

## Efeitos do Clima, da Poluição Atmosférica e do Estado Sanitário das Árvores na Produção e nas Características de Pólenes Alergizantes

André Fabião<sup>1</sup>, Ana Paula Ramos<sup>1</sup>, Maria Filomena Caetano<sup>1</sup>, Margarida Ferreira<sup>2</sup>, Ana Alves<sup>3</sup>, José Carlos Rodrigues<sup>3</sup>, Francisco Abreu<sup>1</sup>, Ana Júlia Francisco<sup>2</sup>, Luísa Nogueira<sup>4</sup>, Rita Moreira<sup>1</sup> e António Fabião<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UTL. Instituto Superior de Agronomia, Departamento de Engenharia Florestal. Tapada da Ajuda, 1349-017 LISBOA

<sup>2</sup>Divisão de Jardins. Departamento de Ambiente e Espaços Verdes, Direcção Municipal de Ambiente Urbano, Câmara Municipal de Lisboa, Rua Vila Correia 17-A, 1700-074 LISBOA

<sup>3</sup>Instituto de Investigação Científica Tropical. Centro de Florestas e Produtos Florestais, Tapada da Ajuda, 1349-017 LISBOA

<sup>4</sup>Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional de Lisboa e Vale do Tejo, Rua Braamcamp 7, 1250-048 LISBOA

**Resumo.** Os pólenes das árvores urbanas podem participar decisivamente na manifestação de doenças respiratórias alérgicas. Por outro lado, o estado sanitário das árvores e a poluição do ar podem influenciar a quantidade, características e época de produção de pólen. Neste contexto, iniciou-se um projecto de investigação visando: (a) desenvolver o conhecimento das relações entre produção de pólen e elementos do clima, poluição atmosférica e estado sanitário das árvores; (b) explorar metodologias expeditas e não destrutivas para a identificação de pólenes, por espectrofotometria de infravermelho próximo e médio (NIR e FTIR); (c) desenvolver critérios técnicos para melhorar a selecção e condução de árvores em áreas urbanas sensíveis. A área principal de monitorização do projecto é o Campo Grande, em Lisboa, onde se monitoriza regularmente a qualidade do ar (estação de Entrecampos), se captura por amostragem pólen atmosférico e se avalia regularmente o estado sanitário das árvores envolventes. A recolha de amostras de pólen para análise através de NIR e FTIR será também efectuada noutras áreas de Lisboa, para a constituição de catálogos espectrais. O aprofundamento e a difusão de conhecimentos neste domínio tem um grande potencial para a melhoria da qualidade de vida da população urbana e peri-urbana sensível às alergias respiratórias.

**Palavras-chave:** Polen; clima; alergizante; estado sanitário; poluição; FTIR

\*\*\*

### Introdução

A incidência de alergias respiratórias tem aumentado nas últimas décadas, especialmente em países industrializados (KOPFERSCHMITT-KUBLER & PAULI, 1999; D'AMATO *et al.*, 2001; GRANUM *et al.*, 2001), sendo a abundância, composição específica e época de ocorrência de pólenes alergizantes na atmosfera os principais factores condicionantes da ocorrência de sintomas de alergia (LORENZONI-CHIESURA *et al.*, 2000). A concentração de pólen na atmosfera está positivamente correlacionada com a densidade e a abundância de vegetação local, tendo a composição florística da vegetação de uma dada área influência decisiva no espectro polínico aí observado (ABREU *et al.*, 2003).

A produção de pólen e o seu transporte na atmosfera são, no entanto, fortemente condicionados por factores meteorológicos, tais como o vento, a temperatura, a precipitação e a humidade relativa da atmosfera (GALÁN *et al.*, 1998; BARNES *et al.*, 2001; HIDALGO *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2003; THIBAUDON *et al.*, 2005). A concentração dos diversos tipos de pólen na atmosfera pode, assim, ser extremamente variável, não só em função da tipologia da vegetação dominante e das alterações que nela ocorrem ao longo do tempo, mas também com os factores ambientais.

Por outro lado, as autarquias são frequentemente confrontadas com protestos de munícipes afectados por alergias respiratórias cuja causa atribuem às árvores de arruamentos e jardins, não dispondo usualmente de informação que permita ajuizar quanto à justiça de tais reclamações. Com efeito, o transporte de pólen pela atmosfera a partir das regiões circundantes pode desempenhar um papel significativo, mas amplamente ignorado, na manifestação daquelas alergias. Além disso, o efeito da poluição atmosférica, embora claramente estabelecido (D'AMATO *et al.*, 2001; GRANUM *et al.*, 2001; MOLINA, 2003; NAMORK *et al.*, 2006), permanece mal conhecido e explicado.

Tanto as árvores florestais como as que se utilizam em ambiente urbano podem dar uma contribuição decisiva para as alergias respiratórias, sobretudo devido ao seu carácter perene, que implica a permanência durante longos períodos, com produção mais ou menos regular de pólen. Mesmo as zonas densamente urbanizadas mantêm geralmente uma quantidade significativa de vegetação lenhosa para fins ornamentais e ambientais, para além de eventuais florestas peri-urbanas. Alguns dos poucos estudos de aerobiologia realizados em Portugal (por exemplo, em Lisboa, Porto e Braga) demonstraram a importância quantitativa dos pólenes de Oleáceas, Fagáceas e, com carácter mais ocasional ou mais localizado, de Cupressáceas, Pináceas e outras espécies arbóreas (RAMOS *et al.*, 2000, ABREU *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os pólenes de Oleáceas e Cupressáceas são particularmente preocupantes para a comunidade médica Mediterrânea, devido à importância na região da incidência e gravidade das alergias às espécies destas famílias botânicas (GALÁN *et al.*, 1998; RAMOS *et al.*, 2000; HIDALGO *et al.*, 2002; CHARPIN *et al.*, 2005; FRADES RODRÍGUEZ *et al.*, 2005; GASTAMINZA *et al.*, 2005). Não é totalmente claro em que medida a presença de estruturas de fungos causadores de doenças destas árvores – com ocorrência frequente sobretudo nos ambientes urbanos – influencia directa ou indirectamente (neste caso através da alteração do comportamento reprodutivo das árvores) a incidência de polinoses nos seres humanos.

Neste contexto, iniciou-se um projecto de investigação, denominado "Efeitos da Poluição Atmosférica e do Estado Sanitário das Árvores na Produção, Morfologia e Identificação dos Grãos de Pólen" (referência PTDC/AMB/64929/2006 da Fundação para a Ciência e a Tecnologia) com o objectivo de aprofundar o conhecimento quanto às relações entre pólen (e estruturas de fungos da atmosfera) e poluição urbana, por um lado, e ocorrência de doenças alérgicas, por outro, na cidade de Lisboa. As instituições participantes do mesmo são o Instituto Superior de Agronomia (ISA), a Câmara Municipal de Lisboa (CML), a Comissão de Coordenação e Desenvolvimento Regional de Lisboa e Vale do Tejo (CCDR-LVT) e o Instituto de Investigação Científica Tropical (ICT/MCTES). O projecto propõe-se monitorizar regularmente, por amostragem, a abundância e a tipologia dos pólenes e estruturas de fungos (esporos ou fragmentos de micélio) atmosféricos, confrontando-os com as variáveis climáticas, a poluição do ar e o estado sanitário das árvores envolventes do local de amostragem.

O objectivo da presente comunicação é dar a conhecer os objectivos gerais do Projecto acima referido e divulgar os primeiros resultados experimentais obtidos no seu âmbito, designadamente na parte referente à relação entre a abundância e composição do pólen atmosférico e as variáveis climáticas. A relação entre a presença de estruturas de fungos na atmosfera e a incidência de doenças nas árvores é tratada em comunicação separada (RAMOS *et al.*, neste volume).

## Material e Métodos

### *Local de estudo*

A actividade experimental do Projecto tem decorrido na zona do Campo Grande, em Lisboa. Para a instalação do capturador volumétrico de pólen e esporos do tipo Hirst (modelo VPPS 2000<sup>®</sup>, da Lanzoni S.R.L.; Figura 1), seleccionou-se o Museu da Cidade de Lisboa (propriedade da CML), que disponibilizou um local de fácil acesso, ainda que seguro, com fornecimento de energia eléctrica. A amostragem da concentração de pólen e esporos na atmosfera efectua-se com recurso a este equipamento.

A informação regular e detalhada da qualidade do ar é obtida através da monitorização efectuada pela estação de Entrecampos, operada pela CCDR-LVT, que compila e divulga os seus resultados.

Os elementos do clima têm sido obtidos através da Estação Meteorológica de Lisboa / Ajuda, situada na Tapada da Ajuda (38°42'N, 9°11'O, 60 m alt.), considerando-se que para os fins deste estudo a Estação em causa é suficientemente representativa do clima da cidade de Lisboa.



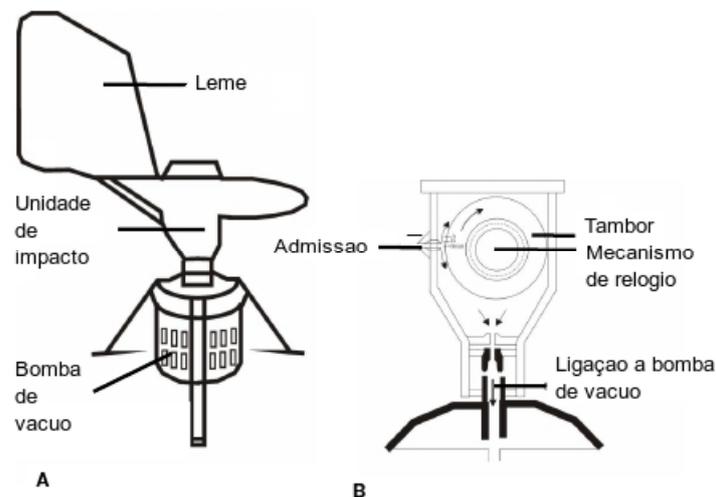
**Figura 1** - Capturador de pólen do tipo Hirst instalado no Museu da Cidade, em Lisboa

*Amostragem aerobiológica: captura, preparação de amostras e contagem*

O captor de pólen utilizado pelo projecto foi instalado no dia 3 de Fevereiro de 2009. Este equipamento é constituído pelos seguintes componentes (GÁLAN *et al.*, 2007; Figura 2):

1. Unidade de impacto – é constituída por um orifício de admissão (14 x 2mm) e por um suporte circular (tambor) onde aderem as partículas. Um mecanismo de relógio permite a rotação do tambor (2 mm por hora), garantindo desta forma uma amostragem de ar contínua durante 7 dias, com dados horários e diários. É colocada uma tira de fita de Melinex<sup>®</sup> coberta com uma substância adesiva sobre a superfície de impacto do tambor, de modo a garantir a aderência das partículas e minimizar o ressalto das mesmas.
2. Leme – está colocado no revestimento exterior da unidade de impacto, funcionando de modo a garantir que o orifício de entrada fica sempre posicionado de acordo com a direcção do vento dominante, maximizando a eficiência de captura das partículas existentes nas correntes atmosféricas.
3. Bomba de vácuo – possui um mecanismo para regular o volume de ar capturado. O débito recomendado para a captura de partículas atmosféricas é de 10 litros/minuto, pois este valor é similar ao volume de ar inalado pelos pulmões humanos nesse espaço de tempo.

Após a substituição semanal, a fita de Melinex<sup>®</sup> é seccionada no laboratório em períodos de 24 horas (24h = 48 mm de fita), com auxílio de uma régua própria para o efeito. Em seguida procede-se à montagem entre lâmina e lamela utilizando uma solução corante e fixadora, específica para o efeito. Cada lâmina (ou seja, um dia de 24h) é colocada sob o microscópio óptico (ampliação de 400x) para identificação e contagem das partículas presentes.



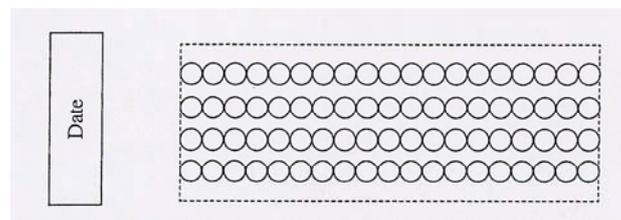
**Figura 2** - Captor de pólen do tipo Hirst (A) e Corte esquemático da unidade de impacto (B) (adaptado de GÁLAN *et al.*, 2007)

Para se proceder à contagem e identificação das partículas é necessário trabalhar através de amostragem, pois a contagem e identificação de todas as partículas presentes na lâmina seria

uma tarefa demasiado laboriosa. Para que os dados obtidos sejam estatisticamente significativos, a área amostrada não deve ser inferior a 10-12% da área de toda a lâmina (FRENGUELLI, 2003).

O método de identificação e contagem consiste na análise de 4 linhas horizontais na lâmina, separadas entre si por cerca de 3 mm, através do método dos campos adjacentes (FRENGUELLI, 2003; Figura 3). Durante este processo é anotada a quantidade de cada tipo de pólen encontrado. Esses valores são depois lançados numa folha de cálculo de Excel<sup>®</sup> (*Microsoft Corporation*), agrupados por espécie ou grupos de espécies, e por data. As contagens de pólen devem ser expressas em número médio diário de grãos por metro cúbico de ar (GÁLAN *et al.*, 2007). Como tal, o número de grãos de pólen contados é multiplicado por um factor que tem em consideração o volume de ar amostrado (10litros/min) e o tamanho do campo de visão do microscópio, na objectiva de 40x (ampliação de 400x). Este factor irá variar com a marca e modelo de microscópio.

Para a elaboração do presente texto, as contagens efectuadas (em número de grãos de pólen por m<sup>3</sup> de ar) foram compiladas semanalmente a partir de 3 de Fevereiro, de forma a representar um valor médio semanal para cada uma das espécies ou dos grupos de espécies mais representativos: *Casuarina* spp., Cupressaceae, Moraceae, Oleaceae, *Pinus* spp., *Platanus* spp., *Populus* spp., *Quercus ilex*, outros *Quercus*, outras lenhosas e outras espécies, além de uma determinação residual correspondente a espécies que não foi possível identificar. As determinações respectivas estão ainda a ser compiladas, apresentado-se aqui os resultados obtidos nos dois primeiros meses, ou seja, até finais de Março.



**Figura 3** - Ilustração esquemática do método de contagem dos campos adjacentes (adaptado de FRENGUELLI, 2003)

#### *Avaliação do estado fitossanitário*

A avaliação do estado fitossanitário do coberto arbóreo efectuou-se em Janeiro e Junho de 2009 por diagnóstico visual, complementado por diagnóstico etiológico sempre que necessário. Em complemento, acompanhou-se semanalmente o estado fitossanitário das árvores ao longo do período acima delimitado.

#### *Identificação através de infra-vermelho médio (FTIR)*

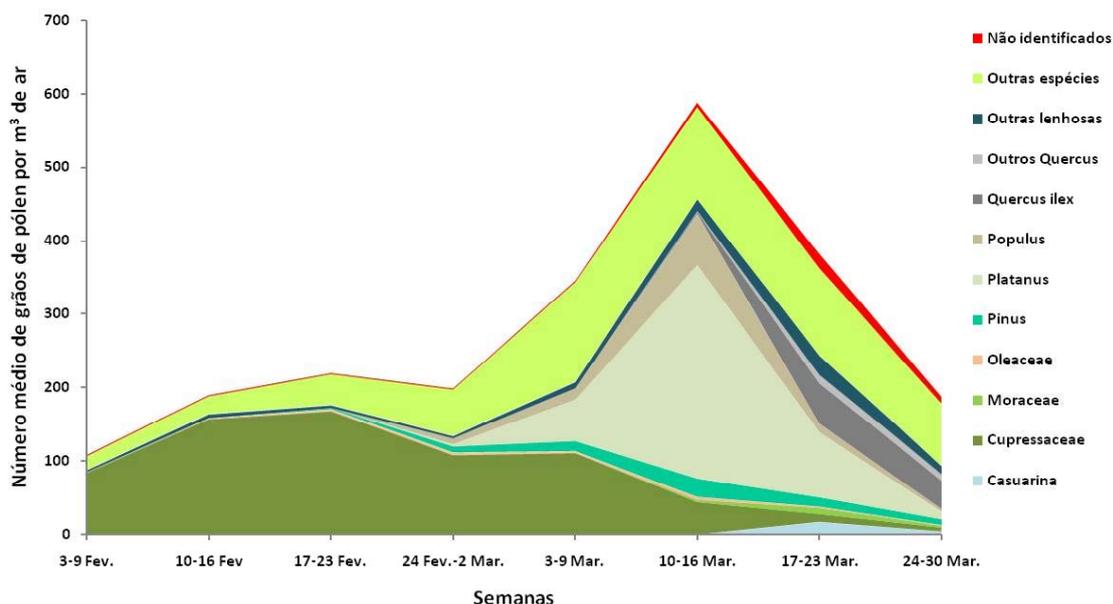
A recolha de pólen para este procedimento é um processo laborioso e demorado, que ainda está a ser aperfeiçoado. Neste momento consiste em colher as flores de cada espécie a estudar e manualmente recolher o seu pólen para um recipiente estéril. Seguidamente esse pólen é crivado num peneiro com malha de 45  $\mu$  ou 100  $\mu$ , consoante a quantidade de lixo e o tamanho dos grãos de pólen da espécie a estudar. Só depois destes procedimentos é que as amostras podem ser utilizadas para a obtenção dos respectivos espectros.

Os espectros ATR-FTIR das amostras de pólen são obtidos recorrendo a um espectrómetro Bruker Alpha, com um acessório de reflexão simples com uma janela de diamante. Os espectros foram obtidos na região dos números de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , resultando da média de 64 varrimentos (co-scans). Os catálogos espectrais são criados recorrendo a um software adequado (OPUS-IDENT<sup>®</sup>).

## Resultados e Discussão

### *Quantidade de pólen*

O espectro polínico correspondente aos dois primeiros meses encontra-se representado na Figura 4. Os resultados obtidos confirmam a grande importância relativa do pólen proveniente de árvores com uso urbano, demonstrando a preponderância de espécies lenhosas durante o período considerado. Contudo, deve salientar-se que este período pouco ou nada abrangeu da época de polinização das gramíneas, sendo o pólen de espécies não lenhosas proveniente sobretudo de *Parietaria* spp., *Urticaceae*, *Papaveraceae* e *Rumex* spp. É de esperar que com o avanço das contagens se obtenham valores crescentes de espécies não lenhosas, devido ao grande volume de pólen geralmente produzido pelas gramíneas, especialmente com o avanço da Primavera, quando a temperatura média do ar sobe e os montantes de precipitação descem (RIBEIRO *et al.*, 2003; SANCHEZ MESA *et al.*, 2003).



**Figura 4** - Espectro polínico correspondente aos dois primeiros meses de operação do capturador de pólen em Lisboa

Durante o período representado na Figura 4, é de realçar a grande importância inicial do pólen de Cupressaceae, cuja importância decresceu fortemente até finais de Março, bem como um pico de produção de pólen de plátano e de choupos (menos importante) durante aquele mês. O pólen de Oleaceae teve muito pouca representação neste período, que antecede a polinização da oliveira: as espécies representadas na figura são, essencialmente, as dos géneros *Fraxinus* e *Ligustrum*, com muito pouca importância relativa (praticamente ilegível na escala adoptada).

### *Efeito dos elementos do clima na abundância de pólen atmosférico*

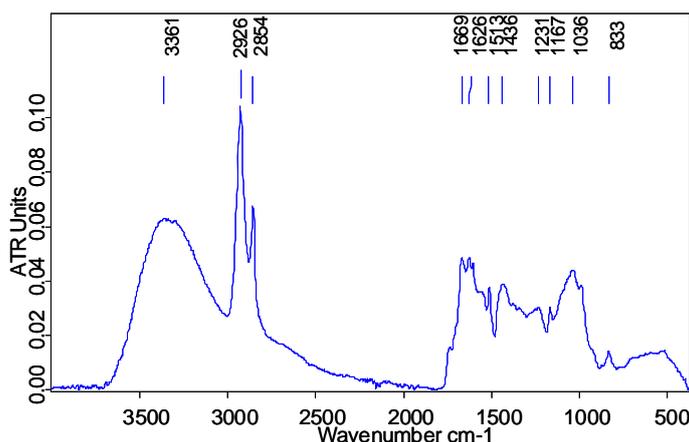
A pouca duração do período de amostragem dificultou a comparação da abundância de pólen na atmosfera com os dados climáticos, sendo contudo de realçar que, da análise da correlação entre a quantidade média de pólen de todas as espécies e a temperatura, humidade relativa e velocidade do vento médias, bem como a precipitação acumulada em cada semana, ressaltou uma correlação mais elevada ( $r = -0,53$ ) com a precipitação ocorrida em cada período. No entanto, os poucos pares de observações disponíveis ( $n = 8$ ) não permitem garantir a significância estatística desta correlação negativa, que em todo o caso é intuitiva e comprovada por outros autores (e. g. RIBEIRO *et al.*, 2003; THIBAUDON *et al.*, 2005). No referente aos restantes elementos do clima os valores de correlação foram ainda demasiado baixos para permitir qualquer interpretação válida ( $-0,27 < r < 0,21$ ).

### *Identificação através de infra-vermelho médio (FTIR)*

A interpretação detalhada das bandas de absorção bem como o seu significado bioquímico está fora do âmbito deste trabalho. Por outro lado, uma das vantagens dos métodos de quimiometria (SIMCA, HCA e Classificação K-NN) que irão ser usados na identificação dos espectros por FTIR é que não requerem um conhecimento apriorístico das características dos espectros. O facto de a interpretação dos espectros não ser necessária acaba por ser uma vantagem para futuros utilizadores da técnica, que não necessitam de ter um conhecimento profundo da espectroscopia de infravermelho.

O espectro de ATR-FTIR do pólen de zambujeiro (Figura 5) é dominado por duas bandas intensas, resultantes do alongamento  $\text{CH}_2$  a  $2926$  e a  $2854$   $\text{cm}^{-1}$ , um indicador seguro da presença de n-alcenos e pela banda de alongamento OH a  $3361$   $\text{cm}^{-1}$ .

No entanto, as bandas mais interessantes encontram-se na região abaixo dos  $2000$   $\text{cm}^{-1}$ , onde se encontram bandas características das proteínas entre  $1600$  e  $1670$   $\text{cm}^{-1}$  (Amide I), o ombro a  $1550$   $\text{cm}^{-1}$  (Amide II), da lenhina a  $1513$   $\text{cm}^{-1}$  e a banda dos polissacáridos centrada a  $1036$   $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 5** - Espectro ATR-FTIR entre  $4000$  e os  $40$   $\text{cm}^{-1}$  do pólen de zambujeiro

## Conclusões

Os resultados obtidos durante o período de estudo aqui considerado permitem confirmar uma importância decisiva do pólen de árvores urbanas no espectro polínico, pelo menos no início da Primavera. Este resultado é potencialmente interessante para a melhoria da qualidade de vida das comunidades de áreas urbanas e peri-urbanas, através da selecção criteriosa das espécies a utilizar. A interacção entre a poluição atmosférica, variáveis meteorológicas e potencial alergizante dos pólenes permanece pouco compreendida, e pode ser influenciada pela ocorrência de doenças nas árvores. O aperfeiçoamento dos conhecimentos nesta área é de capital importância para a saúde humana, sendo também uma base para a melhor selecção e gestão das árvores urbanas.

Os principais resultados que se esperam atingir com este projecto são: (a) aperfeiçoamento da identificação de pólen através de um método não destrutivo, fiável e rápido; (b) definição de critérios para a utilização de informação referente à interacção clima/poluição/pólen; (c) definição de critérios para a gestão das árvores em ambiente urbano.

Com a concretização destes objectivos espera-se contribuir para a redução do risco potencial do aparecimento de alergias respiratórias. Um outro benefício potencial da qualidade de vida das populações poderá resultar do desenvolvimento de orientações específicas para a selecção e plantação de espécies arbóreas com um potencial alergizante reduzido. Adicionalmente, a difusão de informação junto dos doentes alérgicos poderá possibilitar que eles controlem a sua exposição ao pólen, reduzindo o risco de desenvolvimento de alergias respiratórias e/ou episódios alérgicos.

## Agradecimentos

Este Projecto é financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT), referência PTDC/AMB/64929/2006.

## Bibliografia

- ABREU, I., RIBEIRO, H., CUNHA, M., 2003. An aeropalynological study of the Porto region (Portugal). *Aerobiologia* **19**: 235-241.
- BARNES, C., PACHECO, F., LANDUYT, J., HU, F., PORTNOY, J., 2001. The effect of temperature, relative humidity and rainfall on airborne ragweed pollen concentrations. *Aerobiologia* **17**: 61-68.
- CHARPIN, D., CALLEJA, M., LAHOZ, C., PICHOT, C., WAISEL, Y., 2005. Allergy to cypress pollen. *Allergy* **60**: 293-301.
- D'AMATO, G., LICCARDI, G., D'AMATO, M., CAZZOLA, M., 2001. The role of outdoor air pollution and climate changes on the rising trends in respiratory allergy. *Respiratory Medicine* **95**: 606-611.
- FRADES RODRÍGUEZ, A., FERNÁNDEZ COLINO, T., MARTÍN GARCÍA, C., MARTÍNES ALONSO, J.C., CALLEJO MELGOSA, A., DOMÍNGUEZ ORTEGA, J., 2005. Sensibilización al polen de *Olea europaea* en las diferentes comarcas de la provincia de Zamora. *Alergología & Inmunología Clínica* **20**: 139-141.
- FRENGUELLI, G., 2003. Basic macroscopy, calculating the field of view, scanning of slides, sources of error. *Postepy Dermatologii i Alergologii* **XX**, **4**: 227-229
- GALÁN, C., FUILLERAT, M.J., COMTOIS, P., DOMINGUEZ-VILCHES, E., 1998. Bioclimatic factors affecting daily Cupressaceae flowering in southwest Spain. *International Journal of Biometeorology* **41**: 95-100.
- GALÁN, C., CARIÑANOS, P., ALCÁZAR, P., DOMÍNGUEZ, E., 2007. *Spanish Aerobiology Network (REA): Management and Quality Manual*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. Córdoba.

- GASTAMINZA, G., BARTOLOMÉ, B., BERNEDO, N., URIEL, O., AUDÍCANA, M.T., ECHENAGUSIA, M.A., FERNÁNDEZ, E., MUÑOZ, D., 2005. Alergia al polen de las oleáceas en un lugar donde no hay olivos. *Alergología & Inmunología Clínica* **20**: 131-138.
- GRANUM, B., GAARDER, P.I., LØVIK, M., 2001. IgE adjuvant effect caused by particles – immediate and delayed effects. *Toxicology* **156**: 149-159.
- HIDALGO, P.J., MANGIN, A., GALÁN, C., HEMBISE, O., VÁZQUEZ, L.M., SANCHEZ, O., 2002. An automated system for surveying and forecasting *Olea* pollen dispersion. *Aerobiologia* **18**: 23-31.
- KOPFERSCHMITT-KUBLER, M.C., PAULI, G., 1999. Pollens et pollution. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **39**(4): 283-288.
- LORENZONI-CHIESURA, F., GIORATO, M., MARCER, G., 2000. Allergy to pollen of cultivated plants. *Aerobiologia* **16**: 313-316.
- MOLINA, C., 2003. Qualité de l'air et allergie. *Revue Française des Laboratoires* **349**: 35-42.
- NAMORK, E., JOHANSEN, B.V., LØVIK, M., 2006. Detection of allergens adsorbed to ambient air particles collected in four European cities. *Toxicology Letters* **165**: 71-78.
- RAMOS, A.-P., M.-J. MARQUES, A. FABIÃO, J. SANTOS PEREIRA, A. TODO-BOM, L. FONTES, N. NEUPARTH & P. LOPES DA MATA, 2000. Concentration of airborne pollen from Cupressaceae in Lisbon. *Allergie et Immunologie* **XXXI**(3): 109-110.
- RIBEIRO, H., CUNHA, M., ABREU, I., 2003. Airborne pollen concentration in the region of Braga, Portugal, and its relationship with meteorological parameters. *Aerobiologia* **19**: 21-27.
- SANCHEZ MESA, J.A., SMITH, M., EMBERLIN, J., ALLITT, U., CAULTON, E., GALAN, C., 2003. Characteristics of grass pollen seasons in areas of southern Spain and the United Kingdom. *Aerobiologia* **19**: 243-250.
- THIBAUDON, M., OUTTERYCH, R., LACHASSE, C., 2005. Bioclimatologie et allergie. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* **45**: 447-455.