

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS LONDRINA
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

DANILA LUNA SILVA

**USO DE *Tradescantia pallida* PARA O BIOMONITORAMENTO DE
OZÔNIO NA CIDADE DE LONDRINA-PR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**LONDRINA
2016**

DANILA LUNA SILVA

**USO DE *Tradescantia pallida* PARA O BIOMONITORAMENTO DE
OZÔNIO NA CIDADE DE LONDRINA-PR**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina.

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia C. Lobo Faria

**LONDRINA
2016**



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Londrina
Coordenação de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO

Uso de *Tradescantia pallida* para o biomonitoramento de ozônio na cidade de Londrina-PR

por

Danila Luna Silva

Monografia apresentada no dia 30 de Novembro de 2016 ao Curso Superior de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Londrina. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho _____ (aprovado, aprovado com restrições ou reprovado).

Profa. Dra. Joseane Debora Peruço Theodoro
(UTFPR)

Profa. Dra. Kátia Valéria Marques Cardoso Prates
(UTFPR)

Profa. Dra. Patrícia Carneiro Lobo Faria
(UTFPR)
Orientador

Profa. Dra. Ligia Flávia Antunes Batista
Responsável pelo TCC do Curso de Eng. Ambiental

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.

À memória de minha avó Margarida, a eterna flor mais bonita do meu jardim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo presente da vida, por toda luz, proteção, saúde e força em toda a trajetória que me trouxe até aqui.

Agradeço aos meus pais, Ivete e Agnaldo, por terem sonhado comigo esse sonho desde o início, por não terem hesitado e nem medido esforços para me ajudar em torná-lo realidade e por sempre acreditarem em mim e no meu potencial, às vezes até mais do que eu mesma. Agradeço por sempre me incentivarem a buscar o meu lugar do mundo, mesmo que esse lugar possa ficar longe de suas asas. O amor que sinto de vocês e por vocês, é base que tenho de tudo, é a certeza de que Deus não poderia ter sido mais generoso comigo quando me deu vocês como pais. Tudo que tenho e tudo que sou, devo a vocês e deixo aqui minha gratidão eterna e imensurável.

Agradeço ao meu namorado Miguel, pelo companheirismo, pelo carinho, pela boa vontade em ajudar sempre, pela paciência nos meus dias de nervosismo e ansiedade e por compartilhar comigo suas experiências como ex-graduando em Engenharia Ambiental.

Agradeço aos meus amigos e colegas acadêmicos, que fizeram da graduação uma caminhada menos séria e mais divertida, por tornarem mais leve a rotina cansativa de aulas, trabalhos e provas, e principalmente, pela disponibilidade e paciência em me ajudar com os estudos. Vocês são um exemplo que levarei para vida: o de que se constrói muito pouco ou nada nessa vida, sozinho.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia C. Lobo Faria, por compartilhar seus conhecimentos, pela confiança, pela paciência, pela dedicação e pela exemplar orientação.

Agradeço à Profa. Dra. Leila Droprinchinski Martins e equipe do Laboratório de Análises em Poluição do Ar (LAPAR), pela disponibilidade, fornecimento de dados e demais contribuições.

Agradeço às Profas. Dras. Joseane D. P. Theodoro e Kátia V. M. C. Prates, pelas contribuições desde quando este trabalho ainda era um projeto.

Agradeço finalmente, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento e realização deste trabalho e da graduação como um todo. Muito obrigada.

*“Não existe atalho para o caminho da conquista
sólida.”*

(Israel Feliciano)

RESUMO

SILVA, Danila Luna. **USO DE *Tradescantia pallida* PARA O BIOMONITORAMENTO DE OZÔNIO NA CIDADE DE LONDRINA-PR.** 2016. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Ambiental) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

O ozônio é um dos poluentes atmosféricos que mais atinge a vegetação e também à saúde humana. O biomonitoramento apresenta-se como uma ferramenta para avaliar mudanças no meio ambiente que causem danos aos seres vivos. A utilização de plantas como biomonitoras tem sido empregada com sucesso para monitorar a qualidade do ar, por ser um método de fácil manejo e baixo custo. O presente trabalho avaliou o potencial indicador da espécie *Tradescantia pallida* e sua aplicabilidade no biomonitoramento da qualidade do ar na cidade de Londrina-PR utilizando o Teste do Micronúcleo. Este é bem conceituado para avaliar o potencial genotóxico de contaminantes atmosféricos no aumento da taxa de mutação em células mãe de grão de pólen de *Tradescantia*. Foram coletadas inflorescências da espécie *Tradescantia* em três locais diferentes da cidade de Londrina-PR em duas datas (27 de Agosto de 2016 e 07 de Setembro de 2016) que forneceram material para o preparo de 5 lâminas que apresentassem 300 tétrades para análise por local e por data de coleta. Também foi realizado um teste de controle positivo, com ramos de *T. pallida* mantidos em Formaldeído (10%), que reconhecidamente induz à formação de micronúcleos. Embora tenham sido observadas variações entre os valores de temperatura e concentração de ozônio atmosférico nas duas datas de coleta, não houve diferença significativa entre as taxas de formação de micronúcleos, nas inflorescências coletas nos 3 locais. A taxa de formação de micronúcleo variou entre 0,2 e 1,86%, que representa a taxa espontânea de dano e indica a ausência de exposição das plantas a agentes genotóxicos. Também não foi observado o efeito positivo do formaldeído sobre a taxa de formação de micronúcleos, provavelmente em função das condições fornecidas no tratamento, como pouco tempo de exposição das plantas à luz. Devido à grande variabilidade na determinação das taxas de micronúcleos, recomenda-se o preparo de um maior número de lâminas para cada ponto amostral.

Palavras-chave: Biomonitoramento. Poluição Atmosférica. Ozônio. *Tradescantia pallida*. Teste do Micronúcleo.

ABSTRACT

SILVA, Danila Luna. **USE OF *Tradescantia pallida* FOR THE OZONE BIOMONITORING IN THE CITY OF LONDRINA-PR**. 53 p. Course Conclusion Work (Bachelor of Environmental Engineering). – Environmental Engineering Graduation, Federal Technological University of Paraná (UTFPR). Londrina, 2016.

Ozone is one of the pollutants that most affects vegetation and also human health. Biomonitoring presents itself as a tool to evaluate changes in the environment that cause damage to human beings. The use of plants in biomonitoring has been successfully used to air quality monitors, because it is an easy to use and a low cost method. The present study evaluated the potential indicator of the *Tradescantia pallida* specie and its applicability in air quality biomonitoring in the city of Londrina-PR using the micronucleous test. This is well-known to evaluate the genotoxic potential of air pollutants in the increasing mutation rate in pollen mother cells of *Tradescantia*. Inflorescences of the *Tradescantia* specie were collected at three different locations in the city of Londrina-PR, on two dates (August 27th, 2016 and September 7th, 2016), which provided material for the preparation of 5 slides with 300 tetrads for analysis. A positive control test was also performed, with branches of *T. pallida* kept in Formaldehyde (10%), which is known to induce the formation of micronucleous. Although have been observed variations between the values of temperature and atmospheric ozone concentration (in the two collection dates), there was no significant difference between the rates of micronucleous formation in the inflorescences collected at the three sites. The micronucleous formation rate ranged from 0.2 and 1.86%, which represents the spontaneous rate and indicates the absence of exposure of the plants to genotoxic agents. The positive effect of formaldehyde on the micronucleous formation rate was also not observed, probably as a function of the conditions provided in the treatment, with short exposure time to light. Due to the high variability in the determination of micronucleous rates, it is recommended to prepare a larger number of slides for each sampling point.

Keywords: Biomonitoring. Atmospheric Pollution. Ozone. *Tradescantia pallida*. Micronucleous Test.

Keywords: Biomonitoring. Atmospheric pollution. *Tradescantia pallida*. Micronucleous test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estações manuais e automáticas do estado do Paraná	16
Figura 2 -	Necroses tipicamente induzidas por ozônio em folhas de <i>Nicotiniana tabacum</i> Bel W3	20
Figura 3 -	<i>Tradescantia pallida</i> cultivada no Câmpus Londrina da UTFPR	23
Figura 4 -	Ilustração da divisão meiótica para formação de micrósporos em <i>Tradescantia</i>	25
Figura 5 -	Localização dos 3 pontos de coleta de inflorescências de <i>T. pallida</i> para o teste dos micronúcleos	28
Figura 6 -	Locais de coleta das inflorescências de <i>T. pallida</i> para análise dos micronúcleos	29
Figura 7 -	Detalhe do ramo e do ápice contendo a inflorescência de <i>T. pallida</i>	29
Figura 8 -	Sequência de etapas para montagem das lâminas para o teste Trad-MCN	30
Figura 9 -	Ramos de <i>Tradescantia pallida</i> em solução de Formaldeído (10%) (B) e em água (A), para controle positivo para formação de micronúcleos	32
Figura 10 -	Monitor de ozônio Thermo Fisher Scientific* modelo 49i utilizado para a medição das concentrações no ponto UTF	33
Figura 11 -	Fluxo esquemático do monitor de O ₃ modelo 49i, marca Thermo Fisher Scientific	34
Figura 12 -	Variação da temperatura (°C)* e da concentração de O ₃ (ppb)* na véspera e na data da primeira coleta (AGO) das inflorescências de <i>T. pallida</i>	37
Figura 13 -	Variação da temperatura (°C)* e da concentração de O ₃ (ppb)* na véspera e na data da segunda coleta (SET) das inflorescências de <i>T. pallida</i>	38
Figura 14 -	Micrósporos de <i>Tradescantia pallida</i> na fase de tétrades, sem micronúcleos	40
Figura 15 -	Células mães do grão de pólen de <i>Tradescantia pallida</i> na fase de tétrades com micronúcleos	40
Figura 16 -	Frequência de micronúcleos a cada 300 tétrades, obtidas a partir de inflorescências de <i>T. pallida</i> coletadas em 3 pontos no município de Londrina, PR, em duas datas de coleta (AGO e SET)	42
Figura 17 -	Frequência de micronúcleos a cada 300 tétrades obtidas de ramos com inflorescências de <i>T. pallida</i> , mantidas em Formaldeído 10% (controle positivo) e água	42

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de toda a história de ocupação da Terra pela espécie humana, desde o surgimento dos primeiros ancestrais, o homem tem tido uma atuação transformadora e, muitas vezes, predatória sobre a natureza (BRAGA et al., 2001). Desde o século XX, a partir do aumento das emissões oriundas tanto do desenvolvimento industrial e urbano, como das emissões de veículos, os efeitos da poluição atmosférica vêm atingindo os seres vivos (MACHADO, 2008).

Entre os principais poluentes atmosféricos está o ozônio (O_3), poluente secundário produzido a partir de reações químicas entre oxídios de nitrogênio (NOx) e compostos orgânicos voláteis (COVs) em dias com altos índices de radiação solar, principalmente em áreas urbanas, industriais e em regiões onde há estagnação de massas de ar (DUTRA et al., 2009).

As plantas em geral são muito sensíveis a esse gás, que é absorvido predominantemente pelos estômatos durante as trocas gasosas (LARCHER, 2004, ESPÓSITO, 2008). Assim, desde o início do século XX, têm sido realizadas pesquisas a respeito do efeito da poluição sobre as plantas (SAVÓIA, 2013).

A quantificação de contaminantes atmosféricos se faz importante uma vez que é necessário monitorá-los devido à existência de limites estabelecidos por agências ambientais que seguem os sugeridos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para avaliar a situação do meio ambiente (PEDROSO, 2007). É nesse contexto que a utilização de plantas bioindicadoras, em programas de biomonitoramento, é uma alternativa interessante, pois apresentam fácil cultivo, manuseio e cuidados, custos relativamente baixos além de mostrarem respostas conservativas e de fácil avaliação (LUIZ et al., 2004).

A *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var. *purpurea* Boom (também conhecida pelos nomes populares de traboeraba, trapoeraba-roxa ou coração-roxo), tem sido amplamente utilizada em diversos estudos de biomonitoramento, principalmente por apresentar fácil adaptação, ser resistente a parasitas e por se desenvolver durante todo o ano (CARVALHO, 2005, LEAL et al., 2005, TEIXEIRA; BARBÉRIO, 2012). Na maioria dos estudos, a espécie tem sido utilizada por meio da

aplicação do teste do micronúcleo (Trad-MCN) (MA, 1981), sendo considerado um dos testes mais sensíveis para estudos de genotoxicidade (RODRIGUES, 1997, JUNIOR, 2008, ZANATO, 2010, PEREIRA, 2012, TEIXEIRA; BARBÉRIO, 2012, COSTA et al., 2015)

Dessa forma, o propósito deste estudo foi aproveitar a facilidade da obtenção de amostras de *Tradescantia pallida*, comumente encontrada em Londrina e testar a aplicação do bioensaio de micronúcleos em células-mãe de grão de pólen (teste do micronúcleo ou Trad-MCN) para o biomonitoramento da qualidade do ar, no final do inverno, em três pontos da cidade de Londrina-PR.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o potencial de *Tradescantia pallida* como bioindicadora de concentrações de ozônio na atmosfera e sua aplicabilidade no biomonitoramento da qualidade do ar na cidade de Londrina-PR.

2.2 Objetivos específicos

Foram objetivos específicos do projeto:

- Coletar amostras da espécie de *Tradescantia pallida* em diferentes locais da cidade de Londrina-PR, a fim de avaliar se estão submetidas a diferentes níveis de ozônio;
- Quantificar a frequência de micronúcleos na formação dos micrósporos (células que darão origem aos grãos de pólen) em flores de *Tradescantia pallida*.
- Utilizar dados de concentração de ozônio obtidos no Câmpus da UTFPR-Londrina por meio de um monitor de ozônio, nos períodos em que as plantas forem submetidas ao Teste do Micronúcleo, e correlacionar com a frequência de micronúcleos encontrada nas inflorescências das amostras dos diferentes locais coletados, visando avaliar a qualidade do ar, em termos de concentração de ozônio em diferentes pontos de Londrina.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Poluição atmosférica

Queiroz et al. (2007) destacaram que o desenvolvimento industrial e urbano tem ocasionado um aumento crescente na emissão de poluentes atmosféricos, provocando danos à saúde humana e à vegetação, além de prejuízos devido à diminuição da produção agrícola e a degradação, inclusive, de construções.

Conforme a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 3 de 28/06/1990, considera-se poluente:

Qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar:

I - impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde;

II - inconveniente ao bem-estar público;

III - danoso aos materiais, à fauna e flora.

IV - prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

Com relação à sua origem, os poluentes podem ser classificados como primários, sendo aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão. São exemplos de poluentes primários, o dióxido de enxofre (SO_2), o sulfeto de hidrogênio (H_2S), os óxidos de nitrogênio (NO_x), a amônia (NH_3), o monóxido de carbono (CO), o dióxido de carbono (CO_2) e o metano (CH_4). Os classificados como secundários são aqueles formados na atmosfera através da reação química entre os poluentes primários e/ou constituintes naturais na atmosfera. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido sulfúrico (H_2SO_4), o ácido nítrico (HNO_3), o trióxido de enxofre (SO_3), os nitratos (NO_3^-), os sulfatos (SO_4^{2-}), o ozônio (O_3) e o nitrato de peroxiacetila – PAN – ($\text{CH}_3 = \text{OO}_2\text{NO}_2$), podem ser citados como exemplos de poluentes secundários (PEDROSO, 2007).

Ainda, os poluentes atmosféricos podem ser originados de fontes fixas ou móveis. As fontes fixas são, por exemplo, processos de extração, a produção industrial e produção agrícola. Já as fontes móveis, podem ser exemplificadas pelos meios de transporte que dependam da queima de combustíveis fósseis (ZANATO, 2010, SHIRMER; QUADROS, 2010).

De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (2015) (CETESB), determina-se o nível de poluição atmosférica através da quantificação dos poluentes presentes no ar. Ao determinar as concentrações desses poluentes, também se mede o grau de exposição dos receptores (seres vivos em geral) como resultado final da emissão do poluente.

A qualidade do ar pode ser avaliada, em nível local, regional, nacional e internacional, por meio de estimativas das emissões, de uso de modelos matemáticos e de medidas das concentrações dos principais poluentes utilizando métodos físico-químicos. Por meio dessas medidas, é possível verificar normas e valores limites para concentrações de poluentes no ar, estabelecidos e recomendados (KLUMPP et al., 2001). Os limites são estabelecidos por agências de proteção ambiental, onde se destacam a US EPA-NAAQS (Agência de Proteção do Meio Ambiente - Padrões nacionais de qualidade do ar ambiente), nos Estados Unidos e a WHO (Organização Mundial da Saúde) na Suíça (PEDROSO, 2007). No Brasil, há o Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar (PRONAR), criado pela Resolução CONAMA nº 05 de 15 de junho de 1989, que definiu o programa como:

Um dos instrumentos básicos da gestão ambiental para proteção da saúde e bem estar das populações e melhoria da qualidade de vida com o objetivo de permitir o desenvolvimento econômico e social do país de forma ambientalmente segura, pela limitação dos níveis de emissão de poluentes por fontes de poluição atmosférica com vistas a:

- a) uma melhoria na qualidade do ar;
- b) o atendimento aos padrões estabelecidos;
- c) o não comprometimento da qualidade do ar em áreas consideradas não degradadas.

De acordo com Vormittag et al. (2014), o PRONAR foi estabelecido a partir da conscientização de que o crescimento industrial e urbano e da frota de veículos estava gerando um aumento crescente na poluição atmosférica, gerando consequências negativas para a sociedade, a economia e o meio ambiente. A partir da percepção que essas condições iriam continuar, despertou-se para a iniciativa de estabelecer estratégias para controlar, preservar e recuperar a qualidade do ar.

O primeiro recurso decorrente do programa foi a Resolução CONAMA Nº 03, de 28 de junho de 1990, que estabelece os padrões nacionais de qualidade do ar, ainda

hoje em vigência. A Resolução CONAMA Nº 3/90 também determina o monitoramento da qualidade do ar como atribuição de cada Estado do Brasil. Portanto, para conhecer e acompanhar os níveis de qualidade do ar no país como forma de avaliação das ações de controle estabelecidas pelo PRONAR definiu-se uma estratégia, que foi a criação de uma Rede Nacional de Monitoramento da Qualidade do Ar (CONAMA 5/1989). No entanto, de acordo com Vormittag et al. (2014) apenas alguns estados possuem redes de monitoramento (Quadro 1).

Quadro 1 - Monitoramento da qualidade do ar nas diferentes regiões do Brasil (2014).

Regiões	Sem monitoramento da qualidade do ar	Com monitoramento da qualidade do ar
Centro oeste	Mato Grosso do Sul	Mato Grosso, Goiás e Distrito Federal
Nordeste	Alagoas, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte	Bahia, Sergipe
Norte	Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins	
Sudeste		Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo
Sul	Santa Catarina	Paraná, Rio Grande do Sul

Fonte: VORMITTAG et al., 2014.

A Resolução CONAMA Nº 3/90 auxilia na definição sistemática da qualidade ar, através do estabelecimento dos indicadores da qualidade do ar. No total, existem sete indicadores, sendo eles: Partículas Totais em Suspensão (PTS), Fumaça, Partículas Inaláveis (PI ou PM10), Dióxido de Enxofre (SO₂), Monóxido de Carbono (CO), Ozônio (O₃) e Dióxido de Nitrogênio (NO₂) (IAPa, s/data). Os indicadores e os padrões nacionais de qualidade do ar definidos pela Resolução CONAMA nº 3/90 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Padrões de qualidade do ar de acordo com a Resolução CONAMA 03/1990.

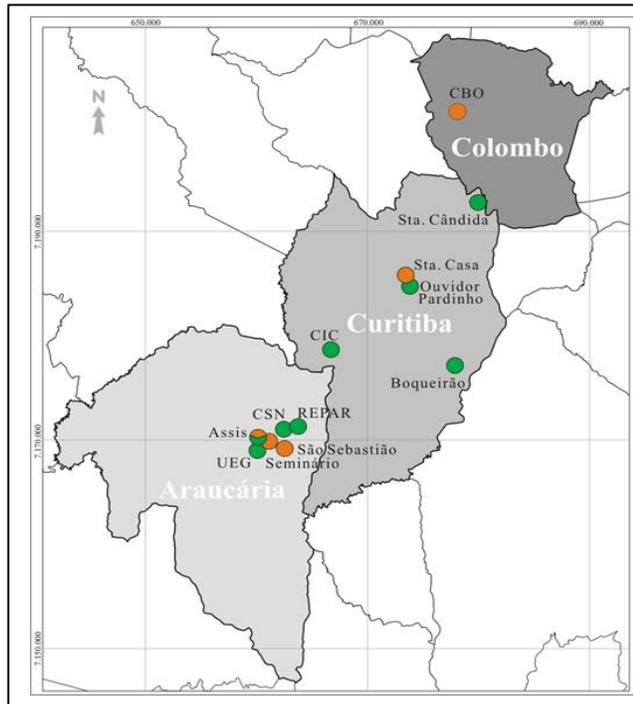
POLUENTE	Tempo de amostragem	Padrão primário [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]	Padrão secundário [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
Partículas totais em suspensão (PTS)	24 horas	240	150
	1 ano	80	60
Fumaça	24 horas	150	100
	1 ano	60	40
Partículas Inaláveis (PI)	24 horas	150	150
	1 ano	50	50
Dióxido de enxofre (SO ₂)	24 horas	365	100
	1 ano	80	40
Monóxido de Carbono (CO)	1 hora	40.000	40.000
	8 horas	10.000	10.000
Ozônio (O ₃)	1 hora	160	160
Dióxido de nitrogênio (NO ₂)	1 hora	320	90
	1 ano	100	100

Fonte: Resolução CONAMA 3/1990.

No estado do Paraná, o monitoramento da qualidade do ar fica a cargo do Instituto Ambiental do Paraná, que realiza o monitoramento da qualidade do ar apenas na cidade de Curitiba e região metropolitana (IAPb, s/data). Foi na década de 80 que se iniciou o monitoramento da qualidade do ar na Região Metropolitana de Curitiba, e atualmente são doze estações de amostragem do ar, das quais oito são automáticas (IAPb, s/data). Quatro delas estão localizadas em Curitiba, analisando de 30 em 30 segundos O₃, SO₂, NO, NO₂, CO, PTS e PI. Em Araucária estão localizadas outras quatro estações automáticas que analisam O₃, SO₂, NO, NO₂, CO e PTS ou PI. Estas oito estações automáticas somam-se às quatro estações manuais de Araucária e Curitiba, as quais fornecem médias diárias para SO₂, Fumaça e PTS. As estações automáticas e as estações manuais fazem parte de uma rede de monitoramento que torna possível a real avaliação das condições da qualidade do ar de Curitiba e Região Metropolitana (IAPb, s/data)

Os resultados do monitoramento são publicados anualmente no Relatório de Qualidade do Ar (IAPb, s/data). Um mapa da localização das estações é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Estações manuais e automáticas do estado do Paraná.



Fonte: IAPc (s/ data).

Nota: **Verde:** Estações automáticas; **Laranja:** Estações manuais.

O fato de Londrina não ter uma rede de monitoramento da qualidade do ar é algo a ser questionado, uma vez que Londrina é uma cidade altamente urbanizada e considerada de porte médio (BARROS et al., 2003). Segundo Targino e Krecl (2016), Londrina enfrenta problemas ambientais comparáveis a cidades maiores e mais antigas no país. Em Londrina a frota de veículos cresceu 85% na última década, e é dominada por veículos (78,3%), que circulam com uma média de 1,47 pessoas por veículo, sendo que, a motorização chegou a uma taxa de 661 veículos por 1000 habitantes em junho de 2015 (a taxa nacional é de 436 veículos por 1000 habitantes). Segundo os autores, o tráfego de veículos a motor é a fonte mais importante de poluição do ar nas cidades, considerando países em desenvolvimento.

De acordo com Januzzi (2005), Londrina se desenvolveu com base na cultura agrícola, mas sua economia se diversificou e em 2005 a cidade apresentava em torno de 14.372 estabelecimentos comerciais e 3.485 indústrias, com uma produção voltada para a metalurgia, mecânica, mobiliário, produtos químicos, papel e papelão, entre outros.

Com o crescimento econômico, a emissão antrópica de gases e partículas tende a se intensificar progressivamente, levando ao aumento da concentração desses gases e partículas na atmosfera. Alguns desses gases e partículas têm efeitos comprovados na saúde humana e no meio ambiente, razão pela qual são considerados “poluentes atmosféricos”. Dentre estes, destacam-se o monóxido de carbono (CO), o material particulado (MP), o dióxido de nitrogênio (NO₂) e o dióxido de enxofre (SO₂) e o ozônio troposférico (O₃) (IEMA, 2012).

3.2 Ozônio

O ozônio é um poluente atmosférico secundário que desempenha diferentes papéis em relação aos seres vivos, dependendo da camada atmosférica em que é encontrado. Na estratosfera, o ozônio absorve radiação ultravioleta entre 210 e 290 nm, protegendo os seres vivos dos efeitos nocivos dessa radiação. Já na troposfera o ozônio é formado como resultado de reações fotoquímicas envolvendo precursores gerados tanto por processos naturais quanto por atividades humanas e pode causar danos à saúde humana e a vegetação (KRUPA; MANNING, 1988).

Ainda segundo Krupa e Manning (1988), as reações que envolvem a formação do ozônio se dão entre os óxidos de nitrogênio (NO_x) e hidrocarbonetos (HC) presentes na exaustão de automóveis e na queima de combustíveis fósseis. Rocha et al. (2009) afirmam que essas reações são as chamadas reações fotoquímicas, tipo de reação que ocorre com frequência e é iniciada por uma molécula que absorve um fóton de luz. Uma representação de uma reação fotoquímica pode ser exemplificada pela Equação 1:



Sendo:

$h = \text{constante de Plank } (6,62607004 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg/s})$

$\nu = \text{frequência da luz (Equação 2)}$

Onde:

$$v = 1/\lambda \quad (2)$$

e $\lambda = \text{comprimento de onda (nm)}$.

Dessa forma, os óxidos de nitrogênio são muito importantes na formação de novos compostos na atmosfera, como o ozônio, por exemplo. A oxidação do NO na atmosfera se dá principalmente pela reação com o ozônio (ROCHA et al., 2009) como mostrado na Equação 3:



O NO₂ que é formado nessa etapa, quando na presença da luz solar, sofre uma reação oposta que provoca a dissociação do NO₂ e a regeneração do NO e do ozônio (ROCHA et al., 2009), conforme as Equações 4 e 5:



Por isso, vale ressaltar que os óxidos de nitrogênio (NO₂, NO) existem em equilíbrio dinâmico com o ozônio, com taxas iguais de formação e destruição de NO₂, por isso as concentrações de ozônio tendem a permanecer em nível baixo, pois são consumidos com a mesma velocidade de geração em condições naturais, porém, no momento em que outro componente entra no ciclo fotoquímico, no caso, compostos provenientes principalmente de motores de veículos e indústrias esse equilíbrio é interrompido (LARCHER, 2004, ROCHA, 2009). Além da interrupção do equilíbrio do ozônio, fatores meteorológicos também influenciam na sua formação e disponibilidade na atmosfera. Radiação solar, umidade relativa do ar e temperatura estão entre os fatores que mais influenciam a concentração de O₃ (BERTAZOLLI, et al., 2006).

Depois de formado, o ozônio troposférico pode ser transportado por longas distâncias a partir de suas fontes, portanto pode atingir tanto áreas rurais quanto urbanizadas (RODRIGUES et al., 1996) e, dentre, os oxidantes fotoquímicos presentes

na troposfera, o ozônio é o que está em maior quantidade (70 a 80%) (SHIRMER; QUADROS, 2010).

Pelo fato do ozônio troposférico ser um gás prejudicial a saúde humana, a Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda que em um período de 8 horas, não seja excedido o valor máximo diário de $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de ozônio (WHO, 2005). No Brasil, o padrão legal (PQAR - Padrão de Qualidade do Ar) é de $160 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (80 ppb), para um período de uma hora, estabelecido pela Resolução CONAMA nº 3/90 (Tabela 1). A Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos do Paraná (SEMA) confirma o padrão nacional, através da Resolução SEMA Nº 016/2014.

Alguns estudos realizados mostram como têm sido detectadas as concentrações de ozônio nas cidades brasileiras. De acordo com Junior (2008), na cidade de Guarulhos, região metropolitana de São Paulo, a concentração de ozônio chegou a $284 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em um dos pontos da cidade (entre 2006 e 2007), quando investigou a influência do aeroporto localizado na cidade nas concentrações de ozônio. Segundo Dutra et al. (2009), a cidade de Belo Horizonte-MG chegou a atingir o valor máximo de $274,7 \mu\text{g}/\text{m}^3$ em maio de 2009, e ultrapassou o padrão de qualidade do ar em 29 dias durante o ano de estudo. Em Curitiba, no ano de 2013, o IAP registrou a máxima de $171 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de média horária de ozônio em 1 dia do mês de agosto de 2013 e violações do padrão de qualidade, três vezes durante o ano.

Considerando os efeitos que o ozônio ocasiona à saúde humana, vale ressaltar a diminuição da capacidade pulmonar e a irritação nos olhos e vias respiratórias, além da diminuição na resistência contra infecções, sendo que também pode ser responsável por disfunções pulmonares, como a asma (MARTINS, 2006, IAPa, s/data).

O ozônio também causa efeitos deletérios na vegetação, podendo interferir nas florestas, no crescimento das plantas, na fotossíntese e, ainda, pode ocasionar redução na produtividade e impacto econômico significativo sobre culturas como soja, feijão, trigo e algodão (MARTINS, 2006).

Os poluentes gasosos como o ozônio entram nas plantas pelos estômatos, durante as trocas gasosas, e podem provocar efeitos fisiológicos, metabólicos e estruturais, que levam a sintomas como clorose, descoloração da folha (Figura 2) e

necrose em tecidos e órgãos, que podem evoluir levando à morte do indivíduo (MANNING; FEDER 1980 apud ESPOSITO, 2008).

Figura 2 - Necroses tipicamente induzidas por ozônio em folhas de *Nicotiniana tabacum* Bel W3.



Fonte: Esposito, 2007.

Para monitorar a presença do ozônio e de outros poluentes atmosféricos e avaliar riscos para os seres vivos, várias espécies vegetais vêm sendo estudadas como bioindicadoras (LIMA, 2007). As mais utilizadas para o ozônio são o choupo (*Populus nigra*), o tabaco (*Nicotiana tabacum*) (KLUMPP, 2001, ESPOSITO, 2008), a *Tradescantia* (LIMA, 2007), o azevém (*Lolium multiflorum* ssp. *italicum* cv. Lema), a couve (*Brassica oleracea acephala*) (ESPOSITO, 2008) e a paluma (*Psidium guajava* ‘Paluma’) (PINA et al., 2007).

Em síntese, Guicherit e Roemer (2000) destacaram que a importância do monitoramento do ozônio se dá por diversos motivos. Entre eles o fato do ozônio troposférico ser atualmente o terceiro gás mais importante causador do efeito estufa. Devido ao seu impacto na saúde e na natureza, seguindo esses autores, o aumento de ozônio em grande escala é um dos mais importantes problemas ambientais a ser resolvido durante as próximas décadas. Essa é a razão pela qual é necessário o monitoramento e alta precisão nas medições de ozônio troposférico, tanto em locais com a atmosfera considerada “limpa”, quanto em locais com impacto direto da atividade humana (proximidade de indústrias, regiões com grande circulação de veículos). Somente com tais registros, pode-se chegar a uma melhor compreensão da química da

troposfera e poder sem equívocos, estabelecer relações entre parâmetros e tendências (GUICHERIT; ROEMER, 2000).

3.3 Biomonitoramento

O biomonitoramento pode ser definido como qualquer método que faz uso da vida para identificar/caracterizar substâncias e ciclos de energia presentes no meio ambiente. Utilizam-se comunidades de organismos cujo traço comportamental possa ser observado e correlacionado a determinadas condições ambientais, podendo ser utilizados como indicadores e quantificadores. Esses organismos podem ser denominados bioindicadores (ELLENBERG, 1991).

Larcher (2004) classifica o biomonitoramento de acordo com o local em que os organismos servirão de monitores:

- Biomonitoramento passivo: é aquele no qual a observação e a análise da planta ocorrem em seu ambiente natural;
- Biomonitoramento ativo: requer a exposição das plantas na área a ser avaliada.

As plantas podem ser consideradas ferramentas bastante eficientes para apontar alterações ao longo do tempo, pois devido ao seu comportamento semelhante ao dos organismos sedentários, estão sempre expostas ao estresse de emissões locais e em maior intensidade do que humanos ou animais, além de que, algumas espécies são altamente sensíveis a agentes mutagênicos, apresentam ciclo de vida curto e possuem baixo custo, como é o caso das plantas herbáceas (CONSTANTIN; OWENS, 1982, LARCHER, 2004).

As respostas das plantas bioindicadoras a poluentes podem ser observadas em níveis macroscópicos e em nível genético. Em níveis macroscópicos se observam necroses, queda de folhas, diminuição de crescimento, clorose, etc. Já em nível genético não é possível a observação a olho nu (ZANATO, 2010).

Temmerman et al. (2001) classificaram as plantas utilizadas em biomonitoramento como:

- Bioindicadoras: àquelas que apresentam sintomas visíveis como necrose e clorose foliar, distúrbios fisiológicos e aborto em flores e frutos;

- Biosensoras ou biomarcadoras: não apresentam sintomas visíveis a olho nu, necessitando de microscópio ou outras técnicas para análise.
- Bioacumuladoras: são as menos sensíveis à poluição do ar, mas são capazes de acumular partículas e gases em seus tecidos;
- Indicadoras ecológicas: através delas é possível observar mudanças nas comunidades vegetais, a partir do aparecimento ou desaparecimento de espécies, devido a sua tolerância à poluição por exemplo.

De acordo com Arndt et al. (1991), a utilização de bioindicadores como metodologia para detectar efeitos de poluição atmosférica sobre os seres vivos, pode representar um sistema de informação complementar no controle da qualidade do ar através da coleta de dados sobre os efeitos da poluição. Porém, a utilização de bioindicadores, não é capaz de substituir medições de concentrações de poluentes através de métodos físico-químicos, mas fornece informações adicionais.

Várias espécies vegetais têm sido utilizadas com eficiência no monitoramento de poluentes, sobretudo do ozônio. Entre elas está a *Tradescantia pallida*, que tem demonstrado grande eficiência devido à sua facilidade de cultivo e boa adaptação às condições climáticas do Brasil e facilidade de aplicação do teste do micronúcleo (LIMA, 2007).

3.4 Biomonitoramento com *Tradescantia pallida*

Algumas plantas são reconhecidas como ótimas indicadoras de efeitos citogênicos e mutagênicos causados por poluentes ambientais, podendo ser usadas tanto em ambientes fechados quanto em ambientes abertos (GRANT, 1994), sendo que plantas do gênero *Tradescantia* têm sido utilizadas desde os primeiros estudos experimentais com material citogenético (MA, 1981).

A espécie *Tradescantia pallida* (Commelinaceae), conhecida no Brasil como Trapoeraba, Trapoerabão ou Coração Roxo (Figura 3), é originária do México. Caracteriza-se por ser uma espécie herbácea densamente ramificada, de pequeno porte, fácil cultivo, fácil adaptação a condições climáticas e de relevo, tipo de solo, altitude e latitude, além de apresentar flores durante o ano inteiro. Apresenta folhas carnosas de 4 a 9 cm de comprimento e bainha de 1 cm. As flores possuem coloração

rósea, contrastando com as folhas roxas, que no cultivo a pleno sol tem a cor acentuada, causando um efeito desejável para ornamentação (Figura 3) (LORENZI, 2013, OLIVEIRA, 2014).

Figura 3 – *Tradescantia pallida* cultivada no Câmpus Londrina da UTFPR.



Fonte: Autoria própria.

A espécie *T. pallida* é classificada como uma espécie de bioensaio, sendo muito utilizada em experimentos como bioindicadora de qualidade ambiental, pois responde com eficiência à poluição do ar, do solo e da água (OLIVEIRA, 2014).

O gênero *Tradescantia* possui cromossomos relativamente grandes, o que facilita a observação citogenética. Para a detecção das aberrações cromossômicas induzidas por agentes clastogênicos nas células da planta foram desenvolvidos o ensaio do filamento do estame (Trad-SMH), o teste de mitose de células do tubo polínico e o ensaio do micronúcleo (Trad-MCN), desenvolvidos para a detecção de alterações nos cromossomos durante a mitose e meiose, cujos trabalhos realizados nas década de 1940 a 1960 são citados por Carvalho (2005). Diversas espécies e clones do gênero *Tradescantia* têm sido utilizadas em bioensaios para estudos genotóxicos e mutagênicos provocados pela poluição do ar no Brasil e em outros países (MA et al., 1994, BATALHA et al., 1999, GUIMARÃES et al. 2000, COSTA et al., 2005, KLUMPP et al., 2006, MACHADO, 2008, SAVÓIA et al. 2009). Cidades nos estados de São Paulo e Mato Grosso já apresentaram projetos de programas de biomonitoramento da qualidade do ar (LIRA et al., 2008, ZANATO, 2010).

Dessa forma, o biomonitoramento com a utilização de *Tradescantia* é uma alternativa interessante, onde é possível observar as respostas das plantas ao grau de poluição a que estão sujeitas, através do acúmulo de elementos tóxicos nas folhas ou pelas alterações genéticas que apresentam. Paralelamente, ainda permite avaliar áreas com grandes extensões, devido ao baixo custo operacional e utilizar um número maior de amostragens (ZANATO, 2010).

3.4.1 Teste do micronúcleo em *Tradescantia* (TRAD-MCN)

Dentre os testes genotóxicos que são capazes de detectar alterações gênicas e cromossômicas, se destaca o teste do micronúcleo, eficiente em fornecer informações sobre os danos no DNA causados por agentes químicos e físicos (OLIVEIRA, 2014).

A fragmentação dos cromossomos ocorre durante a divisão celular e tem sido utilizada como resposta bioindicadora da presença de agentes genotóxicos no ambiente. Estes fragmentos chamados micronúcleos se organizam fora do núcleo principal da célula e podem ser observados em fases específicas da divisão celular, em especial durante as fases da prófase I da meiose para formação de micrósporos em flores de *Tradescantia* (MA, 1982).

O teste do micronúcleo em *Tradescantia* se baseia na contagem de micronúcleos produzidos como resultado da fragmentação de cromossomos das tétrades dos micrósporos de *Tradescantia* (MA, 1981, RODRIGUES et al., 1996).

O bioensaio Trad-MCN é um teste simples, rápido e que pode gerar resultados confiáveis em 24-48 horas (MA, 1981). Assim, vem sendo muito utilizado em programas de monitoramento ambiental, devido a sua efetividade, simplicidade com que é executado e ao baixo custo sua metodologia (ZENGH et al., 1999).

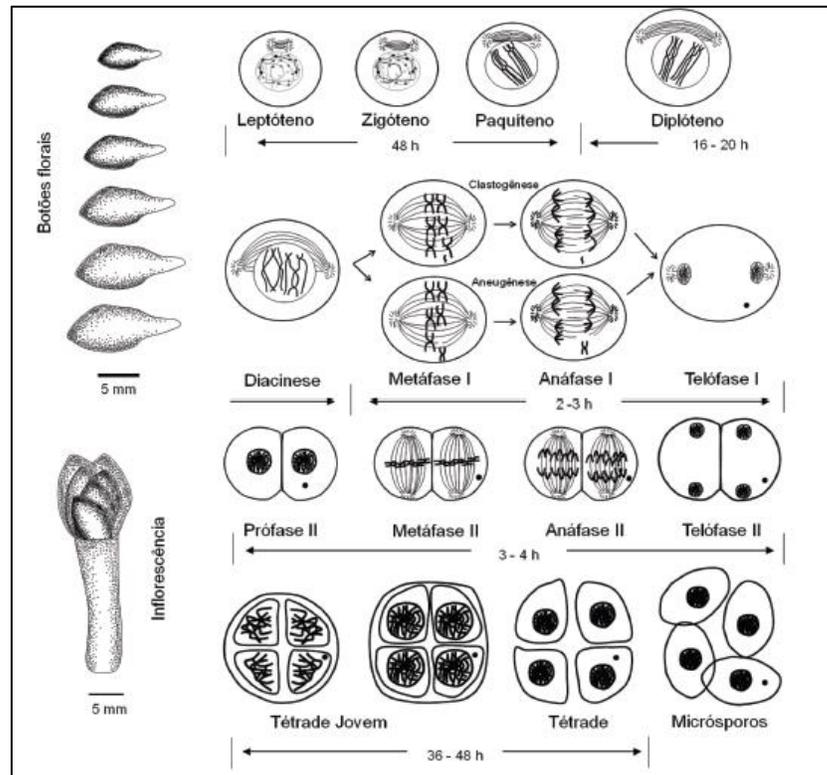
A formação do grão de pólen nas plantas depende da formação de micrósporos, produzidos por meiose, processo de divisão celular reducional com relação ao número de cromossomos da espécie, no qual uma célula diplóide origina quatro células haplóides (a partir de duas divisões nucleares sequenciais, meiose I e II). A meiose I representa a preparação para a divisão celular, sendo que, em sua fase de prófase, os cromossomos homólogos emparelham-se, formando os bivalentes.

Seguem-se as etapas da meiose I, promovendo a separação dos cromossomos homólogos. Na meiose II, segunda divisão celular, as cromátides irmãs alinham-se no plano equatorial da célula e se separam, movendo-se para pólos opostos durante a anáfase, seguida da formação de novos envoltórios nucleares, reorganização dos núcleos, assim como da formação de novas paredes celulares, constituindo as novas células haplóides (RAVEN et al., 2007, FERREIRA, 2008).

O início da prófase I é a fase de maior sensibilidade aos agentes mutagênicos, e o estudo da formação de micrósporos possibilita, então, a análise para detecção dos micronúcleos em uma grande população de células na mesma fase da meiose. Na prática, isto é conseguido através da utilização de inflorescências jovens de *Tradescantia* (MA, 1982).

A Figura 4 ilustra os estágios da divisão celular das células diplóides na formação dos micrósporos em *Tradescantia*, com a formação de micronúcleo, decorrente da “perda” de um cromossomo do fuso (MA, 1983 apud Costa et al., 2015).

Figura 4 – Ilustração da divisão meiótica para formação de micrósporos em *Tradescantia*.



Fonte: Ma, 1983 apud Costa et al., 2015.

Várias substâncias “tóxicas” que exercem efeito mutagênico ou clastogênico, como poluentes (PRAJAPATI; TRIPATHI, 2008), herbicidas (SILVA, 2013), Iodo (GORNI et al. 2014) favorecem a ocorrência de micronúcleos. Segundo Alves et al. (2003), o Formaldeído reconhecidamente induz à mutagênese e leva ao aumento da frequência de micronúcleos nas células mãe de grãos de pólen de *Tradescantia*. Esses autores mantiveram inflorescências de *T. pallida* em uma solução de Formaldeído (10 ppm) como um controle positivo. Mielli et al. (2009) também utilizaram o Formaldeído como controle, submetendo as inflorescências de *T. pallida* a uma solução de Formaldeído (0,2%), obtendo uma frequência de 5% a 11% de micronúcleos.

Carreras et al. (2006), utilizando o Trad-MCN demonstraram que o tráfego veicular na cidade de Córdoba, Argentina, tem influência no aumento da frequência de micronúcleos em *T. pallida*, uma vez que as plantas cultivadas em regiões com tráfego veicular intenso apresentaram uma frequência 1,5 vezes maior do que em regiões com baixa circulação de veículos e com intensa presença de vegetação.

Isidori et al. (2003) utilizaram o mesmo teste no sul da Itália e concluíram que a utilização de bioensaios integrado com análises químicas (cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa) de substâncias potencialmente tóxicas, podem fornecer uma ferramenta de monitoramento da qualidade do ar eficaz. As plantas expostas a atmosfera analisada, apresentaram uma frequência de micronúcleos até 15 vezes maior no inverno do que as plantas que foram expostas nos mesmos pontos, no verão.

Prajapati e Tripathi (2008) conseguiram correlacionar a frequência de micronúcleos em *T. pallida* com as concentrações de material particulado na cidade de Varanasi, Índia, observando que a frequência de micronúcleos aumentou de forma proporcional à concentração de material particulado no período analisado.

No Brasil, Batalha et al. (1999), Ferreira et al. (2003) e Meireles et al. (2009) também utilizaram o Trad-MCN e conseguiram resultados significativos nas avaliações da qualidade do ar urbano da cidade de São Paulo. Esses autores demonstram que o aumento na frequência de micronúcleos estava relacionado à exposição das plantas aos pontos com maiores níveis de poluição.

Tendo em vista o sucesso da utilização do teste em diversos lugares do mundo desde os anos 80, Misik et al. (2006), consideraram o bioensaio Trad-MCN como um dos modelos mais promissores para o monitoramento ambiental.

4. METODOLOGIA

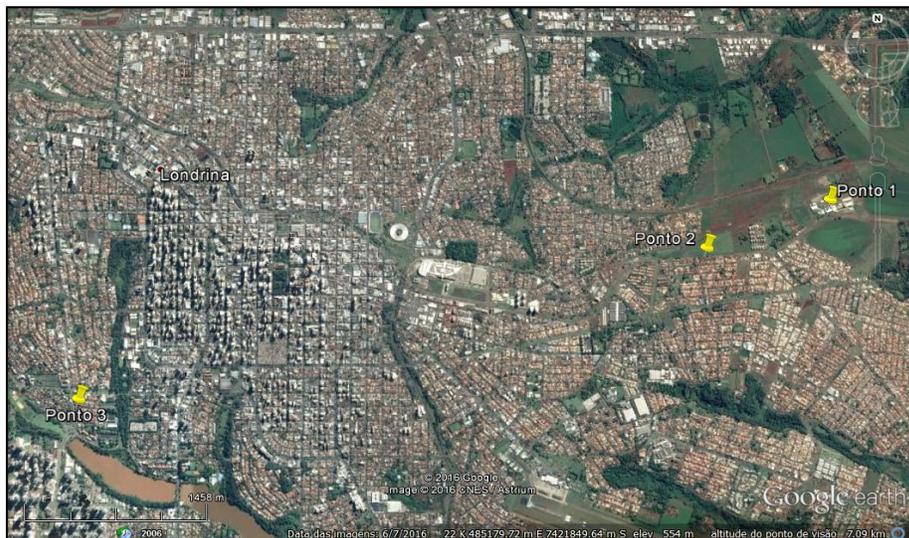
4.1 Materiais utilizados

Os materiais utilizados para a realização esta pesquisa foram amostras com inflorescências jovens das plantas da espécie *Tradescantia pallida*, microscópio óptico, microscópio estereoscópio, lâminas, lamínulas, solução etanol-ácido acético (3:1), etanol 70%, corante azul de metileno (em substituição ao corante carmim acético utilizado no protocolo de Ma (1981)), solução Formaldeído 10% e esmalte incolor para a vedação das lâminas.

4.2 Coleta das amostras

Botões florais da espécie *T. pallida* foram coletados em três pontos da cidade de Londrina-PR (Figura 5). Um dos pontos (UTF) foi o Câmpus Londrina da UTFPR (Figura 6a), na região leste da cidade, onde é possível conhecer as concentrações de ozônio, pois são monitoradas diariamente no Câmpus a partir do monitor de ozônio instalado no Laboratório de Análises em Poluição do Ar, atividade de responsabilidade da Profa. Dra. Leila Droprinchinski Martins.

Figura 5 – Localização dos 3 pontos de coleta de inflorescências de *T. pallida* para o teste dos micronúcleos.



Fonte: Google Earth.

O segundo ponto de coleta (EsP) foi o canteiro localizado na altura do número 1852 da Estrada dos Pioneiros (próximo ao Câmpus) (Figura 6b), onde há grande circulação de veículos e proximidade com o monitor de ozônio. O terceiro ponto foi na Av. Maringá (AvM) (Figura 6c), na altura do número 2393, região oeste da cidade, distante dos outros demais pontos e também com grande circulação de veículos, mas próxima ao lago Igapó, uma área mais arborizada.

Figura 6 – Locais de coleta das inflorescências de *T. pallida* para análise dos micronúcleos.



Fonte: Autoria própria.
Nota: a: UTF; b: EsP; c: AvM.

As coletas foram realizadas nos dias 27 de Agosto de 2016 (AGO) e 07 de Setembro de 2016 (SET), totalizando 15 inflorescências por localidade. A remoção da inflorescência (Figura 7) foi realizada com pinça e tesoura, sendo imediatamente armazenadas em frascos plásticos com solução etanol-ácido acético (3:1) com a identificação de cada ponto e data de coleta.

Figura 7 – Detalhe do ramo e do ápice contendo a inflorescência de *T. pallida*.



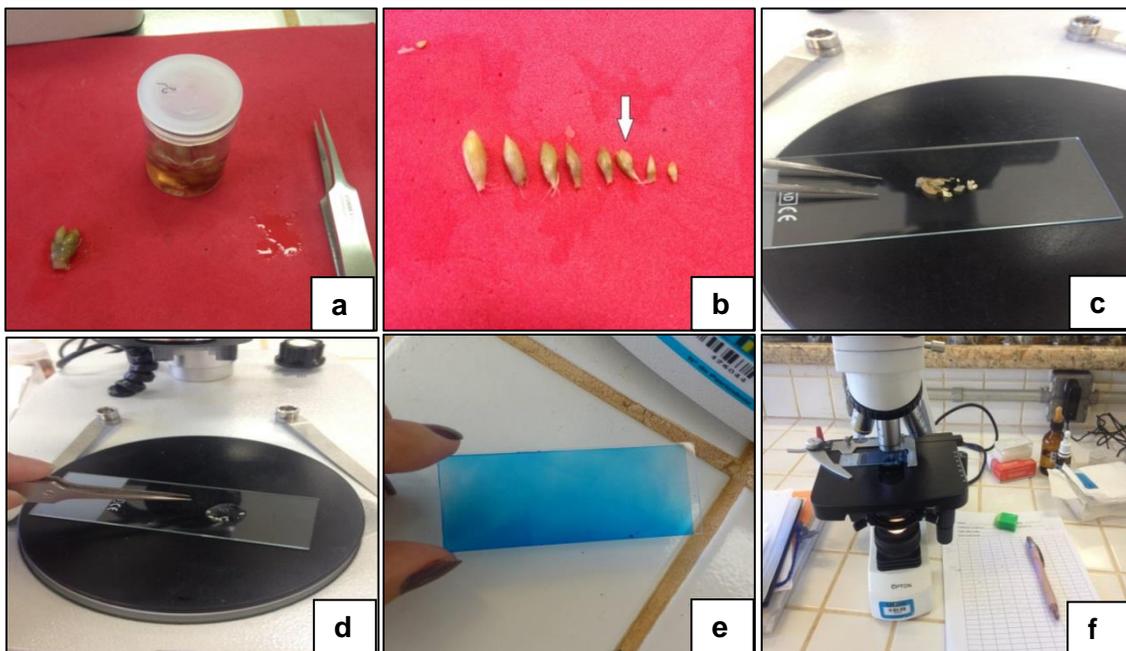
Fonte: Autoria própria

4.3 Preparo das amostras para o Teste do micronúcleo (Trad – MCN)

Seguindo o protocolo de Ma (1981), as inflorescências das plantas foram colhidas e mantidas em uma solução etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas para fixação. Após as 24 horas, as amostras foram armazenadas em etanol 70%, em geladeira, até o momento da realização do teste do micronúcleo (Figura 8a).

Para a realização do Trad-MCN, com o auxílio de pinças, os botões florais foram abertos (afastamento de sépalas e pétalas) para a remoção das anteras, que foram dispostas sobre a lâmina (Figura 8c). Colocava-se 1 gota de água destilada sobre as anteras e a seguir, estas foram dilaceradas com o auxílio de pinças (Figura 8d). Retirou-se os debris restantes e, com auxílio do microscópio óptico, foi realizada uma busca rápida pelas tétrades que, se observadas, recebiam por 1 gota do corante azul de metileno e eram cobertas com a lâminula. Feito esses procedimentos, a lâmina estava pronta para observação das tétrades e contagem dos micronúcleos (Figura 8f).

Figura 8 – Sequência de etapas para montagem das lâminas para o teste Trad-MCN.



Fonte: Autoria própria.

Nota: **a:** recipiente de armazenamento das inflorescências fixadas e inflorescência selecionada para análise; **b:** botões presentes na inflorescência selecionada e botão na fase de tetrade; **c:** dissecção do botão selecionado; **d:** anteras retiradas do botão; **e:** lâmina com corante e lamínula pronta para contagem das tétrades. **f:** contagem de tétrades ao microscópio óptico.

O protocolo do teste foi realizado conforme o estabelecido por MA (1981), com as seguintes adaptações:

- O corante carmim acético foi substituído pelo azul de metileno, uma vez que o corante carmim acético inicialmente obtido foi formulado em uma concentração menor que a encontrada na literatura, o que não possibilitava uma clara visualização dos núcleos em cada tétrade;
- Tendo em vista que o azul de metileno se mostrou eficaz na visualização do material, não foi preciso aquecer a lâmina.

O teste do micronúcleo, ou bioensaio Trad-MCN, consiste em quantificar a fragmentação de cromossomos, induzida por agentes mutagênicos, como por exemplo, poluentes atmosféricos, durante a prófase I da meiose. Essa fragmentação dá origem aos chamados micronúcleos (MCN), que se organizam na periferia do núcleo e podem ser visualizados em tétrades de células mães de grãos de pólen (MA, 1981; LIMA, 2007).

Dessa forma, após o preparo de cada lâmina, esta foi levada ao microscópio óptico para exame e contagem de 300 tétrades e análise da frequência de ocorrência dos micronúcleos, mediante o aumento de 200x e 400x, com o uso de microscópio biológico binocular com óptica infinita marca Opton.

Para cada data e local de coleta, foram preparadas 5 lâminas que contivessem 300 tétrades (ou mais), conforme recomendações de Ma (1981).

4.4 Controle positivo da formação de micronúcleos

Foi realizado um teste para o controle positivo para a formação de micronúcleos, a partir do fornecimento de solução de Formaldeído (10%) às plantas de *T. pallida*. Coletou-se 45 inflorescências de *T. pallida*, das quais 15 foram mantidas em recipiente com água (CH₂O), 15 em uma solução de Formaldeído (10%), por 16 horas (CF16) e 15 foram submetidas à mesma solução por 40 horas (CF40) (Figura 9). Todas amostras de *T. pallida* passaram, previamente, por um período de 24 horas somente em água de torneira antes de serem submetidas à solução de Formaldeído, assim como após o tempo da exposição (16 e 40 horas), configurando o chamado tempo de recuperação (ALVES et al. 2003).

Figura 9 – Ramos de *Tradescantia pallida* em solução de Formaldeído (10%) (B) e em água (A), para controle positivo para formação de micronúcleos.



Fonte: A autoria própria.

A análise das inflorescências do controle foi realizada da mesma forma que para as outras amostras (tópico 4.3). Após os tempos em solução de Formaldeído, as plantas foram transferidas para uma solução etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas para fixação, e depois armazenadas em etanol 70% até o momento da realização do teste do micronúcleo.

4.5 Análise de dados

A frequência de micronúcleos foi calculada e expressa pelo total de micronúcleos a cada 300 tétrades (GUIMARÃES et al., 1999, PEREIRA, 2012, ISIDORI et al., 2003, ALVES et al., 2003). Para comparar as frequências encontradas entre os diferentes dias e os locais de coleta, foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) (FERREIRA et al. 2003, PEREIRA et al. 2012), utilizando o software Excel.

4.6 Monitoramento de ozônio

As concentrações de ozônio junto ao ponto UTF foram obtidas através de um analisador Thermo Fisher Scientific, modelo 49i (Figura 10), instalado no Laboratório de Análises em Poluição do Ar (LAPAR) da UTFPR, que mede as concentrações através de fotometria ultravioleta, e as registra com resolução de 1 minuto.

Figura 10 - Monitor de ozônio Thermo Fisher Scientific* modelo 49i utilizado para a medição das concentrações no ponto UTF.



Fonte: Autoria própria.

Nota *: aparelho localizado no LAPAR/UTFPR, dados gentilmente cedidos pela Profa. Leila Droprinchinski Martins.

As informações abaixo foram transcritas do manual de instruções do analisador Thermo Fisher Scientific (2011).

O modelo 49i opera a partir do princípio de que as moléculas de ozônio absorvem luz ultravioleta a um comprimento de onda de 254 nm. O grau em que a luz ultravioleta é absorvida está diretamente relacionado com a concentração de ozônio e pode ser descrito pela Lei Beer-Lambert (Equação 6):

$$\frac{I}{I_0} = e^{-KLC} \quad (6)$$

Onde:

K = Coeficiente de absorção molecular, 308 cm^{-1} (a 1atm e 0°C)

L = Comprimento da célula, 38 cm

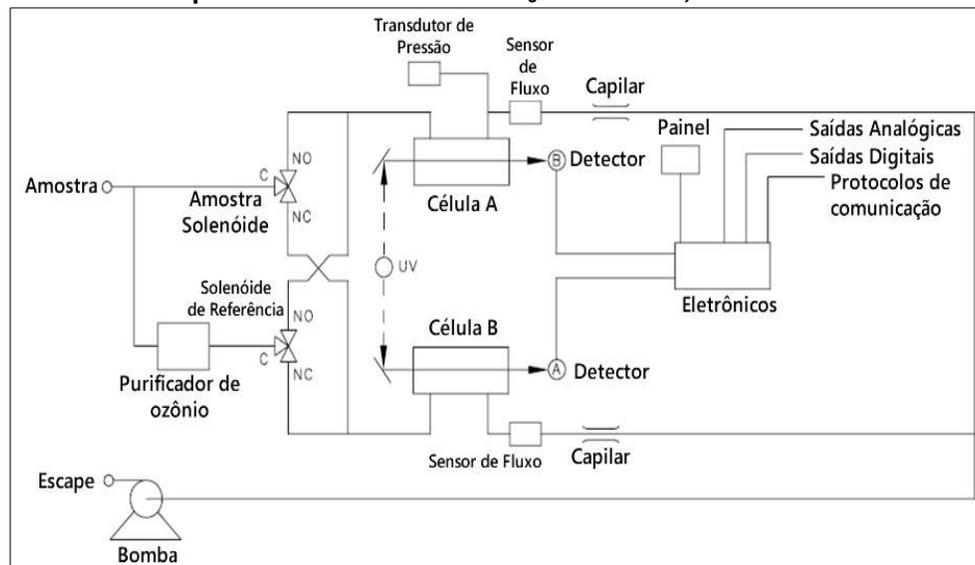
C = Concentração de ozônio em partes por milhão (ppm)

I = Luz ultravioleta de amostra com ozônio (gás de amostra)

I_0 = Luz ultravioleta de amostra sem ozônio (gás de referência)

A amostra de ar é aspirada para dentro do aparelho através de um anteparo e é dividida em duas correntes de gás (Figura 11). Uma corrente de gás flui através de um purificador de ozônio para se tornar o gás de referência (I_0). O gás de referência em seguida, flui para a válvula solenóide de referência. A outra corrente do gás de amostra (I) flui diretamente para a válvula solenóide de amostra. As válvulas solenóides se alternam entre as de referência e as de amostra, entre as células A e B a cada 10 segundos. Quando a célula A contém gás de referência, a célula B contém gás de amostra e vice-versa.

Figura 11 - Fluxo esquemático do monitor de O_3 modelo 49i, marca Thermo Fisher Scientific.



Fonte: Manual de instruções do modelo 49i com adaptações (2011).

As intensidades de luz ultravioleta de cada uma das células são medidas pelos detectores A e B. Quando as válvulas solenóides mudam os fluxos dos gases de referência e de amostra em células opostas, as intensidades de luz são ignoradas por vários segundos para permitir que as células sejam liberadas. O modelo calcula a concentração de ozônio para cada célula e reproduz a concentração média para o visor frontal, para as saídas analógicas e saídas de rede (serial e ethernet).

O monitor de ozônio está instalado no Laboratório de Análises em Poluição do Ar (LAPAR) do Câmpus da UTFPR, e registra as concentrações diariamente, em intervalos de 1 em 1 minuto. Os dados referentes às concentrações de ozônio nos dias de coleta e naqueles de sua véspera, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Leila Droprinchinski Martins e equipe do Laboratório de Análises em Poluição do Ar (LAPAR/UTFPR).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos parâmetros temperatura e concentração de ozônio

Pode-se observar que no período anterior à primeira coleta, as plantas estiveram submetidas a temperaturas mais altas que na segunda data, tanto em termos de temperatura mínima, média e máxima (Tabela 2). As principais diferenças podem ser percebidas em especial pela temperatura média em torno de 23° e da máxima 30°, bem superiores à média de 15° e máxima de 20° observadas na segunda coleta. Outro aspecto que diferiu entre as datas de coleta foi a precipitação e consequente umidade relativa do ar, que foram menores na primeira coleta, pela ausência de chuva e cerca de 40 a 50% de umidade relativa. Já, na véspera da segunda coleta houve precipitação de 15 mm de chuva e 50 a 80% de umidade relativa do ar (IAPAR, 2016).

Tabela 2 – Valores mínimos, médios e máximos absolutos de temperatura e concentração de ozônio nas vésperas e datas de coleta das inflorescências de *T. pallida* para o teste Trad-MCN.

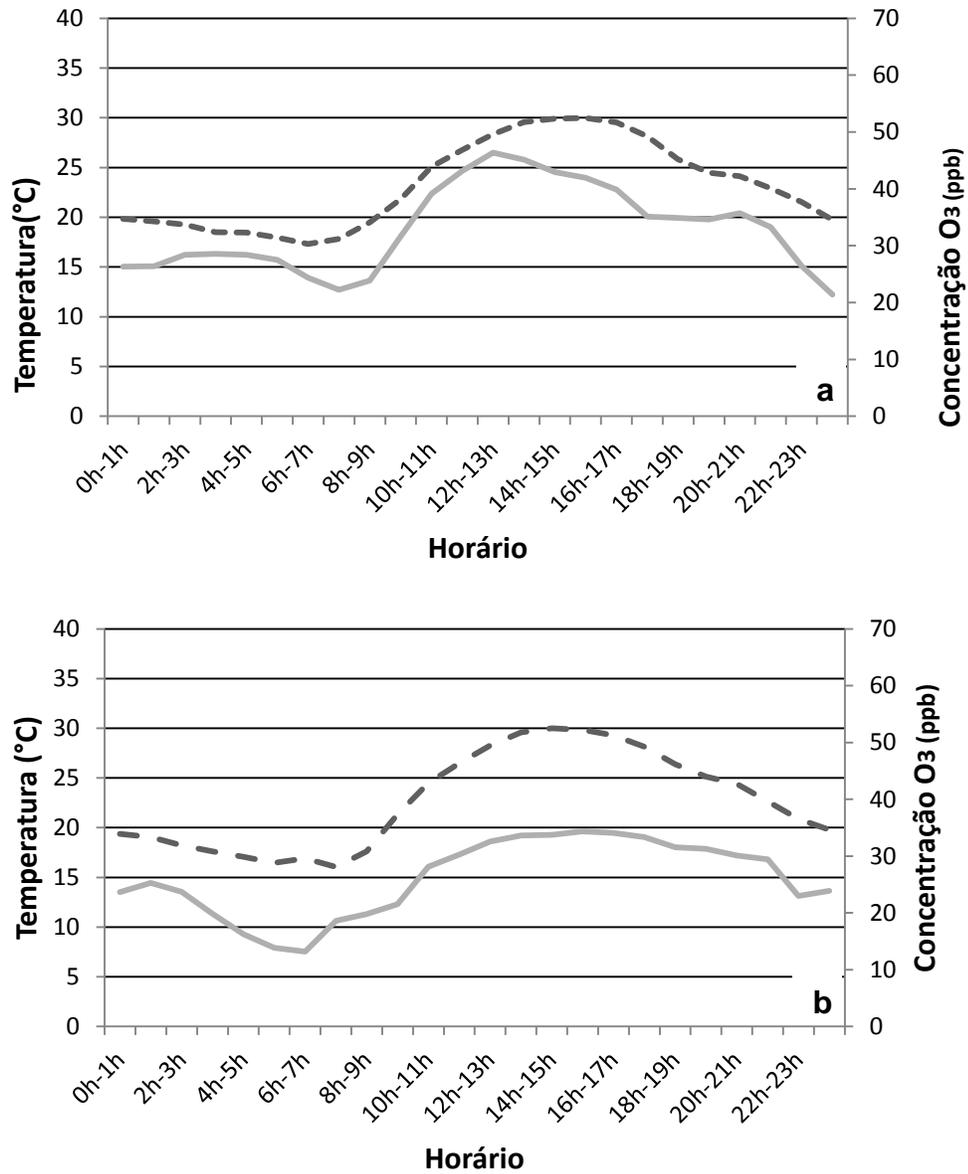
Datas de coleta	Temperatura (°C)			Concentração O ₃ (ppb)		
	Mín.	Méd.	Máx.	Mín.	Méd.	Máx.
VespAGO	17,13	23,16	30,17	18,36	32,80	47,98
AGO	15,51	22,71	30,12	8,12	25,84	36,30
VespSET	11,71	15,77	19,22	3,93	13,71	23,28
SET	9,66	14,16	20,60	10,9	22,47	64,35

Fonte: Autoria própria.

Nota: VespAGO: véspera da data de coleta AGO; **AGO:** dia da data de coleta AGO (27/08/2016); **VespSET:** véspera da data de coleta SET; **SET:** dia da data de coleta SET (07/09/2016).

Da mesma forma, nos períodos que antecederam à primeira coleta, as plantas de *T. pallida* ficaram expostas a maiores concentrações de ozônio do que na segunda coleta, tanto para os valores mínimos, médios e máximos (Tabela 2). Como não havia chovido e as horas estavam quentes (Figura 12), o comportamento da variação da concentração de ozônio foi similar ao da temperatura. Com as temperaturas mais baixas e a presença de nuvens, os valores médios de ozônio também foram menores, com oscilações mais irregulares (Figura 13).

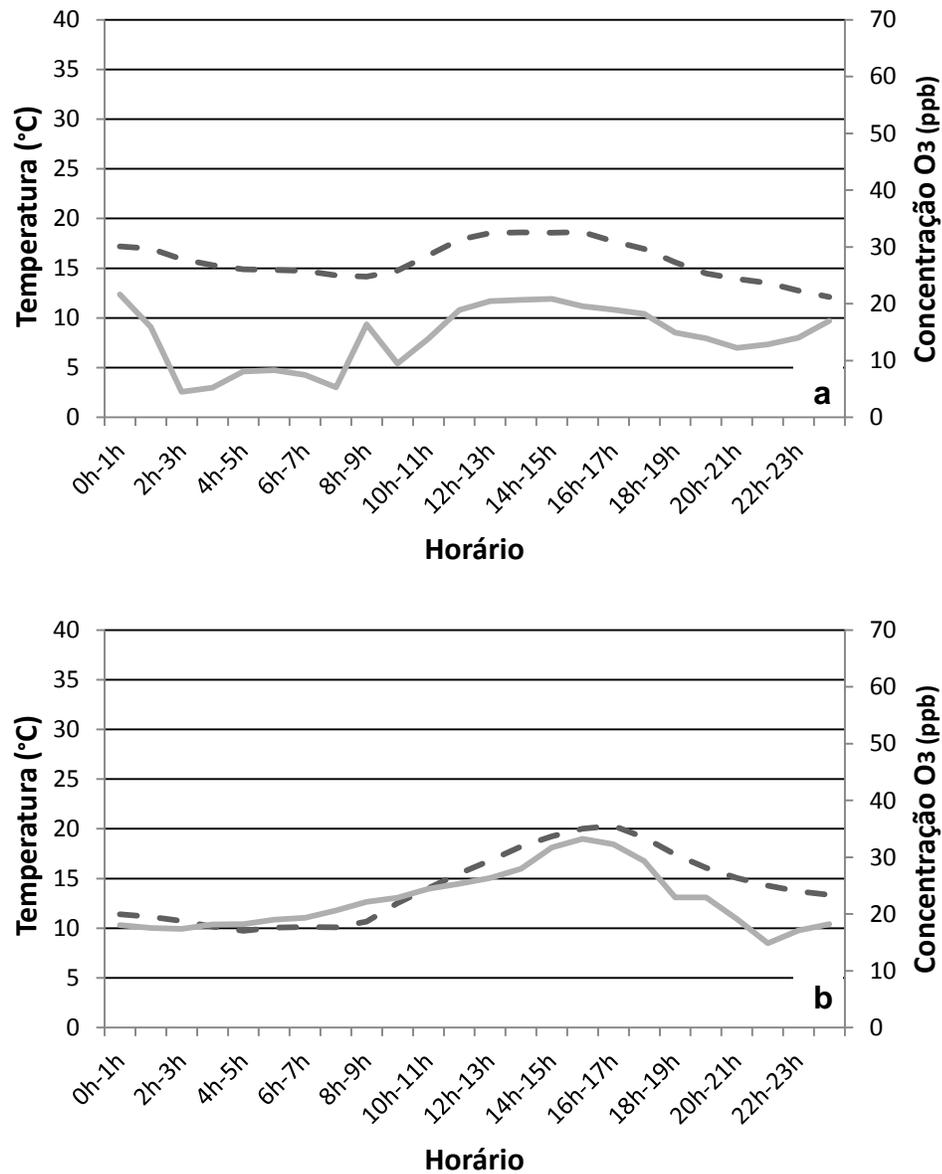
Figura 12 – Variação da temperatura (°C)* e da concentração de O₃ (ppb)* na véspera e na data da primeira coleta (AGO) das inflorescências de *T. pallida*.



Fonte: Autoria própria.

Nota: *: Valores indicam as médias dos respectivos parâmetros para os intervalos de 1 hora; a: Concentração de O₃ (—) e temperatura (- - -) na véspera da coleta AGO; b: Concentração de O₃ e temperatura na data da coleta AGO (27/08/2016).

Figura 13 – Variação da temperatura (°C)* e da concentração de O₃ (ppb)* na véspera e na data da segunda coleta (SET) das inflorescências de *T. pallida*.



Fonte: Autoria própria

Nota: *: Valores indicam as médias dos respectivos parâmetros para os intervalos de 1 hora; **a:** Concentração de O₃ (—) e temperatura (- - -) na véspera da coleta SET; **b:** Concentração de O₃ e temperatura na data da coleta SET (07/09/2016).

Assim, como as coletas foram realizadas por volta das 14 horas, nas 24 a 30 horas anteriores (período necessário para as células mãe dos grãos de pólen passarem da fase de prófase I da meiose para a fase de tétrades), pode-se dizer que as plantas na coleta AGO ficaram expostas a concentrações maiores de ozônio (>40ppb), no

período de 10 às 20 horas da véspera (Figura 12). Por outro lado, antecedendo à coleta (SET) os valores médios de ozônio oscilaram em torno de 20 ppb (Figura13).

Cabe, ainda, destacar que essas concentrações de ozônio estão dentro dos limites dos padrões primário e secundário estabelecidos pela Resolução CONAMA Nº 3/90 ($160 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e pelo recomendado pela OMS ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

5.2 Dificuldades metodológicas

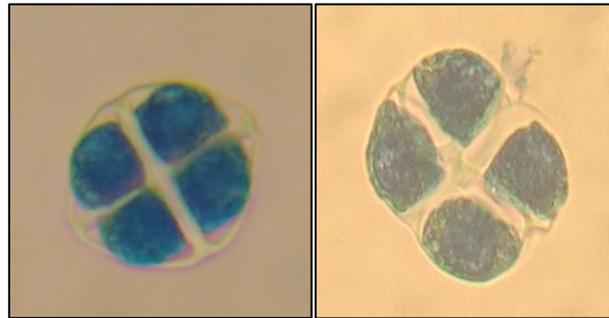
Algumas dificuldades foram encontradas no presente trabalho com relação ao desenvolvimento da metodologia escolhida.

A primeira consistiu em determinar, visualmente, o botão da inflorescência de *T. pallida* que estivesse na exata fase da divisão celular, em que fosse possível visualizar as tétrades que poderiam conter os micronúcleos. Vários botões, de várias inflorescências, foram abertos e estavam em uma fase muito mais jovem do que o desejado ou já na fase de grão de pólen. Essa busca pelo botão exato nas inflorescências consumiu um tempo maior do que o esperado e atrasou o desenvolvimento das fases seguintes da metodologia. Isto por que, de acordo com a literatura, o ideal seria utilizar primeiramente botões de tamanho intermediário em cada inflorescência ou escolher de preferência, dos médios o maior, e, de acordo com o que for encontrado, se muito jovem abrir uma flor mais velha, se muito velha, abrir um botão mais jovem (PEREIRA, 2012, GORNI, 2014). No entanto, no presente estudo, os botões que estavam em fase de tétrade eram, predominantemente, os de tamanho menor.

Depois de superado o obstáculo de encontrar o botão que continha as tétrades, embora deva-se destacar que nem toda inflorescência traz botão na fase de tétrade, confirmou-se a dificuldade de uma visualização adequada dessas células. O corante adquirido (carmim acético) possuía uma concentração de carmim menor do que a predominantemente citada na literatura, deixando o material muito claro, dificultando a delimitação do núcleo e impossibilitando a percepção de prováveis micronúcleos das células. A solução encontrada foi testar o uso do corante azul de metileno, já disponível no laboratório para as práticas que visam a coloração do núcleo celular. Esse corante

apresentou qualidade satisfatória para a visualização dos núcleos (Figura 14), por isso decidiu-se utilizá-lo no restante do estudo.

Figura 14 – Micrósporos de *Tradescantia pallida* na fase de tétrades, sem micronúcleos.

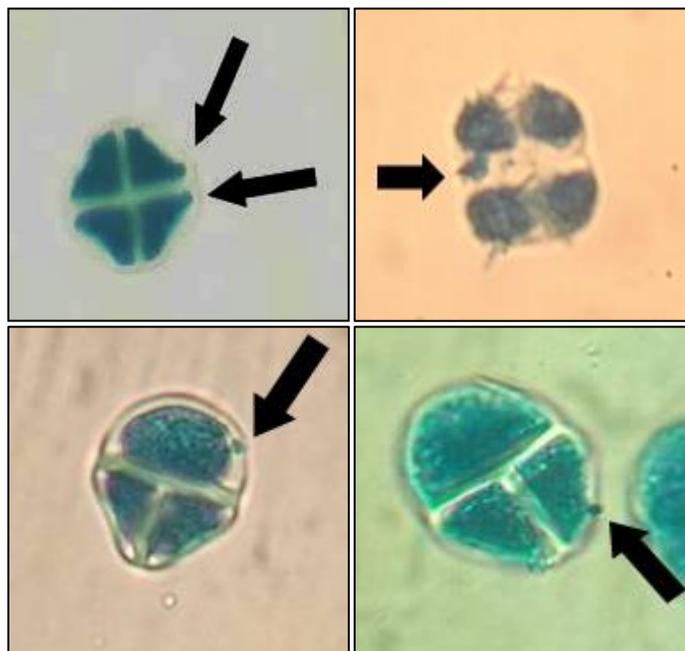


Fonte: Autoria própria.

5.3 Quantificação de micronúcleos

Foram encontrados micronúcleos nas lâminas analisadas nos 3 pontos e nas 2 datas de coleta, porém em frequência muito baixa e com diferentes aparências. As fotos da Figura 15 ilustram alguns dos micronúcleos que puderam ser observados.

Figura 15 – Células mães do grão de pólen de *Tradescantia pallida* na fase de tétrades, com micronúcleos.



Fonte: Autoria própria.

A frequência de formação de micronúcleos nas plantas de *T. pallida* amostradas na primeira coleta (AGO), variou de 0,3 a 1,8% (Tabela 3), porém não houve diferença entre os 3 locais ($p=0,157$) (Figura 16a). Da mesma forma, não houve diferença significativa entre as taxas de formação de micronúcleos na segunda coleta ($p=0,237$), embora tenha havido a tendência das plantas coletadas na EsP apresentarem taxas maiores (Figura 16b). No entanto, a grande variabilidade nos dados, dificulta a sua distinção. Outra tendência observada foi a das menores taxas de formação de MCN terem sido observadas no ponto UTF, local de baixo tráfego veicular (Figura 16a).

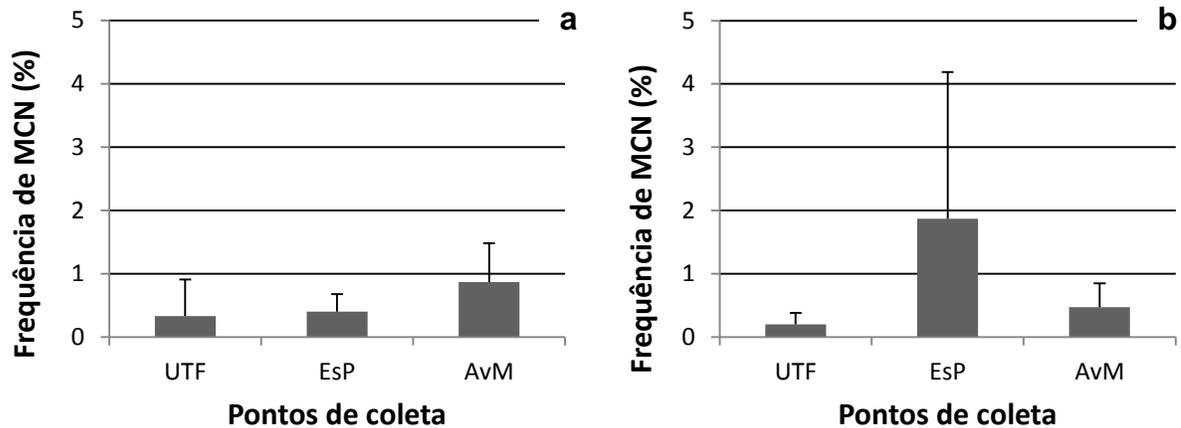
Tabela 3 - Quantificação de MCN obtidas a partir de inflorescências de *Tradescantia pallida* coletadas em 3 locais no município de Londrina e para as mantidas no tratamento controle.

LOCAIS ¹	DATA ²	TOTAL DE MCN ³	MÉDIA DE MCN ⁴	% MCN
UTF	AGO	05	01 ± 1,73	0,37
	SET	03	0,6 ± 0,55	0,2
EsP	AGO	06	1,2 ± 0,84	0,40
	SET	28	5,6 ± 6,95	1,86
AvM	AGO	13	2,6 ± 1,82	0,86
	SET	07	1,4 ± 1,14	0,46
CH ₂ O (-)	OUT	01	0,2 ± 0,44	0,67
CF16 (+)	OUT	07	1,4 ± 2,61	0,47
CF40 (+)	OUT	06	1,2 ± 1,09	0,4

Fonte: Autoria própria.

Nota: ⁽¹⁾ Locais de coleta das inflorescências de *T. pallida*, sendo UTF: na UTFPR; EsP: Estrada dos Pioneiros; AvM: Avenida Maringá; CH₂O (-): ramos com inflorescências mantidas em água; CF16: ramos com inflorescências mantidas por 16 horas em Formaldeído (10%); CF40: ramos com inflorescências mantidas por 40 horas em Formaldeído (10%); ⁽²⁾ Datas de coleta, sendo: AGO: 27 de Agosto de 2016; SET: 07 de Setembro de 2016; ⁽³⁾ Total de micronúcleos contados em 5 lâminas, a cada 300 tétrades; ⁽⁴⁾ Média de micronúcleos ± o desvio padrão, n= 5 repetições.

Figura 16 – Frequência de micronúcleos a cada 300 tétrades, obtidas a partir de inflorescências de *T. pallida* coletadas em 3 pontos no município de Londrina, PR, em duas datas de coleta.

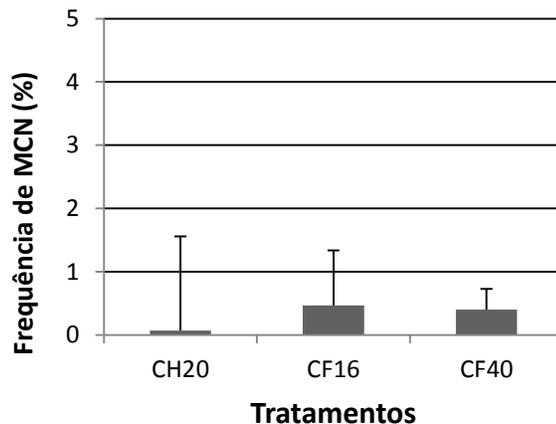


Fonte: Autoria própria.

Nota: a: Agosto (27/08/2016); b: Setembro (07/09/2016).

Também não foi observada diferença significativa ($p=0,49$) na formação de MCN em ramos de *T. pallida* submetidas ao Formaldeído (10%) (Figura 17 e Tabela 3), utilizado como controle positivo. Portanto, pode-se considerar que o Formaldeído não induziu a frequência dos micronúcleos, nas condições experimentais realizadas.

Figura 17 – Frequência de micronúcleos a cada 300 tétrades obtidas de ramos com inflorescências de *T. pallida*, mantidas em Formaldeído 10% (controle positivo) e água.



Fonte: Autoria própria.

Nota: CH20: (-): ramos com inflorescências mantidas em água; CF16: ramos com inflorescências mantidas por 16 horas em Formaldeído (10%); CF40: ramos com inflorescências mantidas por 40 horas em Formaldeído (10%).

Alves et al. (2003), avaliaram o potencial mutagênico do ar em ambientes de laboratórios de pesquisa, onde são utilizadas substâncias químicas e do herbário de fanerógamas, onde o naftaleno é empregado como inseticida, no controle de pragas. Esses autores obtiveram uma frequência média de 7,4% na formação de micronúcleos utilizando Formaldeído (10 ppm) como controle positivo, esses autores obtiveram uma frequência média de 7,4% de micronúcleos, enquanto para o controle negativo (água), a taxa foi de 3,2%. Nos laboratórios, as taxas médias variaram de 3,2% a 4,3% se mantendo sempre próximas as do controle negativo, cujos valores variaram de 1,9% a 5,3% ao longo dos meses de monitoramento. Já no herbário, a frequência média de micronúcleos foi de 7,9% e os autores concluíram que os compostos orgânicos gasosos volatilizados a partir do naftaleno provocaram, da mesma forma que o Formaldeído, um aumento significativo na indução da formação de micronúcleos.

Com isso, uma possível explicação para o controle positivo não ter se mostrado efetivo foi o fato das amostras terem permanecido em laboratório em condições de baixa luminosidade, sem incidência de luz solar ou artificial, além de terem permanecido no escuro (período da noite) na maior parte das horas em que foram submetidas ao tratamento. Como o metabolismo da planta é menor na parte da noite do que na presença de luz solar, é possível que o Formaldeído não tenha sido absorvido a ponto de provocar alterações citogenéticas no intervalo de tempo proporcionado.

Na segunda data de coleta (SET), as concentrações de ozônio foram menores, assim como as temperaturas, que se apresentaram mais amenas que na primeira data de coleta (AGO). Pode-se observar que a temperatura e a concentração de ozônio variam, praticamente, de maneira semelhante, condizente com o conceito de formação do ozônio, que depende essencialmente de radiação e das concentrações de COVs e NOx na atmosfera (MARTINS, 2006). Fenger (1999) também observou resultado semelhante no norte da Europa, em que as concentrações de ozônio acompanhavam paralelamente o aumento das temperaturas, aumentando nos dias quentes e diminuindo nos dias mais frios.

Segundo Braga et al. (2001), os níveis de ozônio aumentam de maneira significativa entre o fim da primavera e o começo do outono e aumentam no meio da manhã, algumas horas após o rush matinal do trânsito (nível máximo de emissão de

óxidos de nitrogênio), atingindo picos no meio da tarde e declinando à noite. Os gráficos das Figuras 11 e 12 correspondem a essa informação.

Com relação à legislação vigente, considerando que a maior concentração em média atingida nas datas de coleta foi de 48 ppb e o maior valor absoluto, de 64,35 ppb (cerca de 94,23 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 126,33 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ respectivamente), a qualidade do ar estava dentro do padrão recomendado pela Resolução CONAMA Nº 3/90 e Resolução SEMA/PR Nº 016/2014, que é de 160 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Quanto à recomendação da OMS, as concentrações também estavam de acordo, uma vez que o valor máximo diário recomendado é 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Porém, o cumprimento das recomendações dos valores recomendados não garante a exclusão de efeitos a níveis inferiores a esses valores (WHO, 2000).

Klumpp et al. (2004) observaram que à temperatura de 11°C a frequência de mutações espontâneas (1,66%) de micronúcleos aumentou 100% em comparação ao experimento que realizaram à temperatura de 22°C (3,37%), utilizando *Tradescantia* clone 4430 em diferentes regiões da Europa. Observaram, também, que a temperatura de 42°C, danificou as células mãe de pólen em tal grau que o desenvolvimento normal é prejudicado, inviabilizando o teste de micronúcleos.

Lima (2007) montou um sistema de fumigação com ozônio, expondo ramos de *T. pallida* a concentrações de 60 e 80 ppb. A autora verificou que com a fumigação com 60 ppb de ozônio houve 7% de frequência de micronúcleos, e ainda, que o maior aumento da frequência de micronúcleos se deu depois de 72 horas após a fumigação com o ozônio.

Já, Costa et al. (2015) realizaram dois ensaios na cidade de São Leopoldo do Sul-RS, com o objetivo de avaliar se existe alguma relação entre a formação de micronúcleos e o número de horas de exposição aguda das inflorescências ao ar atmosférico de pontos amostrais na cidade (ambiente natural) e em ambiente com condições controladas (sala climatizada com temperatura constante de 26°C). A formação de micronúcleos não se relacionou com o tempo de exposição, pois não foram obtidas diferenças significativas entre as frequências de micronúcleos observadas nas inflorescências expostas a 8, 24 e 32 horas ao ar atmosférico natural dos pontos amostrais nem nos mesmos tempos de exposição em ambiente fechado. As

médias das frequências de micronúcleos em 100 tétrades no mês de outubro de 2012, por exemplo, foram de 3,13% para o tempo de exposição de 8 horas, 2,93% para 24 horas e 2,93% para 32 horas considerando os pontos amostrais. No controle negativo no mesmo mês, a frequência foi de 1,27% para 8 horas de exposição, 1,27% para 24 horas e 1,13% para 32 horas. Dessa forma, os autores concluíram que a exposição da espécie *T. pallida* durante diferentes tempos não influenciou de forma diferenciada a taxa de formação de micronúcleos tanto no ambiente natural, quanto em ambiente interno.

Meireles et al. (2008), avaliaram o potencial mutagênico do ar atmosférico na cidade de Senhor do Bonfim-BA, em duas áreas de tráfego diferenciado e utilizando como forma de controle negativo um ponto em local distante dos outros e sem qualquer tráfego de veículo (casa de vegetação do Câmpus da Universidade do Estado da Bahia). Foram observadas frequências de micronúcleos mais altas nos pontos com tráfego veicular (9 a 11%) do que no ponto de controle negativo (7%), neste caso, apontando a eficiência do teste do micronúcleo em *Tradescantia* (Trad-MCN) em indicar o potencial risco mutagênico das substâncias presentes no ar atmosférico.

De acordo com Pereira et al. (2013), a taxa de mutação espontânea em *T. pallida* ocorre na frequência de até 2 micronúcleos a cada 100 tétrades, podendo ocorrer também em ambientes livres de poluição, o que reforça que as frequências encontradas dos pontos de coleta em Londrina foram normais, indicando que as plantas não foram expostas a contaminantes nas 48 horas anteriores às coletas. Já Rodrigues et al. (1997) afirmaram que as frequências espontâneas em *T. paludosa* ocorrem em níveis de 0,87%.

A espécie *Tradescantia* vem sendo utilizada nas mais variadas áreas e com diferentes objetivos, desde analisar o potencial genotóxico de lodo de curtume (GORNÍ et al., 2014) até avaliar o efeito da exposição gestacional à poluição do ar no peso de crianças ao nascer e a resposta à mesma exposição do *T. pallida* a partir de possíveis associações entre as variáveis de exposição (CINTRA, 2014). Dessa forma, pode-se dizer que é uma espécie com grande potencial a ser explorado, que se mostra versátil para as mais diversas oportunidades de estudo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível testar a correlação das concentrações de ozônio com a frequência de micronúcleos encontrada nas inflorescências das amostras de *T. pallida* e dessa forma, avaliar a espécie como bioindicadora de concentrações de ozônio na atmosfera, uma vez que só foi possível a realização de duas datas de coletas das inflorescências. Isso ocorreu devido ao tempo ter se tornado exíguo para a realização do trabalho, uma vez que se “perdeu” um tempo inesperado no desenvolvimento da metodologia, devido às dificuldades metodológicas encontradas, como já citado anteriormente.

Embora não se tenha conseguido concluir com êxito o objetivo inicial do trabalho, é importante ressaltar as vantagens da utilização do teste de micronúcleo com *Tradescantia*, uma vez que depois da familiarização com o método e adaptação a cada necessidade e condições de trabalho, o teste pode ser considerado simples, e possui baixo custo, além do fato da espécie *T. pallida* se propagar com facilidade e florescer durante o ano todo, possibilitando ensaios em longo prazo.

Portanto, conclui-se que são necessários mais estudos nessa linha, realizando coletas de um número maior de inflorescências de *T. pallida*, em mais datas, analisando um número maior de lâminas. O próprio protocolo de Ma (1981), recomenda de 5 a 10 lâminas, provavelmente em função a grande variabilidade de resposta.

O uso da espécie *T. pallida* para o biomonitoramento da qualidade do ar em ambientes fechados ou em experimentos controlados, tem se mostrado interessante com o intuito de se obter respostas em curto prazo, enquanto o uso da espécie para o biomonitoramento da qualidade do ar em ambiente externo requer um acompanhamento mais contínuo em um período maior de tempo.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Edenise S.; PEDROSO, Andréa N. V.; DOMINGOS, Marisa; GUIMARÃES, Eliane T.; SALDIVA, Paulo H. N. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. São Paulo: **Hoehnea**. p. 89-94, 2003.
- ARNDT, Uwe; SCHWEIZER, Birgit. The use of bioindicator for environmental monitoring tropical and subtropical countries. In: **Biological monitoring signals from the environment**. Braunschweig: Gate. p. 199 – 298, 1991.
- BARROS, Miriam F. V.; SCOMPARIM, Akacia; KISHI, Celso S.; CAVIGLIONE, João H.; ARANTES, Márcia, R. L.; NAKASHIMA, Sandra Y.; REIS, Teresinha E. Identificação das ocupações irregulares nos fundos de vale da cidade de Londrina/pr por meio de imagem landsat 7. **R. RA'E GA**, Curitiba: n. 7, p. 47-54, 2003.
- BATALHA, João R. F.; GUIMARÃES, Eliane T.; LOBO, Débora J. A.; LICHTENFELS, Ana J. F. C.; DEUR, Tomislav; CARVALHO, Heloisa A.; ALVES, Edenise S.; DOMINGOS, Marisa; RODRIGUES, Geraldo S.; SALDIVA, PAULO H. N. Exploring the clastogenicity effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using *Tradescantia micronuclei* assay. **Mutation Research**. São Paulo: v. 426, p. 229-232, 1999.
- BERTAZOLLI, André, L.; BELLINI, Fernando, L.; GALLO, Gilmar I. **Estudo da viabilidade do biomonitoramento do ozônio troposférico**. Monografia UNICAMP. 2009.
- BRAGA, Alfesio; BÖHM, György M.; PEREIRA, Luiz A. A., SALDIVA, Paulo. Poluição atmosférica e saúde humana. São Paulo: **Revista USP**, 2001.
- CAMPOS JUNIOR, Edimar. O.; KERR, Warwick. E. Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* aplicado ao Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia. **Revista Horizonte Científico**. Uberlândia: v. 3, n. 2, p. 1-18, 2007.
- CARRERAS, H.A.; PIGNATA, M.L.; SALDIVA, P.H.N.; In situ monitoring of urban ait in Córdoba, Argentina usin the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) biossay. **Atmosferic Enviromental**. v. 40, p. 78240-7830, 2006.
- CARVALHO, Heloisa A. de. A *Tradescantia* como bioindicadora na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. **Radiologia Brasileira**. v. 38, p. 459-462, 2005.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Qualidade do ar no Estado de São Paulo 2015**. Série de relatórios. São Paulo, 2015. Disponível em: < <http://ar.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-relatorios/>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

CINTRA, Camila M. V. **Biomonitoramento da poluição atmosférica em domicílios de um distrito da cidade de São Paulo: uma associação entre peso ao nascer, acúmulo de elementos-traço e danos mutagênicos em *Tradescantia pallida***. 2014. 211 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

CONAMA. Resolução nº 5, de 15 de Junho de 1989. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. **Diário Oficial da União**. 30 ago. 1989.

CONAMA. Resolução nº 3, de 28 de Junho de 1990. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. **Diário Oficial da União**. 22 ago. 1990.

CONSTANTIN, Milton J.; OWENS, Elizabeth T. Introduction and perspectives of plants genect and cytogenetic assays. **Mutation Research**. v. 99, p. 1-12, 1982.

COPELLI, Thalita. S. da. **Biomonitoramento da qualidade do ar utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia sp.*** 2011. 38f. TCC (Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais) – Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

COSTA, Gustavo M.; PETRY, Camila T.; ENDRES, Delio. Avaliação da influência do tempo de exposição de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* para biomonitoramento da genotoxicidade do ar. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 13, n.4, p. 224-230, 2015.

DUTRA, Eliste G. FIORAVANTE, Edwan F. FERREIRA, Flávio D. **Emissão veicular e o ozônio troposférico na região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. In: 9º Congresso Iberomericana de Ingeniería Mecánica, Belo Horizonte, 2009, pág. 29-33.

ELLENBERG H. The use of bioindicator for environmental monitoring tropical and subtropical countries. In: **Biological monitoring signals from the environment**. Braunschweig: Gate. p. 199 – 298, 1991.

ESPOSITO, Marisia P. **Estudo da relação entre necroses foliares indicadoras de ozônio atmosférico e defesas antioxidativas em folhas de *Nicotiana tabacum* “Bel W3”**. 2008. 137 F. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

FENGER, Jes. Urban air quality. **Atmospheric Environment**. v. 33, p. 4877-4900, 1999.

FERREIRA, Tales A. A. **Biologia celular e molecular**. Campinas: Átomo. 2008.

FERREIRA, Maria I.; RODRIGUES, Geraldo S. DOMINGOS, Marisa; SALDIVA Paulo. H.N. In Situ Monitoring of Mutagenicity of Air Pollutants in São Paulo City Using *Tradescantia*-SHM Bioassay. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46, p. 253-258, 2003.

GORNI, P. H. GUANDALINI. Z. V.; SILVEIRA, Z. V.; NAKAYAMA, F. T. Efeito do lodo de curtume na frequência de micronúcleos no bioindicador *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *Purpurea*. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**. v.8, n.4, p. 361-373, 2014.

GOVERNO DO PARANÁ. Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Resolução Nº 16/2014.

GRANT, Willian F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**. v. 310, p. 175-185, 1994.

GUICHERIT, Robert; ROEMER, Michiel. Tropospheric ozone trends. **Chemosphere Global Change Science**. v. 2, p. 167-183, 2000.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR, N.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; SALDIVA P.H.N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. **Environmental and Experimental Botany**. v.44, p. 1-8, 2000

INSTITUTO AGRÔNOMO DO PARANÁ. Dados diários de Londrina. Agrometeorologia. Disponível em: <<http://www.iapar.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1828>>. Acesso em: 07 nov. 2016.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAPa). Indicadores da Qualidade do Ar. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=59>>. Acesso em: 06 out. 2016.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAPb). Monitoramento da Qualidade do Ar. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=92>>. Acesso em 06 out. 2016

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ (IAPc). Mapa da Rede de Monitoramento da Qualidade do Ar. Disponível em: <<http://www.iap.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1414>>. Acesso em:

INSTITUTO DE ENERGIA E MEIO AMBIENTE. **Padrões de qualidade do ar: experiência comparada Brasil, EUA e União Européia**. São Paulo, 2012.

ISIDORI, Marina; FERRARA, Maria; LAVORGNA, Margherita; NARDELLI, Angela; PARRELLA, Alfredo. In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the *Tradescantia* micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). **Chemosphere**. v. 52, p. 121-126, 2003.

JANUZZI, Denise De. C.R. **O desenvolvimento de Londrina e as transformações nos espaços públicos da região central.** In: Semina: Ciências Sociais e Humanas, Londrina, 2005, v.26, p.87-94.

JUNIOR, José R. **Efeitos da poluição atmosférica na área do Aeroporto Internacional de São Paulo - Guarulhos sobre ensaio de bioindicadores vegetais.** 2008. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KRUPA, Sagar V.; MANNING, William J. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution*. **Environmental Pollution**. v. 50, p. 101-137, 1988.

KLUMPP, Andreas; KLUMPP, Gabriele; FOMIN, A. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: A rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). **Revista Brasileira de Botânica**. v. 24, n. 4, p. 511-518, 2001.

KLUMPP, Andreas; ANSEL, Wolfgang; Fomin, Anette; Schnirring, Sandra; Pickl, Christina. Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of *Tradescantia* clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol. **Hereditas**. p. 142-148, 2004.

KLUMPP, Andreas; ANSEL, Wolfgang; KLUMPP, Gabriele; CALATAYUD, Vicent; GARREC, JEAN P.; HE, Shang; PENUELAS, Josep; RIBAS, Angela, RO-POULSEN, Helge; RASMUSSEN, Stine, SANZ, Maria J.; VERGNE, Phillippe. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. **Environmental Pollution**. v. 139, p. 515-522, 2006.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal.** São Carlos: RiMa, 2004.

LEAL, Teresa C. SANTOS. do.; CRISPIM, Verginia R.; CORRÊA, Rosangela da S.; GOMES, Heliana A. **Controle Ambiental da Genotoxicidade da Radiação Ionizante Usando Sistema Bioindicador.** In: International Nuclear Atlantic Conference. 2005, Santos.

LIMA, Elizabeth. S. de. **Capacidade de *Tradescantia pallida* (Rose) DR Hunt cv Purpurea Boom para biomonitoramento do potencial clastogênico de ozônio.** 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2007.

LIRA, Oberdan F. C.; ALMEIDA, Noraney N. A. de. PERES, Wagner L. SANTOS, Wildeyne S. S. dos. **Projeto Piloto de Biomonitoramento com *Tradescantia pallida* em municípios com Alto Risco Ambiental.** Secretaria do Estado de Saúde do Mato Grosso. Cuiabá, 2008.

LORENZI, Harri. **Plantas para jardins no Brasil: herbáceas arbustivas e trepadeiras**. 1ª ed. Plantarum, 2013.

LUIZ, Eriane J.; LAVENDOWSKI, Izabel M. F. de.; OLIVEIRA, Gabriela P. O. de. GUIMARÃES, Eliane T.; DOMINGOS, Marisa; SALDIVA, Paulo H. N. **Sentindo a Cidade: Biomonitoramento da Qualidade do Ar de Santo André com plantas da espécie *Tradescantia pallida* e a Educação Ambiental**. São Paulo, 2004.

MA, The-Hsiu. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspective**. v. 37, p. 85-90, 1981.

MA, The-Hsiu. *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). **Mutation Research**. v. 99, p. 293-302, 1982.

MA The. Hsiu.; CABRERA G. L.; GILL B. S.; SANDHU S.S.; VANDENBERG A. L.; SALAMONE M. F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. **Mutation Research**. v. 310, p. 221-230, 1994.

MACHADO, Alessandra C. F. E. **Avaliação da viabilidade de utilização de *Tradescantia pallida* cv. *Purpurea* no biomonitoramento de fontes estacionárias de contaminação atmosférica**. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente), Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

MARTINS, Leila D. **Sensibilidade da formação do ozônio troposférico às emissões veiculares na Região Metropolitana de São Paulo**. Tese (Doutorado) - Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências, Universidade de São Paulo, 2006.

MEIRELES, José. R. C.; JÚNIOR, Sizenando. J. de A. JÚNIOR, C. S. S.; LUZ, Jesiane da. CERQUEIRA, Eneida. M. Micronúcleos em tétrades de *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. *purpurea* Boom: alterações genéticas decorrentes de poluição aérea urbana. **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 30, n. 3, p. 295-301, Maringá, 2008.

MEIRELES, José; ROCHA, Rodrigo; NETO, Antonio C; CERQUEIRA, Eneida. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in *Tradescantia* (Trad-MCN). **Mutation Research**. v. 675, p. 46-50, 2009.

MIELLI, A. C.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A. Comparação entre as respostas do clone 4430 e *Tradescantia pallida* no teste de micronúcleos (Trad-MN). **J. Brazil Ecotoxicol**. v. 4. n. 1-3. n. 49-54. 2009.

MIKIK, Miroslav; MICIETA, Karol; SOLENSKA, Martina; MISIKOVÁ, Katarina; PISARCÍKOVÁ, Helena, KNASMULLER, Siegfried. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in a eastern European city. **Environmental Pollution**. v. 145, p. 459-466, 2007.

OLIVEIRA, Marly L. **Utilização de *Tradescantia pallida* como bioindicador de contaminação ambiental ao longo do rio Igarçu, Piauí.** Tese (Doutorado em Geografia) - Centro de Filosofia e Ciências Humanas, Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

PEDROSO, Andrea N. V. **Poluentes Atmosféricos & Plantas Bioindicadoras.** Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica – IBT, São Paulo, 2007.

PEREIRA, Boscolli. B. **Biomonitoramento da qualidade do ar da cidade de Uberlândia por meio de ensaios citogenéticos com *Tradescantia*.** 2012. 88f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Departamento de Química e Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

PEREIRA, Boscolli. B.; CAMPOS JÚNIOR, Edimar O.; MORELLI, Sandra. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a *Tradescantia* micronucleus assay. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** n 87, p.17–22, 2013.

PINA, Juliana M.; DIAS, Ana P. S.; RINALDI, Mirian C. S.; MORAES, Regina M. *Psidium guajava* Paluma é sensível às concentrações de ozônio verificadas em São Paulo. **Revista Brasileira de Biociências,** Porto Alegre. v. 5, p. 42-44, 2007.

PRAJAPATI, Santosh K.; TRIPATHI, B.D. Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. **Environment International.** v. 34, p. 1092–1096, 2008.

QUEIROZ, Paula G. M.; JACOMINO, Vanusa M. F.; MENEZES, Maria A. B. de. C. Composição elementar do material particulado presente no aerossol atmosférico do município de Sete Lagoas, Minas Gerais. **Química Nova.** v. 30, n. 5, p. 1233-1239, 2007.

RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray Franklin; EICHHORN, Susan E. **Biologia vegetal.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

ROCHA, Julio C.; ROSA, André H.; CARDOSO, Arnaldo A. **Introdução a Química Ambiental.** 2 ed. 256 p. Porto Alegre: Bookman. 2009

RODRIGUES, Geraldo. S.; MADKOUR, Samia. A.; WEINSTEIN, Leonard. H. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. **Environmental and Experimental Botany.** v. 36, p. 45-50, 1996.

RODRIGUES, G. S.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L.H. *Tradescantia* bioassays as monitoring for environmental mutagenesis: a review. **Revista Plant Science.** v. 16, p. 325-359, 1997.

SAVÓIA, Eriane J. Potencial de *Tradescantia pallida* cv. *Pupurea* para acumular metais pesados oriundos da poluição atmosférica particulada na região do grande ABC paulista. 2013. 129f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

SAVÓIA, Eriane J.; DOMINGOS, Marisa; GUIMARÃES, Eliane T.; BRUMATI, Fabiano;

SALDIVA, H.N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and Polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazi, through Trad-MCN bioassay. **Ecology and Enviromental Safety**. v. 73, p. 255-260, 2009.

SHIRMER, Waldir N.; QUADROS, Marina E. Compostos orgânicos voláteis biogênicos emitidos a partir de vegetação e seu papel no ozônio troposférico urbano. Piracicaba, **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**. v.5, n. 1, p. 25-42, 2010.

SILVA, Thayana da. N. **Atividade genotóxica/mutagênica de nanotubos de carbono funcionalizados em *Tradescantia pallida***. Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI). 2013.

TARGINO, Admir C.; KRECL, Patricia. Local and Regional Contributions to Black Carbon Aerosols in a Mid-Sized City in Southern Brazil. **Aerosol and Air Quality Research**. v. 16, p. 125-137, 2016.

TEIXEIRA, Mateus C. V. BARBÉRIO, Agnes. Biomonitoramento do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt var *purpurea* Boom (Commelinaceae). **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**. v. 7, n.3, 2012.

TEMMERMAN, L. de.; GARREC, J. P.; KLUMPP, A. Biomonitoring of air pollutants with plants - Considerations for the future. **EuroBionet – Urban Air Pollution, Bioindication and Environmental Awareness**. p. 337-373. 2011.

Thermo Fisher Scientific Inc. **Instruction Manual UV Photometric O₃ Analyzer Model 49i**. 2011.

VORMITTAG, Evangelina M. P. A. de. A.; COSTA, Renan R. da. BRAGA A. A. MIRANDA M. **Monitoramento da qualidade do ar no Brasil**. Instituto Saúde e Sustentabilidade, São Paulo, 2014.

ZANATO, Victória T. A. de. B. **Biomonitoramento em São José dos Campos – Campanha 2009 – Extensão para o Vale do Paraíba**. Instituto Nacional de Pesquisas Científicas, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION REGIONAL OFFICE FOR EUROPE COPENHAGEN. Air quality guidelines for Europe. 2a ed. n. 91, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide: Global update 2005. Geneva: **WHO**. 2005.

ZENGH, Dingmu.; LI, Yi.; QINGQIANG, Lin. Pollution monitoring of three rivers passing through Fuzhou City, People's Republic of China. **Mutation Research** 426: 159-161, 1999.