de $MP_{2,5}$ e MP_{10} em avenidas, por exemplo, têm tido efeitos adversos na saúde humana, pois tem ligações com o aumento do risco de doenças respiratórias (Tsai et al 2000; Lin et al 2002). Efeitos à saúde também têm sido associados com metais, uma melhor caracterização das emissões de metais por veículos automotores é necessária (Schauer et al., 2006).

Por isso, estudos têm examinado as concentrações de poluentes atmosféricos nas cidades (Lewne et al., 2004; Yang et al., 2009) e alguns dão ênfase à poluição atmosférica gerada pelo tráfego em megacidades (Allen et al., 2009; Tonne et al., 2007). Algumas áreas dessas grandes cidades podem formar áreas de maior concentração de poluentes, assim chamadas de “hot spots” (WHO, 2006). Esse termo vem sendo utilizado em diferentes situações com o intuito de indicar lugares específicos de maior concentração da variável estudada, no caso, a poluição atmosférica.

Portanto, pode-se afirmar que os possíveis efeitos mutagênicos das complexas misturas de poluentes atmosféricos nas cidades têm causado preocupação pública (Klumpp et al., 2001).

1.2 Poluição e saúde

Poluição atmosférica é um assunto muito importante na saúde pública desde o começo do século XX, principalmente em grandes centros urbanos (Santos et al., 2008). Estimativas indicam que a inalação do MP_{10} é responsável por 800.000 mortes prematuras e 6,4 milhões de anos de vida perdida no mundo (Cohen et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde (2006) recomenda padrões abaixo dos padrões atuais nacionais, por

reconhecer que a poluição atmosférica é responsável por mais de 2 milhões de mortes por ano em todo o mundo. Estimativas classificam a poluição atmosférica urbana (somente $MP_{2,5}$) como o décimo terceiro principal fator de risco de mortalidade e o terceiro entre os riscos ambientais no mundo (Ezzati et al., 2004).

O grande número de pessoas expostas à poluição atmosférica estimulou novos estudos, não apenas para melhor estabelecer o tipo de resposta à exposição, mas também para explicar os possíveis mecanismos pelos quais a poluição atmosférica gera efeitos prejudiciais à saúde (Santos et al., 2008).

Estudos revelam que a exposição a níveis de poluição atmosférica tem sido inequivocamente associada ao aumento do risco de morbidade e mortalidade devido às doenças inflamatórias pulmonares, câncer de pulmão e eventos cardiovasculares (Dockery et al., 1993; Saldiva et al., 1994, 1995; Pope et al., 2002; Mariani et al., 2009). A poluição atmosférica urbana também mostrou acelerar a progressão de tumores para malignidade (Cury et al., 2000). Santos et al. (2008) mostram que os efeitos da poluição atmosférica em relação à arritmia são iniciados predominantemente com concentrações abaixo dos padrões de qualidade do ar. Sah e Balkhair (2011) exemplificam que o excesso de poluição atmosférica pode causar inflamação das vias aéreas, redução da função pulmonar, aumento da asma e doença pulmonar obstrutiva crônica, e afetar a morbidade cardiovascular.

Os estudos epidemiológicos mostram que a exposição à poluição atmosférica pode elevar o risco de acontecimentos adversos na gravidez, incluindo mortalidade infantil, baixo peso ao nascer, parto prematuro, e pequeno tamanho para a idade gestacional (Kloog et al., 2012). Partículas finas podem afetar diretamente a saúde infantil, pois são uma mistura de diferentes substâncias, muitas delas tóxicas, como os metais, e também podem ter matéria orgânica tóxica, como hidrocarbonetos policíclicos

aromáticos adsorvidos na sua superfície (Kloog et al., 2012), porém o conhecimento do impacto exato do $MP_{2,5}$ ainda é muito limitado.

Anenberg et al. (2010) estimaram a carga global de mortalidade relacionada ao ozônio e ao $MP_{2,5}$ utilizando um modelo e os impactos na saúde. O ozônio antropogênico foi associado a mortes por doenças respiratórias e o $MP_{2,5}$ a pulmonares. A Figura 1 mostra uma das simulações utilizadas com altas concentrações destes poluentes distribuídas por algumas regiões do mundo.

Porém, é rara a avaliação dos efeitos crônicos a exposições dos poluentes atmosféricos. Alguns estudos mostram que exposições a longo prazo estão associadas à efeitos crônicos na saúde. Estudos com exposições a partículas finas mostram que há associações com o aumento de morbidade e mortalidade, o que sugere que reduções contínuas a exposição podem resultar em melhoria da expectativa de vida (Pope et al., 2009). Segundo Souza et al.(1998), exposição de longo prazo a poluentes atmosféricos contribui para patogênese de doenças de vias áreas. Os efeitos crônicos do ozônio, por exemplo, estão começando a ser avaliados, Jerrett et al. (2009), foram os primeiros a demonstrar impactos a longo prazo utilizando ozônio. Os efeitos crônicos dos poluentes ocorrem em concentrações mais baixas do que aquelas relacionadas para os efeitos agudos. E ainda, é provável que as medidas de poluição mais importantes para a determinação do risco à saúde são as médias anuais ou até de prazos maiores, contrapondo-se ao conceito de que é preciso ter medidas horárias ou médias de 24 horas, como as atualmente preconizadas pela legislação vigente.

O fato de que se pode estimar riscos à saúde por meio de medidas de longo prazo pode promover a adoção de novos conceitos de monitoramento ambiental, ajudando a reduzir a desigualdade de infra-estrutura das redes de monitoramento da poluição do ar existentes entre as áreas desenvolvidas e

em desenvolvimento do planeta, abrindo espaço para a utilização de bioindicadores vegetais.

Figura 1: Simulações de Horowitz (2006) A - Variação estimada da concentração do ozônio (ppb); B- média anual de $MP_{2.5}$ ($\mu g/m^3$).

1.3 Bioensaios vegetais

Bioindicadores são organismos ou um conjunto de organismos que reagem a perturbações ambientais através de alterações nas suas funções vitais ou composição química e podem ser usados para a avaliação da extensão das mudanças em seus ambientes (Arndt e Schweizer, 1991). Os

organismos mais usados são as plantas. Esta escolha pode ser explicada por vários motivos: larga distribuição geográfica, fácil coleta e legibilidade do impacto dos poluentes. As plantas têm uma sensibilidade diferente dependendo do tipo de poluente e do período de crescimento (Falla et al., 2000).

Os poluentes primeiramente causam deterioração fisiológica nas plantas (danos à fotossíntese, por exemplo) e às vezes podem causar o desaparecimento ou o aparecimento de algumas espécies no ecossistema. Esses danos podem ser vistos a olho nu. Em um segundo momento, para uma análise mais aprofundada, as plantas foram classificadas de acordo com o seu modo de exposição, onde há dois grupos de classificação mais estudados (Falla et al., 2000):

- os bioindicadores passivos que são plantas já existentes no lugar de estudo. Seu uso geralmente está relacionado com a necessidade de abranger toda a área em análise. Além disso, as plantas nativas não precisam de manutenção específica. Entretanto, a interpretação dos resultados deve levar em consideração alguns critérios relacionados à heterogeneidade das condições de vida como a qualidade do solo, as condições climáticas, a estação do ano, a variabilidade genética, metabolismo e a heterogeneidade da distribuição espacial das espécies selecionadas; e

- os bioindicadores ativos que são plantas levadas para a área de estudo. A exposição do material biológico em estufas específicas geralmente evita as restrições anteriores. Com o intuito de resolver algumas desvantagens do método passivo, botânicos investiram nos bioindicadores ativos.

As plantas são os organismos mais utilizados em bioindicação também por apresentarem resultados positivos com baixos níveis de contaminação, sendo, portanto, conhecidas como sensíveis bioindicadores de mutagênese (Ma et al. 1994). Como uma ferramenta complementar aos estudos epidemiológicos, bioensaios com plantas têm sido extensivamente

utilizados no monitoramento da poluição atmosférica (Ma et al., 1985; Guimarães et al., 2000, 2004; Wappelhorst et al., 2000; Klumpp et al., 2006; Fuga et al., 2008; Mariani et al., 2009).

Desde 1960, vários testes de genotoxicidade já tinham sido desenvolvidos para a detecção de genotoxinas individuais e monitoramento dos efeitos no ambiente (Grant, 1982; Ma, 1981). Testes de mutação genética que são baseados na detecção de alterações fenotípicas foram estabelecidos com várias plantas. Outras abordagens baseadas na detecção de aberrações cromossômicas foram desenvolvidas e substituídas por testes de micronúcleo (MCN), pois consumiam menos tempo (Misik, 2011).

Os testes de micronúcleo com plantas são utilizados para detectar o potencial mutagênico dos poluentes atmosféricos. Esse tipo de ensaio foi usado primeiramente in vitro com raízes de *Vicia faba*, e hoje é enormemente utilizado em estudos que objetivam monitoramento ambiental com as plantas *Allium cepa* e *Tradescantia* sp (Sisenando et al., 2011).

Micronúcleos são estruturas resultantes de um cromossomo ou fragmento cromossômico que foi perdido durante a divisão celular e, por esse motivo, não está incluso no núcleo das células filhas, restando no citoplasma das células, permitindo-nos detectar a ação clastogênica e agentes aneugênicos (Sisenando et al., 2011). O teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) é considerado uma ferramenta valiosa por muitos pesquisadores, devido à simplicidade da metodologia e a sensibilidade da planta aos agentes genotóxicos (Sisenando et al., 2011). Esta abordagem é o bioensaio vegetal mais utilizado para detecção de genotoxinas ambientais (Misik, 2011). Este teste tem sido utilizado em todo o mundo para avaliar o potencial genotóxico do ar (Monarca e Feretti, 1997), do solo (Cotelle e Masfaraud, 1998), da água (Crebelli et al., 2005) e dos produtos químicos (Gong et al., 2003).

Dentre os testes realizados em espécies vegetais, um outro estudo relevante é feito com testes abortivos do pólen de plantas (Uhrikova e

Mičieta, 1995; Mičieta e Murin, 1996; Mičieta e Murin, 1997). O teste do índice de abortos em grãos de pólen em plantas possui alta sensibilidade para a determinação da genotoxicidade das partículas atmosféricas uma vez que este teste utiliza células haplóides (microesporos) sendo capaz de detectar mutações letais as quais afetam o desenvolvimento dos grãos de pólen (Mičieta e Murin, 1997; Malallah et al., 1997; Mičieta e Kunova, 2000).

Bioindicadores vegetais podem ser implantados facilmente em áreas desprovidas de sistemas convencionais de monitoramento da poluição atmosférica (Mariani et al., 2009), ou até mesmo em grandes áreas ou regiões onde uma análise instrumental da poluição atmosférica não está extensamente distribuída, já que sistemas instrumentais exigem equipamentos sofisticados que requerem uma manutenção onerosa (Guimarães, 2004).

O uso de organismos indicadores tem a vantagem de trazer dados adicionais aos sistemas tradicionais de monitoramento, isto é:

- o conhecimento de níveis médios de contaminação por micropoluentes graças ao bioacúmulo;
- o conhecimento da real incidência dos poluentes por estudos toxicológicos e ecotoxicológicos;
- uma aproximação mais realista do impacto no meio ambiente e na saúde pública, pois leva em consideração os conceitos de biodisponibilidade, dose e exposição (Falla et al., 2000).

O bioacúmulo é uma outra técnica utilizada em estudos de bioindicadores, onde materiais botânicos, como líquens, musgos, cascas de árvores e folhas são utilizados como bioacumuladores de elementos traço (Ares et al., 2011; Fuga et al., 2008; Kääfer et al., 2012). Essa técnica permite a identificação dos elementos-traço presentes no ar, criando a possibilidade de identificar fontes de poluição atmosférica (Sumita et al., 2003).

As árvores, por exemplo, além de sua função ornamental em áreas urbanas, têm suas folhas e cascas que podem acumular poluentes da atmosfera, por essa característica são apropriadas para indicar a poluição do ar a longo prazo, o que possibilita o monitoramento da concentração atmosférica de metais pesados ilustrando a tendência da distribuição desses metais nas áreas estudadas (Martins, 2009). Kuik e Wolterbeek (1995) propuseram o uso de cascas de árvore como biomonitor de poluição de metais pesados na Holanda. Seu uso foi recomendado pela sua disponibilidade quando comparada com os líquens e musgos. O monitoramento com cascas fornece informação barata da composição e quantificação da deposição de poluentes (Martins, 2009).

Já entre as briófitas, os musgos são frequentemente utilizados para medir a deposição de metais atmosféricos. Existe uma boa correlação entre as concentrações observadas em tecidos de plantas e as concentrações de Cádmio, Zinco, Ferro, Chumbo, Cobre e Vanádio em água de chuva (Falla et al., 2000).

A partir do levantamento dessas técnicas é possível afirmar que o biomonitoramento vegetal atualmente é considerado uma atrativa ferramenta alternativa, pois plantas podem ser utilizadas para detecção, reconhecimento, monitoramento e mapeamento de poluentes atmosféricos.

Para o mapeamento de poluentes atmosféricos, métodos como sistemas de informações geográficas (SIG) associados com análise espacial podem ser usados para identificar “hot spots” e determinar potenciais fatores de risco. Os Sistemas de Informação Geográfica são ferramentas de análise comumente utilizadas para caracterizar padrões espaciais de doenças (Queiroz et al., 2010) e constituem importantes instrumentos dentro da saúde pública como técnicas de análise da distribuição de agravos à população (Queiroz et al., 2010). Portanto, podem ser usados no estudo da distribuição espacial de poluentes atmosféricos para analisar seus possíveis efeitos à saúde.

Tais ações são necessárias principalmente por quatro motivos: para identificar a fonte de poluição e estudar a variação espacial e temporal dos poluentes atmosféricos em diferentes escalas; prevenir riscos diretos à saúde humana; calcular danos causados em construções, vegetações; além de checar a efetividade de programas de monitoramento da poluição atmosférica (Garrec et al., 2002).

A padronização das técnicas, desde o cultivo e a exposição das plantas até a medição de efeitos e avaliação dos resultados, é um requisito fundamental para a validade e a aplicabilidade dos dados obtidos. Porém, a grande diversidade de métodos aplicados nos inúmeros estudos conduzidos e publicados em vários países europeus utilizando plantas como bioindicadoras da poluição do ar, não somente inviabiliza a comparação dos dados obtidos, mas também contribui para reduzir a aceitação desse método biológico de controle da qualidade do ar frente às autoridades e à opinião pública. Por esse motivo, vem sendo feito um esforço para a padronização de métodos de bioindicação (Klumpp et al., 2001).

1.4 Bioensaios vegetais e saúde

Diante das características citadas, bioensaios de mutagênese utilizando plantas têm um papel importante na investigação das consequências prejudiciais da poluição à saúde humana, principalmente em países e regiões que passaram por um rápido desenvolvimento sem preocupação ambiental como resultado da urbanização ou industrialização (Suyama et al., 2002; Guimarães, 2003).

Regiões como estas necessitam de metodologia efetiva e rápida para a estimativa do impacto da poluição de origem antropogênica. Neste cenário, estudos de biomonitoramento podem funcionar como uma medida alternativa e preventiva para o controle de qualidade ambiental e para a determinação eficaz de riscos (Suyama et al., 2002, Guimarães, 2003), pois segundo Ferreira et al. (2007), mesmo pessoas que vivem longe da fonte de

emissão de poluentes podem sofrer as consequências da poluição atmosférica.

Um estudo realizado em São José dos Campos por Mariani et al.(2009), mostrou que a frequência de micronúcleo (MCN) em *Tradescantia pallida* exposta à poluição atmosférica foi significativamente associada à taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer na população. Os autores mostraram que há uma relação considerável, embora não significativa, entre os índices de MCN e mortalidade por doença pulmonar obstrutiva crônica.

Testes de MCN realizados por Sisenando et al. (2011) em um município produtor de cana de açúcar, indicam que tanto os níveis de MCN quanto de poluentes mostram que Tangará da Serra contém um dos piores indicadores de morbidade e mortalidade por doenças respiratórias na região Sul da Amazônia. Também foi observado que o aumento na frequência de MCN foi significativamente correlacionado com o aumento da taxa de doenças respiratórias em crianças, sugerindo que a *Tradescantia pallida* é um importante indicador biológico para ser incluso na avaliação da exposição de riscos humanos à exposição a agentes tóxicos emitidos por queima de biomassa.

Segundo Anenberg et al. (2010), embora alguns países tenham implementado políticas que aprimoram a qualidade do ar, sem uma ação mais eficaz, a carga global de poluição atmosférica antropogênica pode ser maior no futuro do que o estimado no presente.

Na tentativa de aprimorar as políticas de qualidade do ar, testes com grãos de pólen para a avaliação do efeito genotóxico dos poluentes atmosféricos foram realizados por Carneiro et al.(2011), onde foi possível observar o efeito dos poluentes, e a frequência de abortos de grãos de pólen em uma distância de 0, 60 e 120 metros da fonte emissora, no caso, uma avenida com fluxo intenso de veículos.

Diante do contexto de que bioindicadores vegetais funcionam como uma ferramenta complementar em regiões onde as medições de poluentes são distribuídas desigualmente e que têm relação com indicadores de saúde; entendemos que a combinação de técnicas de biomonitoramento e de análise espacial é de extrema importância no sentido de evitar possíveis efeitos dos poluentes à saúde pública. Portanto, este estudo pretende avaliar a eficácia desta combinação em regiões desprovidas de monitoramento convencional da qualidade do ar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo visa caracterizar a distribuição espacial da concentração de poluentes no entorno de indústrias por meio de evidências de toxicidade celular e acúmulo foliar em planta local.

2.2 Objetivos específicos

Propõe-se caracterizar a distribuição espacial da concentração de poluentes da seguinte forma:

- Estimar o potencial tóxico do ar com teste de abortamento polínico;
- Identificar principais fontes de contaminação por meio da análise dos elementos-traço nas folhas;
- Elaborar mapas de distribuição para análise espacial com os dados do teste de abortamento polínico e do teste de bioacumulação foliar.

3. METODOLOGIA

3.1 Áreas de estudo

3.1.1 Área de estudo 1 – Indústria de grande porte no Setor de Mineração, Anchieta, Espírito Santo

3.1.1.1 Caracterização

O local de trabalho foi uma indústria de pelotização de minério de ferro e as comunidades em seu entorno, localizadas no município de Anchieta, no litoral sul do estado do Espírito Santo, Brasil, nas coordenadas geográficas 20° 46'21, 0" S e 40° 34'52, 3" W e em uma área de 405 km², com uma população estimada de 23.902 habitantes (IBGE, 2010). A direção predominante do vento é nordeste e a temperatura média anual se situa entre 23 e 24 °C (RIMA, 2011). Maiores detalhes meteorológicos sobre a região não foram disponibilizados pela empresa e não existem outras estações meteorológicas próximas o suficiente para retratar as condições locais de umidade, temperatura, direção e velocidade do vento, por exemplo.

A indústria estudada é uma empresa brasileira que fornece minério de ferro para indústria siderúrgica mundial há 35 anos. Sua produção é baseada em pelotas de minério de ferro, um tipo de aglomerado arredondado, feito a partir do processo de pelotização do minério de ferro, que é utilizado como matéria-prima em uma das etapas de fabricação do aço pelas usinas siderúrgicas (RIMA, 2011).

A empresa está presente em 81 comunidades, localizadas em 29 municípios de Minas Gerais e do Espírito Santo, que compreendem uma população de aproximadamente 841 mil pessoas (RIMA, 2011).

Em Anchieta, o entorno da indústria é formado por comunidades, sendo que três delas foram estudadas neste trabalho (Mãe-Bá, Recanto do Sol e Condados), pois são as que possuem maior número populacional. A comunidade de Mãe - Bá dista cerca de 2 km da indústria, a Recanto do Sol 3 km e a Condados 6 km. Há que se considerar ainda que a área possui baixa densidade populacional (Figura 2).

Figura 2: Mapa do objeto de estudo, usina e seu entorno. A seta indica a localização da usina, e as letras A, B e C, as comunidades (Recanto do Sol, Mãe-Bá e Condados, respectivamente). A direção predominante do vento é nordeste.

Dessas três comunidades, apenas uma possui estação de monitoramento da qualidade do ar (MP_{10}), pois a empresa faz o monitoramento em quatro estações instaladas nas comunidades de Ubu/Parati, Mãe-Bá, Meaípe e Anchieta (TCA, 2012).

A estrutura da empresa em Anchieta, Espírito Santo, é composta por duas usinas de concentração, um mineroduto de 396 km de extensão (passando por 25 municípios de Germano – MG a Anchieta/Ubu - ES), três usinas de pelotização (que transformam o minério em pelotas) e um terminal marítimo.

Com a segunda usina de concentração que começou a operar em 2008, a produção de minério concentrado passou de 16,5 milhões de toneladas/ano para 24 milhões de toneladas/ano. Em 2008, também entrou em funcionamento a terceira usina de pelotização que permite um aumento de 54% na produção de pelotas de minério de ferro da empresa. Atualmente, a empresa já está planejando a implantação da quarta usina de pelotização.

Além da influência da poluição provinda da usina, a frota de veículos do Espírito Santo consiste em 1.262.848 e 5.024 veículos em Anchieta. Desse total, 2.510 são automóveis, 1.042 são motocicletas, 395 são caminhonetes e 306 são veículos pesados (caminhão, ônibus e microônibus), as demais tipologias de veículos se apresentam em menor número (DETRAN, 2008).

3.1.1.2 Processo de produção das pelotas de minério de ferro

Tudo começa no processo de mineração. A lavra, que é a extração de minério de ferro, acontece em mina a céu aberto, no Complexo das Minas de Alegria, na unidade de Germano, em Mariana (MG) (RIMA, 2011).

Após essa etapa, a polpa de minério concentrado é transportada da unidade de Germano (MG) até a unidade de Ubu (ES) pelos minerodutos. Quando a polpa chega a Ubu, no município de Anchieta (ES), começa a etapa da pelotização. Esse processo é a aglomeração para aproveitamento de minério concentrado ultrafino, transformando-o em pelotas de tamanhos entre 8 e 16mm. Após tratamento térmico apropriado, essas pelotas adquirem características desejáveis aos processos de redução, no processo

de alto-forno ou redução direta. A esse tratamento dá-se o nome de processo de endurecimento ou processo de queima, o qual é realizado no forno de pelletização. Feito isso, estas pelotas são embarcadas em navios no Porto de Ubu, Anchieta (RIMA, 2011).

3.1.1.3 Emissões de poluentes atmosféricos

Usinas de pelletização de minério de ferro no litoral do Espírito Santo, cujas emissões são constituídas principalmente por óxidos de ferro e gases tóxicos, podem causar danos ao ecossistema e a saúde humana (Oliveira et al., 2007).

Em 2007, a empresa realizou a análise química da poeira coletada nas suas estações de monitoramento, de forma a determinar a contribuição de cada fonte existente de partícula total em suspensão (PTS). Essas contribuições podem ter diversas origens (emissões industriais, queimadas, levantamento de poeira ocasionado por tráfego de veículos e solos etc.). Na Figura 3, observa-se que a fonte que mais contribui para os valores de PTS observados na qualidade do ar da região são os solos, seguida de pelotas e fornos de pelletização (RIMA, 2011).

Figura 3: Contribuição média percentual das fontes nas PTS da indústria em Ubu, Anchieta

Além da fonte de emissões pela queima de combustíveis fósseis, como o óleo BPF (baixo ponto de fluidez – óleo combustível pesado utilizado em fornos e caldeiras) e o carvão mineral, usados no processo de

pelotização, o consumo de óleo diesel nos caminhões fora da estrada, na mineração também é uma das principais fontes de emissões da indústria. (RIMA, 2011).

Nos fornos de endurecimento das Usinas 1, 2 e 3, onde ocorre a queima de pelotas, a empresa possui nove precipitadores eletrostáticos com capacidade de retenção do material particulado (TCA, 2012).

Apesar da disponibilidade de dados da concentração de material particulado fornecidos pela rede local, a distribuição espacial da rede de monitoramento não permite avaliar o gradiente de dispersão de poluentes em uma microescala adequada ($MP_{2,5}$) e tampouco disponibiliza informações mais completas sobre seu potencial tóxico e composição elementar característica.

Segundo Leite (2007), a direção da pluma de dispersão do modelo teórico é sul/sudoeste, para o MP_{10} e SO_2 (Figura 4).

3.1.1.4 Definição da espécie e locais de amostragem

A espécie selecionada deve ser diplóide (com grãos de pólen haplóide) com grãos de pólen bem desenvolvidos sob condições climáticas normais (abortamento polínico menor que 5%), distribuição e crescimento comum em ambientes rurais ou industriais (Micieta e Murín, 1998). Além disso, a mesma deve apresentar uma densidade de ocorrência por flor de 300 leituras de grãos de pólen. Por isso, foi realizado um levantamento na área de estudo das espécies existentes nas 3 comunidades em análise e que atendiam os requisitos para a realização do teste do abortamento polínico.

A primeira espécie mais encontrada foi a *Hibiscus rosa sinensis* da família Malvaceae e nome popular Hibisco ou Rosa de Sharon (Figura 5). Porém, esta espécie foi observada uma baixa frequência de grãos de pólen por flor (Figura 6).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5: *Hibiscus rosa sinensis*

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6: Grãos de pólen da *Hibiscus rosa sinensis* em microscópio óptico (aumento de 400X)

Outra espécie encontrada nas 3 comunidades foi a *Bougainvillea spectabilis* Willd (Figura 7) da família Myctaginaceae e nome popular Buganville ou primavera. Nesta espécie, além da observação de uma baixa frequência de grãos de pólen por flor, foram encontrados pólenes com

vacúolos de aspecto oleoso, que dificultam a identificação do grão de pólen abortado (Figura 8).

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7: *Bougainvillea spectabilis* Willd

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 8: Grãos de pólen da *Bougainvillea spectabilis* Willd em microscópio óptico (aumento de 400X)

A terceira espécie foi a *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Figura 9) pertencente à família Apocynaceae e com nome popular Maria sem vergonha. Esta foi a espécie selecionada, pois, conforme mostra a Figura 10, possui alta frequência de grãos de pólen e apresenta grãos de pólen normais e abortados de fácil identificação (Figura 11). A *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. possui o crescimento rápido e floração durante o ano todo, é abundante em todo o território brasileiro.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 10: Grãos de pólen da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don em microscópio óptico (aumento de 100X)

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 11: Grãos de pólen normais e grão de pólen abortado em microscópio óptico (aumento de 400X)

Após a definição da planta, foram selecionadas 5 casas em cada comunidade com abrigo, proteção e disponibilidade do morador para cuidar da planta; e 2 pontos dentro da usina, totalizando 17 pontos de amostragem (Figura 12). Em cada ponto, foi colocada uma jardineira com solo padronizado e 3 mudas da espécie selecionada, portanto foi realizado o biomonitoramento ativo.

A latitude e a longitude em UTM (Universal Transverse Mercator) de cada ponto amostral, determinadas com o GPS, foram registradas para posterior aplicação do programa Surfer 8.0 para a elaboração dos mapas de dispersão espacial.

Foram realizadas 2 campanhas de coleta de folhas e flores com duração de 15 dias cada e 30 dias de adaptação antes e depois da coleta. A primeira campanha foi feita de 07 a 23 de agosto de 2008 e a segunda de 30 de setembro a 13 de outubro de 2008.

Figura 12: Mapa da área de estudo 1 com os 17 locais de amostragem representados pelos pontos pretos. A seta indica a área da indústria

3.1.2 Área de estudo 2 – Indústria de pequeno porte na produção de fios de látex, Jacareí, São Paulo

3.1.2.1 Caracterização

O estudo pretende avaliar uma região que compreende o entorno de uma indústria de fios de látex, no município de Jacareí, São Paulo ($23^{\circ} 18' 13''$ S, $45^{\circ} 58' 36''$ W Figura 13 - A). O município é localizado a 80 quilômetros da capital paulista tem uma área de 460 km² e possui uma população estimada de 212.744 habitantes (IBGE, 2011). A direção predominante do vento é noroeste. Para esta área de estudo também não foi possível encontrar maiores detalhes sobre os dados meteorológicos, pois a estação da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) localizada no

centro da cidade não registrou dados na data e mês que foi realizada a coleta.

A fábrica foi fundada em São Paulo em 1954 e levou seu parque industrial para Jacareí em 1959. Hoje, produz fios para o mercado brasileiro e internacional. Foi a primeira produtora de fios de látex no país, e vem desde então sistematicamente modernizando e ampliando o seu parque industrial.

Além das emissões provenientes da indústria, o local de estudo, também recebe os poluentes provenientes da frota de veículos automotores devido ao tráfego local, que consiste em 5.000 veículos por dia (Figura 13 – B) e contribui com a principal rodovia do Brasil. Esta rodovia conecta São Paulo ao Rio de Janeiro e dista cerca de 3 km da avenida local. A frota é composta da seguinte maneira: 50.561 automóveis, 2.055 caminhões, 373 caminhões tratores, 2.694 caminhonetes, 388 micro-ônibus, 11.111 motocicletas, 1.256 motonetas e 267 ônibus (IBGE, 2007).

Contudo, o local possui apenas uma estação de monitoramento de qualidade do ar da CETESB no centro da cidade o que comprova a necessidade de alternativas para auxiliar o monitoramento da qualidade do ar da região.

O projeto foi realizado com a colaboração dos alunos da Escola Estadual Professor Amância Dias Sampaio em Jacareí dentro do Programa de Pré - Iniciação Científica da USP. A escola localiza-se próxima à indústria (Figura 13 – C) e a questão problema sobre a influência da indústria na região foi trazida pelos próprios alunos.

Figura 13: Mapa da área de estudo 2. O ponto A representa a fábrica de látex, B a principal fonte de tráfego local, e C a escola. A seta representa a direção predominante do vento

3.1.2.2 Processo de produção dos fios de látex

Hoje a fábrica produz fios de látex, fios de látex revestido, fios de LYCRA revestida, fios tintos e fios especiais, para meias, tecelagem, malharia, atendendo a demanda do mercado têxtil.

A produção anual é de cerca de 400 mil toneladas, em cujo processo é utilizado amônia para preservar o látex centrifugado a fim de evitar a coagulação. Em seguida, o material passa pelo processo de vulcanização, emitindo componentes provenientes da borracha natural. Tal emissão provoca desconforto respiratório e vem sendo contestada pela população.

3.1.2.3 Definição da espécie e locais de amostragem

A espécie selecionada também foi a *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. pois, além das características já citadas no Item 3.1.1.4, é abundante em

todo o entorno da fábrica o que possibilita a utilização da espécie como biomonitor passivo, diferentemente da metodologia adotada na área de estudo 1.

Para a análise do entorno da fábrica, foi selecionado um raio de 1 km de distância no sentido da escola e abrangendo todas as plantas dessa espécie que se encontravam neste raio, totalizando 30 pontos amostrais (Figura 14). O raio de 1km foi uma escolha aleatória, mas objetivou avaliar distâncias maiores do que as já estudadas e envolver o entorno da escola. Assim, possibilitando a avaliação das possíveis interferências da fábrica na qualidade do ar também nas proximidades da escola, envolvendo a comunidade local.

A latitude e a longitude em UTM (Universal Transverse Mercator) de cada ponto amostral, determinadas com o GPS, foram registradas para posterior aplicação nos mapas de distribuição do programa Surfer 8.0.

Foram feitas duas coletas em 02 e 06 de fevereiro de 2009 de flores e folhas nos 30 pontos de amostragem.

Figura 14: Mapa da área de estudo 2 com os 30 locais de amostragem representados pelos pontos pretos

3.2 Quantificação de aborto em grãos de pólen

Os botões das flores foram coletados (área de estudo 1 e 2) e armazenados em frasco coletor contendo uma solução fixadora de etanol e ácido acético na proporção de 3:1, garantindo a conservação do material até a análise em laboratório.

A preparação das lâminas foi realizada de acordo com o protocolo de Micieta e Murín 1996. As anteras e os pólenes foram removidos com auxílio da ponta de um estilete histológico. Uma gota de corante Carmin a 45% foi colocada em cima das anteras esmagadas com baixa pressão, extraíndo-se, então, os grãos de pólen. Após a retirada dos “debris” (material macerado) os pólenes são recobertos com uma lamínula e passam a ser avaliados quanto à forma, tamanho e quantidade em microscópio óptico, com aumento de 400 X.

Para um bom processamento estatístico, o protocolo recomenda avaliar em cada ponto cerca de 3.000 grãos de pólen, o que demanda 10 lâminas, ou seja, 10 botões de flores coletados em cada ponto de interesse para a demanda de uma lâmina por botão.

Foram registradas as contagens do total de grãos de pólen normais e do número de grãos de pólen abortados. Tais dados serão transformados em percentagem fazendo-se uma relação entre o número de abortos e total de grãos contados (300 por lâmina sendo grãos normais e abortados).

3.3 Análise de Fluorescência de Raio-X por Dispersão de Energia (EDXRF)

Para a execução do teste de bioacúmulo, as folhas foram coletadas nos pontos amostrais e guardadas em sacos de polietileno com fecho e levadas para laboratório (cerca de 20 folhas por ponto para a espécie utilizada). Após a coleta, procede-se com a limpeza das folhas com água deionizada para a retirada de qualquer material estranho que esteja depositado em sua superfície. Em seguida, as folhas são levadas para uma estufa, mantida a uma temperatura de aproximadamente 37 °C pelo período necessário para sua completa desidratação (cerca de 2 dias para a espécie utilizada). Esse processo garante a preservação do material ao evitar a decomposição por microorganismos (Markert, 1995).

Uma vez desidratado, o material foi transformado em um pó fino e homogêneo, obtido por trituração da amostra seca em um almofariz de porcelana. É pesado cerca de 0,5 g do pó obtido e colocado em um cilindro com 40 mm de diâmetro, ao qual se adiciona 1 g de ácido bórico (H_3BO_3 pa). O cilindro é então, prensado por 60 s com carga equivalente a 1 t (20 mPa), para formar uma pastilha de camada dupla (ácido bórico e pó seco da folha), que foi analisada no equipamento de fluorescência de raio-X por dispersão de energia (EDXRF).

Esta técnica é de grande importância na análise multi-elementar em amostras oriundas de sistemas biológicos, pois pode determinar tanto macro elementos como Cálcio (Ca) e Potássio (K), quanto elementos traços, como Cobre (Cu) e Chumbo (Pb), ou também de elementos não-metals como Enxofre (S) (Richardson,1995).

Entre as vantagens da utilização da técnica para análise química de elementos pode-se citar: a sua adaptabilidade para automação, limite de detectabilidade dentro do exigido por muitas amostras biológicas, preparação rápida e simplificada da amostra e análise multi-elementar. Assim é uma técnica utilizada onde há necessidade de se avaliar os elementos essenciais e tóxicos de uma amostra. Outra característica de relevante importância é que esta é uma técnica não destrutiva, assim, a amostra depois de analisada pode ser arquivada para futuras análises, tornando este método ideal para análises periódicas de estudos de monitoramento de atividades industriais (Richardson et al.1992).

A análise por fluorescência de raios-X é um método quali-quantitativo baseado na medida das intensidades (número de raios-X detectados por unidade de tempo) dos raios-X característicos emitidos pelos elementos que constituem a amostra. Os raios-X emitidos por tubos de raios-X, ou raios-X ou gama por uma fonte radioativa, excitam os elementos constituintes, os quais, por sua vez, emitem linhas espectrais com energias características do elemento e cujas intensidades estão relacionadas com a concentração do elemento na amostra.

Quando um elemento de uma amostra é excitado, este tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio-X, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios-X consiste de três

fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios-X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios-X.

Desse modo ao se considerar a intensidade (número de raios-X detectados por unidade de tempo) dos raios X característicos emitidos pela amostra obtemos linhas espectrais com energias características de cada elemento, onde a intensidade está relacionada à concentração do elemento na amostra. A concentração de cada elemento é, normalmente, expressa em termos de massa desse elemento dividido pela massa total da amostra, sendo habitualmente expressa em % ou em $\mu\text{g/g}$.

Há dois tipos de análise, uma que envolve os elementos de Na a U na forma de metais e a outra onde o espectro resultante é analisado em uma segunda etapa, para obter-se o resultado quantitativo dos elementos K, Ca, Cl, Mg, Si, S, Al, Fe, P, Sr, Br, Ti, Cu, Zn, Ni, Cr, V e Co.

As análises foram feitas com o espectrômetro da marca Shimadzu Co. Este utiliza um tubo gerador de raios-X de ródio (Rh-target tube). As análises quantitativas foram feitas utilizando o software da Shimadzu, com a calibração dos parâmetros fundamentais com a utilização de amostras padronizadas da NIST 1547 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) para Peach Leaves, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações dos elementos no material de referência Peach Leaves (NIST 1547)

Elemento ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Certificado		Determinado		ER ^a	CC ^b
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão		
V	0.37	0.03	ND	ND	ND	ND
Mn	98	3	104	19	0.06	0.18
Fe	218	14	314	62	0.44	0.20
Ni	0.69	0.09	ND	ND	ND	ND
Cu	3.7	0.4	4.0	0.4	0.08	0.11
Zn	17.9	0.4	15.8	3.5	-0.12	0.22
As	0.06	0.018	ND	ND	ND	ND
Se	0.12	0.009	ND	ND	ND	ND
Rb	19.70	1.20	30.93	14.19	0.57	0.46
Sr	53	4	40	12	-0.25	0.31
Cd	0.026	0.003	ND	ND	ND	ND
Hg	0.031	0.007	ND	ND	ND	ND
Pb	0.87	0.03	0.98	0.38	0.13	0.38
Ba	124	4	112	33	-0.10	0.30
Na	24	2	21	6	-0.11	0.29
Mg*	0.432	0.008	0.443	0.023	0.03	0.05
Al	249	8	247	25	-0.01	0.10
P*	0.137	0.007	0.141	0.004	0.03	0.03
S*	0.2	**	0.2	0.0	0.04	0.03
Cl	360	19	402	33	0.12	0.08
K*	2.43	0.03	2.61	0.04	0.07	0.02
Ca*	1.56	0.02	1.70	0.04	0.09	0.02

* Valores expressos em peso em massa.

** Valor não-certificado

^a Erro relativo.^b Coeficiente de correlação; ND valor não-detectado (abaixo do nível de detecção); N= 32.

3.4 Análise Estatística

Para a área de estudo 1, a comparação dos resultados de abortamento polínico foi feita por análise de variância. É considerado um modelo com os fatores Campanha (fixo), Local (fixo) e Ponto (aleatório). Os fatores Campanha e Local obedecem a uma classificação cruzada, e Ponto é hierárquico em cada combinação de Campanha e Local. As médias dos locais foram comparadas duas a duas pelo método de Tukey.

Foi feita uma análise descritiva dos elementos químicos detectados pela EDXRF e em seguida foram analisados por meio da técnica de Análise Fatorial, adotando-se o método de Análise de Componentes Principais (Johnson e Whichern, 1992) com rotação Varimax. Esta técnica constrói novas variáveis, denominadas fatores, a partir das variáveis originais. Variáveis muito correlacionadas apareceram agrupadas em um mesmo fator. Através desta análise fatorial as fontes predominantes da poluição industrial, veicular ou re-suspensão, puderam ser identificadas em cada local estudado.

A análise estatística foi desenvolvida utilizando o SPSS versão 11.0

Foram adotados dois níveis de significância estatística, sendo p menor ou igual a 0,05 para o nível de significância de aceite e p menor ou igual a 0,1 para nível de significância marginal.

Para a área de estudo 2, foi realizado o Teste de Correlação de Pearson e a Análise de Regressão Linear para a avaliação da correlação entre a distância da fonte emissora, as concentrações dos elementos químicos e do abortamento polínico. O nível de significância das análises foi de 5%.

3.5 Análise Espacial – Mapas de distribuição

A latitude e a longitude em UTM (Universal Transverse Mercator) de cada ponto amostral das duas áreas de estudo foram plotadas no programa Surfer 8.0. A análise descritiva dos mapas foi feita a partir de mapas de distribuição obtidos pelo método de “Kriging” do programa com a frequência de abortamento polínico e a concentração dos elementos traço nas duas áreas de estudo.

O método de “Kriging” foi escolhido, pois funciona como um padrão já que faz uma boa interpolação de uma grande variedade de dados,

extrapolando tendências do mapa para áreas que não possuem dados (Golden Software Surfer, 2002). Os mapas de distribuição apresentam curvas de isovalores, chamadas isolinhas, cada isolinha representa os pontos nela situados com valores da variável em estudo, estando esses pontos em sistema de coordenadas UTM (Universal Transverse Mercator) e relacionados a cada ponto de amostragem selecionado no estudo. Desta forma, é possível avaliar as áreas de maior concentração da variável (“hot spots”) e a dispersão dos poluentes nas áreas de estudo e da taxa de abortamento polínico.

4. RESULTADOS

4.1 Área de estudo 1 – Indústria de grande porte no Setor de Mineração, Anchieta, Espírito Santo

Todos os dados de abortamento polínico estão amostrados nos Anexos 1 e 2. Os pontos de amostragem 13 e 14 das duas campanhas foram excluídos das análises estatísticas, pois obtiveram resultados de abortamento polínico muito alto em relação aos outros pontos amostrais. Ao avaliar os possíveis motivos, descobrimos que nestas casas os moradores realizam queima de lixo domiciliar. Portanto, para que estes resultados não influenciassem de uma forma negativa a nossa análise, excluimos esses dados. Porém, vale ressaltar que mesmo excluídos, não se deve descartar a hipótese de que os dados retratam uma reação de toxicidade da planta perante a exposição à queima do lixo.

Foi feita a média da porcentagem da frequência de pólen abortados por cada local de exposição conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Média da porcentagem de abortamento polínico em cada local e o acréscimo percentual relativo à menor média entre os locais

Local	Média do Abortamento (%)	Acréscimo Percentual (%)
Condados	2,090	0,0
Recanto do Sol	2,095	0,2
Mãe-Bá	2,330	11,5
Indústria	2,905	39,0

O acréscimo percentual é relativo a média de abortamento mais baixa de cada média local (Condados). Como pode ser observado na Tabela 2, as comunidades de Condados e Recanto do Sol apresentam o menor nível de

abortamento polínico, enquanto que Mãe-Bá apresenta 11,5% e a indústria 39% acima do valor mínimo.

De acordo com a análise de variância realizada:

- A porcentagem média da Campanha 2 é maior que da 1 ($p=0,042$). Isto ocorre em todos os locais, pois não há efeito de interação entre Local e Campanha ($p=0,790$);
- As médias das porcentagens nos quatro locais não são todas iguais entre si ($p=0,047$).

Portanto, para avaliar a diferença entre as médias dos locais, elas foram comparadas duas a duas pelo método de Tukey, segundo a Tabela 3:

Tabela 3 – Valor de p obtido pelo método de Tukey para comparação das médias das regiões duas a duas

Comparação	p-valor
Condados x Mãe-Bá	0,811
Condados x Recanto do Sol	>0,999
Condados x Indústria	0,068
Mãe-Bá x Recanto do Sol	0,752
Mãe – Bá x Indústria	0,233
Recanto do Sol x Indústria	0,041

Observa-se diferença significativa entre as porcentagens médias na indústria e Recanto do Sol. O valor de p obtido na comparação entre as médias da indústria e Condados tem valor marginal. Não há diferença significativa entre as médias das porcentagens de Mãe- Bá e indústria.

Quanto à distância da fonte emissora (indústria), a comunidade Mãe-Bá é a mais próxima, seguida da Recanto do Sol e Condados. A partir desta análise, é possível observar que quanto mais próximo da fonte emissora, maior a concentração de pólen abortados.

Para a análise dos resultados de acúmulo foliar, foi realizada uma análise descritiva dos elementos analisados com a média e desvio padrão em cada comunidade estudada (Tabelas 4 - 6).

Tabela 4 - Análise descritiva dos elementos-traço em folhas de Mãe-Bá

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Mn	35,25	123,44	72,46	32,64
Fe	947,99	20.411,45	4.388,88	6.088,34
Ni	1,09	1,75	1,25	0,28
Cu	3,26	5,37	4,29	0,66
Zn	18,51	45,16	30,99	7,98
Rb	16,34	55,68	34,97	13,94
Sr	67,55	197,84	129,63	49,78
Pb	1,14	3,48	1,87	0,93
Ba	39,53	418,73	246,61	140,12
Na	33,01	62,19	43,14	8,00
Mg	5.540,00	13.930,00	9.793,33	2.392,29
Al	164,43	348,87	261,91	70,03
P	2.110,00	4.600,00	3.443,33	863,63
S	2.450,00	5.990,00	4.207,78	1.098,23
Cl	6.143,47	20.566,18	10.830,35	4.948,25
K	8.800,00	33.750,00	20.010,00	7.810,09
Ca	11.720,00	29.600,00	22.241,11	6.312,24
C	89,15	96,14	92,43	2,13

Tabela 5 - Análise descritiva dos elementos-traço em folhas de Recanto do Sol

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Mn	23,57	133,71	65,40	31,73
Fe	486,58	6.659,73	1.840,71	1.913,18
Ni	1,45	1,68	1,56	0,17
Cu	3,14	4,67	3,94	0,49
Zn	18,83	38,62	23,80	6,05
Rb	18,84	47,99	29,95	9,36
Sr	55,01	193,15	104,74	37,36
Pb	1,15	1,79	1,43	0,23
Ba	50,34	228,35	123,40	74,68
Na	34,10	87,70	50,72	19,13
Mg	5.770,00	12.610,00	8.312,22	2.079,37
Al	91,93	328,30	186,44	82,36
P	2.070,00	3.280,00	2.725,56	453,30
S	2.140,00	5.030,00	3.531,11	1.033,81
Cl	2.788,40	10.643,29	6.880,26	2.772,58
K	5.500,00	14.880,00	9.433,33	3.087,62
Ca	15.920,00	28.760,00	19.883,33	4.252,07
C	93,20	95,98	94,57	0,94

Tabela 6 - Análise descritiva dos elementos-traço em folhas de Condados

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
Mn	15,19	54,89	40,42	13,29
Fe	438,72	984,75	621,31	160,59
Ni	1,06	1,71	1,28	0,37
Cu	3,43	4,83	4,19	0,53
Zn	15,71	41,11	27,29	7,64
Rb	26,52	63,92	41,50	11,17
Sr	82,39	182,58	116,45	33,44
Pb	1,09	2,36	1,66	0,45
Ba	9,21	189,90	119,89	56,55
Na	20,18	48,84	34,38	9,61
Mg	6.430,00	13.340,00	9.097,78	2.838,29
Al	184,24	639,40	333,78	126,18
P	2.260,00	5.030,00	3.360,00	830,75
S	2.390,00	5.670,00	4.170,00	1.309,24
Cl	4.100,20	10.490,72	7.644,84	2.393,32
K	10.240,00	36.050,00	18.990,00	8.315,11
Ca	13.910,00	25.360,00	19.996,67	4.367,14
C	90,85	95,73	93,25	1,63

Em seguida, foi feita a análise de fatores conforme Tabela 7. Foram obtidos 3 Fatores que explicam 72% da variabilidade do acúmulo foliar. Nestes 3 fatores, foi considerado como indicativo um índice acima de 0,7, e o elemento com maior índice foi considerado como característico ou representativo do respectivo Fator. Os elementos analisados pelo EDXRF que ficaram abaixo do nível de significância foram excluídos da análise fatorial.

Tabela 7 – Análise de Componentes Principais dos elementos-traço nas folhas detectados pelo EDXRF

Elemento	Fator1	Fator2	Fator3
Mn	0,43	0,37	0,50
Fe	0,01	0,86	0,04
Cu	0,74	0,30	-0,25
Zn	0,60	0,59	0,16
Ba	0,09	0,79	0,02
Na	-0,04	0,36	0,76
Al	0,17	0,36	-0,79
S	0,88	-0,06	0,01
Cl	0,80	0,34	0,24
K	0,80	0,01	-0,36
Ca	0,83	0,00	0,04

Os 3 Fatores estão relacionados principalmente com as seguintes fontes:

- Fator 1: produtos de combustão (alto teor de Enxofre – S);
- Fator 2: processo industrial (alto teor de Ferro - Fe);
- Fator 3: presença de aerossol marinho (alto teor de Sódio –Na).

Os 2 elementos representante dos fatores 1 e 2 (relacionados à fontes de poluição atmosférica antrópica) estão representados nos mapas de distribuição. Foram encontradas correlações entre genotoxicidade e a concentração desses elementos, Ferro (Figura 15) e Enxofre (Figura 17). A

taxa de abortamento polínico é maior nas áreas mais próximas à indústria, a área interna da indústria e Mãe-Bá (Figura 16), assim como a concentração dos elementos-traço.

Figura 15: Mapa de distribuição da concentração de Fe (µg/g) em *Catharanthus roseus*. A escala de cores indica a altitude do relevo, a preta a concentração de Fe e a marcação em preto os pontos amostrais.

Figura 16: Mapa de distribuição do abortamento polínico (%) em *Catharanthus roseus*. A escala de cores indica a altitude do relevo, a preta a frequência de abortamento polínico e os pontos pretos são os pontos amostrais.

Figura 17: Mapa de distribuição da concentração de S ($\mu\text{g/g}$) em *Catharanthus roseus*. A escala de cores indica a altitude do relevo, a preta a concentração de S e a marcação em preto, os pontos amostrais.

4.2 Área de estudo 2 – Indústria de pequeno porte na produção de Látex, Jacareí, São Paulo

Todos os dados de abortamento polínico estão amostrados no Anexo 3. A concentração dos 23 elementos foi analisada nas folhas pelo EDXRF; 12 elementos ficaram abaixo do limite de detecção (baseado na Tabela 1) e apenas 6 foram escolhidos pela relação com a indústria e o tráfego local (Al, Cu, Fe, Mn, S e Zn).

A distribuição de cada um desses 6 elementos foi analisada pelos mapas de contorno e apenas 4 apresentaram uma distribuição espacial similar (S, Zn, Al e Cu) devido ao local onde o “hot spot” foi formado.

Diferentemente do esperado, as maiores concentrações destes elementos foram encontradas na área de alto tráfego veicular e não na indústria (Figura 18 a 21), mostrando que na área de estudo a influência da indústria não é tão marcante quanto a do tráfego, de acordo com os indicadores utilizados neste estudo. Uma forte correlação também foi encontrada entre as concentrações desses 4 elementos e o dano celular, representado pelo abortamento polínico (Figura 22).

A partir de então, a área de alto tráfego veicular foi admitida como um “hot spot” comum e a área de estudo foi dividida em faixas de distância deste “hot spot” (Figura 23). As análises de Pearson e de Regressão Linear foram avaliadas agrupando os pontos de amostragem por faixas levando em consideração esta distância.

As análises de Pearson foram feitas entre a distância do “hot spot” e as concentrações elementares do Al, Cu, S e Zn e do abortamento polínico – média e valores máximos (Tabela 8). Foram encontrados resultados significantes na correlação entre a distância do “hot spot”, os valores máximos do abortamento polínico e os elementos Cu, S e Zn. Assim como suas intercorrelações. Porém para o Al, a correlação existe, mas não é tão significativa quanto para os outros elementos.

Portanto, os resultados mostram uma forte correlação entre a distância e o Cu, S, Zn e o dano celular (abortamento polínico). Essas correlações também podem ser observadas nos gráficos de regressão linear, que mostram que quanto mais próximo da área de alto tráfego, maior é a concentração de poluentes e dano celular (Figura 24 e 25).

Figura 18: Mapa de distribuição da concentração média de Al ($\mu\text{g/g}$) em *Catharanthus roseus*

Figura 19: Mapa de distribuição da concentração média de Cu ($\mu\text{g/g}$) em *Catharanthus roseus*

Figura 20: Mapa de distribuição da concentração média de S (µg/g) em *Catharanthus roseus*

Figura 21: Mapa de distribuição da concentração média de Zn (µg/g) em *Catharanthus roseus*

Figura 22: Mapa de distribuição da concentração média de aborto polínico (%) em *Catharanthus roseus*

Figura 23: Mapa da área de estudo com quartis de distância representados pelas linhas pretas. O ponto A representa a fábrica de látex, o ponto B a área de alto tráfego veicular e o ponto C, a escola. Os pontos pretos indicam os 30 pontos amostrais. A área em comum com as maiores concentrações das variáveis estudadas está indicada pelo retângulo vermelho

Tabela 8 - Correlação de Pearson entre a distância da avenida, os elementos-traço e o abortamento polínico

		Distância	Pólen (Média)	Pólen (Max)	Al	Cu	S	Zn
Distância	Correlação de Pearson (2-tailed)	1	-,360	-,970*	-,925	-,982*	-,977*	-,987*
			,640	,030	,075	0,18	0,23	0,13
Pólen (Média)	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,360	1	,547	,027	,495	,542	,503
		,640		,453	,973	,505	,458	,497
Pólen (Máx)	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,970*	,547	1	,804	,970*	,998**	,986*
		,030	,453		,196	,030	,002	,014
Al	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,925	,027	,804	1	,880	,827	,888
		,075	,973	,196		,120	,173	,132
Cu	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,982*	,495	,970*	,880	1	,985*	,997**
		,018	,505	,030	,120		,015	,003
S	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,977*	,542	,998**	,827	,985*	1	,995**
		,023	,458	,002	,173	,015		,005
Zn	Correlação de Pearson (2-tailed)	-,987*	,503	,986*	,868	,997**	,995**	1
		,013	,497	,014	,132	,003	,005	

*Correlação significativa em 0,05 (2-tailed)

**Correlação significativa em 0,01(2-tailed)

Figura 24: Representação gráfica da variação (média+/- erro padrão) do Al (B), Cu (C), S (D) e Zn (E) em função da distância da área de alto tráfego veicular. O gráfico A representa os valores máximos da taxa de abortamento polínico em função da distância do mesmo ponto

Figura 25: Regressão Linear entre a distância da área de alto tráfego veicular e a concentração dos elementos Al (A), Cu (B), S (C), Zn (D) nas folhas

5. DISCUSSÃO

Na área de estudo 1, os mapas de contorno mostram que há um gradiente espacial de toxicidade de Recanto do Sol e Condados, aumentando de Mãe-Bá para a Indústria. Avaliando individualmente os elementos característicos obtidos nos resultados, o ferro (Fe) funcionou como um marcador da fonte fixa, representada pela indústria, e o enxofre (S) da fonte móvel, representada pelo tráfego veicular. Além dos elementos característicos obtidos em cada Fator, no Fator 1, também foram encontradas altas concentrações de Ca, Cl, Cu e K, e no Fator 2 de Ba. De acordo com Schauer et. al (2006), entre os elementos mais abundantes emitidos em MP₁₀ em túneis estão o Ca e S. Ressalta-se que o Ca é um componente de alguns óleos lubrificantes, emitidos pelos veículos automotores; e o S é emitido principalmente por emissões de combustíveis fósseis, óleo de motor e aditivos, níveis de S são altos em óleo diesel. Conforme Item 4.1, houve queima de lixo domiciliar em 2 pontos de amostragem e o K é emitido pela queima de madeira e biomassa. Segundo Schauer et. al (2006), Ba é um dos elementos encontrados por desgastes de freios de veículos. Portanto, o Fator 1 está relacionado com emissões veiculares e queima de biomassa, e o Fator 2 com emissões industriais e veiculares, em uma menor escala.

Vale ressaltar que altos níveis de S também não foram encontrados próximo à indústria, pois a mesma não utiliza óleo diesel como combustível. Durante seus anos de operação, a empresa fez a substituição do seu combustível por gás natural para cumprimento das exigências ambientais no processo de licenciamento.

Conforme é possível observar na Figura 15, a distribuição heterogênea obtida para o Fe coincide com a do aborto polínico (Figura 16),

sugerindo uma associação entre acúmulo foliar e dano celular na planta. Além disso, também acompanha a mesma direção Sul/Sudoeste apresentada na pluma de dispersão do modelo teórico realizado por Leite (2007) (Figura 4).

A associação entre elemento-traço e dano celular também pode ser observada para o S (Figura 17) na região de Mãe-Bá, pois houve um aumento de aborto de grãos de pólen que coincide com a distribuição do S, dado relacionado ao tráfego da avenida próxima a esta comunidade. O teste de grão de pólen também foi capaz de detectar a queima de lixo que ocorria em alguns dos domicílios onde as plantas estavam. Tanto a relação com o tráfego veicular quanto à queima de lixo complementam o modelo teórico da pluma de dispersão realizado em estudo anterior.

A partir disso, o teste de abortamento polínico foi capaz de identificar os poluentes atmosféricos nas folhas em uma micro e mesoescala, dados semelhantes foram encontrados por Carneiro et al.(2011), que afirmam que a utilização de métodos simples e alternativos como índices de aborto polínico e bioacúmulo são apropriados para caracterização de gradientes da qualidade do ar.

Estudos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) com bioensaios vegetais corroboram com os dados do presente trabalho como no do Batalha et al. (1999), ao afirmar que resultados utilizando bioindicadores vegetais (micronúcleo em *Tradescantia*) apóiam o conceito de que centros urbanos são cronicamente expostos à genotoxigênicos ambientais; em 2000 Guimarães e colaboradores confirma que o aumento da frequência de micronúcleos encontrados em espécie vegetal deve-se pela alta concentração de poluentes atmosféricos; Ferreira et al., 2000 encontraram correlações positivas entre as emissões de incinerador de lixo localizado em área urbana e eventos mutagênicos medidos pelo teste de pêlo estaminal em *Tradescantia*; em 2007 André afirma que testes de micronúcleo, pêlo estaminal, mutação em grão de pólen e bioacúmulo foliar

em espécies de *Tradescantia* são capazes de detectar efeitos tóxicos agudos atribuíveis a diferentes gradientes de exposição, segundo Fuga et al. (2008), análises exploratórias revelaram que a acumulação de elementos tóxicos em líquens pode ser utilizada para a determinação do risco de mortalidade por doença cardiopulmonar devido à exposição prolongada em níveis ambientais de poluição atmosférica; também foram encontradas associações significantes por Mariani et al. (2009) entre a frequência de micronúcleos em espécie vegetal e a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares e câncer. Também em 2009, Martins mostra que medidas de acúmulo de elementos traço em cascas de árvore, associadas a métodos geoestatísticos, podem auxiliar a determinação das zonas de maior influência da poluição veicular no cenário urbano.

A diferença entre as referências citadas e a proposta do presente estudo, foi a utilização de um teste mais simples que o MCN, que é o aborto do grão de pólen, além de espécies locais, a fim de adaptar cada vez mais os bioensaios às regiões desprovidas de estações de monitoramento.

Os resultados da área de estudo 1 mostram uma diferença significativa entre a indústria e Recanto do Sol. O valor de p obtido na comparação entre as médias da indústria e Condado tem valor marginal e não há diferença significativa entre as médias das porcentagens de Mãe-Bá e a indústria. Este perfil de resposta também foi encontrado por Micieta e Murin 2007, que entre as espécies testadas, algumas não apresentaram diferença significativa entre os grupos expostos e o controle, mesmo aquelas expostas aos níveis mais elevados de radioatividade. Isto pode ser explicado por uma possível resposta adaptativa por exposições a longo prazo (Oudalova et al., 2005).

Em um curto espaço de tempo, o uso de espécies locais foi capaz de fornecer informações relevantes sobre a atmosfera estudada que complementam o modelo teórico de dispersão da pluma realizado na Universidade Federal do Espírito Santo. Modelos teóricos contam apenas

com informações fornecidas de fontes fixas, mas não com fontes difusas como tráfego veicular ou queima de lixo domiciliar.

Na área de estudo 2, a ideia principal era monitorar a poluição atmosférica causada pela fábrica e sua influência no seu entorno (inclusive a escola), principalmente por causa do desconforto respiratório abordado pela população local, inclusive os alunos de Pré - Iniciação Científica. A partir da análise de Regressão Linear, foi possível observar que áreas no entorno de fontes emissoras tem maior concentração de elementos tóxicos, assim como dano celular, o que indica riscos à saúde da população local (Figura 24). Entretanto, um resultado inesperado foi que o abortamento polínico e a concentração de elementos-traço indicaram que o tráfego local é muito mais problemático do que as emissões industriais para a população local (Figuras 18 a 22), deixando a fábrica como uma fonte emissora em segundo plano. Cerca de 1 km de distância é suficiente para a dispersão dos poluentes, neste caso (distância entre a avenida e a escola). O que comprova que os indicadores utilizados neste estudo (teste de abortamento polínico e acúmulo foliar) não foram capazes de detectar os poluentes emitidos pela indústria, mas pelo tráfego veicular.

Entre os elementos-traço representativos encontrados pelos “hot spots” temos o Al, Cu, S e Zn. Além do S que já foi discutido acima, os outros elementos também estão relacionados a emissões veiculares, pois desgastes dos freios de veículos contém quantias significantes de Zn e Cu e Al é um elemento que está associado à ressuspensão de material particulado (Schauer et. al, 2006).

Estes resultados mostram que o risco de exposição é inversamente proporcional a distância da fonte principal, no caso a avenida de alto tráfego (Figura 23).

Esta informação é importante em cenários urbanos, porque as pessoas podem estar expostas a altos níveis de poluição atmosférica morando próximo a ruas ou avenidas de alto tráfego. É importante saber a

distribuição espacial dos poluentes atmosféricos com a maior precisão possível quando determina risco de exposição (Carneiro et al., 2011).

Testes com abortamento polínico geralmente são realizados em escalas menores de distância (Carneiro et al., 2011; Micieta and Murín, 2007; Misík et al., 2007), nossos resultados mostram a influência das fontes emissoras em uma distância maior que 1 km (caso Jacareí) e maior que 6 km (caso Anchieta). Nas duas áreas de estudo, que tem apenas uma ou duas estações de monitoramento, sistemas convencionais de monitoramento da qualidade do ar são incapazes de monitorar a variação espacial da exposição da população. Quando medidas diretas são indisponíveis, é possível promover uma resolução espacial melhor da exposição à poluição atmosférica utilizando biomonitoramento.

O teste de abortamento polínico tem sido estudado desde 1987, buscando estabelecer bioindicadores padrões para a genotoxicidade em plantas nativas. Segundo Mulcahy (1981), bioensaios com grãos de pólen são sensíveis, pois estão condicionados ao estado haplóide, quando todas as mutações letais que estão afetando o desenvolvimento do pólen são imediatamente evidentes. Grãos de pólen apresentam mudanças morfológicas às emissões atmosféricas, e proporcionam um grande número de fenótipos que podem ser observados em microscópio.

Durante anos, bioensaios com grãos de pólen foram testados em várias espécies locais da Eslováquia para a seleção daquelas mais adequadas como bioindicadoras. Procedimentos metodológicos padrões foram criados em 1996. Desde então, estudos têm provado que o teste de abortamento polínico é um marcador simples e eficiente para genotoxicidade que pode ser empregado tanto para biomonitoramento passivo (caso Jacareí) quanto no ativo (caso Anchieta) (Carneiro et al., 2011). O impacto da poluição atmosférica foi visível em espécies de pinheiro como *P. sylvestris*, *P. nigra* e *P. mugo*, portanto tais espécies foram classificadas como bioindicadoras (Micieta e Murin, 1998). Algumas espécies também

responderam com um aumento de 16 vezes da taxa de abortamento polínico quando expostas a lugares com maior radioatividade (Micieta e Murin, 2007). Testes com aborto de pólen também mostram uma vantagem em determinar a presença de componentes mutagênicos com potenciais riscos carcinogênicos a saúde humana (Micieta and Murín, 2007; Misík et al., 2007), como pode ser observado também nos pontos de amostragem com queima de lixo domiciliar na área de estudo 1.

Carneiro et al., 2011, que comparou diferentes técnicas de monitoramento da qualidade do ar, afirma que o dentre as técnicas abordadas, o abortamento de pólen é o método mais barato e pode ser implementado em áreas desprovidas de suporte de laboratórios de análise sofisticados. Os resultados obtidos pelo abortamento polínico foram praticamente idênticos aos de tubos passivos e EDXRF em cascas de árvores.

As análises químicas das folhas de *C. roseus* da área 2 foram possíveis de identificar a acumulação de elementos relacionados ao tráfego, como o enxofre, zinco, cobre e alumínio. Essas análises também demonstraram a possibilidade de usar o biomonitoramento passivo utilizando folhas de uma planta altamente distribuída em áreas urbanas.

Nossos resultados ilustram o uso de uma metodologia que caracteriza gradientes de concentração, que é o principal objetivo do estudo, e além disso, ainda foi capaz de identificar fontes de poluição atmosférica que não faziam parte do foco do trabalho (queima de lixo domiciliar – área 1 e tráfego veicular – área 2). A flora local foi utilizada na tentativa de indicar espécies padrão como bioindicadoras, como já foi feito em estudos anteriores, e de adaptar a técnica às áreas. Neste estudo, foi possível utilizar a mesma espécie em áreas com condições ambientais muito diferentes, com técnicas de exposição diferentes (biomonitoramento ativo e passivo), mas mesmo assim a *C. roseus* provou ser sensível o suficiente, apesar de ser uma espécie adaptada à ambientes poluídos. Assim, foi possível mostrar o

quanto o próprio meio tem ferramentas valiosas que podem e devem ser aproveitadas para melhorar a qualidade de vida da própria região.

Biomonitoramento tem sido estudado desde 1960 e pode ser uma ferramenta a ser usada pelas autoridades para desenhar programas de monitoramento ambiental, com o monitoramento de áreas de “hot spot” (Ares et al., 2011). Isto posto, as medidas de biomonitoramento poderão orientar a política de ocupação do solo por assentamentos urbanos na perspectiva futura. Mais ainda, os modelos de dispersão empregados quando do licenciamento ambiental de grandes empreendimentos raramente passam por validação por meio de medidas de campo. O biomonitoramento representa uma alternativa de baixo custo para a comprovação empírica dos modelos teóricos de dispersão da pluma.

Neste trabalho, foi possível avaliar o biomonitoramento em duas áreas industriais: uma com um grande empreendimento de potencial econômico importante para nosso país através da validação da pluma de dispersão dos poluentes; outra com um pequeno empreendimento de potencial econômico limitado, porém com o potencial educacional muito grande através da validação da técnica de biomonitoramento com coautoria de alunos de Pré-Iniciação Científica em artigo submetido à revista *Science of the Total Environment* (Anexos 4 e 5). Isso prova a flexibilidade do método e que é possível aplicá-lo em áreas providas apenas de interesse pela ciência.

Portanto, o teste de abortamento polínico é sensível e reflete deleções em qualquer parte do genoma. Nossos resultados reforçam que o uso de metodologias alternativas e simples como testes de abortamento polínico e bioacumulação em folhas são apropriados para caracterizar gradientes de concentração. A combinação de técnicas de biomonitoramento com geoprocessamento podem ser utilizadas para monitoramento ambiental em áreas com tecnologia limitada. Segundo Anenberg et al. (2010), o biomonitoramento utilizando um organismo sensível pode ser uma importante ferramenta para monitoramento da qualidade do ar em regiões que não contém estações de monitoramento ambiental.

5.1 Limitações

A coleta sistemática de dados relativos a esses efeitos permite a criação de um inventário de respostas à poluição, o que representa um sistema de informação no controle da qualidade do ar, adicionalmente aos inventários de emissões e de concentrações ambientais. O emprego de bioindicadores, portanto, não pretende e não consegue substituir medições de concentrações ambientais de poluentes através de métodos físico-químicos, mas fornece informações adicionais referentes a efeitos sobre organismos vivos (Klumpp et al., 2001).

Nossos resultados descrevem uma situação de duas áreas específicas e não podem ser considerados representativos para outros ambientes porque as concentrações de poluentes também variam com as condições meteorológicas.

Ressalta-se que fatores como a direção e velocidade do vento, inversão térmica e precipitação podem contribuir para o transporte, dispersão e deposição dos poluentes atmosféricos. Portanto, a falta de dados meteorológicos das áreas de estudo foi considerada uma limitação para uma avaliação mais aprofundada dos resultados obtidos.

Em campo, destaca-se a dificuldade de encontrar pontos para uma maior amostragem experimental. Na área 1, a dificuldade foi de encontrar casas que se responsabilizassem a cuidar das jardineiras, já na área 2, foi a falta de plantas em todos os lugares que gostaríamos de amostrar.

Quanto à escolha da planta, uma limitação encontrada, mas que não inviabilizou o estudo, foi que a *C. roseus* já é uma planta adaptada a lugares poluídos, o que pode ter influenciado os resultados.

O método de “Kriging” do Programa Surfer, apresenta uma limitação nas suas interpolações de dados, pois quando na falta de dados, o programa faz a análise através de extrapolações. Por isso, uma maior amostragem experimental traria uma maior certeza sobre nossos dados.

6. CONCLUSÃO

O teste de aborto de grão de pólen associado ao acúmulo de elementos-traço foi capaz de identificar a toxicidade das atmosferas estudadas, que estão relacionadas com a proximidade às fontes (indústrias e tráfego veicular).

Os métodos geoestatísticos foram capazes de complementar as técnicas de biomonitoramento aplicadas para prevenir à exposição da população local e possível adensamento.

Bioensaios vegetais podem complementar os sistemas de monitoramento da qualidade do ar convencionais e modelos teóricos. Representam uma metodologia simples e econômica que pode ser utilizada como uma ferramenta para a educação e sensibilização da população.

7. ANEXOS

Anexo 1 – Lâminas de grãos de pólen da Campanha 1 na área de estudo 1

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-01	1	298	2	300	0,67%
PA-01	2	292	8	300	2,67%
PA-01	3	295	5	300	1,67%
PA-01	4	274	26	300	8,67%
PA-01	5	292	9	301	2,99%
PA-01	6	293	12	305	3,93%
PA-01	7	297	3	300	1,00%
PA-01	8	289	11	300	3,67%
PA-01	9	292	8	300	2,67%
PA-01	10	296	4	300	1,33%
PA-01	11	282	18	300	6,00%
PA-01	12	295	5	300	1,67%
PA-01	13	293	7	300	2,33%
PA-01	14	292	8	300	2,67%
PA-02	1	290	10	300	3,33%
PA-02	2	297	3	300	1,00%
PA-02	3	300	0	300	0,00%
PA-02	4	297	3	300	1,00%
PA-02	5	289	13	302	4,30%
PA-02	6	294	6	300	2,00%
PA-02	7	295	5	300	1,67%
PA-02	8	297	3	300	1,00%
PA-02	9	295	5	300	1,67%
PA-02	10	294	6	300	2,00%
PA-02	11	296	4	300	1,33%
PA-02	12	300	2	302	0,66%
PA-02	13	296	4	300	1,33%
PA-02	14	295	5	300	1,67%
PA-02	15	299	1	300	0,33%
PA-02	16	298	2	300	0,67%
PA-02	17	296	4	300	1,33%
PA-02	18	296	4	300	1,33%
PA-02	19	299	1	300	0,33%
PA-02	20	288	12	300	4,00%
PA-02	21	300	0	300	0,00%
PA-02	22	295	5	300	1,67%
PA-03	1	295	5	300	1,67%
PA-03	2	295	5	300	1,67%
PA-03	3	295	5	300	1,67%
PA-03	4	293	7	300	2,33%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-03	5	293	7	300	2,33%
PA-03	6	284	16	300	5,33%
PA-03	7	298	2	300	0,67%
PA-03	8	288	12	300	4,00%
PA-03	9	293	7	300	2,33%
PA-03	10	277	23	300	7,67%
PA-03	11	293	7	300	2,33%
PA-03	12	299	1	300	0,33%
PA-03	13	294	6	300	2,00%
PA-03	14	298	2	300	0,67%
PA-03	15	292	8	300	2,67%
PA-03	16	297	3	300	1,00%
PA-03	17	291	9	300	3,00%
PA-03	18	291	9	300	3,00%
PA-03	19	298	2	300	0,67%
PA-03	20	293	7	300	2,33%
PA-03	21	298	2	300	0,67%
PA-03	22	297	3	300	1,00%
PA-03	23	282	18	300	6,00%
PA-03	24	293	7	300	2,33%
PA-03	25	290	10	300	3,33%
PA-04	1	287	13	300	4,33%
PA-04	2	293	7	300	2,33%
PA-04	3	292	8	300	2,67%
PA-04	4	293	7	300	2,33%
PA-04	5	299	1	300	0,33%
PA-04	6	297	3	300	1,00%
PA-04	7	280	20	300	6,67%
PA-04	8	286	14	300	4,67%
PA-04	9	296	4	300	1,33%
PA-04	10	295	5	300	1,67%
PA-05	1	296	4	300	1,33%
PA-05	2	298	2	300	0,67%
PA-05	3	293	7	300	2,33%
PA-05	4	298	2	300	0,67%
PA-05	5	293	7	300	2,33%
PA-05	6	297	3	300	1,00%
PA-05	7	298	2	300	0,67%
PA-05	8	295	5	300	1,67%
PA-05	9	284	16	300	5,33%
PA-05	10	298	2	300	0,67%
PA-05	11	293	7	300	2,33%
PA-05	12	297	3	300	1,00%
PA-05	13	297	3	300	1,00%
PA-05	14	296	4	300	1,33%
PA-05	15	298	2	300	0,67%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-06	1	289	11	300	3,67%
PA-06	2	283	17	300	5,67%
PA-06	3	290	10	300	3,33%
PA-06	4	288	12	300	4,00%
PA-06	5	295	5	300	1,67%
PA-06	6	294	6	300	2,00%
PA-06	7	294	6	300	2,00%
PA-06	8	292	8	300	2,67%
PA-06	9	296	4	300	1,33%
PA-06	10	297	3	300	1,00%
PA-06	11	295	5	300	1,67%
PA-06	12	297	3	300	1,00%
PA-06	13	298	2	300	0,67%
PA-06	14	294	6	300	2,00%
PA-06	15	300	0	300	0,00%
PA-07	1	289	11	300	3,67%
PA-07	2	294	6	300	2,00%
PA-07	3	300	3	303	0,99%
PA-07	4	293	7	300	2,33%
PA-07	5	298	2	300	0,67%
PA-07	6	295	5	300	1,67%
PA-07	7	264	36	300	12,00%
PA-07	8	296	4	300	1,33%
PA-07	9	293	7	300	2,33%
PA-07	10	294	6	300	2,00%
PA-07	11	294	6	300	2,00%
PA-07	12	293	7	300	2,33%
PA-07	13	293	7	300	2,33%
PA-07	14	284	16	300	5,33%
PA-07	15	294	6	300	2,00%
PA-09	1	295	5	300	1,67%
PA-09	2	298	2	300	0,67%
PA-09	3	296	4	300	1,33%
PA-09	4	292	8	300	2,67%
PA-09	5	293	7	300	2,33%
PA-09	6	294	6	300	2,00%
PA-09	7	297	3	300	1,00%
PA-09	8	294	6	300	2,00%
PA-09	9	296	4	300	1,33%
PA-09	10	297	3	300	1,00%
PA-09	11	295	5	300	1,67%
PA-09	12	299	1	300	0,33%
PA-09	13	293	7	300	2,33%
PA-09	14	296	4	300	1,33%
PA-09	15	297	3	300	1,00%
PA-10	1	299	1	300	0,33%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-10	2	294	6	300	2,00%
PA-10	3	296	4	300	1,33%
PA-10	4	299	1	300	0,33%
PA-10	5	297	3	300	1,00%
PA-10	6	300	0	300	0,00%
PA-10	7	298	2	300	0,67%
PA-10	8	295	5	300	1,67%
PA-10	9	293	7	300	2,33%
PA-10	10	296	4	300	1,33%
PA-10	11	292	8	300	2,67%
PA-10	12	297	3	300	1,00%
PA-10	13	296	4	300	1,33%
PA-10	14	296	4	300	1,33%
PA-10	15	296	4	300	1,33%
PA-11	1	292	8	300	2,67%
PA-11	2	290	10	300	3,33%
PA-11	3	291	9	300	3,00%
PA-11	4	286	14	300	4,67%
PA-11	5	298	2	300	0,67%
PA-11	6	292	8	300	2,67%
PA-11	7	290	10	300	3,33%
PA-11	8	295	5	300	1,67%
PA-11	9	294	6	300	2,00%
PA-11	10	290	10	300	3,33%
PA-11	11	295	5	300	1,67%
PA-11	12	296	4	300	1,33%
PA-11	13	299	1	300	0,33%
PA-11	14	290	10	300	3,33%
PA-11	15	297	3	300	1,00%
PA-12	1	292	8	300	2,67%
PA-12	2	291	9	300	3,00%
PA-12	3	299	1	300	0,33%
PA-12	4	294	6	300	2,00%
PA-12	5	289	11	300	3,67%
PA-12	6	291	9	300	3,00%
PA-12	7	295	5	300	1,67%
PA-12	8	296	4	300	1,33%
PA-12	9	297	3	300	1,00%
PA-12	10	298	2	300	0,67%
PA-12	11	295	5	300	1,67%
PA-12	12	299	1	300	0,33%
PA-12	13	295	5	300	1,67%
PA-12	14	293	7	300	2,33%
PA-12	15	299	1	300	0,33%
PA-13	1	259	41	300	13,67%
PA-13	2	189	111	300	37,00%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-13	3	248	52	300	17,33%
PA-13	4	246	54	300	18,00%
PA-13	5	296	4	300	1,33%
PA-13	6	274	26	300	8,67%
PA-13	7	275	25	300	8,33%
PA-13	8	266	34	300	11,33%
PA-13	9	296	4	300	1,33%
PA-13	10	273	27	300	9,00%
PA-13	11	266	34	300	11,33%
PA-13	12	249	51	300	17,00%
PA-13	13	293	7	300	2,33%
PA-13	14	297	3	300	1,00%
PA-13	15	296	4	300	1,33%
PA-14	1	295	5	300	1,67%
PA-14	2	292	8	300	2,67%
PA-14	3	299	1	300	0,33%
PA-14	4	294	6	300	2,00%
PA-14	5	295	5	300	1,67%
PA-14	6	297	3	300	1,00%
PA-14	7	293	7	300	2,33%
PA-14	8	292	8	300	2,67%
PA-14	9	285	15	300	5,00%
PA-14	10	299	1	300	0,33%
PA-14	11	296	4	300	1,33%
PA-16	1	293	7	300	2,33%
PA-16	2	295	5	300	1,67%
PA-16	3	294	6	300	2,00%
PA-16	4	293	7	300	2,33%
PA-16	5	294	6	300	2,00%
PA-16	6	291	9	300	3,00%
PA-16	7	293	7	300	2,33%
PA-16	8	291	9	300	3,00%
PA-16	9	298	2	300	0,67%
PA-16	10	289	11	300	3,67%
PA-16	11	298	2	300	0,67%
PA-16	12	275	25	300	8,33%
PA-16	13	291	9	300	3,00%
PA-16	14	295	5	300	1,67%
PA-16	15	295	5	300	1,67%
PA-17	1	292	9	301	2,99%
PA-17	2	262	38	300	12,67%
PA-17	3	297	3	300	1,00%
PA-17	4	298	2	300	0,67%
PA-17	5	294	6	300	2,00%
PA-17	6	295	5	300	1,67%
PA-17	7	295	5	300	1,67%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-17	8	294	6	300	2,00%
PA-17	9	294	6	300	2,00%
PA-17	10	296	4	300	1,33%
PA-17	11	296	4	300	1,33%
PA-17	12	296	4	300	1,33%
PA-17	13	295	5	300	1,67%
PA-17	14	292	8	300	2,67%
PA-17	15	296	4	300	1,33%

PA para ponto de amostragem; 0 para grãos de pólen normais;
1 para grãos de pólen abortados

Anexo 2 – Lâminas de grãos de pólen da Campanha 2 na área de estudo 1

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-01	1	292	8	300	2,67%
PA-01	2	297	3	300	1,00%
PA-01	3	297	3	300	1,00%
PA-01	4	288	12	300	4,00%
PA-01	5	286	14	300	4,67%
PA-01	6	277	23	300	7,67%
PA-01	7	293	7	300	2,33%
PA-01	8	295	5	300	1,67%
PA-01	9	271	29	300	9,67%
PA-01	10	296	4	300	1,33%
PA-01	11	292	8	300	2,67%
PA-01	12	294	6	300	2,00%
PA-01	13	299	1	300	0,33%
PA-01	14	299	1	300	0,33%
PA-01	15	292	8	300	2,67%
PA-02	1	290	10	300	3,33%
PA-02	2	296	4	300	1,33%
PA-02	3	297	3	300	1,00%
PA-02	4	290	10	300	3,33%
PA-02	5	298	2	300	0,67%
PA-02	6	290	10	300	3,33%
PA-02	7	289	11	300	3,67%
PA-02	8	295	5	300	1,67%
PA-02	9	289	11	300	3,67%
PA-02	10	297	3	300	1,00%
PA-02	11	293	7	300	2,33%
PA-02	12	296	4	300	1,33%
PA-02	13	300	0	300	0,00%
PA-02	14	300	0	300	0,00%
PA-02	15	297	3	300	1,00%
PA-04	1	288	12	300	4,00%
PA-04	2	294	6	300	2,00%
PA-04	3	270	30	300	10,00%
PA-04	4	299	1	300	0,33%
PA-04	5	296	4	300	1,33%
PA-04	6	292	8	300	2,67%
PA-04	7	294	6	300	2,00%
PA-04	8	294	6	300	2,00%
PA-04	9	287	13	300	4,33%
PA-04	10	281	19	300	6,33%
PA-04	11	290	10	300	3,33%
PA-04	12	289	11	300	3,67%
PA-04	13	274	26	300	8,67%
PA-04	14	297	3	300	1,00%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-04	15	294	6	300	2,00%
PA-05	1	295	5	300	1,67%
PA-05	2	288	12	300	4,00%
PA-05	3	298	2	300	0,67%
PA-05	4	292	8	300	2,67%
PA-05	5	299	1	300	0,33%
PA-05	6	293	7	300	2,33%
PA-05	7	295	5	300	1,67%
PA-05	8	293	7	300	2,33%
PA-05	9	298	2	300	0,67%
PA-05	10	295	5	300	1,67%
PA-05	11	296	4	300	1,33%
PA-05	12	287	13	300	4,33%
PA-05	13	300	0	300	0,00%
PA-05	14	300	0	300	0,00%
PA-05	15	297	3	300	1,00%
PA-06	1	283	17	300	5,67%
PA-06	2	294	6	300	2,00%
PA-06	3	298	2	300	0,67%
PA-06	4	293	7	300	2,33%
PA-06	5	296	4	300	1,33%
PA-06	6	290	10	300	3,33%
PA-06	7	282	18	300	6,00%
PA-06	8	297	3	300	1,00%
PA-06	9	282	18	300	6,00%
PA-06	10	298	2	300	0,67%
PA-06	11	298	2	300	0,67%
PA-06	12	287	13	300	4,33%
PA-06	13	295	5	300	1,67%
PA-06	14	300	0	300	0,00%
PA-06	15	298	2	300	0,67%
PA-07	1	298	2	300	0,67%
PA-07	2	287	13	300	4,33%
PA-07	3	297	3	300	1,00%
PA-07	4	294	6	300	2,00%
PA-07	5	296	4	300	1,33%
PA-07	6	298	2	300	0,67%
PA-07	7	288	12	300	4,00%
PA-07	8	296	4	300	1,33%
PA-07	9	297	3	300	1,00%
PA-07	10	289	11	300	3,67%
PA-07	11	295	5	300	1,67%
PA-07	12	289	11	300	3,67%
PA-07	13	298	2	300	0,67%
PA-07	14	295	5	300	1,67%
PA-07	15	292	8	300	2,67%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-08	1	296	4	300	1,33%
PA-08	2	297	3	300	1,00%
PA-08	3	296	4	300	1,33%
PA-08	4	295	5	300	1,67%
PA-08	5	297	3	300	1,00%
PA-08	6	284	17	301	5,65%
PA-08	7	291	9	300	3,00%
PA-08	8	299	1	300	0,33%
PA-08	9	295	5	300	1,67%
PA-08	10	288	12	300	4,00%
PA-08	11	296	4	300	1,33%
PA-08	12	284	16	300	5,33%
PA-08	13	299	1	300	0,33%
PA-08	14	298	2	300	0,67%
PA-08	15	295	5	300	1,67%
PA-09	1	290	10	300	3,33%
PA-09	2	281	19	300	6,33%
PA-09	3	294	6	300	2,00%
PA-09	4	294	6	300	2,00%
PA-09	5	291	9	300	3,00%
PA-09	6	298	2	300	0,67%
PA-09	7	298	2	300	0,67%
PA-09	8	294	6	300	2,00%
PA-09	9	294	6	300	2,00%
PA-09	10	296	4	300	1,33%
PA-09	11	293	7	300	2,33%
PA-09	12	292	8	300	2,67%
PA-09	13	296	4	300	1,33%
PA-09	14	291	9	300	3,00%
PA-09	15	295	5	300	1,67%
PA-10	1	294	6	300	2,00%
PA-10	2	288	12	300	4,00%
PA-10	3	294	6	300	2,00%
PA-10	4	289	11	300	3,67%
PA-10	5	289	11	300	3,67%
PA-10	6	298	2	300	0,67%
PA-10	7	292	8	300	2,67%
PA-10	8	287	13	300	4,33%
PA-10	9	293	7	300	2,33%
PA-10	10	295	5	300	1,67%
PA-10	11	293	7	300	2,33%
PA-10	12	298	2	300	0,67%
PA-10	13	290	10	300	3,33%
PA-10	14	294	6	300	2,00%
PA-10	15	296	4	300	1,33%
PA-11	1	295	5	300	1,67%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-11	2	297	3	300	1,00%
PA-11	3	297	3	300	1,00%
PA-11	4	298	2	300	0,67%
PA-11	5	297	3	300	1,00%
PA-11	6	296	4	300	1,33%
PA-11	7	294	6	300	2,00%
PA-11	8	295	5	300	1,67%
PA-11	9	280	20	300	6,67%
PA-11	10	298	2	300	0,67%
PA-11	11	296	4	300	1,33%
PA-11	12	295	5	300	1,67%
PA-11	13	297	3	300	1,00%
PA-11	14	296	4	300	1,33%
PA-11	15	295	5	300	1,67%
PA-12	1	294	6	300	2,00%
PA-12	2	296	4	300	1,33%
PA-12	3	296	4	300	1,33%
PA-12	4	291	9	300	3,00%
PA-12	5	299	1	300	0,33%
PA-12	6	294	6	300	2,00%
PA-12	7	295	5	300	1,67%
PA-12	8	287	13	300	4,33%
PA-12	9	293	7	300	2,33%
PA-12	10	296	4	300	1,33%
PA-12	11	296	4	300	1,33%
PA-12	12	292	8	300	2,67%
PA-12	13	297	3	300	1,00%
PA-12	14	290	10	300	3,33%
PA-12	15	300	0	300	0,00%
PA-13	1	292	8	300	2,67%
PA-13	2	300	0	300	0,00%
PA-13	3	297	3	300	1,00%
PA-13	4	274	26	300	8,67%
PA-13	5	254	46	300	15,33%
PA-13	6	261	39	300	13,00%
PA-13	7	238	62	300	20,67%
PA-13	8	297	3	300	1,00%
PA-13	9	277	23	300	7,67%
PA-13	10	295	5	300	1,67%
PA-13	11	294	6	300	2,00%
PA-13	12	294	6	300	2,00%
PA-13	13	169	131	300	43,67%
PA-13	14	293	7	300	2,33%
PA-13	15	294	6	300	2,00%
PA-14	1	296	4	300	1,33%
PA-14	2	257	43	300	14, 33%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-14	3	286	14	300	4,67%
PA-14	4	242	58	300	19,33%
PA-14	5	287	13	300	4,33%
PA-14	6	292	8	300	2,67%
PA-14	7	283	17	300	5,67%
PA-14	8	291	9	300	3,00%
PA-14	9	293	7	300	2,33%
PA-14	10	291	9	300	3,00%
PA-14	11	289	11	300	3,67%
PA-14	12	283	17	300	5,67%
PA-14	13	297	3	300	1,00%
PA-14	14	297	3	300	1,00%
PA-14	15	299	1	300	0,33%
PA-15	1	293	7	300	2,33%
PA-15	2	283	17	300	5,67%
PA-15	3	291	9	300	3,00%
PA-15	4	297	3	300	1,00%
PA-15	5	288	12	300	4,00%
PA-15	6	292	8	300	2,67%
PA-15	7	294	6	300	2,00%
PA-15	8	263	37	300	12,33%
PA-15	9	294	6	300	2,00%
PA-15	10	294	6	300	2,00%
PA-15	11	298	2	300	0,67%
PA-15	12	298	2	300	0,67%
PA-15	13	284	16	300	5,33%
PA-15	14	298	2	300	0,67%
PA-15	15	295	5	300	1,67%
PA-16	1	289	11	300	3,67%
PA-16	2	299	1	300	0,33%
PA-16	3	295	5	300	1,67%
PA-16	4	291	9	300	3,00%
PA-16	5	296	4	300	1,33%
PA-16	6	296	4	300	1,33%
PA-16	7	293	7	300	2,33%
PA-16	8	280	20	300	6,67%
PA-16	9	288	12	300	4,00%
PA-16	10	298	2	300	0,67%
PA-16	11	278	22	300	7,33%
PA-16	12	283	17	300	5,67%
PA-16	13	295	5	300	1,67%
PA-16	14	291	9	300	3,00%
PA-16	15	294	6	300	2,00%
PA-17	1	274	26	300	8,67%
PA-17	2	271	29	300	9,67%
PA-17	3	264	36	300	12,00%

continua

PONTO	LÂMINA	0	1	TOTAL	%
PA-17	4	293	7	300	2,33%
PA-17	5	270	30	300	10,00%
PA-17	6	299	1	300	0,33%
PA-17	7	295	5	300	1,67%
PA-17	8	298	2	300	0,67%
PA-17	9	191	109	300	36,33%
PA-17	10	299	1	300	0,33%
PA-17	11	292	8	300	2,67%
PA-17	12	296	4	300	1,33%
PA-17	13	296	4	300	1,33%
PA-17	14	299	1	300	0,33%
PA-17	15	299	1	300	0,33%

PA para ponto de amostragem; 0 para grãos de pólen normais;
1 para grãos de pólen abortados

Anexo 3 – Lâminas de grãos de pólen da área de estudo 2

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
1	1	298	2	0,67
1	2	296	4	1,33
1	3	297	3	1
1	4	295	5	1,67
1	5	296	4	1,33
1	6	296	4	1,33
1	7	292	8	2,67
1	8	293	7	2,33
1	9	296	4	1,33
1	10	298	2	0,67
2	1	296	4	1,33
2	2	298	2	0,67
2	3	297	3	1
2	4	296	4	1,33
2	5	300	0	0
2	6	272	28	9,33
2	7	299	1	0,33
2	8	298	2	0,67
2	9	299	1	0,33
2	10	290	10	3,33
3	1	291	9	3
3	2	299	1	0,33
3	3	292	8	2,67
3	4	298	2	0,67
3	5	296	4	1,33
3	6	296	4	1,33
3	7	298	2	0,67
3	8	299	1	0,33
3	9	295	5	1,67
3	10	293	7	2,33
4	1	297	3	1
4	2	297	3	1
4	3	291	9	3
4	4	293	7	2,33
4	5	290	10	3,33
4	6	299	1	0,33
4	7	297	3	1
4	8	297	3	1
4	9	295	5	1,67
4	10	295	5	1,67
5	1	295	5	1,67

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
5	2	290	10	3,33
5	3	295	5	1,67
5	4	299	1	0,33
5	5	293	7	2,33
5	6	295	5	1,67
5	7	291	9	3
5	8	297	3	1
5	9	290	10	3,33
5	10	298	2	0,67
6	1	294	6	2
6	2	295	5	1,67
6	3	295	5	1,67
6	4	297	3	1
6	5	294	6	2
6	6	296	4	1,33
6	7	298	2	0,67
6	8	285	15	5
6	9	296	4	1,33
6	10	295	5	1,67
7	1	297	3	1
7	2	296	4	1,33
7	3	295	5	1,67
7	4	294	6	2
7	5	299	1	0,33
7	6	298	2	0,67
7	7	298	2	0,67
7	8	292	8	2,67
7	9	294	6	2
7	10	290	10	3,33
8	1	293	7	2,33
8	2	297	3	1
8	3	296	4	1,33
8	4	297	3	1
8	5	295	5	1,67
8	6	292	8	2,67
8	7	293	7	2,33
8	8	299	1	0,33
8	9	298	2	0,67
8	10	298	2	0,67
9	1	296	4	1,33
9	2	299	1	0,33
9	3	63	237	79
9	4	300	0	0

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
9	5	298	2	0,67
9	6	294	6	2
9	7	298	2	0,67
9	8	10	290	96,67
9	9	0	300	100
9	10	83	217	72,33
10	1	292	8	2,67
10	2	287	13	4,33
10	3	294	6	2
10	4	294	6	2
10	5	293	7	2,33
10	6	299	1	0,33
10	7	287	13	4,33
10	8	293	7	2,33
10	9	287	13	4,33
10	10	291	9	3
11	1	292	8	2,67
11	2	283	17	5,67
11	3	294	6	2
11	4	296	4	1,33
11	5	290	10	3,33
11	6	295	5	1,67
11	7	293	7	2,33
11	8	297	3	1
11	9	298	2	0,67
11	10	294	6	2
12	1	293	7	2,33
12	2	294	6	2
12	3	294	6	2
12	4	294	6	2
12	5	287	13	4,33
12	6	296	4	1,33
12	7	298	2	0,67
12	8	295	5	1,67
12	9	298	2	0,67
12	10	296	4	1,33
13	1	293	7	2,33
13	2	296	4	1,33
13	3	294	6	2
13	4	295	5	1,67
13	5	297	3	1
13	6	295	5	1,67
13	7	298	2	0,67

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
13	8	299	1	0,33
13	9	296	4	1,33
13	10	298	2	0,67
14	1	292	8	2,67
14	2	291	9	3
14	3	289	11	3,67
14	4	286	14	4,67
14	5	292	8	2,67
14	6	285	15	5
14	7	284	16	5,33
14	8	287	13	4,33
14	9	268	32	10,67
14	10	293	7	2,33
15	1	288	12	4
15	2	298	2	0,67
15	3	296	4	1,33
15	4	295	5	1,67
15	5	295	5	1,67
15	6	299	1	0,33
15	7	294	6	2
15	8	294	6	2
15	9	292	8	2,67
15	10	297	3	1
16	1	290	10	3,33
16	2	295	5	1,67
16	3	299	1	0,33
16	4	297	3	1
16	5	292	8	2,67
16	6	293	7	2,33
16	7	299	1	0,33
16	8	295	5	1,67
16	9	292	8	2,67
16	10	294	6	2
17	1	295	5	1,67
17	2	267	33	11
17	3	295	5	1,67
17	4	274	26	8,67
17	5	296	4	1,33
17	6	279	21	7
17	7	299	1	0,33
17	8	294	6	2
17	9	296	4	1,33
17	10	261	39	13

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
18	1	290	10	3,33
18	2	296	4	1,33
18	3	296	4	1,33
18	4	281	19	6,33
18	5	295	5	1,67
18	6	292	8	2,67
18	7	284	16	5,33
18	8	234	66	22
18	9	292	8	2,67
18	10	289	11	3,67
19	1	294	6	2
19	2	284	16	5,33
19	3	290	10	3,33
19	4	293	7	2,33
19	5	288	12	4
19	6	292	8	2,67
19	7	294	6	2
19	8	243	57	19
19	9	267	33	11
19	10	294	6	2
20	1	295	5	1,67
20	2	290	10	3,33
20	3	296	4	1,33
20	4	291	9	3
20	6	289	11	3,67
20	7	295	5	1,67
20	8	288	12	4
20	9	293	7	2,33
20	10	294	6	2
21	1	294	6	2
21	2	299	1	0,33
21	3	293	7	2,33
21	4	289	11	3,67
21	5	298	2	0,67
21	6	296	4	1,33
21	7	298	2	0,67
21	8	294	6	2
21	9	283	17	5,67
21	10	284	16	5,33
22	1	295	5	1,67
22	2	298	2	0,67
22	3	292	8	2,67
22	4	294	6	2

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
22	5	291	9	3
22	6	292	8	2,67
22	7	280	20	6,67
22	8	80	220	73,33
22	9	283	17	5,67
22	10	296	4	1,33
23	1	297	3	1
23	2	295	5	1,67
23	3	300	0	0
23	4	296	4	1,33
23	5	288	12	4
23	6	298	2	0,67
23	7	296	4	1,33
23	8	294	6	2
23	9	296	4	1,33
23	10	298	2	0,67
24	1	298	2	0,67
24	2	297	3	1
24	3	292	8	2,67
24	4	295	5	1,67
24	5	290	10	3,33
24	6	291	9	3
24	7	295	5	1,67
24	8	294	6	2
24	9	297	3	1
24	10	294	6	2
25	1	295	5	1,67
25	2	294	6	2
25	3	297	3	1
25	4	298	2	0,67
25	5	296	4	1,33
25	6	299	1	0,33
25	8	296	4	1,33
25	9	297	3	1
25	10	295	5	1,67
26	1	296	4	1,33
26	2	291	9	3
26	4	291	9	3
26	5	299	1	0,33
26	6	296	4	1,33
26	7	297	3	1
26	8	294	6	2
26	9	282	18	6

continua

PA	Lâmina	Normal	Aborto	%
26	10	291	9	3
27	1	299	1	0,33
27	2	298	2	0,67
27	3	293	7	2,33
27	4	297	3	1
27	5	297	3	1
27	6	289	11	3,67
27	7	297	3	1
27	8	297	3	1
27	9	295	5	1,67
27	10	296	4	1,33
28	1	293	7	2,33
28	2	290	10	3,33
28	3	295	5	1,67
28	4	294	6	2
28	5	291	9	3
28	6	294	6	2
28	7	297	3	1
28	8	297	3	1
28	9	298	2	0,67
28	10	297	3	1
29	1	294	6	2
29	2	298	2	0,67
29	3	295	5	1,67
29	4	295	5	1,67
29	5	294	6	2
29	6	298	2	0,67
29	7	296	4	1,33
29	8	295	5	1,67
29	9	291	9	3
29	10	293	7	2,33
30	1	293	7	2,33
30	2	294	6	2
30	3	295	5	1,67
30	4	290	10	3,33
30	5	299	1	0,33
30	6	297	3	1
30	7	296	4	1,33
30	8	299	1	0,33
30	9	298	2	0,67
30	10	296	4	1,33

PA para ponto de amostragem; 0 para grãos de pólen normais;
1 para grãos de pólen abortados

Anexo 4 - Artigo submetido à revista científica

Vegetal species *Catharanthus roseus* (L.) G. Don as a bioindicator of air quality around a factory in Jacareí, SP, Brazil

Iovine, P^{a,*}; Costa, DMF^b; Dias, MRM^b; Silva, BS^b; Guimarães, ET^a; Carvalho-Oliveira, R^a; Saldiva, PHN^a

^a Experimental Air Pollution Laboratory, Department of Pathology, São Paulo University Medical School, Av Dr. Arnaldo, 455, CEP 01246-903, São Paulo, SP, Brazil - (LIM05 – HCFMUSP)

^b State School Professora Amância Dias Sampaio, R. Ary D Ávila, 200, CEP 12324-772, Jacareí, SP, Brazil

* Corresponding author. Tel./fax: + 55 11 30617254 E-mail address: priscilaiovine@usp.br (Priscila Iovine)

Abstract

Developing countries are experiencing increases in air pollution sources, making assessment of the impacts of air pollution on human health extremely difficult. Plant bioassays have been widely employed to monitor air pollution in areas devoid of conventional air pollution monitoring systems because of their simplicity, low cost and high sensitivity. The aim of this study was to determine the area of influence of a latex factory located in a densely inhabited valley in Jacareí, São Paulo, Brazil. Local flora are used as a bioindicator using abortive pollen tests and the accumulation of toxic elements in leaves is used to detect possible risks to the health of the local population. This work showed that the areas surrounding the emission sources had a higher concentration of toxic elements, leading to greater biological damage, which indicates health risks to the local population. Our results reinforce that the use of alternative and simple methods such as pollen abortion rates and bioaccumulation in leaves are appropriate for characterizing air quality gradients in areas devoid of conventional air pollution monitoring systems, even at greater scales than have been tested before. The association of this technique and geographic information system can be used for environmental screening in areas with limited technology.

Keywords: air pollution, bioassays using plants, pollen abortion assay, bioaccumulation in leaves, passive monitoring

Highlights

Local flora used as bioindicator to detect risks to the health of the population. Alternative methods are appropriate for characterizing air quality gradients. Biomonitoring can be used in areas with limited technology.

1. Introduction

Ambient urban air contains a variety of carcinogenic chemicals, including polycyclic aromatic hydrocarbons, benzene, and arsenic, which are emitted into the atmosphere as a result of the incomplete combustion of fossil fuels associated with motor vehicles and industrial activities (Misík et al., 2006).

At the end of 2006, the World Health Organization stated that air pollution is responsible for more than 2 million deaths per year worldwide. Developing countries are experiencing increases in air pollution sources, and this process has not been followed by a corresponding improvement in the structure of air pollution monitoring networks, making assessment of the impacts of air pollution on human health extremely difficult (Mariani et al.,

2009). It is estimated that the air breathed by 100 million people, especially in urban areas, does not reach the minimum standards of quality and safety (Cifuentes et al., 2005).

Plant bioassays have been widely employed to monitor air pollution (Batalha et al., 1999; Ma, 1981). Because of their simplicity, low cost and high sensitivity, plant bioassays can be easily implemented in areas devoid of conventional air pollution monitoring systems (Ferreira et al., 2000; Guimarães et al., 2000; Mariani et al., 2009; Prajapati and Tripathi, 2008; Savóia et al., 2009; Sumita et al., 2003). In addition to complementing conventional air pollution monitoring systems, plant bioassays may increase the resolution of the air pollution spatial gradient by offering the possibility of studying many plants across a limited area. Within this context, plant bioassays have been used to track the influence of industries, waste incinerators and high traffic on the environment and health (Misík et al., 2007; Savóia et al., 2009; Sumita et al., 2003).

Among these bioassays, one reliable approach is abortive pollen tests with wild plants (Murin and Micieta, 1997). These assays are highly sensitive because the target cells (microspores) are haploid and detect lethal mutations, which affect the development of pollen (Misík et al., 2006). The advantage of using natural flora for the assay is that there is a wide variety of assay material that is readily available, offering different periods for sampling (Micieta and Murin, 1996).

One approach in bioindication studies is the use of botanical materials, such as lichens, mosses, tree bark, and leaves, as bioaccumulators to trace elements (Ares et al., 2011; Fuga et al., 2008; Käffer et al., 2012). This approach allows the identification of trace elements present in the air, creating the possibility of identifying sources of air pollution (Sumita et al., 2003).

In studies of air pollution in urban areas, the pollen abortion test has been shown to be capable of detecting the effects of air pollution and showing the differences in the genotoxicity of different pollutant sources (Micieta and Murin, 2007; Misík et al., 2006). In another study, the pollen abortion test was sensitive enough to detect small changes in pollutants over a short distance (60 meters) (Carneiro et al., 2011).

To explore a scale greater than in these previous studies, the aim of this study was to determine the area of influence of a latex factory located in a densely inhabited valley in Jacarei, São Paulo, Brazil. Local flora is used as a bioindicator using abortive pollen tests, and the accumulation of toxic elements in leaves is used to detect possible risks to the health of the local population.

2. Material and Methods

2.1 Site of study

The study aims to evaluate the influence of a latex factory (Fig. 1 - A) over an area in the city of Jacarei (23° 18' 13" S, 45° 58' 36" W), São Paulo. Jacarei is located 80 km from the state capital and has an area of 460 km² and a population of approximately 212,744 inhabitants (IBGE, 2011).

The study site has an atmosphere that is influenced by a latex factory, which produces approximately 400 thousand tons of latex annually. Ammonia is used in the production process to preserve the centrifuged latex by preventing coagulation. The material then undergoes the curing process, emitting components from natural rubber. Complaints of respiratory problems have consistently been reported by the surrounding population.

In addition to the emissions from the industry, the study site also receives pollutants from a large automotive fleet due to local traffic, which comprises approximately 5,000 vehicles per day (Fig. 1 - B) and contributes to the traffic of the main road in Brazil. The main road connects São Paulo to Rio de Janeiro and is located near the local road (approximately 3 km). The study was conducted with the aid of students from the school close to the industry (Fig. 1 - C). The predominant wind direction is northwest (Fig. 1 place).

Fig. 1. Map of study site. A represents the latex factory, B represents the major source of local traffic, and C represents the school. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

2.2 Species and sites of exposure

The species *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. is a local herbaceous plant that grows up to 1 meter tall. The flowers are white to dark pink with a darker red center. This species has long been cultivated for herbal medicine and as an ornamental plant. The criteria for selection of this species were its abundance in the study area, its rapid growth and flowering throughout the year, and its high density of pollen grains.

Thirty sampling sites were chosen randomly within a 1 km radius of the industry using plants already existing in the area (passive biomonitoring). Each point was georeferenced in UTM (Universal Transverse Mercator).

2.3 Pollen grain abortion test

Approximately 15 buds were collected from each sampling site and fixed in a mixture of acetic acid and ethanol (1:3). From each sample, 3000 pollen grains were evaluated (criteria: size, form and staining ability) according to the protocol of Micieta and Murín (1996).

The buds were opened and the anthers were transferred to slides and stained with Carmine. The pollen grains were released mechanically and evaluated using a microscope under 400-fold magnification. The percentage of abortive pollen grains (Fig. 2) in 300 pollen cells was determined (Fig. 2 place).

Fig. 2. Normal pollen grains and abortive pollen grain of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don under 400-fold magnification. The arrow indicates the abortive pollen grain.

2.4 Measurement of trace elements in leaves

For the bioaccumulation test, the leaves collected were stored in plastic bags with zip-lock closure and were stored in a refrigerator until they were washed with deionized water. Afterward, the leaves were dried in an oven at 37°C for 48 hours. Contamination or the loss of deposited material was avoided.

The dried leaves were ground in a porcelain mortar to a fine powder. For homogeneity in particle sizes, all samples were sieved. To prepare the pellets, approximately 0.5 g of powder was compressed over 1 gram of boric acid (H_3BO_3) by applying 20 mPa of pressure for sixty seconds. The result of this process was a double-layer pellet (leaf powder and boric acid) with a diameter of 40 mm. This pellet was analyzed with Energy Dispersive X-Ray Fluorescence analysis (EDXRF¹). The instrument employed a low-power Rh-target tube at a voltage of 5–50 kV and a current of 1–1000 μA . The characteristic X-ray radiation emitted was detected by a Si (Li) detector. The X-ray fluorescence emission spectra were collected for 240 s on a 10 mm surface area of samples in a vacuum atmosphere. The sample intensities were converted to concentrations by obtaining the sensitivity curve of the equipment for each element of interest using a reference material with its concentrations similar to the samples (NIST1547²). The carbon, in cellulose form, was used as a mass balance, and analyses were made using software of the Shimadzu Company. The precision and accuracy of the method was verified using the reference material similar to the concentration of the samples (NIST 1547 - Table 1) (Table 1 place).

¹ EDXRF – Energy Dispersive X-Ray Fluorescence analysis using an EDX 720HS (Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan).

² NIST 1547 - NIST Standard, SRM 1547 Peach Leaves, National Institute of Standards, Gaithersburg, MD, USA.

Table 1 Precision and accuracy of elements analyzed in EDXRF.

Element ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Certified		Determined		RE ^a	CV ^b
	Means	SD	Means	SD		
V	0.37	0.03	ND	ND	ND	ND
Mn	98	3	104	19	0.06	0.18
Fe	218	14	314	62	0.44	0.20
Ni	0.69	0.09	ND	ND	ND	ND
Cu	3.7	0.4	4.0	0.4	0.08	0.11
Zn	17.9	0.4	15.8	3.5	-0.12	0.22
As	0.06	0.018	ND	ND	ND	ND
Se	0.12	0.009	ND	ND	ND	ND
Rb	19.70	1.20	30.93	14.19	0.57	0.46
Sr	53	4	40	12	-0.25	0.31
Cd	0.026	0.003	ND	ND	ND	ND
Hg	0.031	0.007	ND	ND	ND	ND
Pb	0.87	0.03	0.98	0.38	0.13	0.38
Ba	124	4	112	33	-0.10	0.30
Na	24	2	21	6	-0.11	0.29
Mg*	0.432	0.008	0.443	0.023	0.03	0.05
Al	249	8	247	25	-0.01	0.10
P*	0.137	0.007	0.141	0.004	0.03	0.03
S*	0.2	**	0.2	0.0	0.04	0.03
Cl	360	19	402	33	0.12	0.08
K*	2.43	0.03	2.61	0.04	0.07	0.02
Ca*	1.56	0.02	1.70	0.04	0.09	0.02

* Values expressing weight of mass.

** Non-certified value

^a Relative error.

^b Coefficient correlation; ND is a non-determined value; N= 32.

2.5 Data analysis

Distribution maps of the pollen abortion and element concentration analysis were drawn using the Surfer 8 program (Golden Software, 2002). In these maps, the colors and contours indicate the different concentrations of elements and pollen abortion distributed in the study site.

Pearson correlation and linear regression analyses were performed to examine the damage caused by pollutants and distance from traffic using the SPSS software. Both analyses were performed for the following variables: distance from the local road, pollen abortion and element concentrations. The level of significance for these analyses was set at 5%.

3. Results

The concentration of twenty-three elements were investigated in the leaves by EDXRF; 12 were over the limit of detection, and 6 of them were chosen for their close linked to the industry and local traffic (Al, Cu, Fe, Mn, S and Zn). The distribution of each of these elements was analyzed by contour maps, and only 4 were found to have a similar

distribution in space (S, Zn, Al and Cu) due to a hot spot in the local traffic instead of in the industry, as was expected (Fig. 3 to 6). The distribution map of pollen abortion showed a strong correlation between cell damage and pollutant concentrations (Fig. 7).

Pearson analyses were performed between the distance from the hot spot, the pollen abortion and the element concentrations of Al, Cu, Fe, Mn, S and Zn (Table 2). The results show a strong correlation between distance and Al, Cu, S, Zn and cell damage, as represented by pollen abortion. These correlations can be observed in the graphics of the linear regression analyses and shown that the greater the distance from traffic, the lower the concentration of pollutants (Fig. 8 and 9) (Fig. 3 to 7 place, Table 2 place, Fig. 8 and 9 place).

Fig. 3. Distribution map of mean Al concentrations ($\mu\text{g/g}$) in *Catharanthus roseus*. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

Fig. 4. Distribution map of mean Cu concentrations ($\mu\text{g/g}$) in *Catharanthus roseus*. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

Fig. 5. Distribution map of mean S concentrations ($\mu\text{g/g}$) in *Catharanthus roseus*. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

Fig. 6. Distribution map of mean Zn concentrations ($\mu\text{g/g}$) in *Catharanthus roseus*. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

Fig. 7. Distribution map of pollen abortion mean (%) in *Catharanthus roseus*. The arrow represents the prevailing wind in the northwest direction.

Table 2 Pearson correlations among distance from the road, elements and pollen abortion.

		Distance	Al	Cu	Fe	Mn	Zn	S	Pollen
Distance	Pearson Correlation	1	-0.98*	-0.98*	-0.258	0	-0.97*	-0.98*	-0.97*
	Sig. (2-tailed)		0.01	0.02	0.74	1.000	0.02	0.02	0.02
Al	Pearson Correlation	-0.98*	1	0.96*	0.09	-0.17	0.96*	0.94	0.92
	Sig. (2-tailed)	0.01		0.04	0.91	0.83	0.04	0.05	0.07
Cu	Pearson Correlation	-0.98*	0.96*	1	0.27	0.03	1.000**	0.98*	0.98*
	Sig. (2-tailed)	0.02	0.04		0.72	0.96	0	0.01	0.02
Fe	Pearson Correlation	-0.26	0.09	0.27	1	0.96*	0.28	0.40	0.44
	Sig. (2-tailed)	0.74	0.91	0.73		0.04	0.72	0.59	0.55
Mn	Pearson Correlation	0	-0.17	0.038	0.96*	1	0.05	0.16	0.21
	Sig. (2-tailed)	1.000	0.83	0.96	0.03		0.95	0.84	0.79
Zn	Pearson Correlation	-0.98*	0.95*	1.000**	0.28	0.05	1	0.98*	0.98*
	Sig. (2-tailed)	0.02	0.04	0	0.71	0.94		0.01	0.02
S	Pearson Correlation	-0.98*	0.943	0.98*	0.40	0.16	0.98*	1	0.99**
	Sig. (2-tailed)	0.02	0.05	0.01	0.59	0.84	0.01		0
Pollen	Pearson Correlation	-0.97*	0.92	0.98*	0.44	0.21	0.98*	0.99**	1
	Sig. (2-tailed)	0.02	0.07	0.01	0.55	0.78	0.01	0	

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Fig. 8. Mean pollen abortion rate (A) and Al (B), Cu (C), S (D), and Zn (E) content in leaves at different distances from the road.

Fig. 9. Linear regression between element concentrations of Al (A), Cu (B), S (C), Zn (D) and pollen abortion.

4. Discussion and Conclusion

The purpose of the present study was to assess the possibility of using an alternative methodology to determine the gradient influence of air pollution. The first idea was to monitor air pollution caused by the industry and its influence on the surrounding area, especially in terms of the complaints of respiratory illness reported by the population. This work showed that the areas surrounding the emission sources had a higher concentration of toxic elements, leading to greater biological damage, which indicates health risks to the local population. However, an unexpected result was that the pollen abortion and metal content of the leaves indicated that local traffic is much more problematic for the population's health than the factory emissions. A distance of more than 1 km from the main source (distance between the road and school) is sufficient for the dispersion of pollutants in this case.

Pollen abortion assays are generally tested at smaller scales (Carneiro et al., 2011; Micieta and Murín, 2007; Misík et al., 2007). Our results show the influence of emission sources at a distance of more than 1 km, and the risk of exposure is inversely proportional to distance from the main source, which is the high traffic.

This information is important in urban settings because people may be exposed to higher levels of air pollution by living close to major streets or roads with high traffic. It is important to know the spatial distribution of air pollutants as accurately as possible when

determining risk of exposure (Carneiro et al., 2011). In the case of Jacarei, which has 1 monitoring station, conventional air pollution network systems are incapable of monitoring the spatial variation of the population's exposure. When direct measurements are unavailable, it is possible to provide better spatial resolution of exposure to air pollution using biomonitoring.

Biomonitoring has been studied since 1960 and may be a tool that could be used by authorities to design environmental monitoring programs, with the re-siting of monitoring sites in target zones (Ares et al., 2011). Pollen abortion assays have been tested since 1987 in the search for a set of standard bioindicators of genotoxicity in native local flora. Standardized methodological procedures were created in 1996. Since then, studies have proved that pollen abortion is a simple and efficient marker of genotoxicity that may be employed in both passive (as in our case) and active biomonitoring (Carneiro et al., 2011). Pollen abortion assays also show an advantage in defining the presence of mutagenic compounds with potentially carcinogenic risks to human health (Micieta and Murin, 2007; Misik et al., 2007).

According to Carneiro et al., 2011, who compared three different techniques for monitoring air quality, pollen abortion is the cheapest method and can be implemented in areas without the support of sophisticated analytical laboratories. The results obtained by pollen abortion were virtually identical to those gathered with passive tubes and EDXRF in tree bark.

Chemical analysis of *C. roseus* leaves was able to identify an accumulation of elements related to traffic, such as sulfur, zinc, copper and aluminum. This analysis also demonstrated the possibility of using passive biomonitoring in an urban area by employing leaves from a widely distributed plant.

Our results describe a situation at a specific area; they cannot be considered representative of other roadside environments because pollutant concentrations also depend on meteorological conditions (Simpsons, 1994). Factors such as wind direction and speed, thermal inversion and precipitation may contribute to the transportation, dispersion and deposition of atmospheric pollutants (Dallarosa et al., 2005).

The results illustrate the use of a methodology that identifies concentration gradients and sources of air pollution, which was the main objective of the study. Some limitations, such as the number of sites of exposure and the lack of meteorological data in the region, cannot be excluded. Local flora was used to designate a standard species as a bioindicator, as in others studies. *C. roseus* proved to be sensitive enough in our case, and it is a species that adapts to polluted areas.

In summary, our results reinforce that the use of alternative and simple methods such as pollen abortion rates and bioaccumulation in leaves are appropriate for characterizing air quality gradients. In addition, pollen abortion is an efficient tool for monitoring areas devoid of conventional air pollution monitoring systems, even at greater scales than have been tested before. The association of this technique and geographic information system can be used for environmental screening in areas with limited technology.

Acknowledgements

Special thanks to Marco Antonio Garcia Martins for data analysis and writing assistance.

References

Agrawal SB, Agrawal M. Environmental pollution and plant responses. New York: Lewis Publishers; 1999.

- Ares A, Fernández JA, Aboal JR, Carballeira A. Study of the air quality in industrial areas of Santa Cruz de Tenerife (Spain) by active biomonitoring with *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2011; 74: 533-541.
- Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PHN. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat Res*. 1999; 426: 229-232.
- Carneiro MFH, Ribeiro FQ, Fernandes-Filho FN, Lobo DJA, Barbosa Jr. F, Rhoden CR, Mauad T, Saldiva PHN, Carvalho-Oliveira R. Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. *Environ Exp Bot*. 2011; 72: 272-277.
- Cifuentes, L, Krupnick, AJ, O’Ryan, R, Toman, MA. Urban air quality and human health in Latin America and the Caribbean. Working Paper. Pontificia Universidade Católica do Chile, Santiago, Chile; 2005.
- Dallarosa, JB, Mônico JG, Teixeira EC, Stefens, JL, Wiegand, F. Polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles in the metropolitan area of Porto Alegre, Brazil. *Atmospheric Environment*. 2005; 39: 1609-1625.
- Ferreira MI, Petrenko H, Lobo DJA, Rodrigues GS, Moreira A, Saldiva PHN. In Situ Monitoring of the Mutagenic Effects of the Gaseous Emissions of a Solid Waste Incinerator in Metropolitan São Paulo, Brazil, Using the *Tradescantia* Stamen-Hair Assay. *J. Air & Waste Manage. Assoc*. 2000; 50: 1852-1856.
- Fuga A, Saiki M, Marcelli MP, Saldiva PHN. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environmental Pollution*. 2008; 151: 334-340.
- Golden Software. 2002. Surfer Program, version 8.
- Guimarães ET, Domingos M, Alves ES, Caldini Jr N, Lobo DJA, Lichtenfels JFC, Saldiva PHN. Detection of genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*- micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental Experimental Botany*. 2000; 44:1-8.
- IAEA, Agency’s Laboratories, Vienna, International Atomic Energy Agency. Quantifying uncertainty in nuclear analytical measurements. Pg. 45, 2004.
- IBGE, 2011. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades: Bancos de Dados. Last access: 18/05/2012. <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>.
- Käffer MI, Lemos AT, Apel MA, Rocha JV, Martins SMA, Vargas VMF. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environmental Pollution*. 2012; 163: 24-31.
- Keane B, Collier MH, Shann JR, Rogstad SH. Metal content of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaves in relation to soil contamination and airborne particulate matter. *Sci Total Environ*. 2001; 281 (1-3): 63-78.
- Ma TH. *Tradescantia* Micronucleus Bioassay and Pollen Tube Chromatid Aberration Test for in Situ Monitoring and Mutagen Screening. *Environmental Health Perspectives*. 1981; 37: 85-90.
- Mariani RL, Jorge MPM, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PHN. 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*. 2009; 157: 1767-1770.

Micieta K, Murín G. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment. *Environmental and Experimental Botany*. 1996; 36: 21- 27.

Micieta, K, Murín, G. *Ekológia* (Bratislava). 1997; 16: 2-105.

Micieta K, Murín G. Wild plant species in bio-indication of radioactive-contaminated sites around Jaslovske´ Bohunice nuclear power plant in the Slovak Republic. *Journal of Environmental Radioactivity*. 2007; 93: 26-37.

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. *Mutation Research*. 2006; 605: 1–6.

Misík, M, Micieta K, Solenská M, Misíková K, Pisarcíková H, Knasmüller S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: Demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city. *Environmental Pollution*. 2007; 145: 459-466.

Prajapati SK, Tripathi, BD. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Environment International*. 2008; 34: 1092-1096.

Richardson, D.H.S.; Shoreb, M.; Hartreeb, R.; Richardson, R.M. The use of X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring. *The Science of the Total Environment*. 1995; 176: 97-105.

Savóia, E JL, Domingos M, Guimarães ET, Brumati F, Saldiva PHN. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009; 72: 255-260.

Simpsons RW. A statistical analysis of particulate datasets in Brisbane, Australia. *Atmospheric Environment*. 1994; 26:99-105.

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimaraes ET, Lichtenfels AJFC, Lobo DJA, Saldiva PHN. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* Boom in the characterization of Air Pollution by accumulation of Trace Elements. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 2003; 53: 574-579.

Suyama F, Guimaraes ET, Lobo DJA, Rodrigues GS, Domingos M, Alves ES, Carvalho HA, Saldiva PHN. 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*. 2002; 35: 127-129.

Anexo 5 - Revisões sugeridas pela revista científica

Reviewer #1: Reviewer's Comments

"Vegetal species *Catharanthus roseus* (L.) G. Don as a bioindicator of air quality around a factory in Jacareí, SP, Brazil" by
P. Iovine, D.M.F. Costa, M.R.M. Dias, B.S. Silva, E.T. Guimarães, R. Carvalho-Oliveira, and P.H.N. Saldiva
Submitted to Science of the Total Environment Manuscript No.: STOTEN-D-12-02536

This paper contains valuable information and after revision, it should be published.

Page 1, lines 20-22: Although arsenic can be volatilized by combustion of fossil fuels, arsenic itself is not the result of incomplete combustion.

Page 2, lines 51 and 53: Change "is" to "was" in both lines.

Page 4, lines 1-4: "Thirty sampling sites were chosen randomly within a 1 km radius of the industry using plants already existing in the area (passive biomonitoring). Each point was georeferenced in UTM (Universal Transverse Mercator)." I believe that it is important that this paper contain a figure indicating the location of the 30 sampling sites. Figures 3-7 show many distribution contour lines for each of the species superimposed upon a photograph of the area; the distribution patterns are different, even for species whose concentrations are correlated. Are the distribution patterns really as shown or are the contours at least partially artifacts of interpolation by the software? Information about the distribution of the sampling sites will help enable readers to make that determination. Is there a statistic that can be computed that gives an indication of how accurate the distribution contours are? If so, how does that statistic compare for the different species and in particular, for the species whose concentrations are correlated? I believe the authors have demonstrated the ability of using existing flora as biomonitors, but my question is how reliable are the contour maps generated? Are they qualitatively correct or quantitatively correct?

Page 4, line 47: Change "H3Bo3 fa" to "H3BO3".

Page 4, line 50: Do you mean "mPa" or "MPa"?

Page 6, line 4: What is meant by "hot spot in the local traffic"? Do they mean this particular busy street? If so, the entire street or only a portion of it?

Figures 8 and 9: What are the sizes of the error bars associated with these figures?

Reviewer #2: Comments:

I found this a very interesting and well-written article. I do have some concerns, however that you may wish to address. The title of the article is a bit misleading in my opinion. The major focus of the manuscript is using the pollen abortion test with a native species as an indicator of potential pollution effects. I believe the paper needs to be "geared" more as a technique paper than at present. Also, I think the Methods section needs more detail (see below). I have made several suggestions below that you may wish to consider in revising the manuscript.

Title: See above.

Page 3, beginning with line 13. I think a bit more detailed description of the study site would be useful; when was the factory built, relative size, output, etc.?

Page 4, lines 1-5. This section needs to be expanded. Where in proximity to the factory were the plots located? What is their relative distance and direction from the factory. This

information would be added to Figure 1. You state that the plots were within 1km of the factory, but this is not reflected in the figures and some of your discussion. It appears the distance to the sites extended beyond 1km. Some more detail regarding the sites is warranted. Were they of a specific size, etc.? How were the plants selected? Where a specific number of plants selected per site?

Page 4, line 10. Were the buds collected from the same plant or different plants? Were they collected at @ the same location on each plant or at random?

Page 4, line 17. Some more details regarding the technique would be interesting to the readers.

Page 4, line 20-27. More details needed. How many samples per location?

Page 4, line 29. This is interesting, but can it be analyzed statistically?

Page 5, lines 1-20. What elements are being analyzed? You need to move them from the Results section. Also, you mention that ammonia is what is being used to extract the latex. It would be interesting to measure it, or at least N in the leaves.

General question. Did you observe the plants for incidence of ammonia injury?

General question. Based on your data can one distinguish damage as a result of the factory compared with local traffic? You need to know the distance from the factory.

Page 7, line 29. This statement is wrong. Biomonitoring studies around factories have been conducted since the late 1800s in Europe.

Is Table 1 needed.

Combine several of the Figures. It may reduce the #.

Editor's comments:

Your paper has received favorable but critical reviews. I have not made a decision about it yet because you will be revising it. I hope you can address the reviewers' concerns and make it acceptable.

Please note that Reviewer 1 provided comments on a marked up file which you can download from the EES website.

For further assistance, please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

André PA. *Câmara de Topo Aberto, CTA: construção e uso para observação de potencial tóxico da poluição atmosférica urbana com bioensaios em plantas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2007.

Allen, R.W.; Davies, H.; Cohen, M.A.; Mallach, G.; Kaufman, J.D.; Adar, S.D. The spatial relationship between traffic-generated air pollution and noise in 2 U.S. cities. *Environ. Res.* 2009; 109: 334–342.

Anenberg SC, Horowitz LW, Tong DQ, and West JJ. An Estimate of the Global Burden of Anthropogenic Ozone and Fine Particulate Matter on Premature Human Mortality Using Atmospheric Modeling. *Environmental Health Perspectives.* 2010; 118 (9): 1189-1195.

Ares A, Fernández JA, Aboal JR, Carballeira A. Study of the air quality in industrial areas of Santa Cruz de Tenerife (Spain) by active biomonitoring with *Pseudoscleropodium purum*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2011; 74: 533-541.

Arndt U, Schweizer B. The use of bioindicator for environmental monitoring tropical and subtropical countries. In: *Biological monitoring signals from the environment*. Vieweg: Braunschweig; 1991. 199-298.

Bhanarkar, A.D.; Rao, P.S.; Gajghate, D.G.; Nema, P. Inventory of SO₂, PM and toxic metals emissions from industrial sources in Greater Mumbai, India. *Atmos. Environ.* 2005; 39: 3851–3864.

Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PHN. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutation Research.* 1999; 426: 229-232.

Braga ALF, Pereira LAA, Procópio M, André PA, Saldiva PHN. Associação entre poluição atmosférica e doenças respiratórias e cardiovasculares na

cidade de Itabira, Minas Gerais, Brasil. *Caderno Saúde Pública*. 2007, 23(4): 570-578.

Carneiro MFH, Ribeiro FQ, Fernandes -Filho FN, Lobo DJA, Barbosa Jr F, Rhoden CR, Mauad T, Saldiva PHN, Carvalho-Oliveira R. Pollen abortion rates, nitrogen dioxide by passive diffusive tubes and bioaccumulation in tree barks are effective in the characterization of air pollution. *Environmental and Experimental Botany*. 2011; 72 (2): 272-277.

Cohen A J, Anderson H. R, Ostro B, Pandey K D, Krzyzanowski MI, Künzli N, Gutschmidt K, Pope A, Romieu I, Samet J M, Smith K. The Global Burden of Disease Due to Outdoor Air Pollution. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. Part A. 2005, 68 (13): 1301 - 1307.

Cotelle S, Masfaraud JF. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia* micronucleus assays. *Mutat. Res*. 1999, 426: 167–171.

Crebelli R, Conti L, Monarca S, Feretti D, Zerbini I, Zani C, Veschetti E, Cutilli D, Ottaviani M. Toxicity of the disinfection by products resulting from peracetic acid or hypochlorite disinfected sewage wastewater. *Water Res*. 2005; 39: 1105–1113.

Curtis, L.; Rea, W.; Smith-Willis, P.; Fenyves, E.; Pan, Y. Adverse health effects of outdoor air pollutants. *Environ. Int*. 2002; 32: 815–830.

Cury PM, Lichtenfels AJFC, Reymão MSF, Conceição GMS, Capelozzi VL, Saldiva PHN. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumours in mice. *Pathol Res Pract*. 2000; 196: 627-633.

DETRAN – Departamento Estadual de Trânsito. 2008. Espírito Santo. Disponível em: www.detran.es.gov.br/

Dockery DW, Pope CA, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FA. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *New England Journal of Medicine*. 1993; 329 (24): 1753-1759.

Ezzati M, Rodgers A, Lopez AD, Vander Hoorn S, Murray CJL. Mortality and burden of disease attributable to individual risk factors. In: *Comparative Quantification of Health Risks: Global and Regional Burden of Disease Due to Selected Major Risk Factors*. Geneva: World Health Organization; 2004, 2141–2166.

Falla J; Laval-Gilly P; Henryon M; Morlot D; Ferard J-F. Biological air quality monitoring: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2000; 64: 627–644.

Ferreira MI, Domingos M, Gomes HA, Saldiva PHN, Assunção J.V. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo - SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *Environmental Pollution*. 2007; 145: 219-224.

Ferreira M.I., Petrenko H, Lobo DJ, Rodrigues GS, Moreira A, Saldiva PH. In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emissions of a solid waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2000; 50(10):1852-6.

Fuga A, Saiki M, Marcelli MP, Saldiva PHN. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environmental Pollution*. 2008; 151: 334-340.

Garrec J.P., He S., Rose C., Radnai F. Plant biomonitoring of air pollution in urban areas: examples of some French cities and Beijing (P.R. China). In: *Bioindication and air quality in European Cities*. Klumpp A., Fomim A., Klumpp G. Deizisau: Verlag. 2002; 57- 64.

Golden Software. 2002. Surfer Program, version 8. Surfer 8 Self-Paced Training Guide by Tom Bresnahan and Kari Dickenson Technical Support Golden Software, Inc. Disponível em: www.goldensoftware.com

Gong P, Kuperman RG, Sunahara GI. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the Tradescantia micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Mutat. Res.* 2003; 538: 13–18.

Grant WF. Chromosome aberration assays in Allium. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 1982; 99: 273–291.

Guimarães ET, Domingos M, Alves ES, Caldini Jr N, Lobo DJA, Lichtenfels JFC, Saldiva PHN. Detection of genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the Tradescantia- micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental Experimental Botany*. 2000; 44:1-8.

Guimarães ET. *Poluição atmosférica urbana na cidade de São Paulo e mutagênese: avaliação de riscos utilizando-se bioindicadores vegetais do gênero Tradescantia*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2003.

Guimarães ET; Macchione M; Lobo DJA; Domingos M; Saldiva PHN. Evaluation of mutagenic potencial of urbana air pollution in São Paulo, Southeastern Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. *Environmental Toxicology*. 2004; 19: 578-584.

Horowitz LW. Past, present, and future concentrations of tropospheric ozone and aerosols: Methodology, ozone evaluation, and sensitivity to aerosol wet removal. *Journal of Geophysical Research*. 2006; 111: 1-16.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Bancos de Dados. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>. Acessado em 5 de junho de 2011.

Jerrett M, Burnett RT, Pope CA III, Ito K, Thurston G, Krewski D. Long-term ozone exposure and mortality. *The New England Journal of Medicine*. 2009; 360:1085–109.

Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 3rd Edition. New Jersey: Prentice-Hall International Editions. 1992.

Käffer MI, Lemos AT, Apel MA, Rocha JV, Martins SMA, Vargas VMF. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. *Environmental Pollution*. 2012; 163: 24-31

Kampa M, Castanha E. Human Health effects of air pollution. *Environ. Pollut*. 2008; 151:362-367.

Kloog I; Melly SJ; Ridgway WL; Coull BA; Schwartz J. Using New Satellite Based Exposure Methods to Study the Association Between Pregnancy PM 2.5 Exposure, Premature Birth And Birth Weight In Massachusetts Using new satellite based exposure methods to study the association between pregnancy pm2.5 exposure, premature birth and birth weight in Massachusetts. *Environmental Health* 2012; 11.

Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Calatayud V, Garrec JP, He S, Peñuelas J, Ribas A, Ro-Poulsen H, Rasmussen S, Sanz MJ, Vergne P. Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environ. Pollut*. 2006; 139 (3): 515-522.

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 bioindicadoras (EuroBionet). *Revta brasil. Bot.*, 2001; 24 (4): 511-518.

Kraft, M.; Eikmann, T.; Kappos, A.; Kunzli, N.; Rapp, R.; Schneider, K.; Seitz, H.; Voss, J.U.; Wichmann, H.E. The German view: Effects of nitrogen dioxide on human health derivation of healthrelated short-term and long-term values. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2005; 208: 305–318.

Kuik P, Wolterbeek.T. Factor analysis of atmospheric trace-element deposition data in the Netherlands obtained by moss monitoring. *Water Air Soil Pollut.* 1995; 84: 323.

Lewne, M.; Cyrus, J.; Meliefste, K.; Hoek, G.; Brauer, M.; Fischer, P.; Gehring, U.; Heinrich, J.; Brunekreef, B.; Bellander, T. Spatial variation in nitrogen dioxide in three European areas. *Sci. Total Environ.* 2004; 332: 217–230.

Leite LAS. *Estudo da corrosão de aços-carbono e patinável durante 39 meses de exposição em ambiente marinho-industrial*. [dissertação] Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo. 2007

Lim HJ, Yu JZ, Yang H, Keywood MD. Asia intercomparison of a thermal-optical method for the determination of particle-phase organic and elemental carbon. *Environ Sci Technol.* 2003; 37:993–1001.

Ma, TH. Tradescantia micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.* 1981; 37: 85–90.

Ma TH; Anderson VA; Harris MM; Nears RE; Lee TS. Mutagenicity of drinking water detected by the Tradescantia micronucleus test. *Can. J. Genet. Cytol.* 1985; 27 (2): 143-150.

Ma TH; Cabrera GL; Cebulska-Wasilewska A; Chen R; Loarca F; Venderberg AL; Salamone MF. Tradescantia Stamen Hair Mutation Bioassay. *Mutat. Res.* 1994; 310: 211-220.

Malallah G, Afzal M, Murin G, Murin, A, Abraham D. Genotoxicity of oil pollution on some species of Kuwaiti flora. *Biologia (Bratislava).* 1997, 52: 61-70.

Mariani RL, Jorge MPM, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PHN. 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*. 2009; 157: 1767-1770.

Markert B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *Sci Total Environ*. 1995; 176: 45-61.

Martins APG. *Cascas de árvores como biomonitores da poluição atmosférica de origem veicular em parques urbanos da cidade de São Paulo* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. 2009.

Mavroidis, I.; Chaloulakou, A. Long-term trends of primary and secondary NO₂ production in the Athens, variation of the NO₂/NO_x ratio. *Atmos. Environ*. 2011; 45: 6872–6879.

Mičieta K, Kunova K. Phytoindication of genotoxic deterioration of polluted environment. *Biológia* (Bratislava); 2000, 55 8): 75-9.

Mičieta K, Murin G. Microspore analysis for genotoxicity of a polluted environment. *Environmental and Experimental Botany*; 1996, 36: 21- 27.

Mičieta K, Murin G. Wild plant species in practical use for bioindication polluted environment. *Ekológia* (Bratislava); 1997, 16: 193–202.

Mičieta K, Murin G. Three species of genus pinus suitable as bioindicators of polluted environment. *Water, Air, and Soil Pollution*. 1998;104: 413–422.

Mičieta K, Murin G Wild plant species in bio-indication of radioactive-contaminated sites around Jaslovske´ Bohunice nuclear power plant in the Slovak Republic. *Journal of Environmental Radioactivity*; 2007, 93: 26-37.

Misik M, Ma TH, Nersesyan A, Monarca A, Kim JK, Knasmueller S. Micronucleus assays with Tradescantia pollen tetrads: an update. *Mutagenesis*. 2011; 26: 215–221.

Monarca S, Feretti D. Monitoring of mutagens in urban air samples. *Mutat. Res*. 1997; 426 (2): 189–192.

Mulcahy DL. Pollen Tetrads in the Detection of Environmental Mutagenesis. *Environmental Health Perspectives*. 1981; 37: 91-94.

Murín, G., Mičieta K. Wild Plant and Crop Plant Species for “in situ” Microspore Analysis of a Polluted Environment. In: *Environmental Pollution and plant responses*. Agrawal SB e Agrawal M. Boca Raton: Lewis Publisher. 2000. 317 - 328.

Oliveira C.R.M., Oliva M.A., Pereira E.G. Efeito do material particulado de ferro no teor de pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Revista Brasileira de Biociências*. 2007; 5 (2): 681- 683.

Oudalova A., Geras'kin S., Vasiliev D., Dikarev V. Cytogenetic variability in *Pinus sylvestris* L. populations experiencing anthropogenic influence. *Radioprotection*. 2005; 40 (1):223 - 228.

Ozcan HK. Long Term Variations of the Atmospheric Air Pollutants in Istanbul City. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2012; 9: 781-790.

Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002; 287: 1132-1141.

Pope CA III, Ezzati M, Dockery DW. Fine-Particulate Air Pollution and Life Expectancy in the United States. *The New England Journal of Medicine*. 2009; 360: 376-86.

Queiroz JW, Dias GH, Nobre ML, Dias MCS, SF, Barbosa JD, Trindade-Neto PB, Blackwell JM, Selma M. B. Jeronimo Hansen's Disease (Leprosy) and to Determine Areas of Greater Risk of Disease Richardson, D. H. S. Pollution Monitoring with Lichens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(2): 306–314.

Richardson, D.H.S.; Shoreb, M.; Hartreeb, R.; Richardson, R.M. The use of X-ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring. *The Science of the Total Environment*. 1995: 97-105.

RIMA - *Relatório de Impacto Ambiental do Projeto da 4ª usina de pelotização em Ponta de Ubu, ES*. Samarco Mineração S/A. 2011. Disponível em: www.samarco.com.br

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva OS, Barone LA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Bohm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: preliminary report. *Environmental Research*. 1994; 65 (2): 218-225.

Saldiva PH, Pope CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone LA, Bohm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Arch. Environ. Health*. 1995; 50 (2): 159-163.

Santos U P, Terra-Filho M, Lin C A, Pereira L A A, Vieira T C B, Saldiva P H N, Braga A L F. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2008; 62: 267-272.

Schauer J J, Lough G C, Shafer M M, Christensen W F, Arndt M F, DeMinter JT, Park J-S. Characterization of Metals Emitted from Motor Vehicles. *Health Effects Institute*. 2006; 133: 1-98.

Shah PS., Balkhair T. Air pollution and birth outcomes: A systematic review. *Environment International*. 2011; 37: 498–516.

Sisenando HA, Medeiros SRB, Saldiva PHN, Artaxo P, Hacon SS. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by *Tradescantia* micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. *Environmental Health*. 2011;10: 41.

Snow ET. *Metal carcinogenesis: mechanistic implications*. Pharmac Ther. 1992; 53: 31-65.

Souza MB, Saldiva PHN, Pope C A III, Capelozzi VL. Respiratory Changes due to Long-term Exposure to Urban Levels of Air Pollution: A Histopathologic Study in Humans. *Chest*. 1998; 13:1312-1318.

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimaraes ET, Lichtenfels AJFC, Lobo DJA, Saldiva PHN. Tradescantia pallida cv. purpurea Boom in the characterization of Air Pollution by accumulation of Trace Elements. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 2003; 53: 574-579.

Suyama F, Guimaraes ET, Lobo DJA, Rodrigues GS, Domingos M, Alves ES, Carvalho HA, Saldiva PHN. 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*. 2002; 35: 127-129.

TCA – *Termo de Compromisso Ambiental*. 2012. Espírito Santo: Samarco S/A. Disponível em: www.samarco.com.br

Tonne, C.; Melly, S.; Mittleman, M.; Coull, B.; Goldberg, R.; Schwartz, J. A case-control analysis of exposure to traffic and acute myocardial infarction. *Environ. Health Perspect.* 2007; 115: 53–57.

Tsai FC, Apte MG, Daisey JM. An exploratory analysis of the relationship between mortality and the chemical composition of airborne particulate matter. *Inhalation Toxicol* 2000; 12(2):121–135.

Uhrikova H, Micieta K. In situ bioindication of genotoxic effect using the species of native flora in the vicinity of the nickel plant. *Biologia* (Bratislava). 1995; 50: 65–68.

Wang J, Da L, Song K, Li B.L. Temporal variations of surface water quality in urban, suburban and rural areas during rapid urbanization in Shanghai, China. *Environ. Pollut.* 2008, 152, 387–393.

Wappelhorst O; Kuehn L; Oehlman J; Market B. Deposition and disease: a moss monitoring project as an approach to ascertaining potential connections. *Sci. Total Environ.* 2000; 249: 243-256.

WHO - *World Health Organization. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.* Regional Office for Europe. Copenhagen: Denmark, 2006.

Yang, S.; Yuesi, W.; Changchun, Z. Measurement of the vertical profile of atmospheric SO₂ during the heating period in Beijing on days of high air pollution. *Atmos. Environ.* 2009; 43: 468–472.