

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS**

JULIANA CAROLINE VIVIAN SPÓSITO

**Biomonitoramento da qualidade do ar em cidades
localizadas no sul do Estado do Mato Grosso do Sul**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
AMBIENTAL**

DOURADOS/MS

2015

JULIANA CAROLINE VIVIAN SPÓSITO

**Biomonitoramento da qualidade do ar em cidades
localizadas no sul do Estado do Mato Grosso do Sul**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alexéia Barufatti Grisolia

**Dissertação de mestrado submetida ao programa
de pós-graduação em Ciência e Tecnologia
Ambiental, como um dos requisitos necessários
para obtenção do título de mestre em Ciência e
Tecnologia na área de concentração Ciência
Ambiental.**

DOURADOS/MS

2015

Ficha Catalográfica Elaborada Pela Biblioteca Central – UFGD

| | |
|-------|--|
| S771b | <p>Spósito, Juliana Caroline Vivian. Biomonitoramento da qualidade do ar em cidades localizadas no sul do Estado do Mato Grosso do Sul. / Juliana Caroline Vivian Spósito. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 72f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dr. Alexéia Barufatti Grisolia. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Biomonitoramento. 2. Qualidade do ar. 3. <i>Tradescantia pallida</i>. I. Título.</p> |
|-------|--|

CDD – 574.191

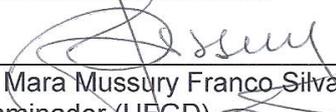


Termo de Aprovação

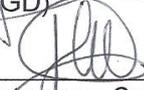
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: **“Biomonitoramento da qualidade do ar em cidades localizadas no sul do estado do Mato Grosso do Sul”**, de autoria de **Juliana Caroline Vivian Spósito**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.ª Dr.ª Alexéia Baruffatti Grisolia
Presidente da banca examinadora



Dr.ª Rosilda Mara Mussury Franco Silva
Membro Examinador (UFGD)



Dr. Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando
Membro Examinador (UFF)

Dourados/MS, 12 de Março de 2015.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e em especial:

À Universidade Federal da Grande Dourados/Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental por ter me proporcionado condições para o desenvolvimento desse trabalho e a todos os professores pelos conhecimentos adquiridos e apoio constante.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e à FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul) pelo suporte financeiro a pesquisa.

A orientadora Prof^ª. Dr^ª. Alexeia Barufatti Grisolia, pela confiança, apoio e dedicação ao longo deste trabalho, além dos conhecimentos por mim adquiridos, frutos de sua orientação, que muito contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos Professores Doutores Rosilda Mara Mussury Franco Silva, Anderson Caires de Lima Rodrigues, Leonardo de Oliveira Seno e Herbert Ary Sisenando pelo carinho e sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos técnicos William Falco do Departamento de Física da UFGD, pela atenção e auxílio indispensável durante o período em que utilizei o laboratório desse departamento.

Aos colegas de Laboratório, em especial ao meu amigo Bruno do Amaral Crispim, que me ajudou em vários momentos, inclusive no constante incentivo a continuar no caminho acadêmico.

À Deus, por ser fonte de luz, sabedoria e força durante toda esta caminhada e ter me abençoado com saúde e coragem para enfrentar todos os desafios, além de iluminar meu caminho para que eu pudesse conhecer pessoas incríveis.

Aos meus pais, Salete e Amauri, e aos meus irmãos Junior e Jorge, e com carinho, força e incentivo foram em grande parte responsáveis pela realização desse trabalho. Obrigado por estarem sempre presentes na minha vida, por me incentivarem e também me suportarem nas horas de estresse.

A um grande companheiro Leandro Dalbem, que esteve ao meu lado durante todo este trabalho, por me ajudar em todos os momentos difíceis e com quem também dividia momentos de alegria.

Muito Obrigada!

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

| Tabela | Legenda | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Número médio de micronúcleos em tétrades de <i>Tradescantia pallida</i> em 2010, 2011, e 2012 durante diferentes meses de coleta, e diferença estatística (Teste de Tukey a nível de 5% de significância). | 30 |
| 2 | Número médio de micronúcleos em tétrades de <i>Tradescantia pallida</i> em 2010, 2011, e 2012 nos diferentes locais, e diferenças estatísticas (Testes de Tukey a nível de 5% de significância). | 31 |

CAPÍTULO III

| Tabela | Legenda | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Parâmetros Físicos. Dados de Temperatura (Temp.°C) e Umidade relativa do ar (U.R.%), mensuradas durante os períodos de coletas nas diferentes cidades. | 44 |
| 2 | Quadrados médios dos micronúcleos (MCN), Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID) encontrados em <i>Tradescantia pallida</i> . | 45 |
| 3 | Resultados dos Parâmetros Biológicos. Frequência de Micronúcleo (MCN), Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID), observadas em células de <i>Tradescantia pallida</i> nas cidades da Região da Grande Dourados e média dos períodos de coleta. | 46 |
| 4 | Média dos dados da Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (Fv/Fm), e da frota veicular observada nas respectivas cidades da Região da Grande Dourados. | 48 |
| 5 | Correlação entre cidades, coleta, frequência de micronúcleos (MCN), índice de dano (ID), frequência de dano (FD), Fluorescência Máxima (Fm), Rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) observadas em <i>Tradescantia pallida</i> , além das variáveis temperatura, umidade relativa do ar e tráfego veicular, indicando suas diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Coeficiente de correlação de Pearson, a nível de 5% de significância. | 48 |

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

| Figura | Legenda | Página |
|---------------|--|---------------|
| 1 | Canteiro ornamentado com <i>Tradescantia pallida</i> (Rose) Hunt var. <i>purpurea</i> | 13 |
| 2 | Diagrama da formação de micronúcleo | 14 |
| 3 | Micronúcleos (apontados pela seta) em tetrade de <i>Tradescantia pallida</i> em aumento de 100x. | 14 |

CAPÍTULO II

| Figura | Legenda | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Mapa de Dourados, MS, Brasil, mostrando os três locais monitorados (local 1, local 2 e 3) | 28 |
| 2 | Temperatura, umidade relativa (UR) e número médio de micronúcleos (MCN) nos locais 1, 2 e 3 durante 2010, 2011, e 2012. | 33 |

CAPÍTULO III

| Figura | Legenda | Página |
|---------------|---|---------------|
| 1 | Distribuição espacial do local de estudo, delimitando a Região da Grande Dourados (a), cidades estudadas (b), coordenadas geográficas dos pontos de estudo (c). | 40 |
| 2 | Classificação de danos no DNA em células foliares, por meio da eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa). Cauda dos cometas apontados pela seta. | 42 |

Resumo

O processo de urbanização e industrialização, têm despertado preocupação em relação às questões ambientais. Dentre elas, a poluição atmosférica, tornou-se alvo de muitas pesquisas devido o processo de deteriorização da qualidade do ar e efeitos nocivos causados em organismos vivos. Com a finalidade de caracterizar a qualidade do ar relacionada ao tráfego veicular na Região da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, foram mensuradas quantidade de danos genéticos por meio dos biotestes de mutagenicidade (Micronúcleo) e genotoxicidade (Ensaio do Cometa), além de avaliação da capacidade fotossintética em *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea*. O presente estudo realizou coleta de inflorescências jovens de *T. pallida*, para as análises da quantidade de micronúcleos, por meio do bioensaio *Tradescantia*-Micronúcleo (Trad-MCN). Folhas da mesma planta também foram coletadas para realização do Ensaio do Cometa e avaliação da Fluorescência máxima (Fm) e Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II – PSII (Fv/Fm). As análises estatísticas foram efetuadas no SAS, empregando teste de Tukey 5% para as que atenderam as pressuposições do modelo, também foi aplicado o teste de Pearson para cálculo de correlação simples a 5%. De maneira geral, para os testes de Micronúcleo e Ensaio do Cometa foi observado que os pontos com maior fluxo de veículos apresentaram maiores valores de danos genéticos. A análise de Fluorescência, indicou que a interação dupla entre Fv/Fm x Tráfego e Fv/Fm x Cidade apresentou significância, demonstrando que a planta possa estar em estresse. Para Fm, não foram observados valores significativos. Análises demonstraram que fatores climáticos, tráfego e período de coleta, foram significativos na formação de micronúcleo. Diante do exposto, pode-se concluir, que pontos com tráfego de veículos mais intenso, apresentaram maior quantidade de danos em relação aos locais com menor tráfego, indicando que contaminantes atmosféricos constituem fatores determinantes na formação de danos genéticos, e de variação da Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (PSII). Além disso, fatores meteorológicos possuem influência quanto à presença de agentes genotóxicos nos ambientes de estudo.

Palavras-chave: Poluição do ar; fluxo veicular, biotestes vegetais, *Tradescantia pallida*.

Abstract

The process of urbanization and industrialization, have aroused concern about environmental issues. Among them, air pollution, has been widely studied because of the process of air quality deterioration and harmful effects on living organisms. In order to characterize air quality and relate it to the vehicular traffic in Dourados, Mato Grosso do Sul, were measured amount of genetic damage through bioassays of mutagenicity (Micronucleus) and genotoxicity (Comet Assay), and also avaliation of the photosynthetic capacity in *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt var. *purpurea*. This study performed the collection of young inflorescences of *T. pallida*, for analysis of the number of micronuclei, through the *Tradescantia* micronucleus bioassay-(Trad-MCN). Plant leaves were collected to measure the Comet Assay and evaluation of maximal fluorescence (Fm) and maximum efficiency of photosystem II photosynthetic - PSII (Fv / Fm). Statistical analyzes were performed in SAS, using 5% Tukey test for the ones that met the assumptions of the model, it was also applied the Pearson test for 5% simple correlation calculation. In general, for the micronucleus test and comet assay was observed that the points with greater flow of vehicles had higher genetic damage. Fluorescence analysis indicated that the interaction between Fv / Fm x Traffic and Fv / Fm x City was significant, indicating that the plant can be undergoing stress. To Fm, significant values were not observed. Analysis showed that climatic factors, traffic and sampling period were significant in the formation of micronuclei. Given the above, it can be concluded that points with more intense vehicle traffic, showed a higher amount of damage compared to sites with less traffic, indicating that atmospheric contaminants are decisive factors in the formation of genetic damage, and in variation of the photosynthetic efficiency maximum of photosystem II (PSII). Furthermore, meteorological factors have an influence on the presence of genotoxic agents in the study environments.

Keywords: Air pollution; vehicular flow, plant bioassays, *Tradescantia pallida*.

OBJETIVO GERAL

- Biomonitoramento da qualidade do ar por meio de avaliação de danos genéticos em bioensaios vegetais, em cidades localizadas no sul do Estado do Mato Grosso do Sul (MS).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demonstrar a eficiência do bioteste Trad-MCN para analisar a quantidade de micronúcleos relacionados ao tráfego veicular;
- Verificar a variação dos danos genéticos entre as diferentes épocas do biomonitoramento;
- Avaliar a influência de fatores meteorológicos (Temperatura e Umidade relativa) na dispersão dos poluentes, através dos biotestes utilizados no estudo;
- Padronizar o bioteste Ensaio do Cometa, utilizando tecidos foliares de *Tradescantia pallida*, e avaliar sua eficiência no biomonitoramento do ar;
- Determinar a Fluorescência máxima e a Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (PSII) em *T. pallida*;
- Analisar a correlação entre Danos genéticos, Capacidade Fotossintética, Fatores climáticos, Época de coleta e Tráfego veicular, nas diferentes cidades da Região da Grande Dourados;

HIPÓTESE

A alteração genética é mais frequente em *Tradescantia pallida* nas cidades com elevado fluxo de veículos.

SUMÁRIO

| | |
|------------------------|-----|
| LISTA DE TABELAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | II |
| RESUMO | III |
| ABSTRACT | IV |
| OBJETIVOS..... | V |
| HIPÓTESE | V |

CAPÍTULO I

Utilização de bioensaios em *Tradescantia* como sistemas de biomonitoramento para avaliação de poluentes ambientais

| | |
|---|----|
| Resumo | 9 |
| 1. Introdução | 9 |
| 2. Biomonitoramento e bioensaios | 12 |
| 3. Bioensaios vegetais | 12 |
| 4. Bioensaios em <i>Tradescantia pallida</i> | 13 |
| 4.1. Teste de micronúcleo (Trad-MCN) | 13 |
| 4.2. Teste de Mutação em Pelo Estaminal (Trad-SHM) | 15 |
| 4.3. Ensaio do cometa | 15 |
| 4.4. Avaliação de Índice e Densidade Estomática (id estomática) | 16 |
| 4.5. Parâmetros de crescimento | 16 |
| 4.6. Composição química foliar | 17 |
| 4.7. Eficiência Fotossintética..... | 18 |
| 5. Conclusão | 19 |
| 6. Referências | 19 |

CAPÍTULO II

Instabilidade genética em plantas associado ao tráfego de veículos e a variáveis climáticas

| | |
|--|----|
| Resumo | 25 |
| 1. Introdução | 26 |
| 2. Material e Métodos | 28 |
| 2.1 Área de estudo e período de coleta | 28 |
| 2.2 Teste Trad–MCN | 29 |
| 2.3 Análises estatísticas | 29 |

| | |
|---|----|
| 3. Resultados e Discussão | 29 |
| 4. Conclusão | 34 |
| 5. Agradecimentos | 34 |
| 6. Referências | 34 |
| CAPÍTULO III | |
| Biomonitoramento dos danos genéticos e da capacidade fotossintética associada a poluentes atmosféricos | |
| Resumo | 38 |
| 1. Introdução | 39 |
| 2. Material e métodos | 40 |
| 2.1 Área de estudo | 39 |
| 2.2 Contagem de veículos..... | 41 |
| 2.3 Teste de Micronúcleo em Tradescantia (Trad-MCN) | 41 |
| 2.4 Ensaio do Cometa | 41 |
| 2.5 Determinação da Fluorescência | 43 |
| 2.6 Parâmetros Meteorológicos | 43 |
| 2.7 Análises estatísticas | 44 |
| 3 Resultados | 44 |
| 4. Discussão..... | 49 |
| 5. Conclusão | 51 |
| 6 Referências | 52 |
| Considerações gerais | 55 |
| Anexos | 56 |

CAPÍTULO I

O Capítulo I aborda conceitos teóricos e referências da literatura, que abrangem o suporte necessário para a compreensão dos conteúdos e análises apresentados nos capítulos subsequentes, além de referenciar trabalhos que possam auxiliar a organizar informações sobre o trabalho desenvolvido.

O Capítulo I foi apresentado de acordo com as normas da revista *Environmental Pollution*, descritas no Anexo II.

Utilização de bioensaios em *Tradescantia* como sistemas de biomonitoramento para avaliação de poluentes ambientais

Utilização de bioensaios em *Tradescantia* como sistemas de biomonitoramento para avaliação de poluentes ambientais

Juliana Caroline Vivian Spósito^a, Alexéia Barufatti Grisolia^{b,*}

^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados – MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, MS, Brasil.

*Correspondência do autor: Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Tel.: +55 67 34102223. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br (Grisolia, AB).

Resumo

Estudos sobre os efeitos genéticos de agentes químicos e físicos, em espécies e clones de *Tradescantia* têm sido utilizado como modelos experimentais, em virtude de uma série de características favoráveis, que oferecem oportunidades para a detecção de agentes que afetam os organismos vivos. A possibilidade de utilizar diversas técnicas de avaliação de aberrações e quebras cromossômicas, alterações morfofisiológicas e fotossintéticas utilizando *Tradescantia*, têm sido consideradas alternativas para a análise de mutagênese ambiental e tem despertado grande interesse no meio científico. O presente estudo teve como objetivo, fazer um levantamento na literatura acadêmica sobre a utilização dos bioensaios em *Tradescantia*, na avaliação da mutagênese ambiental. Com base na revisão de literatura foi possível concluir que a *Tradescantia* demonstra ser altamente sensível e um excelente organismo teste devido sua ampla variedade de bioensaios, sendo considerada um elemento essencial no biomonitoramento de ambientes degradados.

Palavras-chave: Bioindicador, genotóxico, estresse ambiental.

1. Introdução

A qualidade do ar é um dos requisitos fundamentais para a saúde humana e para a qualidade de vida dos ecossistemas. No entanto, o processo de urbanização e industrialização, impulsionado pela revolução industrial desde meados do século XIX, vem introduzindo de forma excessiva, compostos e partículas na atmosfera, resultando no processo conhecido como poluição atmosférica (Costa e Droste 2012).

O aumento da frota veicular nos centros urbanos é um dos principais agravantes da poluição atmosférica, devido ao processo de combustão incompleta, emitindo diversas substâncias tóxicas como, monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos (HC), óxidos de

enxofre e nitrogênio e material particulado (MP) (Onursal e Gautam 1997). Devido ao aumento da concentração de poluentes, há necessidade de se controlar as emissões atmosféricas e monitorar a qualidade do ar, visto que a presença de poluentes pode estar associada à degradação ambiental e exposição da população aos mesmos (Rodriguez et al. 2011).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), instituído a partir da lei nº 6.938, de 31/08/1981, e, regulamentada pelo decreto 99.274 de 06/06/1990, foi elaborado, a fim de estabelecer normas, critérios e padrões relativos ao controle e à manutenção da qualidade do meio ambiente, com vistas ao uso racional dos recursos ambientais.

A partir da criação do CONAMA, várias resoluções estabeleceram programas visando reduzir as emissões e monitorar a poluição atmosférica. Considerando que a emissão de poluentes por veículos automotores contribui para a deterioração da qualidade do ar, especialmente nos centros urbanos, foi instituído o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE) (Resolução CONAMA nº 18 de 1986), com finalidade de reduzir os níveis de emissão de poluentes por veículos automotores visando o atendimento aos Padrões de Qualidade do Ar.

Considerando o acelerado crescimento urbano, industrial, veicular e conseqüente aumento da poluição atmosférica com seus reflexos negativos, principalmente nas regiões metropolitanas, foi instituído o Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar (PRONAR) (Resolução CONAMA nº 5 de 1989), que tem como objetivo melhorar a qualidade do ar; atender padrões estabelecidos e não comprometer a qualidade do ar em áreas não degradadas.

Desta forma, visando contribuir para a implantação e acompanhamento do PROCONVE e do PRONAR, foi lançado em 2013 por meio do Ministério do Meio Ambiente, o Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas por Veículos Automotores Rodoviários 2013, com base nos dados de 2012, visando uma contribuição no controle da poluição do ar e na redução das emissões de gases de efeito estufa (MMA 2013).

O contínuo acréscimo das fontes poluidoras como observado no aumento de aproximadamente 27% no total de veículos no ano de 2012, em relação à frota brasileira estimada em 2009, têm despertado grande preocupação, uma vez que os veículos automotores, fonte significativa de emissão de contaminantes atmosféricos, podem chegar a contribuir em termos globais, com 10% das emissões atmosféricas (Costa e Droste 2012; MMA 2013).

Informações sobre a qualidade do ar no Brasil são de grande relevância, para o desenvolvimento de políticas públicas adequadas à melhoria desse parâmetro. Dados fornecidos pelos Órgãos Estaduais do Meio Ambiente (OEMA), Instituto Estadual de Meio Ambiente (IEMA) e colaboração do Ministério do Meio Ambiente, permitiram a elaboração do 1º Diagnóstico das redes de monitoramento da qualidade do ar no Brasil, informando sobre concentrações de poluentes em determinadas regiões (Distrito Federal, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Bahia, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe), suprindo o direito da sociedade à informação ambiental, e contemplar meta implantada pelo PRONAR (IEMA 2014).

No entanto, o diagnóstico de monitoramento da qualidade do ar no Brasil apresenta problemas quanto aos recursos orçamentários, fragilidade na estrutura técnico-institucional, além de ser incompleto, uma vez que somente nove das 27 unidades federativas, são monitoradas. Além do mais, mostra-se defasado, uma vez que o padrão de qualidade do ar adotado em relação a alguns poluentes, segue diretrizes com base no ano de 1990, previstos no PRONAR (IEMA 2014).

O monitoramento da qualidade do ar é uma atividade de enorme relevância para a gestão ambiental, contudo, apesar do Brasil possuir frota estimada em 79 milhões de veículos, em alguns estados, dados sobre a qualidade do ar ainda são incomuns ou escassos, uma vez que são poucas as cidades que possuem rede de monitoramento de poluentes atmosféricos (DENATRAN 2013). A Região Metropolitana de São Paulo, com 24 milhões de veículos representa uma das poucas cidades, que desde a década de 1980 através da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) faz o monitoramento da qualidade do ar da região. Assim como São Paulo, os Estados da Bahia com 3 milhões de veículos e do Paraná com 6 milhões, realizam monitoramento da qualidade do ar através do Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (INEMA) e do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) respectivamente (DENATRAN 2013; CETESB 2014; INEMA 2014 e IAP 2014).

Segundo Martins et al. (2002), emissões de gases poluentes provenientes de veículos são os grandes vilões da poluição do ar nas cidades e causam danos a saúde e ao ambiente. No entanto, apesar do monitoramento do ar atmosférico ser realizado por métodos físico-químicos e estabelecer valores limites para concentrações de poluentes no ar, estes por sua vez não são capazes de informar sobre os impactos dos poluentes nos organismos vivos (Isidori et al. 2003; Klumpp et al. 2004).

2. Biomonitoramento e Bioensaios

Em meados do século passado, iniciou-se a utilização de organismos vivos, conhecidos como bioindicadores, como método experimental na detecção de impactos negativos dos poluentes sobre os organismos vivos, denominado de biomonitoramento (Carneiro e Takayanagui 2009).

Os organismos bioindicadores, são organismos vivos capazes de fornecer informações como alterações morfológicas e/ou fisiológicas que ocorrem em ambientes que passaram por mudanças físico-químicas e estejam degradados (Klumpp et al. 2004).

O biomonitoramento do ar atmosférico pode ser passivo, utilizando organismos existentes naturalmente na área de estudo ou ativo, quando os organismos bioindicadores são introduzidos no ambiente a ser estudado (Guimarães et al. 2000).

3. Bioensaios vegetais

A utilização de plantas no monitoramento como *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Lycopersicon esculentum*, *Pisum sativum*, espécies de líquen, bromélias e várias espécies do gênero *Tradescantia*, vêm sendo utilizadas, por serem considerados bioensaios mais rápidos e simples quando comparados à ensaios com animais (Grant 1994; Ma 1981).

As plantas bioindicadoras possuem sensibilidade às alterações do ambiente, fornecendo resposta significativa e subsídios importantes no monitoramento de poluentes da água, solo e ar. Essa sensibilidade pode ser atribuída à principal via de entrada de poluentes nas plantas, os estômatos, por onde são realizadas trocas gasosas, podendo ocasionar efeitos em nível macroscópico, como aparecimento de cloroses, necroses, queda de folhas ou diminuição no seu crescimento, como em nível genético, estrutural, fisiológico ou bioquímico (Alves et al. 2001; Savóia 2007).

Considerando as diferentes formas que as plantas podem reagir a perturbações ambientais e aos diferentes tipos de poluentes, elas podem ser classificadas como bioindicadoras, biosensoras, bioacumuladoras e biointegradoras. Entre as espécies biosensoras destaca-se a *Tradescantia*, sendo utilizada para os ensaios tanto o clone híbrido, entre *T. subcaulis* Bush e *T. hirsutiflora* Bush, bem como a *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt var. *purpurea* Boom (Ma et al. 1994).

Tradescantia pallida (Rose) D.R Hunt var. *purpurea* (Commelinaceae) (Figura 1), é uma planta herbácea ornamental, amplamente cultivada em regiões tropicais e subtropicais, apresenta fácil adaptação, se desenvolve durante todo o ano, além de ser uma planta adequada para estudos de monitoramento. Considerando sua ampla utilização

como organismo bioindicador no biomonitoramento, vários testes podem ser realizados, baseado no uso desta planta (Batalha et al. 1999).



Figura 1: Canteiro ornamentado com *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt var. *purpurea*

4. Bioensaios em *Tradescantia pallida*

4.1. Teste de Micronúcleo (Trad-MCN)

O teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad - MCN), é um dos bioensaios mais utilizados na avaliação do potencial genotóxico dos poluentes atmosféricos por oferecer vantagens como baixo custo financeiro, alta sensibilidade, eficácia, além de permitir preparações citológicas simples e de rápida execução (Klumpp et al. 2004).

Os micronúcleos correspondem a pequenas massas de cromatina derivadas de quebras cromossômicas (clastogênese) e/ou de aberrações cromossômicas numéricas (aneugênese), induzidas por agentes que danificam diretamente o cromossomo ou que afetam o fuso mitótico. As estruturas que resultam de fragmentos ou cromossomos inteiros, não se ligam as fibras do fuso mitótico e não são incorporados no núcleo das células filhas durante a meiose. Desta forma, essas estruturas permanecem no citoplasma das células interfásicas e formam a própria membrana nuclear, originando os micronúcleos (Figura 2) (Holland et al. 2008; Meireles e Cerqueira 2011).

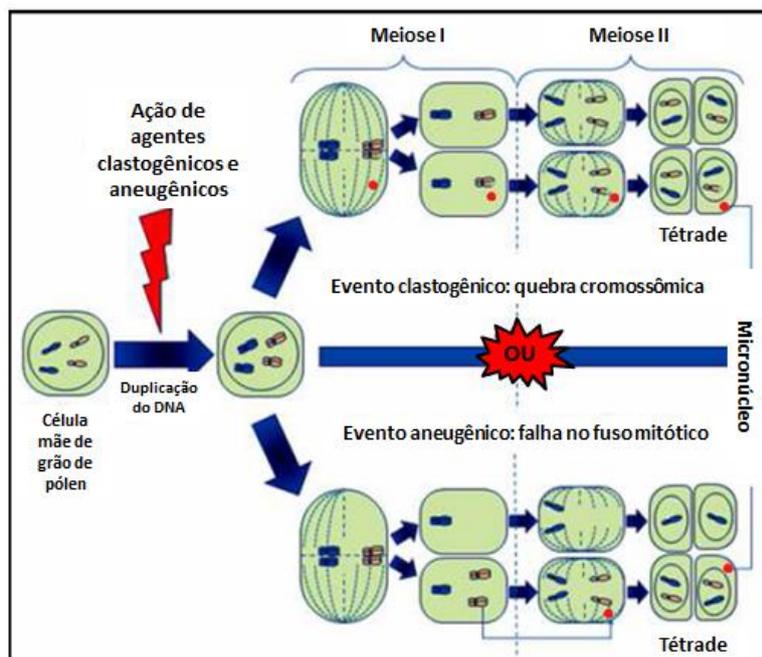


Figura 2: Diagrama da formação de micronúcleo
Fonte: Adaptado de Meireles e Cerqueira, 2011.

Desta forma, os micronúcleos se assemelham ao núcleo principal quanto à forma, estrutura e propriedades de coloração, e pode variar quanto ao tamanho (Figura 3) (Ma et al. 1981).



Figura 3: Micronúcleos (apontados pela seta) em tetrade de *Tradescantia pallida* em aumento de 100x.

Segundo estudo realizado por Crispim et al. (2011) o teste Trad-MCN demonstrou ser excelente ferramenta na detecção de possíveis efeitos genotóxicos presentes no ar atmosférico.

A planta *Tradescantia pallida*, por meio do bioensaio Trad-MCN, é considerada excelente bioindicadora e altamente sensível, sendo muito importante na avaliação do poder mutagênico de poluentes atmosféricos em *Tradescantia* (Venâncio et al. 2014).

4.2. Teste de Mutação em pelo estaminal (Trad – SHM)

Considerando a ampla utilização da *Tradescantia* em estudos genéticos, foram encontradas uma série de características que permitem a detecção de agentes que afetam a estabilidade do genoma. O bioensaio da mutação do pelo estaminal de *Tradescantia* (Trad-SHM – *Tradescantia* Stamen Hair Mutation) é uma excelente ferramenta para testar e monitorar o grau de toxicidade de agentes genotóxicos presentes no ambiente. A técnica Trad-SHM, combina versatilidade, sensibilidade e grande capacidade para ser um indicador nos riscos potenciais aos quais os seres vivos estão expostos (Sparrow 1974).

Segundo Ma et al. (1994), o bioensaio Trad-SHM, é baseado na detecção de mutações mitóticas. As células de pêlos estaminais do clone 4430 são heterozigotas para cor de flor, com um marcador fenotípico visível que muda a cor dos filamentos do estame de azul (dominante) para rosa (recessivo). Desta forma, mutações no alelo azul irão produzir uma célula recessiva rosa, tornando possível detectar mutações com base na mudança de coloração nas células de pêlos estaminais.

De acordo com Patussi e Bundchen (2013), em teste realizado com o bioensaio Trad-SHM, a fim de evidenciar a existência de risco genotóxico associado ao uso do herbicida triazina, foi observado mutações em pelos estaminais, demonstrando a técnica como ferramenta eficiente na avaliação do potencial genotóxico de contaminantes.

O teste de mutação em pêlos estaminais (Trad-SHM) tem sido amplamente utilizado na avaliação do risco ambiental para análise de poluentes na água, ar e solo e pode, portanto, ser usado como biomarcador de qualidade destes ambientes. Assim sendo, pode auxiliar na construção de normas de segurança que minimizem a contaminação ambiental, e na prevenção dos impactos da poluição ambiental sobre os seres vivos (Duan et al. 1999).

4.3. Ensaio do Cometa

A técnica “Ensaio do Cometa” ou “eletroforese em gel de célula única” (SCGE), proposto por Ostling e Johanson em 1984, permite detectar quebras na dupla fita de DNA, produzidas por alterações genéticas nas células, através de uma técnica de eletroforese

em gel sob condições neutras. Posteriormente, a técnica foi modificada por Singh et al. (1988), para uma técnica sob condições alcalinas e mais eficiente.

O ensaio do cometa consiste basicamente, em fazer passar uma corrente elétrica pelas células, proporcionando a migração dos fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. A extensão da migração dos fragmentos de DNA depende diretamente de danos presentes nas células, desta forma, após a eletroforese, as células que apresentarem núcleo intacto com membrana bem delimitada, são consideradas sem dano, e as células identificadas visualmente com “cauda”, formadas pelos fragmentos de DNA, são consideradas células com danos detectáveis e serão classificadas quanto ao tamanho da cauda (Betti et al. 1994).

O ensaio do cometa apresenta vantagens sobre outros ensaios citogenéticos para detectar danos no DNA, como simplicidade, sensibilidade, rapidez, econômico e muito eficiente na visualização de danos diretamente no material genético de células individuais (Rajaguru et al. 1999).

O ensaio é bem estabelecido e bastante utilizado pela comunidade científica como ferramenta valiosa por permitir estudo quantitativo e qualitativo na avaliação de danos no DNA (Ventura et al. 2013). Em estudo realizado utilizando o ensaio cometa em *T. pallida*, foi observado eficiência da técnica na avaliação de eventuais lesões genômicas provocadas por agentes mutagênicos (Leite, Zandonato e Fluminham 2013).

4.4. Índice e Densidade estomática

As plantas utilizadas como bioindicadores, apresentam alta sensibilidade a agentes genotóxicos, uma vez que os poluentes gasosos entram em contato com a planta através de trocas gasosas por meio dos estômatos presentes nas folhas, podendo ocorrer efeitos fisiológicos, metabólicos, estruturais e ultraestruturais, sendo interpretados como respostas adaptativas dos vegetais a mudanças nas condições ambientais (Fahn 1986).

Crispim et al. (2011) relataram alterações na anatomia e fisiologia da folha, baseadas em Índice e densidade estomática de *T. pallida* associados à intensidade do tráfego de veículos em Dourados (MS, Brasil), demonstrando os efeitos da ação dos poluentes na planta.

4.5. Parâmetros de crescimento

Os fatores de estresse para as plantas podem estar associados ao déficit hídrico, salinidade, luminosidade, umidade do ar e do solo e à poluição do ar. Esses fatores,

geralmente podem ocasionar em alterações genéticas, fisiológicas ou anatômicas, podendo em alguns casos evoluir para cloroses e necroses foliares (Alves et al. 2001; Klumpp et al. 2004).

Variações anatômicas como espessura da folha e quantidade de estômatos, representam uma estratégia adaptativa a ambientes poluídos, dificultando o deslocamento dos poluentes para o interior da folha ao possuírem menos espaços intercelulares no parênquima lacunoso, como encontrado em experimento utilizando clone 4430 de *Tradescantia*. No entanto, alterações relacionadas à capacidade de trocas gasosas acarretam comprometimento da taxa fotossintética e conseqüentemente ao crescimento da planta, o qual constitui uma das formas mais sensíveis de medir o estresse em um organismo (Alves et al. 2001).

Os efeitos dos poluentes sobre o crescimento das plantas pode ser de forma direta ou indireta. Quando partículas em suspensão atingem as folhas e bloqueiam os estômatos, a condutância de CO₂ diminui e interfere a fotossíntese. O processo fotossintético também pode ser comprometido quando gases poluentes como SO₂ e NO_x entram nas folhas através de trocas gasosas e formam íons tóxicos levando ao fechamento dos estômatos como mecanismo de proteção das plantas. No entanto em baixas concentrações esses gases podem servir como fonte adicional de nitrogênio e enxofre para as plantas (Zeiger 2006).

O ozônio é considerado um dos poluentes mais prejudiciais às plantas. Nas folhas o ozônio reage com O₂ produzindo espécies reativas de oxigênio, como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ânion superóxido (O₂⁻), Oxigênio singleto (¹O₂) e radical hidroxila (OH) que desnaturam proteínas e danificam ácidos nucléicos, dando origem a mutações (Lima, Souza e Domingos 2009).

4.6. Composição química foliar

A concentração de elementos químicos não essenciais nas folhas esta diretamente relacionada à deposição de partículas provenientes da poluição atmosférica por emissões veiculares. Amostras foliares de *T. pallida* expostas em regiões centrais com intenso fluxo de veículos, apresentaram maiores concentrações dos elementos químicos como, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn, em relação a regiões com abundância de vegetação e baixo fluxo de veículos (Santos 2012; Mulgrew e Williams 2000).

Os elementos químicos Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn, estão relacionadas com poluição do ar por emissões veiculares, sendo liberados principalmente pela queima de

combustível fóssil (Ba e Mn), desgaste de pneus (Cd e Zn) e de peças metálicas dos veículos (Cr, Cu e Fe) (Monaci et al. 2000).

Desta forma, a planta *T. pallida* também demonstra ser eficiente no monitoramento da qualidade do ar através de alterações morfofisiológicas como, acúmulo de elementos químicos, redução no crescimento e espessura das folhas (Santos 2012).

4.7.Eficiência Fotossintética

Uma ampla variedade de fatores como a ação tóxica de poluentes, podem influenciar nos parâmetros fisiológicos como a eficiência quântica fotoquímica das plantas, refletindo as condições ambientais em que a planta se desenvolve. Por esta razão, a fluorescência da clorofila tem sido usada para estudar mecanismos de estresses sofridos pelas plantas, sendo, portanto, um potencial indicador das condições adversas do ambiente (Silva et al. 2011).

A fotossíntese depende de pigmentos fotossintéticos que absorvem a energia luminosa e alteram temporariamente as suas condições eletrônicas, ou seja, passam do estado basal para o excitado, instável e de vida curta. Desta maneira, após receberem os fótons, os pigmentos dissipam esta energia proveniente da luz por meio de três vias, dissipação fotoquímica (Ph), dissipação não-fotoquímica, ou seja, produção de calor (D) e fluorescência (F). A fluorescência, em temperatura ambiente, emite uma luz com ponto máximo de emissão na faixa de 682 nm e outro ponto menos pronunciado em 740 nm (Krause e Weis 1984).

A emissão da fluorescência acontece quando o excesso de energia luminosa absorvida pela clorofila *a* é dissipada, sendo reemitida como luz. Quando um tecido fotossintetizante, previamente adaptado no escuro, é rapidamente iluminado, após um nível de fluorescência mínimo (F_0) ocorre um aumento máximo da fluorescência (F_m). A razão F_v/F_m , é a mais importante variável e esta diretamente relacionada com a eficiência fotoquímica do fotossistema II (PSII) em que F_m é a fluorescência máxima e F_v é a fluorescência variável, que é obtida pela diferença entre a F_m-F_0 . O F_0 representa a fluorescência inicial, que pode ser alterado por estresses do ambiente (Araújo et al. 2004).

As medições da fluorescência da clorofila *a* têm sido difundidas por ser um método simples, rápido, sensível e não destrutivo, além de permitir a análise qualitativa e quantitativa da absorção, aproveitamento da energia luminosa pelo fotossistema II e possíveis relações com a capacidade fotossintética (Mouget e Tremblin 2002). Mensurações da clorofila *a*, são frequentemente utilizadas para avaliar a eficiência

fotoquímica e o estado fisiológico das plantas quando expostas ao efeito tóxico de poluentes ou de estresses ambientais (Baker e Rosenqvist 2004).

Conclusão

Com base na revisão de literatura pode-se concluir que a *Tradescantia* demonstra ser uma planta altamente sensível e um excelente organismo teste devido sua ampla variedade de bioensaios e características favoráveis, sendo considerada um elemento essencial no biomonitoramento de ambientes degradados.

5. Referências:

Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Loo DJA (2001) Estudo Anatômico Foliar do Clone Híbrido 4430 de *Tradescantia*: Alterações Decorrentes da Poluição Aérea Urbana. Rev Bras Botân 24:567-576.

Araújo RA, Siqueira DL, Martinez CA, Fernandes AR (2004) Características Biométricas, Índice SPDA-502 e emissão de fluorescência em porta enxertos de citros. Rev Ceres 51:189-199.

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

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. J Exp Bot 55:1607-1621.

Betti C, Loprieno TDLG, Barale R (1994) Microgel electrophoresis assay (Comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects, Mutat Res 307:323-333.

Carneiro RMA, Takayanagui AMM (2009) Estudos sobre bioindicadores vegetais e poluição atmosférica por meio de revisão sistemática da literatura. Rev Bras Ciênc Amb 13.

Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2014). Histórico. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/institucional/institucional/52-Hist%C3%B3rico>>. Acessado 04 de Novembro de 2014.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (2014) 1º Diagnóstico de monitoramento da qualidade do ar no Brasil. Disponível em:

<http://www.energiaeambiente.org.br/documentos/diagnosticoQualidadedoAr-VersaoFinal-Std.pdf>. Acessado 04 de Novembro de 2014.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (1989). Resolução nº 005 de 1989. Dispõe sobre o Programa Nacional de Controle da Poluição do Ar – PRONAR. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res89/res0589.html>. Acessado em 20 de Outubro de 2014.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (1986). Resolução nº 018 de 1986. Dispõe sobre a criação do Programa de Controle de Poluição do Ar por veículos Automotores – PROCONVE. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p. 8792-8795, 1986. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res1886.html>. Acessado 20 de Outubro de 2014.

Conselho Nacional do Meio Ambiente (1990). Resolução Conama nº 03, de 28 de Junho de 1990. Estabelece padrões primários e secundários de qualidade do ar e critérios de classificação e episódios críticos de poluição do ar. Diário Oficial da União, Brasília.

Costa GM, Droste A (2012) Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, southern Brazil. *Braz J Biol* 72:801-806.

Crispim BA, Vaini JO, Grisolia AB, Teixeira TZ, Mussury RM, Seno LO (2011) Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int* 19:718-723.

Departamento Nacional de Trânsito (2013). Frota de veículos no ano de 2013. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>. Acessado em 10 de Novembro de 2014.

Duan CQ, Hu B, Wang ZB, Wen CH, Yan SQ, Jiang XH, Wang DK, Li Q, Liang XF (1999) *Tradescantia* bioassays for the determination of genotoxicity of water in the Panlong River, Kunming, People's Republic of China. *Mut Res* 426:127-31.

Fahn A (1986) Structural and Functional Properties of Trichomes of Xeromorphic leaves. *Ann Bot* 57:631-637.

Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mut Res* 310:175- 185.

Guimarães ET, Domingos M, Alves ES, Caldini Jr N, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Saldiva PHN (2000) Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Experimen Bot* 24:1- 8.

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

Instituto do Meio Ambiente e Recursos Hídricos (2014). Monitoramento, qualidade do ar. Disponível em: <http://www.inema.ba.gov.br/servicos/monitoramento/qualidade-do-ar-direciona-para-a-pagina-da-cetrel/>. Acessado em 21 de Outubro de 2014.

Instituto Ambiental do Paraná (2014). Monitoramento da qualidade do ar. Disponível em: <http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=639>. Acessado em 21 de Outubro de 2014.

Instituto de Energia e Meio Ambiente (2014). 1º Diagnóstico da rede de monitoramento da qualidade do ar no Brasil. Abril de 2014. Brasília: IEMA, 2014. 277 p. Disponível em: <http://www.energiaeambiente.org.br/documentos/diagnosticoQualidadedoAr-VersaoFinal-Std.pdf>. Acessado em: 20 de Outubro de 2014.

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

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

Krause H, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Res* 5:139-157.

Leite KAS, Zandonato VV, Fluminhan A (2013) Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv *purpurea* através do Ensaio do Cometa. *IX Fórum Ambiental da Alta Paulista* 9:399-417.

Lima ES, Souza SR, Domingos M (2009) Sensitivity of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. 'Purpurea' to genotoxicity induced by ozone. *Mut Res* 675:41-45.

Ma TH (1981) *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environ health perspect* 37:85-90.

Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone MF (1994) *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mut Res* 310:221-230.

Martins LC, Latorre MRDO, Cardoso MRA, Gonçalves FLT, Salvida PHN, Braga ALF (2002) Air Pollution and Emergency Room Visits due to Pneumonia and Influenza in São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 36:88-94.

Meireles JRC, Cerqueira EMM (2011). Use of the Micronucleus Test on *Tradescantia* (*Trad-MCN*) to Evaluate the Genotoxic Effects of Air Pollution, *Air Pollution – New Developments*. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/air-pollution-new-developments/use-of-the-micronucleus-test-ontradescantia-trad-mcn-to-evaluate-the-genotoxic-effects-of-air-pollu>. Acessado em 06 de Março de 2014.

Ministério do Meio Ambiente (2014). Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas por veículos Automotores Rodoviários 2013, ano base 2012. Janeiro de 2014. Disponível em: http://www.feam.br/images/stories/inventario/inventario_Ar/2014-05-27%20inventrio%202013.pdf. Acessado em 12 de Outubro de 2014.

Monaci F, Moni F, Lanciotti E, Grechi D, Bargagli R (2000) Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emissions, in place of lead. *Environ Pollut* 107:321-327.

Mouget J, Tremblin G (2002) Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Bot* 74:219-231.

Mulgrew A, Williams P (2000) Biomonitoring of air quality using plants. Berlin: WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control/Federal Environmental Agency-Germany 10.

Onursal B, Gautam SP (1997) Vehicular Air Pollution: Experiences from Seven Latin American. World Bank Technical Paper 373.

Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Res Communicat* 123:291-298.

Patussi C, Bündchen M (2013) Avaliação in situ da genotoxicidade de triazinas utilizando o bioensaio Trad-SHM de *Tradescantia* clone 4430. *Ciênc e Saúde Coletiva* 18:1173-1178.

Rajaguru P, Fairbairn LJ, Ashby J, Willington MA, Turner S, Woolford LA, Chinnasamy N, Rafferty JA (1999) Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *Mut Res* 444:175-180.

Rodriguez JH, Weller SB, Wannaz ED, Klumpp A, Pignat ML (2011) Air quality biomonitoring in agricultural areas nearby to urban and industrial emission sources in

Córdoba province, Argentina, employing the bioindicator *Tillandsia capillaris*. *Ecological Indicators* 11:1673–1680.

Santos APM (2012) Biomonitoramento vegetal da qualidade do ar em Ribeirão Preto – SP. Dissertação, Universidade de São Paulo.

Savóia E JL. Potencial de *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* para biomonitoramento da poluição aérea de Santo André [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007.

Silva PEM, Santiago EF, Silva EM, Suárez YR, Daloso DM (2011) Fluorescência da clorofila-a e variação da simetria como ferramentas de investigação de plantas sob estresse. *Idesia* 29:45-52.

Singh N, McCoy M, Tice R, Schneider L (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-199.

Sparrow AH, Schairer LA (1974) The effects of chemical mutagens and specific air pollutants (O₃, SO₂, NO₂, N₂O) on somatic mutation rate in *Tradescantia*, In: Bubinin, N.P. Genetic effects of pollution in the environment. Institute Obshchei Genetiki.

Venâncio RSS, Dilarri G, Mendes CR, Martins AO (2014) Utilização de *Tradescantia* para avaliar o potencial mutagênico de poluentes atmosféricos. *Scientia Vitae*, 2, 6.

Ventura L, Giovannini A, Savio M, Donà M, Macovei A, Buttafava A, Carbonera D, Balestrazzi A (2013) Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere* 92:1-9.

Zeiger E (2006) The Effect of Air Pollution on Plants. *Plant Physiology* 5.

CAPÍTULO II

Artigo submetido 06/02/2015, na revista *Ecotoxicology and Environmental Safety*, ISSN 0147-6513. Carta de submissão (Anexo III).

Instabilidade genética em plantas associado ao tráfego de veículos e a variáveis climáticas

Instabilidade genética em plantas associado ao tráfego de veículos e a variáveis climáticas

Juliana Caroline Vivian Sposito^a, Bruno do Amaral Crispim^a, Rosilda Mara Mussury^b,
Alexeia Barufatti Grisolia^{b,*}

^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados – MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, MS, Brasil.

*Correspondência do autor: Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Tel.: +55 67 34102223. *E-mail*: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br (Grisolia, AB).

Resumo

A fim de caracterizar o efeito do tráfego de veículos na qualidade do ar, foram mensurados a quantidade de micronúcleos em *Tradescantia pallida* no município de Dourados, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Inflorescências jovens de *T. pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* foram coletadas nos anos de 2010, 2011, e 2012 em três locais caracterizados pela intensidade de tráfego de veículos automotores diferenciados. Para análise de Trad-MCN foi utilizado metodologia padronizada, a fim de avaliar o potencial mutagênico dos poluentes atmosféricos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de correlação linear de Pearson, para as variáveis climáticas e número micronúcleos. O aumento no número médio de veículos durante o estudo foi associado ao aumento na frequência de micronúcleos. No entanto, as análises mostraram que fatores climáticos também são fatores significativos na formação de micronúcleos, embora o tráfego de veículos seja a variável mais importante. Desta forma, o teste de micronúcleo em *Tradescantia* demonstrou ser um método útil de avaliação da qualidade do ar.

Destaques da pesquisa

- Estudamos sobre o aumento da poluição atmosférica na cidade de Dourados, MS.
- Determinamos a associação de micronúcleos em *Tradescantia pallida* com o tráfego de veículos ao longo de três anos consecutivos.
- O biomonitoramento da qualidade do ar irá fornecer informações sobre os efeitos prejudiciais causados nos organismos vivos.
- Fatores climáticos também influenciaram na formação de micronúcleos.
- Os efeitos observados em *Tradescantia* podem ser útil na avaliação da qualidade do ar.

Palavras-chave: Micronúcleos; poluição atmosférica; *Tradescantia*; umidade

1. Introdução

A contaminação e a poluição atmosférica resultante da atividade humana são causados pela intensa atividade industrial e tráfego veicular (Rodriguez et al. 2011). Devido o aumento das atividades antrópicas, a emissão de poluentes atmosféricos aumentou substancialmente nas últimas décadas, influenciando diretamente na qualidade do ar e afetando a saúde dos seres humanos, paisagem, clima, plantas e animais (Kanakidou et al. 2011).

As plantas têm sido frequentemente utilizadas no biomonitoramento por apresentarem uma série de vantagens em relação aos métodos convencionais, como: maior número de amostragens, baixo custo operacional, maior sensibilidade e avaliação de dano cromossômico em preparações citológicas de rápida execução. A técnica fornece informações sobre os níveis de contaminantes atmosféricos provenientes da indústria além das práticas urbanas e domésticas (Catinon et al. 2008). Variáveis climáticas, tais como temperatura e umidade relativa também podem influenciar na quantidade de

poluentes dispersos na atmosfera, os quais podem contribuir para instabilidade genética (Pereira et al., 2013a).

O ensaio de micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN), consiste em detectar micronúcleos (MCN) em tétrades em fase de meiose. Agentes clastogênicos, podem causar quebras cromossômicas e aberrações cromossômicas (Carvalho, 2005). Segundo Lindberg (2007), os micronúcleos são estruturas pequenas e arredondadas, que se formam a partir de quebras cromossômicas ou perda de cromossomos inteiros, que não foram ligados ao fuso na divisão celular durante a meiose dos grãos de pólen. Este trabalho utilizou MCN como identificadores de danos genotóxicos em *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt var. *purpurea*.

O teste Trad-MCN tem sido empregado em diversos trabalhos científicos, e tem apresentado vantagens, incluindo simplicidade na metodologia, fácil acesso ao material biológico e sensibilidade da planta à exposição a agentes genotóxicos. Desta forma, o teste Trad-MCN, permite detectar danos cromossômicos a ser avaliada em preparações citológicas rápidas e é uma ferramenta importante para a detecção de efeitos clastogênicos resultantes de poluentes atmosféricos (Pereira et al., 2013b).

A poluição atmosférica tem aumentado na cidade de Dourados (MS - Brasil), e é importante entender os efeitos desse aumento, bem como a realização de biomonitoramento ambiental para analisar os efeitos causados nos organismos vivos. O presente trabalho analisou a quantidade de MCN em *T. pallida* e determinou a associação de MCN com o tráfego de veículos ao longo de três anos consecutivos.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo e período de coleta

Três canteiros ornamentados com *T. pallida*, localizados em diferentes pontos da cidade de Dourados-MS, Brasil, apresentando tráfego de veículos automotores diferenciado, foram utilizados neste estudo. Nesses locais, o número de veículos foi avaliado por três vezes, 7-8 h, 12-13 h, e 17-18 h durante o mesmo dia, em 2010, 2011 e 2012. Os pontos foram localizados na S 22° 14 867' W 054° 48 286' (local 1); S 22° 13 136' W 054° 48 588' (local 2); e S 22° 11 796' W 054° 56 025' (local 3) (Fig. 1).



Figura 1. Mapa de Dourados, MS, Brasil, mostrando os três locais monitorados (local 1, local 2 e 3)

Dados das condições meteorológicas (temperatura e umidade relativa) em que as plantas foram expostas durante cada período de biomonitoramento, foram realizados utilizando o equipamento Termohigrômetro digital (Mimipa). Inflorescências jovens de *T. pallida* foram coletadas entre os meses de maio a agosto, em cada um dos três anos de

estudo. As inflorescências foram fixadas em solução Carnoy e transferidas após 24 horas, para etanol a 70%.

2.2 Teste Trad-MCN

Metodologia adaptada proposta por Ma (1981) foi utilizada para o processamento do material biológico. Cinco lâminas foram preparadas a partir de cada local de amostragem (1, 2 e 3), totalizando 60 lâminas para cada ano (2010, 2011 e 2012). Um número de 300 tétrades foram contadas, em microscópio (Bioval) de 400X, e o número médio de micronúcleos calculado para cada local de amostragem.

2.3 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 (ano) x 4 (coleta/mês) x 3 (locais), com 5 repetições. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A análise de correlação linear de Pearson foi utilizada para as variáveis climáticas e frequência de micronúcleos.

3. Resultados e discussão

O número médio de MCN observado em tétrades de *T. pallida* durante os três anos consecutivos, e nos três locais de amostragem distintos, mostraram que ao longo do tempo, o número de MCN aumentou de maneira diretamente proporcional à intensidade do tráfego de veículos, a temperatura, e a umidade relativa do ar em cada local de amostragem. O número de veículos automotores em cada local variou anualmente durante o período de estudo. O número médio de veículos automotores que passou pelo local 1 foi de 1.700 (tráfego intenso), no local 2 foi de 900 (tráfego leve), e no local 3 foi de 30 (tráfego mínimo) durante os três anos consecutivos. Os resultados da qualidade do ar,

obtidos nos anos de 2010, 2011 e 2012 mostram que o ensaio Trad-MCN pode efetivamente estimar a instabilidade genética determinada por variações na intensidade do tráfego veicular, corroborando as observações anteriores (Crispim et al, 2014; Misik et al. de 2011; Pereira et al, 2014).

Utilizando à análise de variância, verificou-se que as três variáveis; ano, coleta e local (1274.69***, 325.99***, e 5961.74***, respectivamente, onde *** denota $p < 0.001$), quando analisadas individualmente, foram significativas. Porém, na interação tripla, as variáveis não apresentaram significância (-107.61). A interação dupla ano/coleta (460.76***) e ano/ponto (333.84***) foram significativas.

Em 2010 e 2011, não houve diferença estatística no número de MCN nos diferentes meses. Em 2012, no entanto, no mês de Maio foi observado maior número médio de MCN (36,13), em relação aos outros meses (Tabela 1). Entre Junho e Agosto de 2012, o número de MCN não aumentou em relação aos anos anteriores (Tabela 1).

Tabela 1 Número médio de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* em 2010, 2011, e 2012 durante diferentes meses de coleta, e diferença estatística (Teste de Tukey a nível de 5% de significância).

| Meses de coleta | 2010 | 2011 | 2012 |
|-----------------|----------|----------|------------|
| Maio | 14,80 Ac | 23,67 Ab | 36,13 Aa |
| Junho | 15,53 Ab | 22,87 Aa | 20,93 BCab |
| Julho | 16,60 Ab | 24,93 Aa | 14,60 Cb |
| Agosto | 16,60 Ab | 24,06 Aa | 23,73 Ba |

Médias seguidas por letras minúsculas na linha, ou por letras maiúsculas na coluna, não diferem significativamente.

Este resultado pode estar associado aos altos níveis de umidade relativa do ar, causando a dispersão dos poluentes e, portanto, menor número de MCN. De acordo com

Pereira et al. (2013a), o aumento na umidade relativa, reduz o número de partículas na atmosfera, resultando em uma correlação negativa entre a precipitação e o número de MCN.

Tabela 2 mostra que, o número médio de MCN foi maior no local 1 em 2011. Nos locais 2 e 3, verificou-se um aumento significativo no número de MCN ao longo dos três anos. O menor número médio de MCN foi observado no local 3, que corresponde ao menor fluxo veicular, em relação aos outros locais.

Tabela 2 Número médio de micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* em 2010, 2011, e 2012 nos diferentes locais, e diferenças estatísticas (Testes de Tukey a nível de 5% de significância).

| Locais | 2010 | 2011 | 2012 |
|--------|----------|----------|----------|
| 1 | 22,45 Aa | 35,40 Aa | 28,10 Aa |
| 2 | 19,55 Ac | 27,85 Ba | 28,30 Ab |
| 3 | 5,65 Bb | 8,40 Cb | 15,15 Ba |

Médias seguidas por letras minúsculas na linha, ou por letras maiúsculas na coluna, não diferem significativamente.

Como pode ser visto na Tabela 2, o local 1 mostrou um aumento no número de MCN no ano de 2011 (35,40), sendo também observado maior intensidade no tráfego de veículos neste ano, em comparação com 2010 e 2012. Assim, o aumento da instabilidade genética, está associado ao efeito genotóxico dos poluentes. Este resultado também foi relatado por Pereira et al. (2013b), que verificaram que o número de MCN foi maior em locais com tráfego de veículos mais intenso.

Estes resultados corroboram com estudo de Costa & Droste (2012) que observaram correlação entre o tráfego de veículos intenso e maiores ocorrências de micronúcleos em *T. pallida*. De acordo com Alvarenga et al. (2009), intervenções

instaladas nas ruas como lombadas eletrônicas a fim de alterar o perfil de velocidade dos veículos, aumenta a quantidade de poluentes atmosféricos decorrente da aceleração dos automóveis e conseqüentemente queima de combustíveis. Desta forma, é possível atribuir o aumento de eventos genotóxicos nos pontos 1 e 2 (Hayel Bom Faker e Ponta Porã respectivamente), por serem locais próximos a lombadas eletrônicas.

O local 3, possui o menor tráfego veicular em relação aos demais locais monitorados, porém, observou-se aumento significativo no número de MCN ao longo dos três anos. Este resultado pode ser justificado pelo crescimento do fluxo de veículos, determinado pelo aumento considerável da população estudantil universitária nas proximidades. As análises de MCN sugerem que a poluição do ar não foi o único fator associado com a instabilidade genética em tétrades de *T. pallida*; fatores climáticos, como umidade relativa do ar, temperatura e precipitação também foram indicadores significativos na formação MCN (Meireles et al., 2009).

A Figura 2 mostra a correlação entre temperatura, umidade relativa, e o número de MCN para cada local de amostragem ao longo dos três anos de estudo. Os dados apresentados na figura 2 sugerem que baixos níveis de umidade afetam positivamente o número médio de MCN. Os números mais baixos de MCN observados nos anos de 2010 e 2012 podem ser atribuídos aos níveis mais elevados de precipitação nesses anos. Em 2011, os dados de umidade relativa e temperatura foram significativamente menores, sendo observado maior número de MCN.

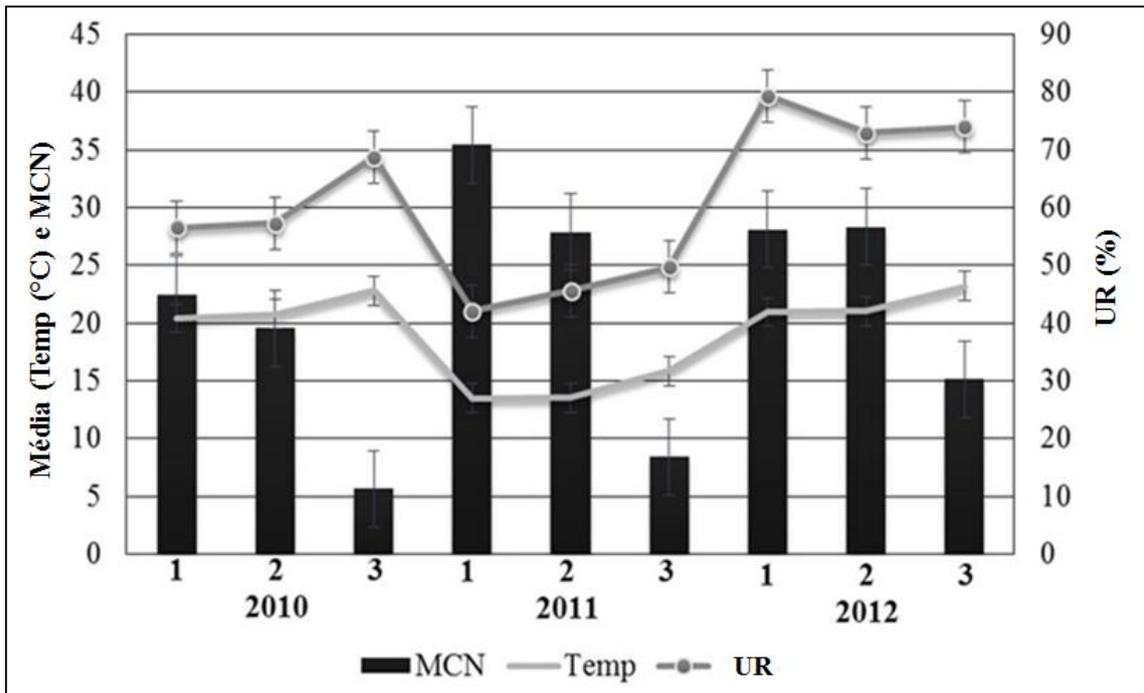


Figura 2. Temperatura, umidade relativa (UR) e número médio de micronúcleos (MCN) nos locais 1, 2 e 3 durante 2010, 2011, e 2012.

Os resultados de correlação linear indicaram que houve uma associação negativa entre umidade relativa ($r = -0,99$ e $p = 0,006$) e número de micronúcleo, bem como entre temperatura ($r = -0,99$ e $p = 0,01$) e micronúcleo em 2010. Em relação a 2011, não foi observada nenhuma associação significativa. No ano de 2012, foi possível observar o mesmo resultado para temperatura ($r = -0,99$ e $p = 0,02$) e micronúcleo.

Os resultados do presente estudo corroboram com os de Pereira et al. (2013a), os quais permitem concluir que, apesar de fatores climáticos terem influência positiva sobre a instabilidade genética em tétrades de *T. pallida* ao longo dos anos, o fator determinante para os danos foi o aumento do tráfego de veículos nos locais monitorados. Estes resultados mostram que o teste Trad-MCN em *T. pallida*, é uma opção viável para o biomonitoramento da genotoxicidade do ambiente.

4. Conclusão

Os baixos índices de temperatura e umidade relativa do ar podem aumentar à incidência de poluentes atmosféricos. O estudo confirmou que a intensidade do tráfego de veículos, é outro fator importante responsável pelo aumento do número de MCN. Tendo em conta que muitos estudos têm demonstrado a eficiência do ensaio Trad-MCN para o biomonitoramento da qualidade do ar, propomos, com base no presente trabalho, que esta técnica deve ser incluída como um parâmetro adicional na avaliação da qualidade do ar nas cidades, bem como a critérios físico-químicos habituais.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico.

6. Referências

Alvarenga, G.S., Viveros, H.P., Canale, A.C., 2009. Study on the impact tolling in increasing the trip time in fuel consumption and pollutant generation. *Rev. Minerva* 6, 263-271.

Catinon, M., Ayrault, S., Daudin, L., Sevin, L., Asta, J., Tissut, M., Ravanel, P., 2008. Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. *Atmos. Environ.* 42, 1223–1238.

Carvalho, H.A., 2005. The *Tradescantia* as vegetable bioindicator in monitoring clastogenic effects of ionizing radiation. *Radiol. Bras.* 38, 459-462.

Costa, G.M., Droste, A., 2012. Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, southern Brazil. *Braz. J. Biol.* 72, 801-806.

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

Crispim, B.A., Sposito, J.C.V., Grisolia, A.B., Mussury, R.M., Seno, L.O., 2014. Effects of atmospheric pollutants on somatic and germ cells of *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. HUNT cv. *Purpurea*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86, 1899-1906.

Kanakidou, M., Mihalopoulos, N., Kindap, T., Im, U., Vrekoussis, M., Gerasopoulos, E., Dermitzaki, E., Unal, A., Koçak, M., Markakis, K., Melas, D., Kouvarakis, G., Youssef, A.F., Richter, A., Hatzianastassiou, N., Hilboll, A., Ebojje, F., Wittrock, F., Savigny, C.V., Burrows, J.P., Weissenmayer, A.L., Moubasher, H., 2011. Megacities as hot spots of air pollution in the East Mediterranean. *Atmos. Environ.* 45, 1223-1235.

Lindberg, H.K., Wang, X., Järventaus, H., Falck, G.C.M., Norppa, H., Fenech, M., 2007. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat. Res.* 617, 33-45.

Ma, T.H., 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental health perspectives* 37, 85-90.

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

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

Pereira, B.B., Campos Júnior, E.O., Lima, E.A.P., Barrozo, M.A., Morelli, S., 2014. Biomonitoring air quality during and after a public transportation strike in the center of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil by *Tradescantia micronucleus* bioassay. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 3680-3685.

Pereira, B.B., Campos Júnior, E.O., Morelli, S., 2013a. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia micronucleus* assay. *Ecotoxicol Environ Safety* 87, 17–22.

Pereira, T.S., Beltrami, L.S., Rocha, J.A.V., Broto, F.P., Comellas, L.R., Salvadori, D.M.F., Vargas, V.M.F., 2013b. Toxicogenetic monitoring in urban cities exposed to different air borne contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 90, 174–182.

Rodriguez, J.H., Weller, S.B., Wannaz, E.D., Klumpp, A., Pignata, M.L., 2011. Air quality biomonitoring in agricultural areas nearby to urban and industrial emission sources in Córdoba province, Argentina, employing the bioindicator *Tillandsia capillaris*. *Ecol. Indic.* 11, 1673–1680.

CAPÍTULO III

O Capítulo III foi apresentado de acordo com as normas da revista Environmental Pollution, descritas no Anexo II.

Biomonitoramento de danos genéticos e da capacidade fotossintética associada a poluentes atmosféricos

Biomonitoramento de danos genéticos e da capacidade fotossintética associada a poluentes atmosféricos

Juliana Caroline Vivian Spósito^a, Alexéia Barufatti Grisolia^{b,*}

^a Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados – MS, Brasil.

^b Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados, MS, Brasil.

*Correspondência do autor: Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brasil. Tel.: +55 67 34102223. E-mail: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br (Grisolia, AB).

RESUMO

O objetivo do estudo foi monitorar o potencial mutagênico e genotóxico do ar atmosférico e analisar a capacidade fotossintética associado ao tráfego veicular, em *Tradescantia pallida* var. *purpurea*, em cidades localizadas na Região da Grande Dourados, MS. Biotestes de mutagenicidade (micronúcleo), genotoxicidade (ensaio do cometa) e de Fluorescência foram mensurados em *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea*. A partir dos dados de Fluorescência, Fluorescência máxima (Fm) e Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II – PSII (Fv/Fm), foi possível verificar que houve interação significativa entre Fv/Fm x Tráfego e Fv/Fm x Cidade. Contudo, para Fm, não foram verificados valores significativos. Baseado nos testes de MCN e Cometa foi observado número de danos genéticos diferenciados para cada cidade monitorada, sendo verificado que a cidade de Dourados apresentou a maior frequência de danos para ambos os testes. Também foi observado diferença significativa entre os meses, sendo verificado maior número de danos nos meses de Setembro e Novembro, em relação aos demais meses monitorados. Com base nos resultados da análise de correlação foi observado que as variantes: tráfego, fatores climáticos e período de coleta, foram parâmetros relevantes para a ocorrência de danos genéticos. Os resultados confirmam a sensibilidade da planta *T. pallida* à presença de agentes genotóxicos nos ambientes, proveniente da emissão de gases por veículos automotores, a qual é altamente variável dependendo da cidade em estudo, sendo os danos genotóxicos e mutagênicos sobre as plantas também diversos. Contudo, não foi verificada relação entre os testes Trad-MCN e Cometa com os dados de Fluorescência, sendo necessário mais estudos visando minimizar variáveis que possam ter provocado outros tipos de estresse. Também foi possível observar que fatores abióticos como temperatura e umidade também são variantes importantes na determinação da presença de agentes genotóxicos na atmosfera.

Palavras chave: Poluição atmosférica; Tráfego; *Tradescantia pallida*.

1. Introdução

Fatores de estresse para as plantas como deficiência nutricional de oxigênio para as raízes, déficit hídrico, salinidade, resfriamento, calor e poluição atmosférica, geralmente estão inter-relacionados e podem estar acompanhados de respostas celulares, bioquímicas e moleculares por parte das plantas (Crispim et al. 2012; Klumpp et al. 2000).

O biomonitoramento tem sido utilizado como método capaz de detectar efeitos causados por fatores estressantes sobre os organismos vivos, denominados bioindicadores (Lopes, Salles e Barbério 2012). Dentre os bioindicadores, as plantas têm sido frequentemente utilizadas por fornecerem informações importantes sobre os níveis de contaminantes e apresentarem vantagens em relação aos métodos convencionais (Catinon et al. 2008).

Entre os bioensaios empregados na avaliação dos efeitos dos poluentes ambientais, destaca-se o Ensaio de Cometa e o Teste de Micronúcleo em seres vivos, ambos considerados ferramentas relevantes na avaliação da qualidade ambiental e na detecção de alterações no material genético (Boettcher et al. 2010).

O teste Trad-MCN, consiste na estimativa da frequência de micronúcleos, sendo que o número de micronúcleos relacionado à concentração de poluentes (Bortoli, Azevedo e Silva 2009). O Ensaio do Cometa permite detectar níveis de danos no DNA em diferentes tipos de células, por meio da migração de fragmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Desta forma, as células observadas recebem uma classificação de dano, em relação a extensão da migração dos fragmentos (Collins 2004; Speit e Hartmann 2005).

A ação tóxica de poluentes, podem inibir processos biológicos nas plantas tais como a concentração de pigmentos fotossintéticos. Por esta razão, a fluorescência da clorofila *a* também tem sido utilizado como parâmetro no estudo de toxicidade de diferentes contaminantes, sendo, indicador da eficiência fotoquímica e o estado fisiológico das plantas quando expostas ao efeito tóxico de poluentes ou de condições adversas do ambiente (MacFarlane e Burchett 2001, Duke e Watkinson 2002).

Devido à ausência de estudos que avaliem o risco genotóxico causado pelo tráfego veicular, em cidades localizadas no sul do Estado do Mato Grosso do Sul, o presente trabalho teve como objetivo monitorar o potencial mutagênico e genotóxico do ar atmosférico e analisar a capacidade fotossintética em *Tradescantia pallida* var. *purpurea* associado a poluição atmosférica por veículos automotores, na Região da Grande Dourados.

2. Material e métodos

2.1 Área de estudo

A Região da Grande Dourados, localizada no sul do Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil, possui aproximadamente 377.842 habitantes e 207.710 veículos, concentrando grande parte da frota veicular do Estado (DENATRAN 2014; IBGE 2014). A região é constituída por 12 municípios: Caarapó, Deodápolis, Douradina, Dourados, Fátima do Sul, Glória de Dourados, Itaporã, Jateí, Juti, Nova Alvorada do Sul, Rio Brilhante, Vicentina e Mata, utilizada como ponto controle (Figura 1).

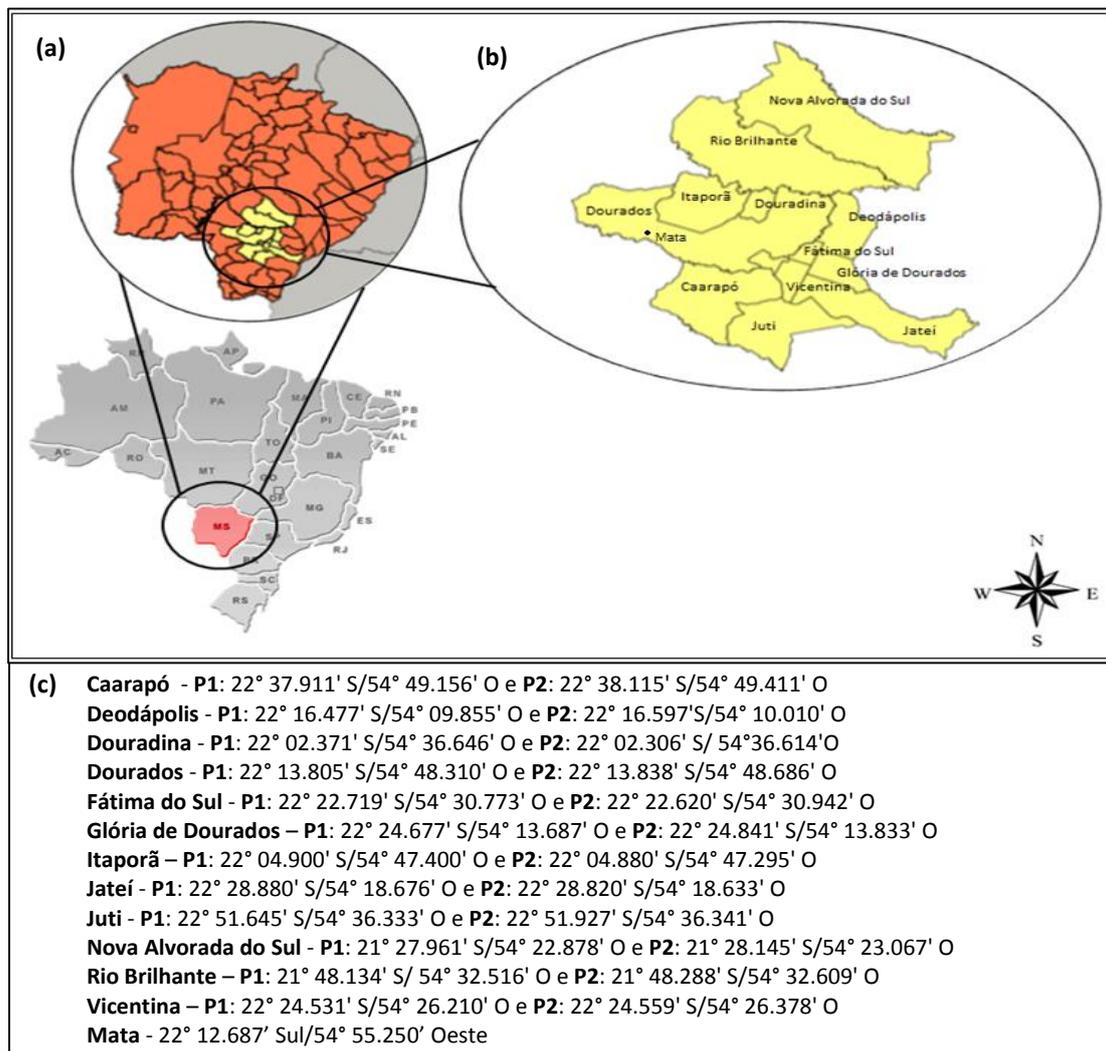


Figura 1: Distribuição espacial do local de estudo, delimitando a Região da Grande Dourados (a), cidades estudadas (b), coordenadas geográficas dos pontos de estudo (c).

O experimento foi realizado em condições de campo, sendo selecionado dois pontos distintos para cada cidade, priorizando locais onde espécies da planta *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom, utilizada para este estudo era cultivada.

Os bioindicadores foram expostos em locais: sem fontes locais de poluição atmosférica e/ou próximo a ruas movimentadas com alto tráfego (carros, motos, caminhões, carretas, veículos de transporte público, entre outros).

2.2 Contagem de veículos

Os pontos das cidades foram avaliados quanto ao fluxo veicular (sem distinção quanto ao tipo de veículo) que trafegavam nesses locais em três períodos do dia, 8h-9h, 11h-12h e 16h-17h, durante um único dia, do mês de Dezembro. Para realização da análise estatística de correlação, foi calculada a média do tráfego veicular dos três períodos de contagem de cada cidade estudada.

2.3 Teste de Micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN)

O teste Trad-MCN foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Ma et al. (1994). Inflorescências jovens foram coletadas nos meses de Março, Maio, Julho, Setembro e Novembro de 2014, e fixadas em solução Carnoy (etanol 3: 1 ácido acético) por 24 horas e posteriormente conservadas em álcool 70%, até o processamento das amostras. Para cada ponto amostral foram preparadas três lâminas, perfazendo um total de seis lâminas por cidade, para cada período de coleta. Lâminas de *T. pallida* foram coradas com Carmim 2%, sendo realizada contagem e análise de micronúcleos em 300 tétrades de cada lâmina (1800 tétrades por cidade) em microscópio óptico (Bioval) no aumento de 400 x. Os resultados foram expressos em percentual (frequência de micronúcleos em 100 tétrades).

2.4 Ensaio Cometa

Para realização do Ensaio do Cometa foi utilizada metodologia adaptada proposta por Boettcher et al. (2010). Folhas de *T. pallida* foram coletadas nos meses de Maio, Julho, Setembro e Novembro e armazenadas em sacos plásticos sob-refrigeração até o processamento das amostras. As folhas foram lavadas com água destilada e maceradas com auxílio de pistilo. Posteriormente, foram acrescentados aos tecidos foliares, 1ml de solução salina (PBS) e 500µl de EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). Foram diluídos 60µl de cada amostra em 20µl de solução salina (PBS). Duas lâminas de cada ponto amostral foram confeccionadas com 80 µl de suspensão celular e 200 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5 % (v/v) a 37 °C. Lâminas permaneceram em solução de lise, à 4 °C, por 1 hora. Após a lise, as lâminas foram armazenadas em solução tampão NaOH

0,3 mol L⁻¹ e EDTA 0,001 mol L⁻¹ (pH>13) por 20 minutos e submetidas à eletroforese a 25 V, 300 mA, por 30 minutos. Após a eletroforese, lâminas foram neutralizadas com Tris 0,4 mol L⁻¹ por 15 minutos, fixadas em etanol por 10 minutos e coradas com brometo de etídeo (0,02 mol L⁻¹). Um total de 100 nucleóides de cada lâmina foi observado em microscópio de fluorescência (Labomed - T121100) na objetiva de 400x, por um único observador.

As células foliares foram classificadas visualmente de acordo com o tamanho da “cauda”; classe 0 (células sem dano), classe 1 (células ligeiramente danificado), classe 2 (dano intermediário, apresentam cauda com tamanho inferior ao diâmetro da cabeça), classe 3 (células apresentam cauda com tamanho equivalente a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça), classe 4 (não é possível observar a cabeça do cometa, altamente danificado) (Figura 2).

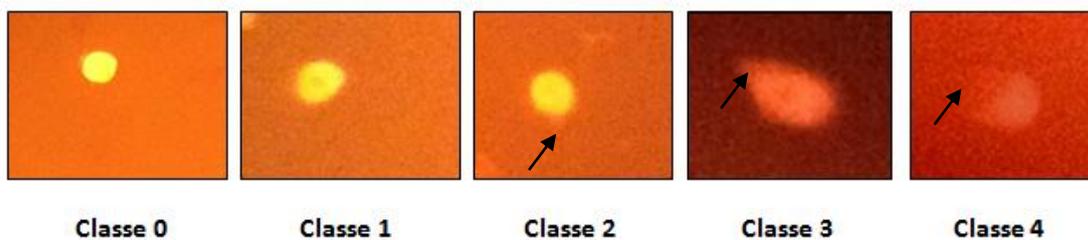


Figura 2: Classificação de danos no DNA em células foliares, por meio da eletroforese em gel de célula única (Ensaio do Cometa). Cauda dos cometas apontados pela seta.

A partir dos dados do Ensaio do Cometa, foi calculada a média das repetições (duas lâminas) de cada ponto e em seguida dos pontos amostrais de cada cidade. Posteriormente para cada cidade foi calculado dois parâmetros de avaliação: Índice de Dano (ID), definido como o dano total sofrido pelo indivíduo e a Frequência de Dano (FD), definida como o número de células que sofreram algum tipo de dano expresso em percentagem. Para o cálculo do Índice de Dano admite-se a seguinte fórmula: $ID = [(N^{\circ} \text{ de cometas classe } 0 \times 0) + (N^{\circ} \text{ de cometas classe } 1 \times 1) + (N^{\circ} \text{ de cometas classe } 2 \times 2) + (N^{\circ} \text{ de cometas classe } 3 \times 3) + (N^{\circ} \text{ de cometas classe } 4 \times 4)]$. Assim, o Índice de dano variou entre a pontuação 0 (sem dano) a 400 (dano máximo).

$$ID \text{ (ua)} = \frac{N1 + 2N2 + 3N3 + 4N4}{S/100}$$

Onde, ID = Índice de danos no DNA; ua = unidade arbitrária; N1 – N4 = nucleóides nas classes 1, 2, 3 e 4; S = número de nucleóides analisados, incluindo os da classe 0.

Para o cálculo da Frequência de Dano admite-se o uso da seguinte fórmula: $FD = [(N^\circ \text{ de cometas classe 1}) + (N^\circ \text{ de cometas classe 2}) + (N^\circ \text{ de cometas classe 3}) + (N^\circ \text{ de cometas classe 4})]$. Deste modo, a Frequência de Dano varia entre 0 (sem células lesionadas) a 100 (todas as células lesionadas).

2.5 Determinação da Fluorescência

Para realização dos testes de fluorescência foram coletadas no mês de Setembro, três folhas jovens de diferentes plantas de *T. pallida* de cada ponto amostral, sendo armazenadas sob refrigeração até o processamento das amostras, realizado no laboratório de Biofotônica da Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia (FACET-UFMG). Folhas foram adaptadas no escuro por 30 minutos e cortadas no sentido longitudinal, sendo utilizado para as análises face adaxial, lado direito da folha. Os parâmetros de Fluorescência máxima (F_m) e Eficiência quântica máxima do fotossistema II (PSII) (F_v/F_m), foram avaliados utilizando o equipamento Closed FluorCam FC 800-C (Photon Systems Instruments).

A avaliação da fluorescência da clorofila foi desenvolvida realizando experimento prévio, com coleta de folhas de *T. pallida* em diferentes horários do dia, não sendo observada variação nos valores de Fluorescência em função do dia.

2.6 Parâmetros Meteorológicos

Simultâneo a coleta de material biológico, foram efetuadas medições de temperatura ($^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (%) nos meses de Maio, Julho, Setembro e Novembro, com auxílio do equipamento Termohidrômetro Digital (Mimipa), que subsidiara as análises quanto à condição da atmosfera urbana da Região da Grande Dourados (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros Físicos. Dados de Temperatura (Temp.°C) e Umidade relativa do ar (U.R.%), mensuradas durante os períodos de coletas nas diferentes cidades.

| Cidades | Parâmetros Físicos - Condições Meteorológicas | | | | | | | |
|----------------------|---|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | Maio | | Julho | | Setembro | | Novembro | |
| | Temp. (°C) | U.R. (%) | Temp. (°C) | U.R. (%) | Temp. (°C) | U.R. (%) | Temp. (°C) | U.R. (%) |
| Caarapó | 26,45 | 53,95 | 24,65 | 53 | 23 | 45,45 | 27,85 | 41,9 |
| Deodápolis | 29,5 | 43,9 | 25,05 | 56,15 | 27,75 | 52,95 | 27,3 | 32,95 |
| Douradina | 29,05 | 49,35 | 24,05 | 59,05 | 28,5 | 56,05 | 23,8 | 55,55 |
| Dourados | 26,35 | 56,1 | 29,6 | 44,35 | 27,45 | 43,2 | 30,2 | 37,95 |
| Fátima do Sul | 23,6 | 73,2 | 25,15 | 52,95 | 27,65 | 43 | 24,45 | 35,9 |
| Glória de Dourados | 28,95 | 45,6 | 26,5 | 45,15 | 27,35 | 46,25 | 28,95 | 36 |
| Itaporã | 22 | 69,35 | 19,05 | 70,55 | 21,25 | 54,6 | 29,7 | 35,95 |
| Jateí | 28,35 | 48,9 | 26,9 | 47,5 | 27,35 | 48,7 | 26,25 | 38,5 |
| Juti | 24,5 | 61,5 | 23,75 | 54,55 | 21,5 | 51,75 | 27,45 | 41,15 |
| Nova Alvorada do Sul | 24,9 | 55,25 | 21,75 | 59 | 24,35 | 73,9 | 27,25 | 41,75 |
| Rio Brillhante | 28,6 | 52,7 | 24,9 | 56 | 25,25 | 67,1 | 28,75 | 44,4 |
| Vicentina | 25,6 | 64,95 | 26,45 | 47,45 | 27,1 | 43,95 | 24,25 | 38,6 |
| Mata | 18,9 | 74,5 | 19,2 | 66,9 | 17,2 | 70,4 | 20,3 | 71 |

2.5 Análises estatísticas

As características de Micronúcleo (MCN), Fluorescência Máxima (Fm), Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II – PSII (Fv/Fm), Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID), foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos resíduos e de Bartlett, para homogeneidade entre as variâncias. A análise estatística foi efetuada com auxílio do pacote computacional SAS 9.2 (SAS 2000).

Todas as características atenderam as pressuposições (normalidade e homogeneidade) e foram submetidas à análise de variância e posterior comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Também foi aplicado o teste de Pearson para calcular as correlações simples entre as variáveis. O nível de significância adotado foi de 5%.

3. Resultados

Os resultados referentes aos quadrados médios do número de MCN, Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID) encontram-se na Tabela 2.

Na Tabela 2, foi observado que os resultados de MCN, FD e ID tiveram influência altamente significativa para as variáveis cidade, coleta e para a interação cidade x coleta.

Tabela 2: Quadrados médios dos micronúcleos (MCN), Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID) encontrados em *Tradescantia pallida*.

| Causas de Variação | MCN | | FD | | ID | |
|--------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|
| | GL | Quadrados Médios | GL | Quadrados Médios | GL | Quadrados Médios |
| Cidade | 12 | 24.22*** | 12 | 1682.79*** | 12 | 1977.18*** |
| Coleta | 4 | 174.28*** | 3 | 8515.70*** | 2 | 7831.24*** |
| Cidade * Coleta | 38 | 4.77*** | 36 | 314.39*** | 36 | 314.54*** |
| CV (%) | 23.38 | | 15.70 | | 15.68 | |
| R ² | 0.93 | | 0.87 | | 0.85 | |

*** Altamente significativo ($p < 0,0001$), *Significativo ($p < 0,05$) e NS não significativo

Os resultados de MCN, FD e ID tiveram influência altamente significativa para as variáveis cidade, coleta e para a interação cidade x coleta (Tabela 2).

Para os testes de mutagenicidade e genotoxicidade em *T. pallida* nas cidades da Região da Grande Dourados e nos respectivos períodos de coleta os resultados foram apresentados a seguir (Tabela 3).

Foi possível observar que o mês de Março não apresentou diferença significativa para média da frequência de micronúcleo entre as cidades. No mês de Maio foi observado diferença entre as cidades de Douradina (1.16) e Glória de Dourados (1.44) em relação as demais. Em relação ao mês de Julho, os municípios de Nova Alvorada do Sul (1.55), Douradina (2.39), Vicentina (2.78), Jateí (2.50), Deodápolis (2.89), Juti (2,11) e Itaporã (3,11) apresentaram diferença significativa em relação às demais cidades monitoradas. Em Setembro a cidade de Dourados (13,33) apresentou a maior média da frequência de micronúcleo e as cidades de Vicentina e Juti as menores médias em relação as demais. No mês de Novembro, foi possível observar que as cidades de Dourados (9,11), Fátima do Sul (7,66), Juti (8,11), Caarapó (7,11) e Itaporã (7,00) apresentaram as maiores médias. Além do mais, as frequências de MCN observadas nas cidades foram significativamente superiores ao do controle negativo (0,00), em relação ao último período de amostragem (Novembro).

Baseado na média dos meses de coleta, foi observado que a cidade de Dourados (6,85), apresentou o maior média da frequência de micronúcleos, seguido pelas cidades de Fátima do Sul (4,59), Caarapó (3,98) e Rio Brilhante (3,94).

Tabela 3: Resultados dos Parâmetros Biológicos. Frequência de Micronúcleo (MCN), Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID), observadas em células de *Tradescantia pallida* nas cidades da Região da Grande Dourados e média dos períodos de coleta.

| CIDADES | Parâmetros de Mutagenicidade e Genotoxicidade | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|--------|---------|---------|
| | Março | | Maio | | Julho | | | Setembro | | | Novembro | | | Médias | | |
| | MCN | MCN | FD | ID | MCN | FD | ID | MCN | FD | ID | MCN | FD | ID | MCN | FD | ID |
| Nova Alvorada do Sul | 1,11 bA | 1,55 bA | 17.75 cB | 22.75 cB | 1,55 bB | 32.00 bcC | 34.25 bcC | * | 69.00 aA | 70.75 aA | 5,22 aB | 55.5 aA | 57.00 abB | 2,35 C | 43.50 C | 46.18 C |
| Rio Brillhante | 0,77 cA | 2,39 bcA | 24.75 cB | 31.00 cB | 5,11 abA | 45.25 bcB | 49.75 bcB | 5,78 aB | 78.25 aA | 84.00 aA | 5,66 aB | 77.50 aA | 83.00 aA | 3,94 B | 56.43 B | 61.93 B |
| Dourados | 1,33 eA | 4,39 dA | 66.75 aA | 72.75 aA | 6,11 cdA | 82.75 aA | 88.50 aA | 13,33 aA | 65.75 aA | 70.00 aA | 9,11 bA | 68.50 aA | 71.50 aA | 6,85 A | 70.93 A | 75.68 A |
| Douradina | 0,44 cA | 1,16 bcB | 31.50 aB | 35.25 aB | 2,39 abcB | 36.50 aB | 39.00 aB | * | 41.00 aB | 42.50 aB | 4,44 aB | 44.00 aB | 45.50 aB | 2,10 D | 36.90 D | 39.50 D |
| Fátima do Sul | 0,55 dA | 4,22 bcA | 29.75 bB | 33.50 bB | 3,89 cA | 60.50 aA | 61.25 aB | 6,66 abcB | 49.75 abB | 56.75 abB | 7,66 aA | 49.75 abB | 55.50 abB | 4,59 B | 47.43 C | 51.75 C |
| Glória de Dourados | 0,33 cA | 1,44 bcB | 23.25 bB | 26.75 bB | 3,38 abA | 56.25 aB | 58.50 aB | 5,22 aB | 59.75 aA | 62.50 aA | 5,83 aB | 60.50 aA | 63.25 aA | 3,24 C | 49.93 C | 52.75 B |
| Vicentina | 1,33 bA | 2,66 abA | 23.75 bB | 29.25 bB | 2,78 abB | 61.50 aA | 63.00 aB | 3,50 abC | 56.75 aA | 59.25 aB | 4,28 aB | 55.75 aA | 57.75 aB | 2,90 C | 49.43 C | 52.31 B |
| Jateí | 1,22 aA | * | 16.75 bC | 19.25 bB | 2,50 aB | 43.75 aB | 44.50 aB | * | 51.00 aB | 52.25 aB | * | 54.50 aA | 55.50 aB | 1,73 D | 39.64 D | 41.08 D |
| Deodópolis | 0,33 cA | 2,61 bcA | 26.25 bB | 32.50 bB | 2,89 abcB | 53.25 aB | 56.25 abB | 5,44 abB | 58.25 aA | 60.50 aA | 5,50 aB | 57.25 aA | 60.00 aA | 3,35 C | 48.75 C | 52.31 B |
| Juti | 0,94 eA | 2,44 cdeA | 33.25 bB | 34.75 bB | 2,11 deB | 54.25 abB | 56.75 abB | 3,00 bcdeC | 60.25 aA | 61.75 aA | 8,11 aA | 64.75 aA | 70.75 aA | 3,31 C | 53.12 B | 56 B |
| Caarapó | 0,33 dA | 1,77 cdA | 39.75 bB | 43.00 bB | 3,38 bcA | 71.50 aA | 73.50 aA | 7,33 aB | 63.25 aA | 66.25 abA | 7,11 aA | 63.25 aA | 65.75 abA | 3,98 B | 59.43 B | 62.12 B |
| Itaporã | 0,78 dA | 2,66 cdA | 31.00 aB | 33.25 aB | 3,11 bcdB | 53.00 aB | 57.25 aB | * | 52.50 aB | 55.75 aB | 7,00 aA | 53.50 aB | 56.50 aB | 3,38 C | 47.50 C | 50.68 C |
| Mata | * | * | 18.50 aB | 20.00 aB | * | 22.50 aC | 22.50 aC | * | 23.00 aC | 23.50 aC | 0,00 aC | 19.00 aC | 19.00 aC | 0,00 D | 20.75 E | 21.25 E |

Letras minúsculas na linha comparam as variáveis em cada mês, letras maiúsculas na coluna comparam as variáveis em cada cidade. Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha, ou maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. (*) Sem coleta de material biológico.

De maneira geral, foi observado diferença significativa entre os períodos de coleta, sendo verificado maior número de danos genotóxicos nos meses de Setembro e Novembro, em relação aos demais meses monitorados.

Na Tabela 3, também foi possível observar os resultados do Ensaio do Cometa, sendo verificado que o mês de Maio não apresentou diferença significativa para a maioria das cidades, para ambas as variáveis Frequência de Dano (FD) e Índice de Dano (ID), entre as cidades, com exceção para as cidades de Dourados (66,75 - 72,75) FD e ID respectivamente, e para a cidade de Jateí (16,75) para a variável FD. Em relação ao mês de Julho não foi observado diferença significativa entre as cidades, com exceção dos municípios de Dourados (82,75), Fátima do Sul (60,50), Vicentina (61,50) e Caarapó (71,50), para FD e entre Dourados (88,50) e Caarapó (73,50) para ID, e para Nova Alvorada do Sul (32,00 - 34,25), para ambas as variáveis.

Em relação ao Ponto Controle (Mata), foi observado os menores valores entre as cidades, exceto para o mês de Maio, no qual foi possível observar menor valor de FD (16,75) para a cidade de Jateí. Em relação ao mês de Julho a cidade de Nova Alvorada do Sul não diferiu significativamente da Mata (22,50). Para os demais meses de coleta (Setembro e Novembro), a Mata diferiu significativamente das demais cidades monitoradas em relação ao menor número de danos observados para ambas as variáveis, FD e ID.

Baseado na média dos meses de coleta foi observado que a cidade de Dourados (70,93 e 75,68), apresenta a maior Frequência e Índice de Dano em células de *T. pallida*, seguida pelas cidades de Caarapó (59,43 e 62,12), Rio Brilhante (56,43 e 61,93) e Juti (53,12 e 56), para ambas as variáveis FD e ID respectivamente.

Em relação aos períodos de amostragem, no mês de Maio não foi observado diferença significativa entre as variáveis FD e ID, sendo também observado menor número de danos neste período de coleta. De maneira geral, foi verificado que todas as cidades apresentaram maior número de danos (FD e ID), nos meses de Setembro e Novembro, em relação aos demais meses monitorados, com exceção das cidades de Dourados, Douradina, Itaporã e Mata que não apresentaram variação significativa quanto os danos observados durante os diferentes meses de coleta.

Na Tabela 4, foi demonstrada a interação entre cidade, tráfego e Fv/Fm. As cidades de Rio Brilhante, Douradina e Vicentina, apresentaram diferença significativa quanto aos valores da eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), em relação ao Ponto Controle (Mata).

Tabela 4: Média dos dados da Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (Fv/Fm), e da frota veicular observada nas respectivas cidades da Região da Grande Dourados.

| Cidades | Tráfego | Parâmetros fisiológicos |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|
| | Frota Veicular | Fluorescência Fv/Fm |
| Nova Alvorada do Sul | 64 | 0,850 ^{ABC} |
| Rio Brillhante | 674 | 0,860 ^{AB} |
| Dourados | 559,16 | 0,850 ^{ABC} |
| Douradina | 40,33 | 0,860 ^{AB} |
| Fátima do Sul | 274,49 | 0,853 ^{ABC} |
| Glória de Dourados | 356 | 0,853 ^{ABC} |
| Vicentina | 251 | 0,861 ^A |
| Jateí | 52,66 | 0,845 ^{ABC} |
| Deodápolis | 219,33 | 0,853 ^{ABC} |
| Juti | 35,99 | 0,845 ^{ABC} |
| Caarapó | 230,08 | 0,841 ^{BC} |
| Itaporã | 110,83 | 0,846 ^{ABC} |
| Mata | 00 | 0,840 ^C |

Médias seguidas por letras maiúsculas na coluna comparam as variáveis em cada cidade. Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na análise de correlação simples de Pearson entre as características estudadas, foi verificada significância para quase todas as variáveis, exceto para as variáveis destacadas em negrito (Tabela 5).

Tabela 5: Correlação entre cidades, coleta, frequência de micronúcleos (MCN), índice de dano (ID), frequência de dano (FD), Fluorescência Máxima (Fm), Rendimento quântico máximo do PSII (Fv/Fm) observadas em *Tradescantia pallida*, além das variáveis temperatura, umidade relativa do ar e tráfego veicular, indicando suas diferenças estatísticas, conforme determinado pelo teste de Coeficiente de correlação de Pearson, a nível de 5% de significância.

| | Coleta | MCN | FD | ID | Temp | UR | Tráfego | Fm | Fv/Fm |
|------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------|--------------------------|----------|---------|---------------------------|---------------------------|
| Cidades | 0.0^{NS} | -0.11^{NS} | -0.18^{NS} | -0.22* | -0.45*** | 0.17* | -0.33* | -0.08^{NS} | -0.51*** |
| Coleta | | 0.70*** | 0.55*** | 0.52*** | 0.10^{NS} | -0.47*** | - | - | - |
| MCN | | | 0.66*** | 0.68*** | 0.35*** | -0.51*** | 0.40* | 0.00^{NS} | 0.09^{NS} |
| FD | | | | 0.99*** | 0.32*** | -0.43*** | 0.66*** | 0.02^{NS} | 0.40* |
| ID | | | | | 0.35*** | -0.44*** | 0.65*** | 0.05^{NS} | 0.39* |
| Temp (°C) | | | | | | -0.70*** | 0.53*** | 0.02^{NS} | 0.02^{NS} |
| UR (%) | | | | | | | -0.32* | -0.15^{NS} | -0.18^{NS} |
| Tráfego | | | | | | | | 0.19^{NS} | 0.20^{NS} |
| Fm | | | | | | | | | -0.27^{NS} |

O sinal “-” nos valores apresentados indica correlação negativa e os demais correlação positiva *(P<0,05), ***(P<0,001) e Não significativo (NS).

Os resultados referentes à Fluorescência máxima (Fm) e Eficiência fotossintética máxima do fotossistema II (Fv/Fm) indicaram a existência de correlação negativa altamente significativa entre Fv/Fm com as diferentes cidades (-0.51). Contudo, não houve significância para nenhuma das variáveis em relação a Fm.

4. Discussão

Os sistemas biológicos possuem um estado de estabilidade e equilíbrio, estando adaptados a um complexo de fatores ambientais ao longo de sua evolução. No entanto, quando os fatores são inter-relacionados e/ou sofrem alterações, os mesmos provocam reações nos organismos, através de respostas celulares, bioquímicas e moleculares em busca de nova adaptação (Crispim et al. 2011; Klumpp et al. 2000).

No presente estudo a frequência de micronúcleos revelou que a quantidade de danos genéticos observados em *T. pallida* foi proporcional ao fluxo de veículos. Baseado na avaliação do parâmetro de mutagenicidade e genotoxicidade, verificou-se que Dourados e Rio Brilhante apresentam alto tráfego veicular (559,16 e 674 veículos) respectivamente, em relação as demais cidades monitoradas, porém, diferem significativamente entre si. Segundo Costa e Droste (2012) que também utilizaram o Trad-MCN para monitorar áreas urbanas com intenso fluxo de veículos, indicaram haver associação entre o potencial mutagênico e o alto nível de poluição das áreas de tráfego intenso.

Em estudo realizado por Moura e Fernandez (2012), demonstraram que intervenções instaladas nas ruas como rotatórias, a fim reduzir o fluxo de veículos e alterar o perfil de velocidade dos veículos, aumenta a quantidade de poluentes atmosféricos decorrente da aceleração dos automóveis e conseqüentemente consumo excessivo de combustíveis. Nesse contexto, altos valores na frequência de micronúcleo na cidade de Rio Brilhante, também pode estar associada a presença de intervenções como lombada e rotatória próximo os pontos amostrais.

As cidades de Caarapó (230,08 veículos) e Fátima do Sul (274,49 veículos), com proximidade de um dos pontos amostrais a principal via de acesso aos municípios (Rodovia BR-163 e Rodovia MS 278) respectivamente, torna o tráfego de veículos automotores leves e pesados contínuo e intenso. Monarca et al. (1999) descreveram maior frequência de micronúcleos em plantas que foram expostas em rua com tráfego veicular intenso em relação aos demais locais monitorados com médio e pequeno tráfego. Crispim et al. (2014) também demonstraram que o ensaio Trad-MCN é viável para estimar danos genéticos determinados pela variação da intensidade do tráfego veicular.

Em relação as demais cidades monitoradas a menor frequência de micronúcleos, pode ser atribuído a regiões com baixo tráfego veicular, corroborando com os resultados apresentados por Junior et al. (2008) na cidade de Senhor de Bonfim, Bahia e por Mariani et al. (2008) em São José dos Campos, Vale do Paraíba-SP.

O bioteste Trad-MCN demonstra ser eficaz em detectar danos cromossômicos ocasionados por poluentes atmosféricos, sendo os micronúcleos efetivos indicadores de danos ao material genético causado por diferentes poluentes liberados na atmosfera (Ma et al., 1984; Ma et al., 1996).

Em relação aos danos observados no Ensaio do Cometa, foi observado que a cidade de Dourados apresentou maior número de danos, seguido pelas cidades de Rio Brillhante, Caarapó, Glória de Dourados, Vicentina, Deodópolis e Juti, apresentando similaridade aos resultados observados pelo Teste de Micronúcleo, com exceção para as cidades de Glória de Dourados, Vicentina, Deodópolis e Juti.

Assim como Caarapó, as cidades de Glória de Dourados, Vicentina, Deodópolis e Juti se caracterizam por ter uma rodovia que passa por seu território, estando os pontos amostrais próximos a rodovia. O tráfego contínuo de veículos por estas rodovias aumenta a emissão de poluentes atmosféricos e conseqüentemente o número de danos genéticos por eles provocados nas plantas de *T. pallida*.

A detecção da degradação do DNA através do Ensaio do Cometa, pode ser atribuído as plantas sujeitas ao estresse ambiental por poluentes atmosféricos, corroborando com os resultados apresentados por Sengottaiyan et al. (2012), utilizando tecido foliares de *Acalypha indica*, no distrito de Namakkal, na Índia, e por Sriussadaporn et al. (2003), em folhas de *Ginkgo biloba*, *Epipremnum Aureum* e *Vinca rosea*, na cidade de Tóquio, no Japão.

A falta de concordância entre os resultados dos diferentes testes pode estar associado à natureza do material biológico utilizado, como: inflorescências, para o teste de Mutagenicidade (Trad-MCN) e tecido foliar, para o teste de Genotoxicidade (Ensaio do Cometa).

A capacidade fotossintética em condições ambientais desfavoráveis é um dos primeiros processos a sofrer alterações, ocorrendo sua redução ainda que não seja visível os sintomas. Quando uma planta está com seu aparelho fotossintético saudável, ou seja, não está submetida ao estresse, a razão Fv/Fm deve variar entre 0,75 e 0,85, mostrando que o aparato fotossintético é altamente eficiente (Bolhar-Nordenkamp et al. 1989).

Resultados da eficiência fotossintética máxima do PSII (Fv/Fm) encontrados no trabalho, indicaram valores normais para a maioria das cidades. No entanto, as cidades de Rio Brillhante (0,860), Douradina (0,860) e Vicentina (0,861), apresentaram para a razão Fv/Fm valores acima dos normais, indicando a possibilidade de alteração na eficiência do fotossistema II (PSII).

Segundo Zeiger (2006), as respostas das plantas podem ser influenciadas por poluentes e pelas condições em que as plantas se encontram e são submetidas no local de estudo como, luminosidade, umidade, temperatura, suprimento de água e minerais, desta forma, tanto a poluição atmosférica, quanto demais variáveis podem ter causado estresse nas plantas e conseqüentemente ter alterado a capacidade fotossintética das mesmas.

De forma geral, os biotestes indicaram que os danos verificados no ponto controle (Mata), foram menores quando comparado as cidades monitoradas. Luiz et al. (2005) observaram menor frequência de micronúcleo no controle negativo, o qual apresentava paisagem típica de mata atlântica, baixo tráfego automotivo e ausência de indústrias. Nesse contexto, os achados da literatura corroboram com os resultados obtidos neste estudo.

Em relação aos períodos de coleta, para ambos os testes, mutagenicidade e genotoxicidade, foi observado que os meses de Setembro e Novembro apresentaram maior número de danos diferindo dos demais, que podem estar associados a queda da umidade relativa nestes períodos. Segundo Meireles et al. (2009), o estresse causado nas plantas, pelo declínio da umidade relativa do ar associado a quantidade elevada de poluentes liberados por veículos automotores, são fatores que podem contribuir na formação de MCN.

Baseando-se na análise de correlação, foi observado que a presença de poluentes atmosféricos associado ao aumento de frota veicular não foi o único fator que causou danos clastogênicos e/ou aneugênicos em *T. pallida*. Fatores climáticos, como umidade relativa do ar, temperatura e período de coleta também influenciaram na ocorrência de danos genéticos.

Conclusão

De acordo com os resultados da pesquisa, pode-se concluir que as cidades com maior tráfego veicular e com rodovia próximo aos pontos amostrais, apresentaram índices significativamente maiores de danos genéticos, demonstrando que os biotestes mutagênico (Trad-MCN) e genotóxico (Ensaio do Cometa) foram eficazes para o biomonitoramento.

Também foi observado que tanto a frota veicular quanto fatores climáticos são variantes importantes na determinação da presença de agentes genotóxicos na atmosfera, e que ambos são altamente variáveis, uma vez que as cidades monitoradas apresentaram efeitos genotóxico, mutagênico e capacidade fotossintética distinta ao longo dos períodos

avaliados e significativamente superiores ao do ponto controle. Contudo, não foi verificada relação entre os testes Trad-MCN e Cometa com os dados de Fluorescência, sendo necessário mais estudos visando minimizar variáveis que possam ter provocado outros tipos de estresse.

Desta forma, foi possível confirmar a capacidade da planta em responder aos fatores ambientais pelos parâmetros avaliados.

5. Referências

- Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *J Exp Bot* 55:1607-1621.
- Boettcher M, Grund S, Keiter S, Kosmehl T, Reifferscheid G, Seitz N, Rocha PS, Hollert H, Braunbeck T (2010) Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mut Res* 700:11-17.
- Bolhar-Nordenkampf HR, Long SP, Baker NR, Oquist G, Schreiber U, Lechner EG (1989) Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. *Functional Ecology* 3:497-514.
- Bortoli GM, Azevedo MB, Silva LB (2009) Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mut Res* 675:1-4.
- Catinon M, Ayrault S, Daudin L, Sevin L, Asta J, Tissut M, Ravanel P (2008) Atmospheric inorganic contaminants and their distribution inside stem tissues of *Fraxinus excelsior* L. *Atmosph Environ* 42:1223-1238
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations - Review. *Mol Biotechnol* 26:249-61.
- Costa GM, Droste A (2012) Genotoxicity on *Tradescantia pallida* var. *purpurea* plants exposed to urban and rural environments in the metropolitan area of Porto Alegre, southern Brazil. *Braz J Biol* 72:801-806.
- Crispim BA, Spósito JCV, Mussury RM, Seno LO, Grisolia AB (2014) Effects of atmospheric pollutants on somatic and germ cells of *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. HUNT cv. *purpúrea*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 86: 1899-1906.

Crispim BA, Vaini JO, Grisolia AB, Teixeira TZ, Mussury RM, Seno LO (2011) Biomonitoring the genotoxic effects of pollutants on *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt in Dourados, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int* 19:718-723.

Departamento Nacional de Trânsito (2013). Frota de veículos no ano de 2013. Disponível em: <http://www.denatran.gov.br/frota.htm>. Acessado em 10 de Novembro de 2014.

Duke N, Watkinson AJ (2002) Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil-polluted sediments. *Marine Pollut Bulletin* 44:1269-1276.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013). Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=50&search=mato-grosso-do-sul>. Acesado em 25 de Novembro de 2014.

Júnior JAS, Júnior JCSS, Oliveira JL, Cerqueira EMM, Meireles JRC (2008) Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana. *Acta Sc Biological Sciences* 30:295-301.

Klumpp A, Domingos M, Pignata ML (2000) Air pollution and vegetation damage in South America – State of knowledge and perspectives. *Environ pollut and plant responses* 111-136.

Klumpp A, Ansel W, Klumpp G, Fomin A (2001). Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Rev Bras Bot* 24:511-18.

Lopes EVS, Salles FJ, Barbério A (2012) Análise da qualidade do ar em área de baixo e intenso tráfego veicular em Guaratinguetá- Vale do Paraíba-SP, utilizando o bioensaio Trad-SH. II Simposio de Pesquisa em Mata Atlântica.

Luiz JE, Lavendowski IMF, Oliveira GO, Guimarães ET, Domingos M, Saldiva PHN (2005) Sentido a cidade: Biomonitoramento da qualidade do ar de Santo André com plantas da espécie *Tradescantia pallida* e a educação ambiental. Serviço Municipal de saneamento ambiental de Santo André. Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André. Disponível em: <http://portal.mercociudades.net/sites/portal.mercociudades.net/files/archivos/documentos/Modulos/Ambiente/Aire/biomonitoramento.pdf>. Acessado em 4 de Março de 2015.

Ma TH (1981) *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ health perspect* 37:85-90.

Macfarlane GR, Burchett MD (2001) Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Pollut Bulletin* 42:233-240.

Mariani RL, Jorge MPM, Pereira SS (2008) Caracterização da qualidade do ar em São José Dos Campos-SP, utilizando *Tradescantia pallida* (Trad-MCN). *Rev Bras Geoquím*, 22:27-33.

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

Monarca S, Feretti D, Zanardini A, Falistocco, Nardi G (1999) Monitoring of mutagens in urban air sample. *Mut Res* 426:189-192.

Mouget J, Tremblin G (2002) Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquatic Bot* 74:219-231.

Moura GMG, Fernandez FN. Problemas Socioambientais e Estrutura Institucional da Gestão Urbana em Palmas (TO). *Rev. Des. Regional, Santa Cruz do Sul* 17:33-55.

Rodriguez JH, Weller SB, Wannaz ED, Klumpp A, Pignat ML (2011) Air quality biomonitoring in agricultural areas nearby to urban and industrial emission sources in Córdoba province, Argentina, employing the bioindicator *Tillandsia capillaris*. *Ecol Ind*, 11:1673–1680.

Sengottaiyan A, Govarathanan M, Selvankumar T, Selvam K (2012) Molecular based rapid method to resolve the extent of DNA damages in *Acalypha Indica*. *Int J Pharm Bio Sci* 3:142 – 146.

Speit G, Hartmann A (2005) The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291:85–95.

Sriussadaporn C, Yamamoto K, Fukushi K, Simazaki D (2003). Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutat. Res* 541:31–44.

Teixeira EC, Feltes S, Santana ER (2008). Estudo das emissões de fontes móveis na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Química Nova* 31: 244-248.

Zeiger E (2006) The Effect of Air Pollution on Plants. *Plant Physiology* 5.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O trabalho possibilitou observar que a planta *Tradescantia* demonstra ser uma planta altamente sensível e um excelente organismo teste devido sua ampla variedade de bioensaios e características favoráveis, sendo considerada um elemento essencial no biomonitoramento de ambientes degradados.

O Ensaio do Cometa padronizado neste estudo, também demonstrou ser uma técnica eficiente e viável com base na utilização de tecidos foliares de *Tradescantia pallida*, na avaliação da qualidade do ar.

Os testes demonstraram que tanto a frota veicular quanto fatores climáticos são variantes importantes para determinar a presença de agentes genotóxicos nos ambientes de estudo, uma vez que as cidades monitoradas apresentaram potencial genotóxico, mutagênico e capacidade fotossintética distinta ao longo dos períodos avaliados e significativamente superiores ao do ponto controle. Além do mais, a presença de agentes genotóxicos demonstrou ser variável, dependendo da localização das fontes poluidoras, épocas de coleta, condições atmosféricas, sendo os danos genéticos sobre as plantas também diversos para cada região.

Assim sendo, este estudo possibilitou gerar subsídios para auxiliar planos de gestão de qualidade do ar na região e pode ser incluída como um parâmetro adicional na avaliação da presença de poluentes atmosféricos.

Anexo I

Atividades desenvolvidas como exigência do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

- Os créditos mínimos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação foram cumpridos. Nos anos de 2013 e 2014 foi apresentado no 60º Congresso Brasileiro de Genética os trabalhos intitulados:

- “*Genotoxic effects on Tradescantia pallida (Rose) D.R. Hunt. by vehicle traffic pollution in Dourados, Mato Grosso do Sul/Brazil*” (2013) e “*A three years study to evaluate air quality using Tradescantia pallida (Rose) in Dourados, MS*” respectivamente, no qual recebeu **Menção honrosa** pelo pôster na área de Mutagênese, Sociedade Brasileira de Genética - SBG.

- Ainda no ano de 2014, foi realizado a elaboração de artigo, com autoria de Crispim, B. A.; **Sposito, J.C.V.**; Grisolia, A. B.; Mussury, R. M.; Seno, L. O. Intitulado “*Effects of atmospheric pollutants in somatic and germ cells of Tradescantia pallida (Rose) D.R. HUNT var. purpúrea*”, e publicado na revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Anexo II



ENVIRONMENTAL POLLUTION



DESCRIPTION

Environmental Pollution is an international journal that seeks to publish papers that report results from original, novel research that addresses significant environmental pollution issues and problems and contribute new knowledge to science.

The editors welcome high quality papers where the pollutants are clearly defined and measured and can be directly related to biological, ecological, and human health effects. This includes air, water, and soil pollution and climate change. New techniques for the study and measurement of pollutants are also encouraged. Papers, such as meta analyses, that report findings from re-examination and interpretation of existing data are welcome. Modeling papers are also welcome. Critical review papers are also of interest as are letters to the editor.

The editors do not wish to publish papers that describe results from routine surveys and monitoring programs that are primarily of local interest. Descriptions of well-known pollutants, such as legacy pollutants, in yet another location are not of interest. Papers about sewage, waste and wastewater treatment and management, agronomy, remediation, biomonitoring, bioremediation and phytoremediation are not acceptable.

The editors welcome the following contributions: Full research papers: Results from completed investigations Review papers: In-depth critical reviews of special subjects Commentaries: Opinions and concerns about current scientific issues, invited or unsolicited Letters to the Editor: short focused letters to raise issues or concerns about papers published in the journal and solicit a reply from the authors of those papers

AUDIENCE

Pollution research workers including chemists, toxicologists, environmentalists, conservationists, botanists, marine scientists, ecologists, biologists.

IMPACT FACTOR

2013: 3.902 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2014

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Introduction

Environmental Pollution is an international journal that seeks to publish papers that report results from original, novel research that addresses significant environmental pollution issues and problems and contribute new knowledge to science.

The editors welcome high quality papers where the pollutants are clearly defined and measured and can be directly related to biological, ecological, and human health effects. This includes air, water, and soil pollution and climate change. New techniques for the study and measurement of pollutants are also encouraged. Papers, such as meta analyses, that report findings from re-examination and interpretation of existing data are welcome. Modeling papers are also welcome. Critical review papers are also of interest as are letters to the editor.

The editors do not wish to publish papers that describe results from routine surveys and monitoring programs that are primarily of local interest. Descriptions of well-known pollutants, such as legacy pollutants, in yet another location are not of interest. Papers about sewage, waste and wastewater treatment and management, agronomy, remediation, biomonitoring, bioremediation and phytoremediation are not acceptable.

The editors welcome the following contributions: Full research papers: Results from completed investigations Review papers: In-depth critical reviews of special subjects Commentaries: Opinions and concerns about current scientific issues, invited or unsolicited Letters to the Editor: short focused letters to raise issues or concerns about papers published in the journal and solicit a reply from the authors of those papers

Types of paper

- *Full Research Papers:* Full Research Papers should not exceed 5000 words (including abstract but excluding references). If this is not possible, please contact the Editor in Chief. To facilitate the review process line numbers should be inserted into the text of the manuscript.

- *Short Communications:* These follow the same format as full papers, except that Results and Discussion sections should be combined. Manuscripts should not exceed 2000 words.

- *Rapid Communications:* These are Short Communication papers that are submitted for consideration for publication on an accelerated schedule. These papers report highly significant new findings and indicate new directions for research. Authors should fax

or E-mail the abstract of their manuscript to the Editor-in-Chief, or appropriate Associate Editor before submitting a Rapid Communication manuscript.

- *Special Issues*: Proposals for Special Issues of Full Research Papers that focus on a specific topic or theme will also be considered.

- *New Initiatives*: Intended as very brief reports of significant new findings indicating new directions in research. Manuscripts should be no more than 6-8 double spaced manuscript pages, including no more than 10 references and 1-3 short tables and/or small figures. An abstract is not required. Include a very brief Introduction, Materials and Methods, and Discussion of Results, including speculation about their meaning and implications. Please submit the name and complete mailing address (including e-mail address) of one appropriate referee who has agreed to review the manuscript. Authors should contact the Editor-in-Chief, or appropriate Associate Editor by e-mail before submitting a New Initiatives manuscript.

- *Review Papers*: Authors may submit manuscripts that provide in-depth critical review of a special subject. These reviews must provide a Synthesis and Critical Evaluation of the state of the knowledge of the subject and indicate research directions. The Editors also periodically invite review articles.

- *Commentary*: Commentary papers may be submitted that express opinions and concerns, suggest research priorities and question conventional methodologies and conclusions. Manuscripts should include an Abstract, Introduction, Presentation of the Concerns or Analysis and Conclusions. References, Tables and Illustrations should be used sparingly. The manuscript should not exceed 12 double-spaced pages. The Editors will evaluate all manuscripts, for suitability of publication.

- *Letters to Editor*: Readers are encouraged to write to any of the Editors and raise issues and concerns about papers published in the journal. Editors or authors will reply to letters.

Please note that the word count does not include figures, tables or the reference list

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Manuscript Submission

The complete manuscript can be submitted via EES at <http://www.ees.elsevier.com/envpol>, following all instructions exactly.

Complete manuscripts received via EES will be further evaluated by an Editor. Authors are requested to choose an editor most appropriate to their research field during the submission process. This final evaluation will determine whether or not a manuscript will be sent out for review.

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail. Please note that authors have a maximum of 6 weeks to resubmit a revised manuscript, unless an extension is requested from the editor. The resubmission of previously rejected manuscripts is by invitation only.

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of five potential referees who are well-qualified to review the manuscript, if they are asked to review it. Reviewers are asked to evaluate the originality, significance and technical quality of the work, as well as the clarity of the manuscript, and the relevance of the subject matter to the journal. The final decision for publication of all manuscripts is made by the Editor-in-Chief.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Cover Letter

A cover letter must be sent with the manuscript and must include:

- The novelty, scientific significance and importance of the manuscript.
- The names and valid, current e-mail addresses for five (5) potential reviewers who are well-qualified to review the manuscript if they are asked to review it. Potential reviewers should be from the international scientific community and not from one country or region.

- The name and e-mail address of the corresponding author.

Article structure

Subdivision - unnumbered heads

Full Research Papers should not exceed 5000 words (including abstract but excluding references). If this is not possible, please contact the Editor in Chief.

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply "the text".

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

Full Research Papers: Provide the following data on the title page (in the order given).

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent

address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. (*maximum length 100-150 words*).

The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Capsule: In addition to the abstract for the manuscript, authors are required to submit a one- sentence statement that describes the significance of their work to the rest of the scientific community. When necessary, the capsule may be edited before publication.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Keywords: Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Note that these keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Units and symbols: The SI system should be used for all scientific and laboratory data:

if in certain instance, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the authors.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the

reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/environmental-pollution>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Name and year style in the text

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown ..."

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. Note that any (consistent) reference style and format may be used: the Publisher will ensure that the correct style for this journal will be introduced for the proof stages, the final print version and the PDF files for electronic distribution.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
 - Full postal address
 - All necessary files have been uploaded, and contain:
 - Keywords
 - All figure captions
 - All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
 - Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
 - All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
 - Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
 - For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.
- For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Anexo III

Ecotoxicology and Environmental Safety: Submission Confirmation

De: ees.ees.0.2f1d9d.1b042577@eesmail.elsevier.com em nome de EES (ELS)
(ees2@elsevier.com)

Enviada: sexta-feira, 6 de fevereiro de 2015 18:38:10

Para: juliana_sposito@hotmail.com

Title: Genetic instability in plants associated with vehicular traffic and climatic variables

Research Paper

Corresponding Author: Ms. Juliana Sposito

Authors: Bruno A Crispim; Rosilda M Mussury; Alexéia B Grisolia

Dear Ms. Sposito,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Ecotoxicology and Environmental Safety.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Ecotoxicology and Environmental Safety as an author:

<http://ees.elsevier.com/ees/>

Your username is: juliana_sposito@hotmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: <http://ees.elsevier.com>

[/ees/automail_query.asp](http://ees.elsevier.com/ees/automail_query.asp)

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Ecotoxicology and Environmental Safety. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Journal Manager, Ecotoxicology and Environmental Safety

Editorial Office

Email: ees2@elsevier.com