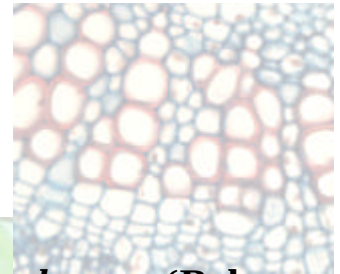
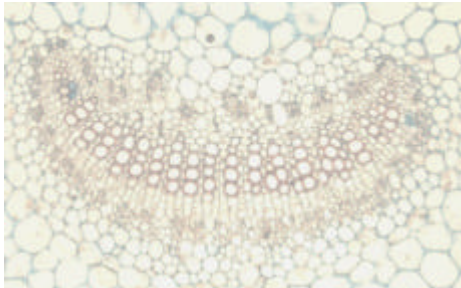
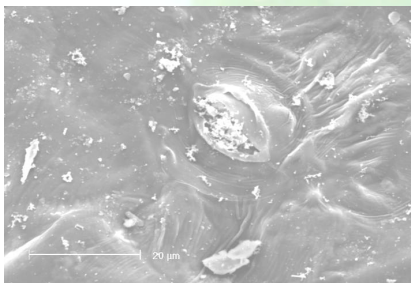


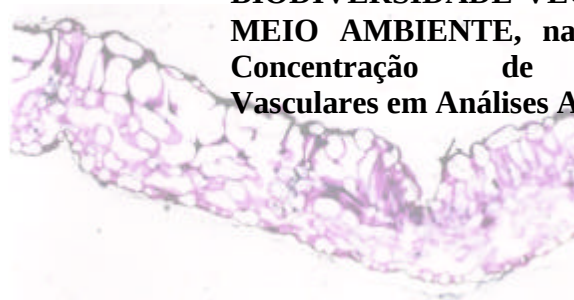
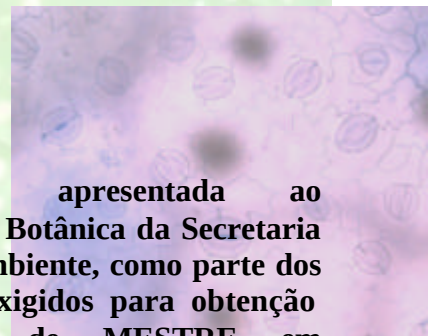
ANDREA NUNES VAZ PEDROSO



AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' SOB DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO ATMOSFÉRICA



Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais



**SÃO PAULO
2006**

ANDREA NUNES VAZ PEDROSO

AVALIAÇÃO ESTRUTURAL DE *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’
SOB DIFERENTES NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO
ATMOSFÉRICA

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

ORIENTADORA: Dra. EDENISE SEGALA ALVES

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Pedroso, Andrea Nunes Vaz

P372a Avaliação estrutural de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' sob diferentes níveis de contaminação atmosférica. / Andrea Nunes Vaz Pedroso -- São Paulo, 2006.
60 p. il.

Dissertação (mestrado)—Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2006

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica. 2. Anatomia foliar. 3. Bioindicadores. I. Título

CDU 502.55

À Anna Rosa Moreira Nunes e Antonio Manoel Nunes por terem plantado uma semente, e onde estiverem devem estar muito orgulhosos, dedico.

“Se estamos neste mundo para amadurecer, aprender a viver melhor, temos de usar nossos recursos, buscar o jeito certo de formatar as energias vitais, desenvolver nosso mundo interior, criar o lugar e a maneira como desejamos viver. Esse é um direito nosso. Todos somos livres e vivemos no mundo que criamos. Se ele não está bom, temos o recurso de mudá-lo, revendo nossas atitudes, observando os fatos da vida, experimentando até conseguirmos um resultado melhor. A felicidade é conquistada assim” (Lucius)

Agradecimentos

Agradeço a Deus e ao meu mentor que ajudaram em todos os momentos de minha vida.

À Dra. Edenise Segala Alves, minha orientadora, que sempre me ensinou a lutar pelos meus objetivos, incentivando a busca de recursos para o crescimento da minha carreira científica. Agradeço por ter me orientado desde a Iniciação Científica, quando eu nem sabia o que era “Esau”, e me ensinado a amar esta linda área que é a anatomia vegetal.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Botânica pela utilização de suas instalações e equipamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, em especial à secretária Márcia e à vice-presidente Dra. Solange Cristina Mazzoni-Viveiros que sempre ajudaram.

À Dra. Marisa Domingos, pelos sábios conselhos, e ajuda nos momentos mais desesperadores, empréstimo de bibliografias, e fotos gentilmente cedidas.

À Dra. Regina Maria de Moraes pelos conselhos, sugestões e empréstimo de bibliografias.

À Dra. Patrícia Borges Pita, minha mais recente amiga, tecnicamente perfeita no laboratório, e pela ajuda constante científica e não científica neste último ano.

À Dra. Agnes Elisete Luchi, pelo apoio nos momentos difíceis tanto científicos como pessoais, por todos os conselhos, muito obrigada.

À Seção de Anatomia e Morfologia que possibilitou a realização deste trabalho, em especial à Maria Manoel que, sem sua ajuda diária no laboratório, a parte prática não teria sido tão bem realizada.

Ao povo da Anatomia: Fernanda Tresmondi, Fernanda Nunes (little sister), Fernanda (Fezão), Bárbara, Jéssica, Michelle, Bruna, Gorete, Alessandra, Renata, Eduardo, Cristiane, Telma, Marcos (pela trilha sonora), Marcelo, Carol, Cristina.

À Seção de Ecologia que sempre me recebeu de braços abertos, em especial Amariles, Dorinha, Marli, Valdenice, Dra. Silvia Ribeiro, Adriana, Elizabeth, Jéssica, Juliana, LÍlian, MarÍsia, MaurÍcio e Silvia Sant’Anna.

As meninas do Herbário: Bia, Fátima, Lívia, Marília, Rebeca, Renata e ao Anderson.

À Erika Amano, pelos ensinamentos da técnica de historesina.

À Dra. Maria Amélia, pela ajuda na preparação do material, captura e tratamento das imagens da microscopia eletrônica de varredura.

À Sandra, Vera e ‘teacher’ Fátima, pela ajuda e incentivo total desde quando decidi prestar o exame de seleção.

Às minhas amigas Telma Conti e Renata D'Agostino pela companhia, torcida e ajuda ao longo destes dois últimos anos que passamos juntas em cursos, congressos, e no dia-a-dia, quem disse que não somos capazes de parar o trânsito!

À doutoranda e minha amiga Silvia Sant'Anna, uma pessoa ímpar, com um ótimo senso de humor e companheirismo, e que compartilhou todos os tabacos para realização deste estudo, valeu!

À minha amigona Ferrnanda Tresmondi, simplesmente por tudo e toda ajuda nestes dois anos, sem se importar com finais de semanas, feriados, férias então, nem pensar! Pelas conversas botânicas e pessoais, pelo ombro amigo, muita paciência e momentos divertidíssimos, obrigadíssima.

Ao Marcelo Pasquale, pelas correções, idéias, sugestões, caronas, muita paciência e muitos momentos divertidos durante esse trabalho.

Ao Maurício Manga Lamano, pelas sugestões, empréstimos, colaboração geral na preparação das aulas, inglês, muita paciência e carinho, e por tudo que fez por mim ao longo deste trabalho, valeu mano brou!

À Tó, Madrinha, Deise, Denise, minha pequena grande família, pelo incentivo constante e principalmente por sempre terem acreditado em mim, independente das circunstâncias em que a vida nos coloca no seu decorrer. Lilica e Kim os dois presentes que ganhei durante este período.

Aos meus pais, Waldir e Ernesta, por compreenderem que muitas vezes eram apenas coadjuvantes na minha vida, mesmo assim sempre me apoiaram e acreditaram em mim, podem ter certeza que vocês dois são os principais responsáveis por eu ter chegado até aqui, muito obrigada!

1. Introdução	9
1.1. Principais poluentes aéreos	9
1.2. Entrada dos poluentes na planta e alguns sintomas	12
1.3. Biomonitoramento da qualidade do ar.....	14
2. Objetivos	18
3. Material e métodos	19
3.1. A planta estudada.....	19
3.2. Obtenção das plantas	21
3.3. Descrição dos pontos de exposição	23
3.4. Coleta do material e seleção das folhas	27
3.5. Processamento das amostras para análise em microscopia fotônica	27
3.6. Parâmetros avaliados	28
3.7. Processamento das amostras para análise ao microscópio eletrônico de varredura – folhas com necroses	29
3.8. Análise estatística	30
4. Resultados	31
4.1. Descrição da folha de <i>Nicotiana tabacum</i> ‘Bel W3’	31
4.2. Análise estrutural de plantas submetidas aos poluentes aéreos de São Paulo	33
4.2.1 Variações qualitativas em folhas sem necrose.....	33
4.2.2. Variações qualitativas em folhas com necrose	33
5. Discussão	45
6. Conclusões	52
7. Perspectivas	53
8. Resumo	54
9. Abstract	56
10. Referências bibliográficas	58

1. Introdução

1.1. Principais poluentes aéreos

Atualmente o aumento da população humana mundial nos últimos séculos tem gerado progresso econômico e tecnológico (Freedman 1995). Entretanto, além de benefícios, trouxe uma série de consequências ambientais desfavoráveis. De acordo com Fenger (1999), a população praticamente dobrou nos últimos cinquenta anos e está concentrada nos grandes centros urbanos.

Nestes centros o ar é contaminado por uma variedade de poluentes originados de fontes estacionárias e móveis, principalmente a partir da queima de combustíveis fósseis (Freedman 1995, Han & Naeher 2006).

Segundo Freedman (1995) poluente atmosférico é definido como qualquer substância adicionada à atmosfera em concentrações suficientemente altas para causar efeito mensurável nos seres vivos e em materiais, o que também está de acordo com a Resolução CONAMA nº 3, de 28/06/1990 (CONAMA 1990), que considera poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

Atualmente existem identificados aproximadamente 3.000 diferentes poluentes de origem antropogênica. Somente os motores dos carros produzem cerca de 500 substâncias diferentes (Fenger 1999).

Os poluentes podem ser divididos em primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles liberados diretamente da fonte de emissão, como dióxido de enxofre (SO_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), óxidos de nitrogênio (NO_x), amônia (NH_3), monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO_2) e metano (CH_4). Os poluentes secundários são aqueles formados na atmosfera através de reações químicas entre os poluentes primários; dentre eles, o ozônio (O_3) e o peroxiacetilnitrato ($\text{PAN} - \text{CH}_3 = \text{OO}_2\text{NO}_2$) estão entre os mais prejudiciais às pessoas e à vegetação (Freedman 1995). Em adição a esses poluentes há ainda os hidrocarbonetos, mercúrio, e material particulado, que corresponde às partículas em suspensão com diâmetro menor que $50\mu\text{m}$. Estas partículas podem conter elementos tóxicos como arsênico, chumbo, cobre e níquel e também aerossóis emitidos pela combustão (Freedman 1995).

Os óxidos de nitrogênio e hidrocarbonetos, sob presença da radiação solar, sofrem reações fotoquímicas complexas formando assim o *smog* fotoquímico, sendo o ozônio seu principal componente. A palavra *smog* origina-se da combinação das palavras *smoke* – fumaça, e *fog* – neblina, e foi originalmente empregada na Inglaterra, para designar a névoa que envolvia Londres nos anos de 1950.

O ozônio troposférico pode ser formado naturalmente por reações fotoquímicas, que consistem na interação do oxigênio molecular (O_2) com a radiação ultravioleta formando átomos de oxigênio (O), que podem se recombinar resultando em O_2 ou se combinar com O_2 e formar o ozônio (O_3). O ozônio também pode ser formado a partir de óxidos de nitrogênio (monóxido (NO) e dióxido (NO_2)) e hidrocarbonetos, provenientes de processos de combustão, que são lançados na atmosfera, que sob a luz solar, após a absorção da radiação UV na faixa de 300 a 400 nm, o NO_2 se transforma em NO e oxigênio atômico, muito reativo, o qual se combina com o oxigênio atmosférico molecular (O_2) (Freedman 1995, Krupa & Manning 1988, Larcher 2000).

Muitos dos componentes do *smog* fotoquímico, em especial o ozônio, têm alto poder oxidativo e, por isso, são muito tóxicos aos seres vivos, causando danos consideráveis às plantas nativas e culturas agrícolas em muitos locais (Swanson *et al.* 1973, Freedman 1995, Liu & Reddley 1999, Zeiger 2002).

Devido aos efeitos deletérios à saúde humana, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu alguns limites de exposição ao ozônio, para os quais a população está sujeita a riscos. O limite máximo sugerido é de $160\mu\text{g}/\text{m}^3$, por 1 hora, e o limite de atenção é de $200\mu\text{g}/\text{m}^3$, por 1 hora (Cetesb 2004, Resolução CONAMA nº 3, de 28/06/1990).

Em relação à vegetação, busca-se estabelecer a dose mais baixa de ozônio capaz de produzir um efeito mensurável. O valor de 40ppb de ozônio ($78,4\mu\text{g}/\text{m}^3/\text{h}$) é considerado aquele a partir do qual podem ocorrer injúrias em plantas sensíveis de clima temperado. Na Europa tem sido aplicado um índice referente à dose de exposição acumulada de ozônio de 40ppb – AOT40. Tal índice é a soma de todos os valores horários que excedem 40ppb, após subtração deste valor (Cetesb 2004).

Destaca-se também a importância econômica dos efeitos do ozônio sobre a produtividade agrícola. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) estimou, para 2005, perdas agrícolas da ordem de 500 milhões de dólares, causadas pelo ozônio, sem incluir os danos a folhagens de árvores e outras plantas, que repercutem na paisagem das cidades, áreas de recreação, parques urbanos e áreas de vegetação natural (Cetesb 2004). Diante disso, a EPA estabeleceu o valor de referência para proteção da produtividade agrícola (VRPP) em 200ppb (ou aproximadamente $400\mu\text{g}/\text{m}^3$), acumulados durante o período de cinco dias, como valor de referência acima do qual aparecem injúrias visíveis em plantas sensíveis.

1.2. Entrada dos poluentes na planta e alguns sintomas

Os poluentes gasosos entram na planta diretamente pelos estômatos durante as trocas gasosas, podendo provocar efeitos fisiológicos, metabólicos, ultraestruturais e estruturais, que levam a sintomas como clorose, descoloração da folha e necrose em tecidos e órgãos, que podem evoluir levando à morte do indivíduo (Manning & Feder 1980, Larcher 2000). O ozônio, em particular, se dissocia muito rapidamente nos tecidos vegetais, formando oxigênio molecular e peróxidos, que afetam primeiramente a membrana plasmática e, posteriormente, todas as biomembranas (Larcher 2000). Tal toxicidade decorre da formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs) nas células, as quais são muito reativas e danificam moléculas vitais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, afetando as membranas celulares, e alterando o metabolismo celular; a intensidade de ação biológica, no entanto, depende da eficiência do sistema celular antioxidativo, composto por substâncias capazes de capturar e neutralizar as EAOs (Bray *et al.* 2000).

Existem muitos critérios para o reconhecimento inicial de danos causados por poluentes aéreos em geral e, em especial, o ozônio. Porém são necessárias técnicas específicas para detectá-los. Dentre eles podem ser citados: a diminuição ou aumento de atividades de certas enzimas (Dijak & Ormrod 1982, Antonielli *et al.* 1997, Pasqualini *et al.* 2003), alterações genéticas (Guimarães *et al.* 2000, Klumpp *et al.* 2006), alterações quantitativas e qualitativas entre metabólitos, aparecimento de hormônios vegetais relacionados ao estresse (Dijak & Ormrod 1982), aumento ou diminuição da respiração, distúrbios na fotossíntese (Heath 1994, Pääkkönen *et al.* 1998, Kolb & Matyssek 2001, Gerosa *et al.* 2003), e alterações na abertura e no fechamento estomático (Schaub *et al.* 2005). Tais alterações podem levar à formação de sintomas visíveis na planta, que são facilmente identificáveis em muitas espécies.

Em relação aos parâmetros anatômicos, plantas submetidas a poluentes aéreos, incluindo o ozônio, podem apresentar alterações na densidade estomática (Evans & Miller 1972, Sharma & Butter 1975, Masuch *et al.* 1992, Evans *et al.* 1996, Pääkkönen *et al.* 1995, Pääkkönen *et al.* 1997, Pääkkönen *et al.* 1998, Alves *et al.* 2001), alterações na quantidade de espaços intercelulares no mesofilo e alterações nos tecidos constituintes do mesofilo (Bobrov 1955, Evans & Miller 1972, Evans *et al.* 1996, Alves *et al.* 2001, Gerosa *et al.* 2003, Gravano *et al.* 2003, Reig-Armiñana *et al.* 2004), alterações nas células que envolvem a câmara subestomática (Bobrov 1955), alterações na área dos feixes vasculares (Masuch *et al.* 1992, Alves *et al.* 2001, Reig-Armiñana *et al.* 2004), colapso das células do floema (Masuch *et al.* 1992, Soda *et al.* 2000), escamas anômalas (Moura comunicação pessoal), aumento na densidade dos tricomas (Sharma & Butter 1975), células hipertrofiadas do mesofilo (Masuch *et al.* 1992), aumento de cristais de oxalato de cálcio na epiderme (Soda *et al.* 2000), degradação da cera epicuticular (Masuch *et al.* 1992, Viskari *et al.* 2000) e degradação dos canais secretores (Reig-Armiñana *et al.* 2004).

Povilatis (1962), trabalhando com o gênero *Nicotiana*, encontrou alterações iniciais nas células do parênquima paliçádico e, ocasionalmente, nas células do parênquima lacunoso quando a planta foi submetida ao ozônio. Glater *et al.* (1962) trabalharam com *Nicotiana glutinosa* e perceberam que, nessa espécie, as células do parênquima lacunoso são as mais vulneráveis à presença de ozônio.

Em nível ultraestrutural o cloroplasto é a organela que mais sofre o efeito da ação dos poluentes. Alterações em sua forma, número, tamanho, aumento da elétrondensidade, degeneração ou intumescência dos tilacóides, granulação do estroma são alguns dos sintomas mais citados (Pääkkönen *et al.* 1995, Pääkkönen *et al.* 1997, Soda *et al.* 2000, Reig-Armiñana *et al.* 2004). Entretanto, existem outras características

avaliadas, como acúmulo de lipídios e outros depósitos no citoplasma, e desarranjo de mitocôndrias (Soda *et al.* 2000, Viskari *et al.* 2000).

1.3. Biomonitoramento da qualidade do ar

Efeitos da poluição atmosférica em organismos vêm sendo apontados desde o século XIX. Nylander (1866) (*apud* Klumpp 2001) encontrou mudanças nas comunidades líquênicas epifíticas situadas em áreas poluídas.

Roholm (1937) (*apud* Weinstein *et al.* 1998) atribuiu a morte de gado na Islândia à contaminação da forragem, em consequência de erupção vulcânica. Hoje se sabe que o flúor presente nos gases e acumulado nas gramíneas forrageiras foi o principal responsável pelas mortes.

Na década de 50, no sul da Califórnia (EUA), ocorreu uma queda na produção das indústrias de charuto em decorrência do aparecimento de manchas necróticas nas folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Pesquisadores do USDA Agricultural Research Center, em Beltsville, patrocinados pela cooperativa agrícola local, descobriram que as manchas formavam-se em decorrência da presença do ozônio no ambiente (Heggestad 1991).

Os exemplos citados evidenciam o potencial de organismos vivos, especialmente plantas, como indicadores da presença de poluentes. Dessa forma, o biomonitoramento tornou-se uma prática comum em países do hemisfério norte, principalmente Europa (Heggestad & Middleton 1959, Ashmore *et al.* 1978, Heggestad 1991, Klumpp *et al.* 2001, Vergé *et al.* 2002).

De acordo com Arndt & Schweizer (1991) o biomonitoramento é definido como método que faz uso da vida para identificar e/ou caracterizar mudanças ambientais

induzidas pela ação humana. Em programas de biomonitoramento, utilizam-se organismos ou comunidades de organismos que reagem de forma previsível e quantificável a perturbações ambientais, por meio de alterações nas suas funções vitais ou composição química, podendo ser usados para avaliação da extensão das mudanças em seu ambiente, estes são denominados organismos bioindicadores.

De Temmerman *et al.* (2004) classificam as plantas empregadas no biomonitoramento em:

- a) bioindicadoras – plantas que apresentam sintomas visíveis como necroses, cloroses e distúrbios fisiológicos, tais como redução no crescimento, redução no número e diâmetro das flores;
- b) biosensoras – plantas que reagem aos efeitos dos poluentes aéreos com efeitos não-visíveis, apresentando alterações moleculares, celulares, fisiológicas e bioquímicas;
- c) bioacumuladoras – plantas que também não apresentam sintomas visíveis e são menos sensíveis aos poluentes aéreos, porém acumulam partículas de poeira e gases dentro dos seus tecidos;
- d) biointegradoras – aquelas que indicam o impacto da poluição por intermédio do aparecimento, desaparecimento ou mudança na densidade da população ou até comunidades.

Falla *et al.* (2000) simplificam a classificação de plantas bioindicadoras em apenas dois tipos: passivos e ativos. Os bioindicadores passivos são plantas que já estão presentes no local de estudo. A sua utilização está frequentemente relacionada a toda área que está sendo pesquisada, e sua utilização apresenta a vantagem de que as espécies nativas não necessitam de manutenção específica. Porém os resultados podem ser influenciados por variáveis, como qualidade do solo, condições climáticas,

variabilidade genética, estado metabólico, heterogeneidade e distribuição espacial das espécies selecionadas. Já as plantas bioindicadoras ativas são introduzidas no local de estudo. Nesse caso, a possibilidade de controle de fatores de confusão é maior, e a exposição em casa de vegetação livra os estudos das restrições descritas para os passivos.

Arndt & Schweizer (1991) classificam os bioindicadores em indicadores de resposta e indicadores de acumulação. Estes se subdividem em organismos apontadores (população ou comunidade de organismos que podem indicar alguma informação a respeito das condições ambientais do ecossistema); organismos testes (empregados em ensaios ecotoxicológicos) e organismos monitores ativos e passivos (utilizados para monitorar qualitativamente ou quantitativamente os níveis de poluentes e suas repercussões).

Como exemplo da viabilidade de programas de biomonitoramento da qualidade do ar empregando-se plantas bioindicadoras cita-se o EuroBionet – rede europeia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras, que foi criado em 1999 e encerrado em 2002, envolvendo 12 cidades em oito países europeus. Os objetivos principais foram estabelecer o uso de plantas bioindicadoras em nível europeu, transferir conhecimento e experiências, comparar os tipos de poluição nas diferentes cidades envolvidas, demonstrar ao público o impacto dos poluentes atmosféricos, e informar à população sobre a qualidade do ar na sua cidade, incentivando atividades do município que refletissem em melhoria na qualidade de vida. O programa foi um sucesso, uma vez que mostrou que as plantas bioindicadoras monitoram de forma muito eficiente a qualidade do ar, além de serem altamente indicadas em atividades de educação ambiental, e contribuir com uma comunicação mais eficiente entre os cidadãos e as autoridades municipais (EuroBionet 2004).

Um outro exemplo é o Forest Health Monitoring Program (FHM), programa desenvolvido entre 1994 e 2000, com a participação de 33 estados norte-americanos e 918 pontos de coleta. Este programa enfocou os efeitos do ozônio sobre a vegetação, avaliando o impacto deste poluente na floresta, por intermédio de injúrias visíveis, selecionando, assim, as plantas mais sensíveis (Smith *et al.* 2003).

No Brasil não existem programas de biomonitoramento nesse nível. Existem alguns centros que realizam estudos com plantas bioindicadoras já consagradas ou com espécies nativas com tal potencial, visando, sob diferentes enfoques, avaliar o efeito da poluição atmosférica em algumas localidades do país, como Salvador (Lima *et al.* 2000, Klumpp *et al.* 2003), São Paulo (Domingos *et al.* 1998, Batalha *et al.* 1999, Ferreira *et al.* 2000, Guimarães *et al.* 2000, Alves *et al.* 2001, Domingos *et al.* 2002, Moraes *et al.* 2002, Alves *et al.* 2003), Viçosa (Prado-Filho 1993, Chaves *et al.* 2002, Silva *et al.* 2005a, Silva *et al.* 2005b) e Curitiba (Alves 2001, Bujokas 2001).

Considerando que dentre os poluentes atmosféricos, o ozônio é um dos mais importantes, existem muitos estudos que descrevem sintomas visíveis entre os danos provocados por esse gás na vegetação nativa. Alguns autores avaliaram a concentração de ozônio em diferentes regiões com base nos sintomas visíveis presentes na vegetação (Heggestad & Middleton 1959, Heagle & Heck 1974, Klumpp *et al.* 1994, Pääkkönen *et al.* 1995, Günthardt-Goerg 1996, Soda *et al.* 2000, Kolb & Matyssek 2001, Manning *et al.* 2002, Gerosa *et al.* 2003, Oredonvici *et al.* 2003, van Tienhove & Scholes 2003) ou em bioindicadoras ativas incluindo o cultivar Bel W3 do tabaco (Ashmore *et al.* 1978, Domingos *et al.* 1998, Vergé *et al.* 2002).

2. Objetivos

Nicotiana tabacum Bel W3 é amplamente empregada em programas de biomonitoramento da qualidade do ar em regiões temperadas. Contudo, para sua utilização efetiva em estudos voltados ao monitoramento da qualidade em regiões tropicais, é necessário estabelecer por que nessas regiões observa-se uma fraca relação entre a área foliar afetada por necrose e a concentração de ozônio no ar.

Assim, com base na análise estrutural da folha, buscam-se detectar algumas respostas da cultivar frente às condições ambientais da cidade de São Paulo, que contribuam para explicar o por quê dessa fraca resposta.

Objetivou-se, dessa forma, responder às seguintes questões:

1. A estrutura anatômica da folha dessa planta, quando mantida nas condições ambientais da cidade de São Paulo, apresenta alterações estruturais que dificultem a entrada dos poluentes na planta?
2. Quais são os tecidos primeiramente afetados?
3. É possível relacionar parâmetros anatômicos com a concentração de poluentes, especialmente o ozônio, a qual a planta está submetida?

3. Material e métodos

3.1. A planta estudada

Nicotiana tabacum ‘Bel W3’ – Solanaceae (Figura 1), cultivar do tabaco e bioindicadora de ozônio, foi a espécie utilizada para a realização deste trabalho. A origem do cultivar remonta a década de 50, quando as indústrias produtoras de charutos, situadas na cidade de Beltsville, no Vale de Connecticut – USA, começaram a acumular prejuízos, uma vez que as plantas empregadas na indústria apresentavam manchas nas folhas que impediam sua utilização (Heggstad 1991).

Em 1959, num lote de vinte plantas de *N. tabacum* que cresciam na Consolidated Cigar Company W3, duas delas apresentaram lesões duas a três vezes maiores do que as lesões típicas associadas a ‘manchas do tempo’, sintomas correspondentes a necroses desenvolvidas pela ação do ozônio. Estas plantas foram consideradas mais sensíveis que as demais, e pesquisadores do USDA Agricultural Research Center passaram a estudar e padronizar esta cultivar, o que deu origem ao seu emprego como bioindicadora de ozônio. Devido aos nomes da cidade e da companhia, a cultivar foi denominada ‘Bel’ (Beltsville) e ‘W3’ (Consolidated Cigar Company W3) (Heggstad 1991).



Foto: M. Domingos

Figura 1. *Nicotiana tabacum* 'Bel W3'.

3.2. Obtenção das plantas

A obtenção das mudas de *Nicotiana tabacum* ‘Bel W3’ seguiu a metodologia estabelecida pelo “Verein Deutscher Ingenieure” – VDI (1999) e envolveu as etapas descritas a seguir.

Sementes doadas pela Universidade de Hohenheim, Alemanha, foram colocadas em caixas plásticas contendo substrato Plantimax[®] e vermiculita fina na proporção de 3:1. Após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos apoiados sobre telas de arame galvanizado, dispostas sobre caixas plásticas contendo água de torneira. A irrigação adequada das plantas foi garantida por cordões de náilon previamente inseridos nos vasos, cujas extremidades estavam em contato com as raízes da planta e com a água presente nas caixas. Semanalmente cada vaso recebeu 100 ml de solução de Hoagland (Epstein 1975). As plantas estiveram prontas para a exposição quando apresentaram ao menos seis folhas, o que levou aproximadamente dois meses após a semeadura.

Em cada um dos pontos de exposição descritos no item 3.3, seis vasos de tabaco Bel W3 foram colocados sobre suporte metálico retangular com 80 cm de espessura, o qual abrigou duas caixas contendo água para irrigação. As caixas foram recobertas por tela metálica e placa de isopor, estando os vasos encaixados nesta, o que assegurou sua estabilidade. O suporte foi protegido por tela sombrite que recobriu a superfície de topo e três das laterais. O sombrite, além de impedir a insolação direta reduz em 50% a intensidade luminosa, protege a planta contra vento e precipitação, garantindo seu desenvolvimento satisfatório (Figura 2). O posicionamento do suporte em campo foi estabelecido com bússola a fim de padronizar o nível de insolação das plantas. As

plantas permaneceram expostas durante 14 dias, de acordo com o protocolo estabelecido (VDI 1999).

As plantas utilizadas fazem parte de um estudo que está em andamento, que relaciona a concentração de ozônio com indicadores de saúde pública, visando à criação de um programa de biomonitoramento do ozônio na cidade de São Paulo. Tal estudo está sendo realizado pela doutoranda Sílvia Sant'Anna, sob a orientação da Dra. Marisa Domingos, da Seção de Ecologia do Instituto de Botânica.



Foto: M. Domingos

Figura 2. Método de exposição das plantas.

3.3. Descrição dos pontos de exposição

As plantas foram expostas em três períodos distintos: 01 a 15 de outubro, 29 de outubro a 12 de novembro e 26 de novembro a 11 de dezembro de 2003, em diferentes pontos da cidade de São Paulo (Figura 3), descritos a seguir:

- Ibirapuera: situado no Viveiro Manequinho Lopes, portão 7, próximo à Avenida IV Centenário (zona sul da cidade de São Paulo);
- Moóca: situado na Rua Bresser, 2.341, na Administração Regional da Moóca e Centro Educacional e Esportivo Municipal (zona leste da cidade de São Paulo);
- Santana: situado na Avenida Santos Dumont, 1.019, no Parque de Material Aeronáutico (zona norte da cidade de São Paulo);
- São Caetano do Sul: situado na Rua Aurélia s/n na Escola Municipal Infantil Fernando Pessoa (Região Metropolitana de São Paulo);

Os quatro pontos selecionados são monitorados por estações medidoras da Cetesb e são locais onde as concentrações de ozônio atingem valores elevados. Além disso, o período de agosto a dezembro, de acordo com a Cetesb (2002) é aquele no qual as concentrações de ozônio são as mais altas, o que justifica a escolha do período e dos locais de exposição das plantas.

Tabela 1. Concentrações médias de poluentes aéreos, dados climáticos na Região Metropolitana de São Paulo e área foliar com necrose em plantas de *Nicotina tabacum* Bel W3 expostas na cidade de São Paulo. Dados de poluentes e climáticos fornecidos pela Cetesb (2004) e médias calculadas para os períodos de exposição.

	Exposição I (01-15/10)				Exposição II (29/10 – 12/11)				Exposição III (26/11 – 11/12)			
	Ibirapuera	Moóca	Santana	São Caetano do Sul	Ibirapuera	Moóca	Santana	São Caetano do Sul	Ibirapuera	Moóca	Santana	São Caetano do Sul
CO (ppm)	0,6	-	-	0,9	0,5	-	-	0,9	0,7	-	-	1,1
MP ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	45,5	39,0	36,4	22,1	40,8	30,8	32,5	25,9	40,0	30,6	26,2	28,8
NO ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	5,5	-	-	29,3	6,2	-	-	37,7	10,6	-	-	41,9
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	31,3	-	-	46,8	30,2	-	-	46,6	31,3	-	-	53,7
NO _x ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	21,1	-	-	48,2	21,7	-	-	54,7	25,2	-	-	62,2
O ₃ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) *	69,2	67,8	71,6	69,2	64,6	57,0	59,8	42,6**	45,4	39,6	54,8	41,8
AOT40 (ppb.h) #	744	556	832	568	828	505	715	59**	385	76	294	124
Rad (W/m^2)	176	-	-		368,8	-	-	-	167	-	-	-
Temp (°C)	18,2	-	-	19,5	19,7	-	-	18,2	21,7	-	22,7	-
Umidade (%)	74,5	-	-	83,7	70,2	-	89,8	-	76	-	88,4	-
Ventos (m/s)	244	-	182	172	260	-	157	178	381	-	268	223
Área necrosada (%)***	13,3	5,0	6,7	11,7	16,7	6,7	6,7	11,7	13,3	6,7	5,0	5,0

(# AOT40: índice referente à exposição acumulada acima de 40 ppb. Os valores horários são subtraídos de 40ppb, e os que excederam este valor são somados, formando assim este índice.

- Dados não obtidos.

* Concentrações de ozônio para o período de 10 às 14 horas.

** Medidas obtidas até o dia 07/11.

*** Dados cedidos por Silvia Sant'Anna.

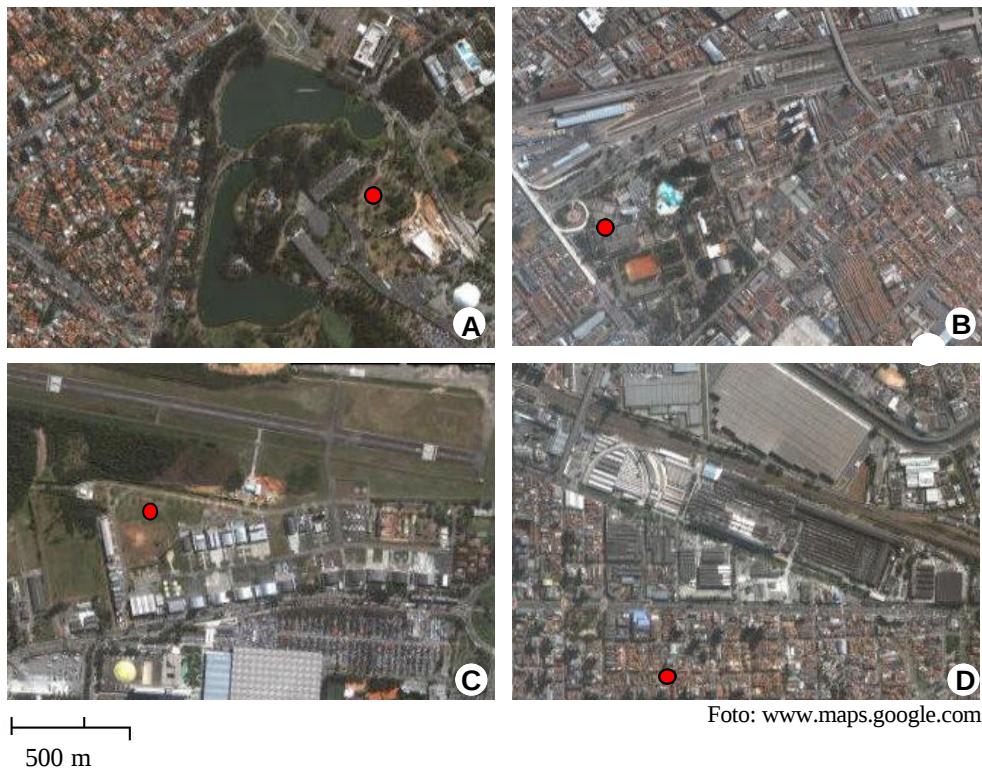


Figura 3. Visão aérea dos pontos de exposição ●: A. Ibirapuera. B. Moóca. C. Santana. D. São Caetano do Sul.

Como ponto controle utilizou-se casa de vegetação situada no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga – PEFI, que possui um sistema de filtros que impede a entrada dos poluentes gasosos e de material particulado, garantindo assim a qualidade do ar, apresentando ainda condições controladas de temperatura. (Figura 4).



Foto: M.L. Ferreira

Figura 4. Casa de vegetação.

3.4. Coleta do material e seleção das folhas

Ao término de cada período de exposição foram selecionados três indivíduos em cada um dos quatro ambientes e da casa de vegetação. Nestes, foi coletada a folha do terceiro nó que se expandiu no ambiente, e que não apresentava necrose, totalizando 15 folhas. Foram coletadas, também, folhas com necrose do quarto, quinto ou sexto nós dos mesmos indivíduos, incluindo os da casa de vegetação (sem necrose) totalizando, também 15 folhas.

As folhas foram fixadas em FAA₇₀ (Berlyn & Miksche 1976) ou FGAA (Lersten & Curtis 1988) e posteriormente armazenadas em álcool 70% ou 95%.

3.5. Processamento das amostras para análise em microscopia fotônica

Foram selecionados fragmentos com cerca de 4cm² da região mediana das folhas sem necrose, de todos os ambientes, incluindo os da casa de vegetação, os quais foram diafanizados de acordo com Strittmatter (1973, modificado). As amostras foram fervidas por quatro minutos, sendo metade do tempo em álcool 95% e o restante em solução de hidróxido de sódio a 5% e álcool 95% (1:1). Em seguida, os fragmentos foram colocados em solução aquosa de hipoclorito de sódio a 20% até sua descoloração. O material foi corado em solução aquosa de azul de astra (1%) e safranina (1%), na proporção 9:1, desidratado em série etílica e montado em resina sintética *Permout* (Kraus & Arduin 1997).

Amostras da região mediana das mesmas folhas (sem necrose) foram hidratadas e emblocadas em polietilenoglicol 2000 (20%) (Richter 1981, modificado). O material foi seccionado em micrótomo rotativo Olympus CUT 4055, com espessura entre 16-18µm.

As secções foram depositadas em lâminas histológicas contendo adesivo de Haupt (Haupt 1930 *apud* Kraus & Arduin 1997). As lâminas foram aquecidas a 40°C para a distensão e fixação das secções. Para a coloração, utilizou-se a solução acima descrita, e como meio de montagem utilizou-se glicerina a 66%.

Amostras contendo tecido sadio e tecido afetado foram retiradas da região mediana das folhas com necrose. Estas foram desidratadas em série etanólica crescente até a concentração de 95% e emblocadas em historesina Leica, de acordo com instruções do fabricante. Empregando-se o mesmo micrótomo, foram obtidas secções transversais com 5µm de espessura, que foram depositadas em lâminas, colocadas em água para sua distensão e coradas com azul de toluidina em tampão fosfato 0,1M, pH 6,8 (O'Brien & McCully 1965).

Para classificação das características morfológicas seguiu-se Radford *et al.* (1974) e anatômicas seguiu-se Metcalfe & Chalk (1950), Esau (1974), Fahn (1974).

3.6. Parâmetros avaliados

Para análises qualitativas e quantitativas dos tecidos foliares, foi utilizado microscópio equipado com câmera para captura de imagens e sistema semi-automático de medições – Olympus modelo BX41-BF-III, com *software* de análise de imagens Image-Pro Express versão 4.0.1, da Media Cybernetics.

Nas folhas sem necrose foram quantificadas (em μm) as seguintes características: espessura do parênquima paliçádico, espessura do parênquima lacunoso, espessura do mesofilo, espessura das células do mesofilo + células epidérmicas (espessura da lâmina foliar). Estabeleceu-se em campo de $200\ \mu\text{m}^2$ a densidade e o índice estomático em ambas as superfícies. Determinou-se o número de elementos de vaso da nervura principal e avaliou-se seu agrupamento.

Para as folhas com necrose foram estabelecidos critérios de reconhecimento qualitativos, como alterações no aspecto geral das células, desde a parte sadia até a necrose, sempre comparando-se com o material de referência mantido em casa de vegetação.

3.7. Processamento das amostras para análise ao microscópio eletrônico de varredura – folhas com necroses

Fragmentos de folhas de plantas da casa de vegetação, e de folhas com necrose, de plantas dos ambientes sujeitos aos poluentes urbanos, foram avaliados ao MEV. Foram selecionados, nas folhas com necrose, fragmentos da região de transição entre tecido sadio e tecido com necrose, e de tecido com a necrose. Todo o material foi desidratado em série etanólica. As amostras passaram por secagem ao ponto crítico com acetona, empregando-se equipamento Bal-Tec CPD 030, foram aderidas a suporte metálico com fita dupla face e metalizadas com ouro, empregando-se equipamento Bal-Tec SCD 050, para posterior observação em microscópio de varredura (Philips XL series XL 20).

Foram observados os aspectos gerais da epiderme das folhas.

3.8. *Análise estatística*

Para determinação das diferenças entre os locais de amostragem, para cada variável quantitativa, aplicou-se intervalo de confiança eliminando assim os *outliers*, logo após realizou-se análise de variância paramétrica (Teste F) ou não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis), quando não houve distribuição normal e/ou igualdade de variâncias. Quando o nível de significância ($p < 0,05$) da análise foi atingido, aplicou-se teste de Dunn's de comparações múltiplas, para identificação das diferenças entre os tratamentos. Para as análises foi utilizado o *software* Sigma Stat.

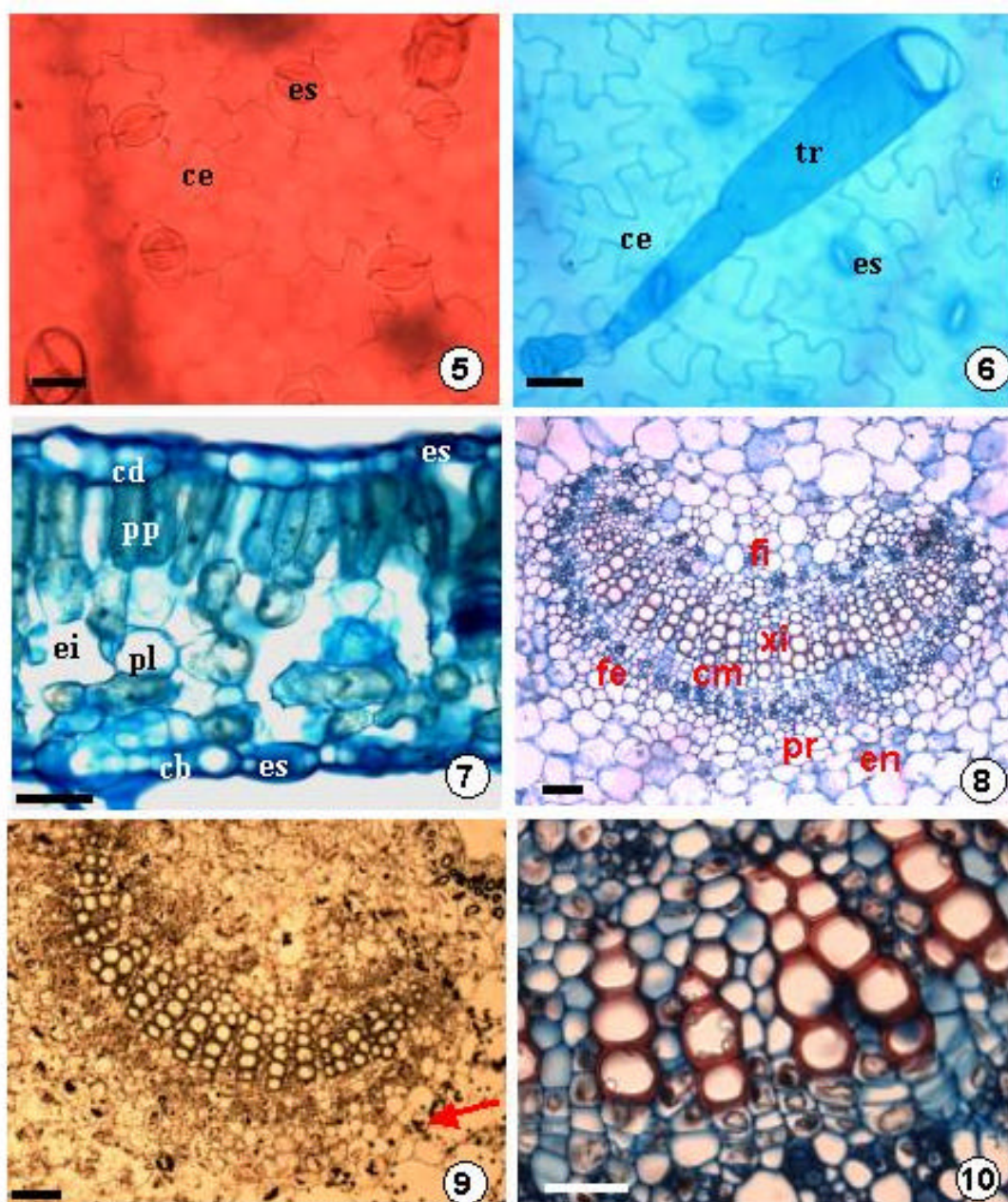
4. Resultados

4.1. Descrição da folha de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3'

A folha de *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' é simples, alterna, pilosa com tricomas em ambas as superfícies, ápice acuminado, base decorrente, margem crenada; a folha adulta apresenta comprimento médio de 11,3 cm e largura, na região mediana, de 20 cm; seu padrão de nervação é broquidódromo.

As células epidérmicas das superfícies abaxial e adaxial, em vista frontal, apresentam paredes sinuosas, de formato irregular (Figuras 5 e 6). Os estômatos são freqüentes na superfície abaxial ($36/\text{mm}^2$) e se apresentam em menor freqüência na superfície adaxial ($23/\text{mm}^2$), portanto a folha é anfiestomática e os estômatos são do tipo anomocítico (Figuras 5 e 6). Os tricomas glandulares são unicelulares e multicelulares (Figura 6). Em secção transversal as células epidérmicas são unisseriadas, o mesofilo é dorsiventral, com uma camada única de parênquima paliçádico e de quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso (Figura 7). A endoderme é facilmente identificada pela presença de amiloplastos, evidenciados com o auxílio de lugol (Figura 9).

O sistema vascular da nervura principal apresenta formato de meia lua, constituído por uma unidade bicolateral com floema interno e externo ao xilema. (Figura 8). Nas nervuras secundárias o feixe é colateral. Apresenta atividade cambial somente na face abaxial da nervura principal (Figura 10). O periciclo envolve os feixes vasculares (Figura 8).



Figuras 5 – 8. Fotomicrografias de folhas sem necrose de *N. tabacum* 'Bel W3'. 5 - 6. Secções paradérmicas. 5. Superfície adaxial. 6. Superfície abaxial 7 – 10. Secções transversais da região mediana. 7. Limbo foliar. 8 – 10. Nervura principal. 9. Endoderme com amiloplastos (seta). 10. Agrupamento dos elementos de vaso (barras = 50µm). cb = células epidérmicas abaxiais, cd = células epidérmicas adaxiais, ce = célula epidérmica, cm = câmbio, ei = espaços intercelulares, el = elementos de vaso, en = endoderme, es = estômato, fe = floema externo, fi = floema interno, pl = parênquima lacunoso, pp = parênquima paliçádico, pr = periciclo, tr = tricoma., ,pp = parênquima paliçádico, pl = parênquima lacunoso, xi = xilema.

4.2. *Análise estrutural de plantas submetidas aos poluentes aéreos de São Paulo*

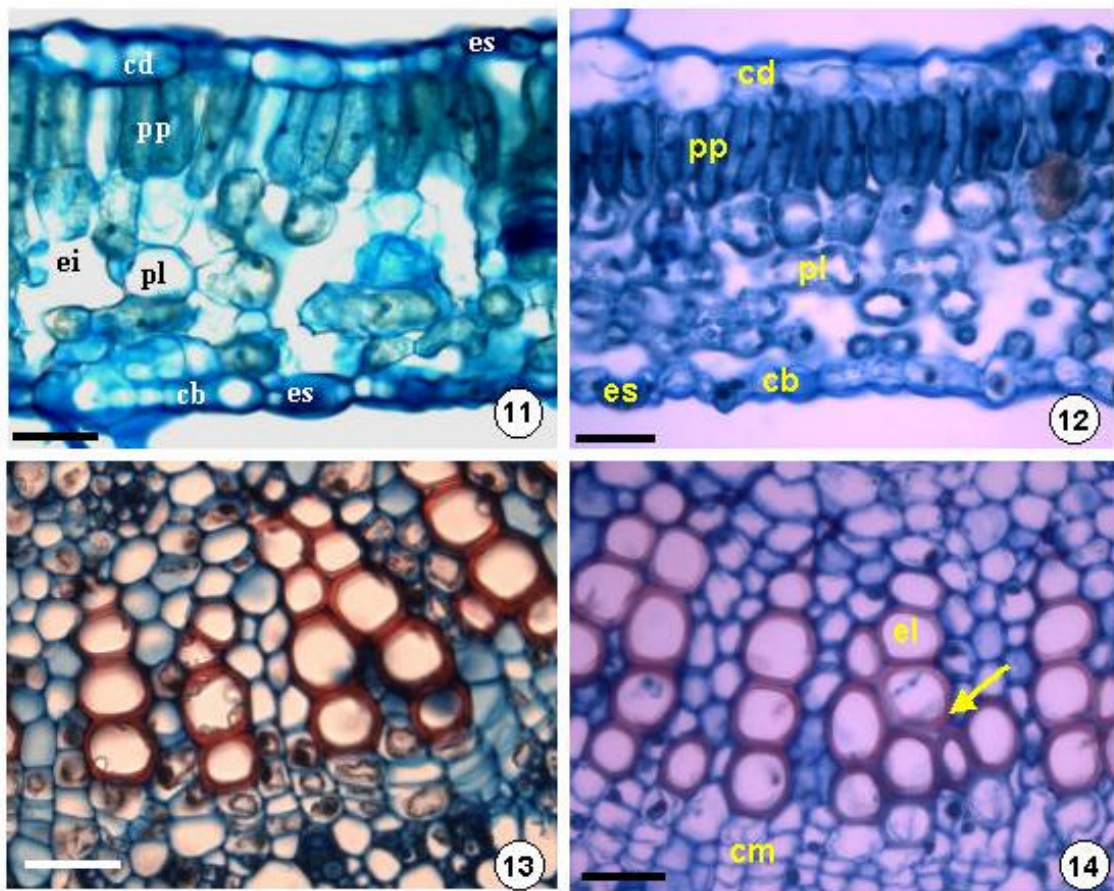
4.2.1 Variações qualitativas em folhas sem necrose

Foram observadas variações qualitativas na região mediana de folhas sem necrose dos indivíduos provenientes dos diferentes ambientes de exposição. As plantas expostas aos poluentes apresentaram uma mudança no formato das células do parênquima paliçádico (Figura 12) quando comparadas aquelas da casa de vegetação (Figura 11). Observou-se também na nervura principal maior agrupamento dos elementos de vaso nas plantas submetidas aos poluentes (Figura 14) quando comparadas àquelas da casa de vegetação (Figura 13).

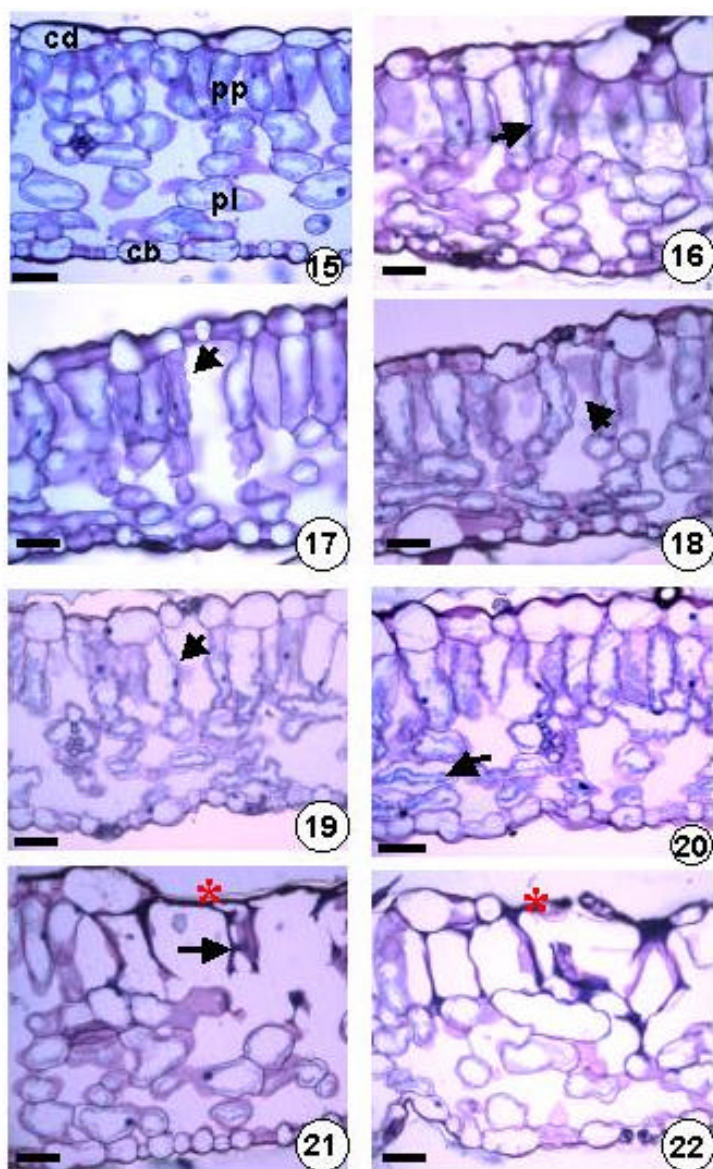
4.2.2. Variações qualitativas em folhas com necrose

São descritas a seguir as principais alterações estruturais nas folhas que apresentaram necroses. Para permitir comparações, mostra-se na figura 15 o limbo de folha sem necrose de planta mantida em casa de vegetação. Observa-se o aspecto normal da folha, que apresenta parênquima paliçádico e lacunoso com paredes anticlinais lisas, vacúolos íntegros, ocupando a região central da célula, o que é evidenciado pela distribuição periférica dos cloroplastos. Nas figuras 16 a 22 observam-se algumas das alterações presentes nas plantas expostas no Ibirapuera, local, dentre os estudados, que apresenta os maiores valores de AOT40. (Tabela 1). As mesmas alterações foram observadas em plantas expostas nos outros locais estudados. Na figura 16, observam-se sinuosidades nas paredes anticlinais do parênquima paliçádico em regiões da folha aparentemente saudáveis e circunvizinhas à necrose; à medida que se analisam os tecidos mais próximos à necrose verifica-se que a sinuosidade é mais acentuada (Figuras 17 a 19). Na

figura 20 observa-se, também, alteração no parênquima lacunoso (seta) que se apresenta plasmolisado. Nas figuras 21 e 22, observam-se, também alterações nas células epidérmicas da superfície adaxial que, na região da necrose, apresentam-se rompidas. Nessa mesma região, as células do parênquima paliçádico se romperam, dando lugar a espaços intercelulares. Comparando-se a situação das células epidérmicas da superfície adaxial com aquelas da superfície abaxial verifica-se que as últimas são menos afetadas, o mesmo se dá com o parênquima lacunoso (Figuras 21 e 22). Não foram observadas alterações nos feixes vasculares de pequeno calibre, mesmo na região onde epiderme da superfície adaxial e parênquima paliçádico mostram-se totalmente desestruturados.

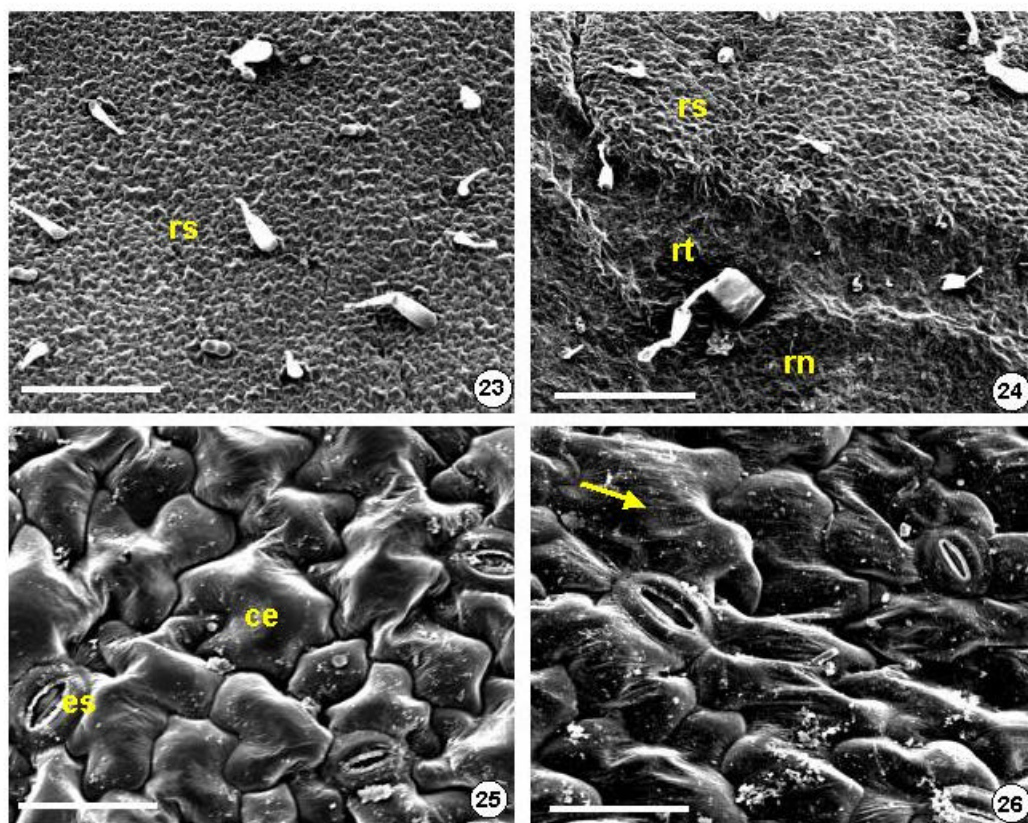


Figuras 11 – 14. Fotomicrografias de seções transversais da região mediana de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3'. 11 – 12. Região do limbo. 13 – 14. Agrupamento dos elementos de vaso na nervura principal. 11 e 13. Folhas expostas na casa de vegetação. 12 e 14. Folhas expostas no Ibirapuera (barra = 50μm). cm = câmbio, cb = células epidérmicas abaxiais, cd = células epidérmicas adaxiais, es = estômato, el = elementos de vaso, en = endoderme, fe = floema externo, fi = floema interno, pr= periciclo, pp = parênquima paliçádico, pl = parênquima lacunoso, xi= xilema.

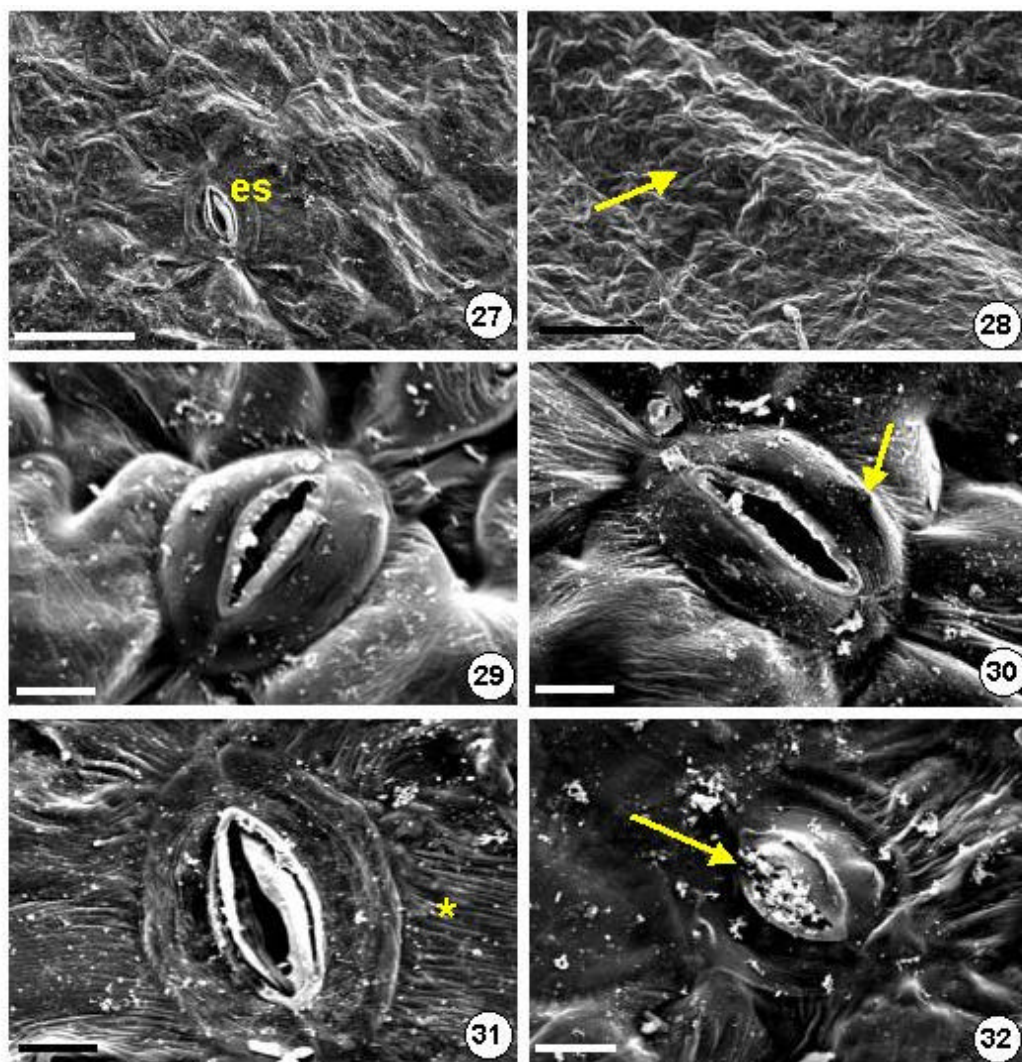


Figuras 15 – 22. Fotomicrografias de secções transversais de folha de *N. tabacum*. ‘Bel W3’ e. 15. Planta mantida em casa de vegetação. 16 – 22. Plantas expostas na exposição II no Ibirapuera, folhas com necrose. 16. Presença de sinuosidade nas paredes anticlinais do parênquima paliádico (seta). 17 – 19. Alterações no aspecto do parênquima paliádico com aumento da sinuosidade das paredes celulares. (setas). 20 – 22. Alterações no parênquima paliádico e lacunoso (setas) e colapso das células epidérmicas adaxiais (*). 20. Plasmólise do vacúolo das células do parênquima lacunoso (seta) (barras = 50µm). cb = células epidérmicas abaxiais, cd = células epidérmicas adaxiais, pp = parênquima paliádico, pl = parênquima lacunoso.

Nas figuras 23 a 32 são apresentados aspectos da epiderme de folhas de *N. tabacum* Bel W3 submetidas a poluentes gasosos da cidade de São Paulo e, para comparação, imagens da epiderme de plantas mantidas em casa de vegetação. As alterações descritas a seguir foram observadas nas plantas dos diferentes ambientes submetidos aos poluentes gasosos aqui avaliados. Na figura 24 observa-se a região de transição entre o tecido sadio e o tecido necrosado, que apresenta uma depressão bem acentuada, não observada nas plantas da casa de vegetação (Figura 23). Como se vê nas figuras 25 e 26, as células epidérmicas das plantas mantidas em casa de vegetação apresentam superfícies mais lisas quando comparadas às das plantas expostas aos poluentes; estas apresentam-se mais estriadas e aparentemente menos túrgidas, o que pode estar indicando o início da plasmólise sofrida pelas mesmas e observada em regiões mais próximas à necrose (Figuras 27 e 28, 30-32). Na região da necrose, observam-se estômatos alterados (Figura 31), em comparação com aquelas das plantas da casa de vegetação (Figura 30). Na área com necrose a superfície é totalmente irregular, pois há erosão da cera epicuticular e modificação morfológica da mesma, que perde a arquitetura característica (Figuras 27 e 28). Os estômatos apresentam certa deformação em seu aspecto e ligeiro estriamento em relação às plantas da casa de vegetação; em alguns notam-se pequenas fissuras nas células guarda, mesmo em regiões próximas à necrose (Figura 30). Na região da necrose evidenciam-se estômatos atrofiados e abertos; em alguns se observam obliteração do ostíolo e deformação das células guarda e subsidiárias (Figuras 31 e 32).



Figuras 23 – 26. Eletromicrografias da superfície adaxial da folha de *N. tabacum* ‘Bel W3’. 23 e 25. Plantas mantidas em casa de vegetação. 24 e 26. Plantas expostas na cidade de São Paulo. 23. Folha sem necrose. 24. Região de transição entre a necrose e a área sadia (barra = 500µm). 25. Área sadia das plantas da casa de vegetação. 26. Área próxima à região de transição, apresentando rugosidade das células epidérmicas (seta) (barra = 50µm). ce = células epidérmicas, es = estômato, rn = região da necrose, rs = região sadia, rt = região de transição.



Figuras 27 – 32. Eletromicrografias da superfície adaxial de folhas de *N. tabacum* 'Bel W3'. 27 e 28. Planta exposta em São Paulo. 27. Área da necrose mostrando a deformação da arquitetura da cera epicuticular e estômato aberto (barra = 50µm). 28. Superfície irregular da área necrosada (seta) (barra = 200µm). 29. Estômato de planta da casa de vegetação (barra = 10µm). 30. Estômato localizado na área próxima à necrose, apresentando pequenas fissuras nas células guarda (seta) (barra = 10µm). 31 – 32. Estômatos na região da necrose. (barra = 10µm). 31. Estriamento das células epidérmicas (*). 32. Estômato com o ostíolo obliterado (seta). es = estômato.

4.2.3 Variações quantitativas em folhas sem necrose

A análise da densidade estomática mostrou que as plantas expostas no Ibirapuera variaram em relação às plantas da casa de vegetação e apresentaram os maiores valores em ambas as superfícies, enquanto que as plantas expostas na Moóca, Santana e São Caetano do Sul (SCS) não diferiram estatisticamente das plantas da casa de vegetação (Figuras 13A e B).

Ao contrário da densidade estomática, o índice estomático relativo à superfície abaxial mostrou variação entre as plantas da casa de vegetação e as plantas expostas aos poluentes de São Paulo, sendo maior nas primeiras. Já na superfície adaxial, as plantas da casa de vegetação e do Ibirapuera não variaram entre si e apresentaram índices mais baixos, quando comparadas àqueles das plantas dos demais locais (Figuras 13 C e D).

Quando se compara a espessura dos tecidos da folha, verifica-se que a do parênquima paliçádico não variou nas plantas expostas em Santana e SCS, em relação àquelas da casa de vegetação, enquanto que nas plantas da Moóca e Ibirapuera os valores foram significativamente menores (Figura 13 E). A espessura do parênquima lacunoso foi menor nas plantas da casa de vegetação e não diferiu daquelas do Ibirapuera, enquanto que as dos demais locais foram maiores e não diferiram entre si (Figura 13 F). Quanto ao número de camadas de parênquima lacunoso, as plantas do Ibirapuera apresentaram o menor valor; nos demais locais os valores foram estatisticamente iguais àquele das plantas da casa de vegetação (Figura 13 G). A espessura média do mesofilo e a espessura da folha, na qual se inclui a epiderme, variaram da mesma maneira (Figuras 13 H e I). As plantas de todos os locais avaliados variaram em relação às plantas da casa de vegetação, as folhas das plantas expostas no Ibirapuera apresentam menor espessura de mesofilo e da lâmina, enquanto que as plantas da Moóca, Santana e SCS apresentaram valores maiores que os das

plantas da casa de vegetação. Com relação à densidade de vasos do xilema na nervura principal foram observados maiores valores nas plantas do Ibirapuera, Moóca e SCS, enquanto que plantas de Santana não variaram em relação àquelas da casa de vegetação (Figura 13 J).

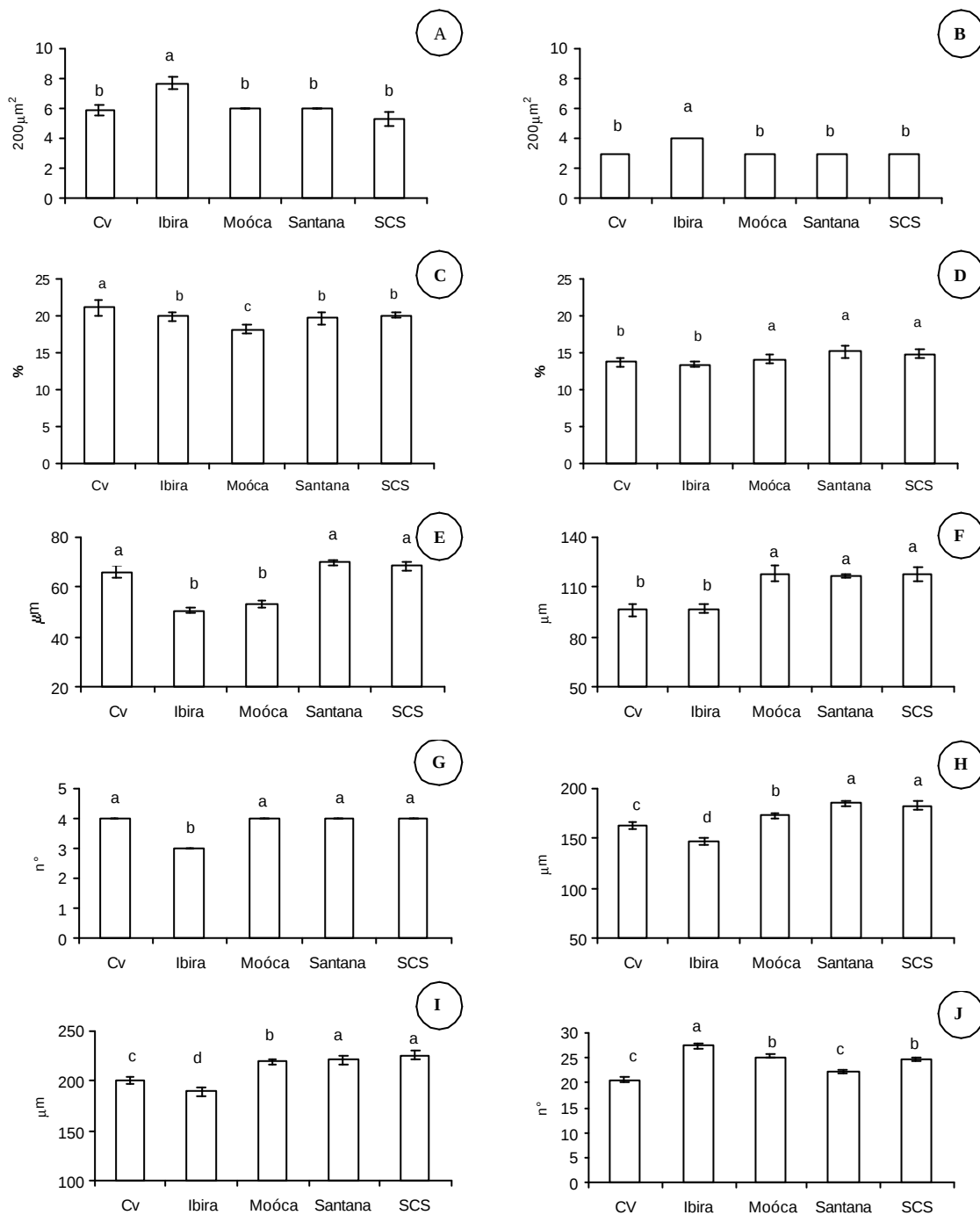


Figura 13. Valores médios de parâmetros anatômicos (colunas) e desvios-padrão (barras) avaliados em folhas sem necrose de *Nicotiana tabacum* Bel W3 expostas em diferentes ambientes na cidade de São Paulo. Letras diferentes indicam variações estatisticamente significantes pelo teste de Dunn ($p < 0,05$). A-B. Densidade estomática. A. Superfície abaxial. B. Superfície adaxial. C-D. Índice estomático. C. Superfície abaxial. D. Superfície adaxial. E. Espessura do parênquima paliçádico. F-G. Parênquima lacunoso. F. Espessura. G. Número de camadas. H. Espessura do mesófilo. I. Espessura da lâmina foliar. J. Densidade dos elementos de vaso. Cv = casa de vegetação, Ibira = Ibirapuera, SCS = São Caetano do Sul.

4.3. Relação entre as características anatômicas e a concentração de alguns poluentes

Para um melhor entendimento das respostas das plantas aos poluentes, foram confeccionados gráficos que relacionam os valores médios das diferentes características anatômicas com a concentração média de ozônio no período no qual os valores foram mais altos (exposição II – 29/10 – 12/11/2003, no período das 10 às 14 horas). Os parâmetros foliares quantitativos foram também relacionados com a concentração média de material particulado referente o período da segunda exposição (29/10 – 12/11/2003), uma vez que este também atinge valores elevados nos pontos de exposição aqui considerados (Tabela 1).

Nota-se que as plantas expostas no Ibirapuera, região com maior concentração dos poluentes apresentaram variações das características quando comparadas às dos demais locais. Estas apresentam a maior densidade estomática, nas duas superfícies (Figuras 14 A e D), a maior densidade de elementos de vaso (Figuras 14E e F), o menor número de camadas de parênquima lacunoso (Figuras 14G e 14H) e a menor espessura da lâmina foliar (Figuras 14 I e J). Além disso, as plantas desse local apresentaram maior área necrosada, de acordo com S.M. Sant'Anna (dados gentilmente cedidos e apresentados na Tabela 1).

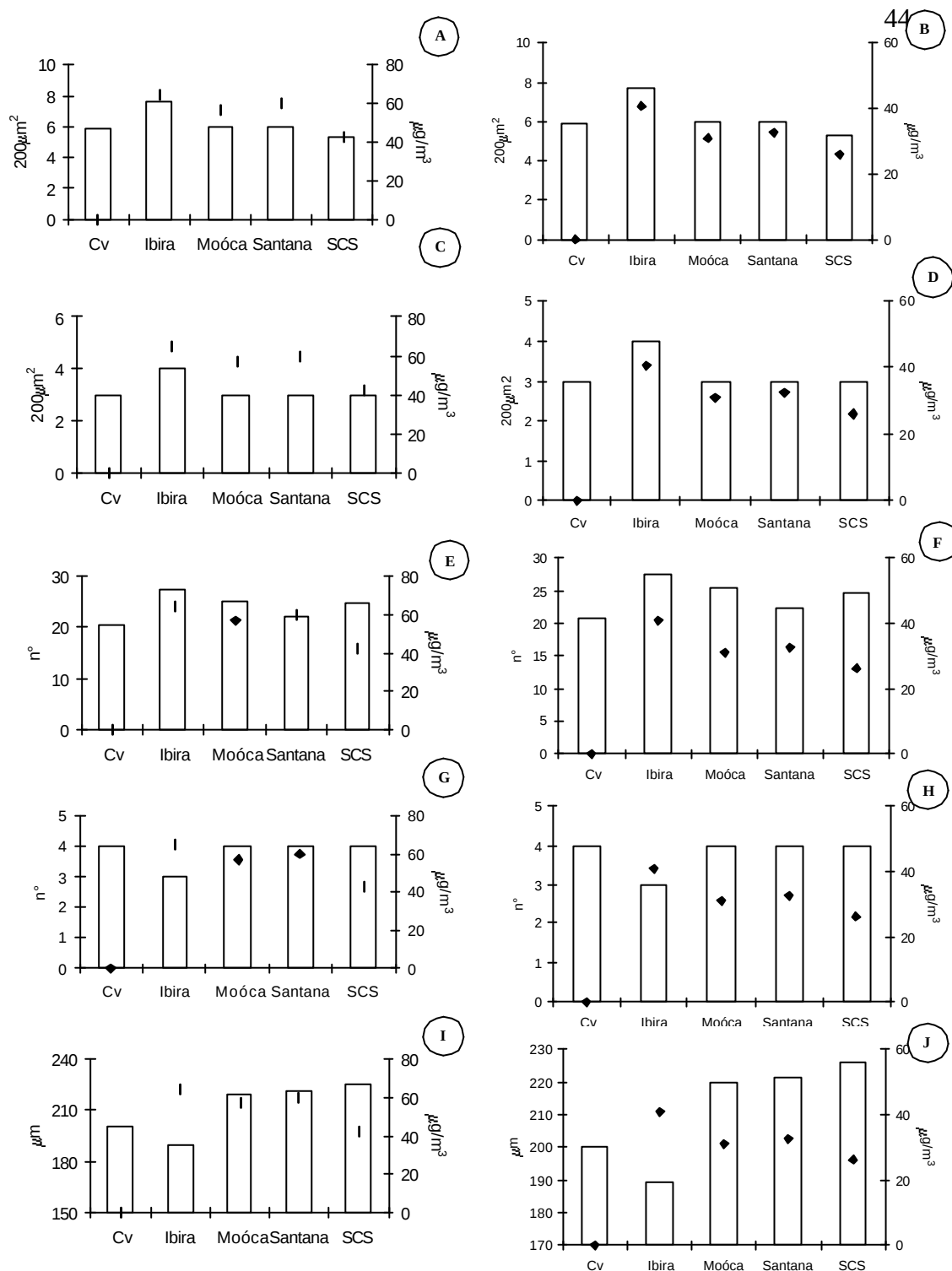


Figura 14. Relação entre os valores médios (colunas) de algumas características anatómicas avaliados em folhas sem necrose de *Nicotiana tabacum* Bel W3 expostas em diferentes ambientes na cidade de São Paulo e alguns poluentes (pontos) como: ozônio (no período da exposição II – 29/10 – 12/11/2003, de das 10 às 14h, figuras: A ,C, E, G e I) e concentração de material particulado (exposição II – 29/10 – 12/11/2003, figuras B, D, F, H e J). A-D. Densidade estomática. A e C. Superfície abaxial. B e D. Superfície adaxial. E-F. Densidade dos elementos de vaso. G-H. Número de camadas do parênquima lacunoso. I-J. Espessura da lâmina foliar. Cv = casa de vegetação, Ibira = Ibirapuera, SCS = São Caetano do Sul.

5. Discussão

A maior parte dos poluentes gasosos presentes na atmosfera é absorvida pelas plantas através dos estômatos (Manning & Feder 1980), portanto em ambientes com grandes concentrações de poluentes aéreos, as plantas podem apresentar alterações quantitativas e/ou qualitativas nos mesmos. Vários autores constataram tais alterações, especialmente em plantas submetidas ao ozônio. O aumento na densidade estomática foi encontrado por Evans & Miller 1972, Masuch *et al.* 1992, Pääkkönen *et al.* 1995, Evans *et al.* 1996, Pääkkönen *et al.* 1997, que correlacionaram positivamente a sensibilidade da planta com a densidade estomática. Já Sharma & Butler 1975, Sharma 1989, Alves 2001 encontraram relação inversa.

Plantas de *N. tabacum* Bel W3 expostas no Ibirapuera apresentaram a maior densidade estomática. Nesse local foram constatados o maior valor de AOT40, se considerados os três períodos de exposição, as maiores concentrações de material particulado e a mais alta porcentagem de área foliar necrosada. O índice estomático, calculado para as mesmas plantas, não mostrou uma relação clara com a concentração de poluentes, o que justifica a falta de citações que mencionem tal característica em plantas submetidas à poluentes aéreos; a densidade de estômatos, ao contrário, é bastante empregada em estudos que consideram parâmetros estruturais quantitativos em plantas submetidas a poluentes aéreos.

A diminuição na densidade estomática pode representar uma estratégia para diminuir a entrada do poluente na planta, enquanto que aumento na densidade, quase sempre acompanhado de diminuição no tamanho do estômato, representa um mecanismo para maximizar a eficiência do fechamento deste, quando as concentrações de poluentes no ar são elevadas. Plantas submetidas a estresse hídrico apresentam igualmente aumento na

densidade estomática (Larcher 2000), o que sugere que as plantas respondem de forma similar ao estresse seja ele a falta de água ou o excesso de poluentes.

Não se sabe ao certo qual é o mecanismo que induz a planta a aumentar a densidade estomática quando exposta aos poluentes. Contudo Lake *et al.* (2001) verificaram em *Arabidopsis thaliana*, que folhas adultas submetidas a altas concentrações de CO₂, induziam as folhas jovens da mesma planta a apresentarem menor densidade estomática, sendo o inverso também observado, ou seja, quando as folhas maduras foram submetidas a baixas concentrações de CO₂, as folhas jovens analisadas apresentaram maior número de estômatos. Os autores concluíram que as folhas mais velhas são capazes de detectar e transmitir as informações externas para as folhas jovens da mesma planta.

A sinalização destas mensagens é realizada por meio da transdução hormonal. Sugere-se que os hormônios responsáveis pela sinalização sejam o etileno, por ser produzido praticamente em todas as partes da planta e por estar relacionado a quase todos os tipos de estresses fisiológicos, e o ABA (ácido abscísico), que inibe a abertura estomática quando a planta está sob estresse ambiental (Djak & Ormrod 1982, Larcher 2000, Taiz & Zieger 2004). Em alguns casos, esta sinalização também pode ser feita por espécies ativas de oxigênio, tais como: ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (Bray *et al.* 2000).

Muitos trabalhos sustentam a hipótese de que as características estruturais da folha, além dos estômatos, são importantes na determinação da sensibilidade do vegetal aos poluentes. Variações na espessura dos tecidos que constituem o mesofilo são respostas observadas por diferentes autores (Bussotti *et al.* 1995, Evans *et al.* 1996, Alves 2001, Gerosa *et al.* 2003).

No presente estudo, quando se comparam as plantas dos diferentes locais avaliados, aquelas expostas no Ibirapuera mostraram alterações mais evidentes na espessura dos

tecidos foliares em relação às plantas expostas ao ar isento de poluentes. Nas primeiras houve redução na espessura do parênquima paliçádico e no número de camadas de parênquima lacunoso, que refletiram na menor espessura do mesofilo e, conseqüentemente, da lâmina foliar. Nos demais locais, tais alterações, de uma maneira geral, foram inversas às aquelas observadas nas plantas do Ibirapuera.

Na literatura, existem informações contraditórias quanto à relação entre a espessura dos tecidos foliares e a contaminação do ambiente por poluentes aéreos. Bussotti *et al.* 1995, Alves 2001, Gerosa *et al.* 2003, correlacionam positivamente a espessura foliar com a concentração dos poluentes. Entretanto outros autores encontraram uma relação inversa, isto é, o aumento da concentração de poluentes provocou uma diminuição na espessura foliar (Eleftheriou 1987, Evans *et al.* 1996 Alves *et al.* 2001, Reig-Armiñana *et al.* 2004).

A “compactação” do mesofilo nas plantas mantidas no Ibirapuera poderia ser vantajosa, uma vez que dificultaria a difusão dos poluentes gasosos na folha.

Na nervura principal da folha de *N. tabacum* Bel W3 exposta aos poluentes de São Paulo, especialmente o ozônio, foram observadas variações qualitativas e quantitativas nos elementos de vaso do xilema secundário, como maior densidade e maior agrupamento dos mesmos.

Na literatura há registros de efeito provocado por poluentes nos elementos condutores do xilema e do floema, dentre elas a na redução da área dos elementos de vasos e a degradação do floema (Masuch *et al.* 1992, Reig-Armiñana *et al.* 2004). Alves *et al.* (2001) verificaram redução no diâmetro dos elementos do metaxilema da nervura principal em folha de *Tradescantia* clone 4430. Masuch *et al.* (1992) observaram aumento na lignificação dos feixes vasculares em *Picea abies*. No xilema secundário de *Cecropia glazoui*, Alves (1995) observou redução na frequência dos vasos e no comprimento e diâmetro dos elementos de vaso no lenho de árvores coletadas em locais mais poluídos, no

entorno do pólo industrial de Cubatão, instalado na Baixada Santista no pé da Serra do Mar – SP.

As alterações provocadas pela poluição aérea nos elementos condutores são similares àsquelas observadas em plantas sob estresse hídrico. Nessa situação, uma das estratégias para sobrevivência consiste no aumento da capacidade de condução de água. Segundo Larcher (2000), ocorre uma ampliação da área do sistema vascular, isto é, maior quantidade de xilema, adensamento da venação nas folhas e redução da distância de transporte, ou seja, internós mais curtos.

O aumento na frequência dos vasos, no cultivar Bel W3 do tabaco, pode ser interpretado como uma resposta para aumentar a eficiência na condução, enquanto que o seu agrupamento, uma garantia de maior segurança no transporte de água, uma vez que se houver interrupção no fluxo em um vaso, a seiva ascendente pode ser mais facilmente desviada para um vaso contíguo. Numerosos estudos têm mostrado que a segurança e a eficiência são dois aspectos que devem ser sempre considerados quando se avalia o transporte no xilema secundário (Bass *et al.* 1983, Zimmerman 1983). Embora tais estudos se refiram ao xilema secundário do caule, o mesmo deve se aplicar ao xilema secundário da folha.

De acordo com Fink (1999), a formação da necrose em folhas é um processo ocasionado pela degeneração das células devido a alterações nas membranas plasmáticas, que resultam na ruptura das organelas e, conseqüentemente, em alterações em processos fisiológicos e metabólicos. Quando a planta é exposta ao ozônio, o alvo principal é o mesofilo; suas células começam a apresentar plasmólise ou encolhimento e o vacúolo aumenta, rompendo as estruturas internas e, finalmente, levando à formação da necrose. O colapso das células do mesofilo pode provocar depressão das células epidérmicas.

Trabalhos que mostram o efeito do ozônio, especialmente, no parênquima paliçádico, são citados para o tabaco (Povilatis 1962, Swanson *et al.* 1973), como para outras dicotiledôneas herbáceas, independentemente da coloração das necroses e da sensibilidade do vegetal (Ledbetter *et al.* 1959, Evans *et al.* 1996).

Confirmando as informações da literatura, em *N. tabacum* Bel W3 submetida à poluição de São Paulo, as células do parênquima paliçádico foram as primeiras a apresentarem alterações, mostrando maior sinuosidade das paredes anticlinais e alteração do formato celular. Em uma área mais próxima à necrose, as células do parênquima paliçádico sofreram plasmólise, o que levou a uma deformação no mesofilo. Igualmente, as células do parênquima lacunoso e as células epidérmicas adaxiais também sofreram dano. O colapso das células epidérmicas abaxiais ocorreu bem próximo à necrose. Na região da necrose, em microscopia fotônica, devido às pequenas dimensões dos elementos condutores, não se constatou nenhuma alteração aparente nos mesmos, o que mostra a necessidade da realização de estudos com microscópio eletrônico de transmissão para elucidar possíveis alterações ultra-estruturais.

No tabaco, as necroses são visualizadas em todo o limbo foliar nas regiões intervenais, porém não é possível prever o local onde a mesma será formada. De acordo com Avery (1933), a folha de *N. tabacum* apresenta porções diferentes de crescimento, que Huxley 1932 (*apud* Avery 1933) denomina “crescimento heterogônico”, e por meio de uma simples expressão matemática, fórmula de Huxley, podem ser determinados os diferentes estágios de desenvolvimento da folha. Aplicando esta fórmula, Avery (*l.c.*) concluiu que na folha de *N. tabacum* houve maior crescimento na região marginal do que na região próxima à nervura principal. Além disso, o autor informou que durante o desenvolvimento foliar, as células do parênquima paliçádico foram as últimas a cessarem a divisão celular, portanto foram consideradas as células mais jovens, quando comparadas às demais. Talvez isso

explique a maior sensibilidade dessas células ao ozônio, como constatado no presente trabalho e em outros já citados.

Povilatis (1962) tentou esclarecer a maior sensibilidade do parênquima paliçádico ao ozônio. O autor propôs duas hipóteses: o parênquima paliçádico é o mais jovem, portanto é o mais sensível ou as células do parênquima lacunoso apresentam maior atividade metabólica. Contudo, o autor não esclareceu por que a maior atividade metabólica implicaria em maior proteção. Conhecimentos mais recentes dão conta que as plantas alteram o metabolismo de várias maneiras, para se acomodar ao estresse ambiental, incluindo produção dos compostos osmorreguladores, tais como prolina e glicina betaína (Taiz & Zieger 2004) e aumentando a produção de antioxidantes (Bray *et al.* 2000). Pode-se supor que, quanto maior é a atividade metabólica do tecido, maior é a possibilidade de se produzir tais compostos. Esta poderia ser uma explicação para a menor sensibilidade do parênquima lacunoso, quando comparado ao paliçádico.

Nas folhas de *N. tabacum* Bel W3, na região da necrose, observou-se uma deformação muito acentuada nos estômatos e demais células epidérmicas. Tais alterações estão de acordo com o que foi descrito por diferentes autores em plantas cujas folhas apresentavam necroses provocadas por poluentes gasosos (Ojamperä & Huttunen 1989, Masuch *et al.* 1992, Bussotti *et al.* 1995, Günthardt-Goerg *et al.* 2000, Viskari *et al.* 2000). De uma maneira geral, os sintomas se repetem e os mais comuns são: o aumento da erosão e degradação das ceras epicuticulares e a obliteração dos estômatos. As alterações nas ceras decorrem do fato destas representarem a primeira barreira que o vegetal impõe à entrada de substâncias e organismos em seu interior.

Fink (1999) esclareceu que a obliteração dos estômatos, em decorrência da degradação das ceras, reduz a transpiração, o que interfere na condução da água e, numa etapa posterior, poderia induzir a deficiência de minerais na planta.

Com base nos resultados observados no tabaco Bel W3 conclui-se que a planta apresenta uma série de sintomas, que podem ser vistos como tentativa de minimizar os efeitos dos gases presentes no ar urbano. Assim, o aumento na densidade e agrupamento dos elementos condutores do xilema poderiam representar uma tentativa de aumentar a condução, prejudicada diante da menor eficiência dos estômatos, comprometidos quanto ao seu funcionamento, devido à degradação das ceras epicuticulares. Lembrando a importância da transpiração como parte do mecanismo que “puxa” a água dentro do xilema (teoria da coesão-tensão, Taiz & Ziege 2004). Igualmente, o aumento na densidade dos estômatos poderia ser parte uma resposta a esta série de acontecimentos. Ao mesmo tempo, o aumento na densidade estomática implicaria, em tese, num aumento da possibilidade de entrada dos gases na planta. A compactação do mesofilo seria, assim, uma forma de dificultar a difusão dos poluentes gasosos aéreos. Como se vê, fica difícil explicar as alterações isoladamente, uma vez que a planta representa um todo e as respostas que permitem sua sobrevivência em ambientes poluídos vão além das estruturais, aqui analisadas. Contudo, as mudanças estruturais que ocorrem em tecidos não necrosados, ainda sem mudanças morfológicas visíveis, poderão contribuir para se entender o por quê da fraca relação geralmente observada entre a porcentagem de área foliar afetada por necrose e a concentração de ozônio na atmosfera, em estudos voltados ao monitoramento da qualidade do ar com *N. tabacum* Bel W3.

Além disso, estudos que avaliem a estrutura devem ser integrados com análises bioquímicas e fisiológicas, para que se possa entender a complexidade das respostas da planta frente ao ambiente.

6. Conclusões

A análise de folhas de tabaco Bel W3 expostas em São Paulo, em locais submetidos a altos índices de poluentes, especialmente o ozônio permitem concluir que:

- A estrutura anatômica da folha de *N. tabacum* Bel W3 favorece a entrada e difusão de poluentes aéreos, entre os quais o ozônio, uma vez que é anfi-estomática, dorsiventral com parênquima lacunoso bem desenvolvido, o que facilita a difusão dos poluentes gasosos no seu interior.
- O parênquima paliçádico foi o tecido primeiramente afetado; em áreas próximas à necrose foi possível observar sinuosidades nas suas paredes; alterações nos demais tecidos da folha foram observadas apenas em áreas comparativamente mais necrosadas.
- Em microscopia eletrônica de varredura evidenciou-se a desestruturação da ornamentação da cera epicuticular, a presença de estômatos atrofiados, com ostíolo obliterado e deformação das células guarda e subsidiárias.
- A estrutura anatômica da folha foi mais alterada em plantas expostas em local mais contaminado por ozônio (Ibirapuera). Nestas observou-se: redução na espessura do mesofilo, especialmente no parênquima paliçádico, aumento na densidade estomática e na densidade dos elementos de vaso, degradação das ceras epicuticulares e deformação dos estômatos.

7. Perspectivas

Estudos futuros a serem desenvolvidos com a mesma planta deverão focar aspectos da ultra-estrutura da mesma. Além disso, um monitoramento das condições ambientais permitirá determinar se os fatores climáticos interferem nas respostas aqui encontradas.

8. Resumo

Nicotiana tabacum 'Bel W3' é uma bioindicadora consagrada de ozônio uma vez que, em contato com esse poluente, apresenta necroses foliares facilmente identificáveis. Este estudo teve como objetivos verificar se: a estrutura anatômica da folha dessa planta, quando mantida nas condições ambientais da cidade de São Paulo, apresenta alterações estruturais que dificultem a entrada dos poluentes na planta; quais são os tecidos primeiramente afetados e se é possível relacionar parâmetros anatômicos com a concentração de poluentes, especialmente o ozônio, a qual a planta está submetida. Plantas de *N. tabacum* foram expostas em diferentes pontos da cidade de São Paulo: Parque do Ibirapuera, Moóca, Santana e São Caetano do Sul (RMSP), locais monitorados pela CETESB e sujeitos principalmente ao ozônio, nos meses de outubro à dezembro de 2003. Como controle utilizou-se casa de vegetação, que apresenta sistema de filtros, que impede a entrada de poluentes. Folhas com e sem necrose foram fixadas em FAA₇₀ e em FGAA, e posteriormente armazenadas em álcool 70% e 95%, respectivamente. Estas foram processadas segundo técnicas usuais empregadas em anatomia vegetal. Realizaram-se análises quantitativas e qualitativas dos tecidos foliares. Comparando as folhas sem necroses expostas na cidade e aquelas da casa de vegetação verificaram-se alterações na densidade estomática, espessura das células dos parênquimas paliçádico e do parênquima lacunoso e número de camadas do parênquima paliçádico e densidade dos elementos de vaso. Foi possível relacionar alterações estruturais quantitativas a concentração de ozônio e material particulado no Ibirapuera, local onde os índices desses poluentes são comparativamente mais altos. Variações no formato das células do parênquima paliçádico, agrupamento dos elementos de vaso foram as variações qualitativas observadas. Nas folhas com necroses, as primeiras

alterações ocorreram nas células do parênquima paliçádico, como sinuosidade das paredes anticlinais seguida da compactação das células do parênquima clorofiliano, com aglomeração dos cloroplastos na periferia das mesmas; observou-se o colapso das células epidérmicas adaxiais, seguido da plasmólise do tecido parenquimático e colapso das células epidérmicas abaxiais. Observações nas superfícies foliares realizadas em microscopia eletrônica de varredura evidenciaram a desestruturação da ornamentação da cera epicuticular, presença de estômatos atrofiados, com ostíolo obliterado e deformação das células guarda e subsidiárias. Os resultados obtidos indicam que a folha de tabaco Bel W3 sofre alterações em sua estrutura, mesmo naquela que não apresenta necrose, quando a planta é submetida aos poluentes aéreos urbanos.

Palavras-chave: anatomia foliar, estômatos, necrose, *Nicotiana tabacum* Bel W3, parênquima paliçádico

9. Abstract

Nicotiana tabacum 'Bel W3', bioindicator of ozone shows foliar injuries easily identified when they are exposed to air pollution. The objectives of this study are: to verify if the entering and diffusion of ozone inside the plants are due to the anatomic structure or not, to make a relationship between anatomical parameters with the concentration of ozone and to detect any alteration in the structure of the leaf surrounding of visible injury. Plants of tobacco were exposed to different polluted sites of São Paulo city, southeasterstern Brazil which were: Parque do Ibirapuera, Moóca, Santana and São Caetano do Sul (RMSP) and these places were performed by CETESB. A greenhouse with filtered air was used for the control plants. Specific leaves with and without injuries were fixed in FAA₇₀ and FGAA, and stored in alcohol 70% e 95%, respectively. They were processed according to usual anatomic techniques for plants. Quantitative and qualitative analyzes were also done. Leaves without injuries showed alterations in: stomatic density, number of spongy parenchyma layers, density of elements vessels and also showed higher mesophyll cells. It was possible to relate quantitative structural alterations to ozone and particulate matter at the Parque do Ibirapuera, which is the most polluted site. It was observed qualitative changes like alterations in the form of palisade parenchyma and grouping elements vessels. In the leaves with injuries, the first alteration was the sinuosity of anticlinal walls in the palisade parenchyma, followed by compactation mesophyll cells with agglomerations of chloroplasts in the cells periphery, collapsed of upper epidermis cells, plasmolyse of tissue and collapsed of lower epidermis. Scanning electron microscope examination showed the structure of epicuticular wax alterations, atrofiated stomata, obliterated pore and deformation of guard and subsidiary cells. The results indicated that cultivar Bel W3 suffered alterations on its structure when submitted to air pollution.

Key words: foliar anatomy, stomata, injury, *Nicotiana tabacum* Bel W3, palisade parenchyma

10. Referências bibliográficas

- Alves, E.S.** 1995. The effects of the pollution on wood of *Cecropia glazioui* (Cecropiaceae). IAWA Journal 16: 69-80.
- Alves, V.** 2001. Análise dos efeitos dos poluentes de fábrica de cimento em plantas bioindicadoras: *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) e *Zinnia elegans* Cav. (Asteraceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Alves, E.S., Giusti, P.M., Domingos, M., Saldiva, P.H.N., Guimarães, E.T. & Lobo, D.J.A.** 2001. Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de *Tradescantia*: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. Revista Brasileira de Botânica 24: 567-76.
- Alves, E.S., Pedroso, A.N.V., Domingos, M., Guimarães, E.T. & Saldiva, P.H.N.** 2003. Biomonitoramento do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. Hoehnea: 89-94.
- Antonielli, M. Pasqualini, S., Ederli, L., Batini, P., Moscatello, S. & Loreto, F.** 1997. Physiological characteristics of tobacco cultivars with contrasting sensitivity to ozone. Environmental and Experimental Botany 38: 271-77.
- Arndt, U. & Schweizer, B.** 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Signals from the environment. Ellenberg *et al.* (eds.). Biological monitoring. Vieweg, Eschborn. pp. 199-298.
- Ashmore, M.R., Bell, J.N.B. & Reily, C.L.** 1978. A survey of ozone levels in the British Isles using indicator plants. Nature 276: 813-915.
- Avery, G.S.** 1933. Structure and development of the tobacco leaf. American Journal of Botany 20: 565-92.

- Bass, P., Werker, E. & Fahn, A.** 1983. Some ecological trends in vessel characters. IAWA Bulletin 4: 141-59.
- Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S. & Saldiva, P.H.N.** 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. Mutation Research 426: 229-32.
- Berlyn, G.P. & Miksche, J.P.** 1976. Botanical microtechnique and cytochemistry. The Iowa State College Press, Ames.
- Bobrov, R.A.** 1955. The leaf structure of *Poa annua* with observations on its smog sensitivity in Los Angeles county. American Journal of Botany 42: 467-74.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stresses. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants. B.B. Buchanan, W. Gruissen & R.L. Jones (eds.). American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158-203.
- Bujokas, W.M.** 2001. O impacto da poeira de cimento em *Schinus terebinthifolius* Raddi. (Anacardiaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Bussotti, F., Bottacci, A., Bartolesi, A., Grossoni, P. & Tani, C.** 1995. Morpho-anatomical alterations in leaves collected from beech trees (*Fagus sylvatica* L.) in conditions of natural water stress. Environmental and Experimental Botany 35: 201-13.
- Cetesb.** 2002. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2001. Série Relatórios.
- Cetesb.** 2004. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2003. Série Relatórios.
- Conama.** 1990. Resolução nº3, de 28/09/1990. Ministério do Meio Ambiente. <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res90/res0390.html>

Chaves, A.C.F., Silva, E.A.M., Azevedo, A.A. Cano, M.A.O. & Matsuoka, MK. 2002.

Ação do flúor dissolvido em chuva simulada sobre a estrutura foliar de *Panicum maximum* Jacq. (Colonião) e *Chloris gayana* Kunth. (Capim – Rhodes) – Poacea. Acta Botanica Brasilica 16: 395-406.

De Temmerman, L., Bell, J.N.B., Garrec, J. P., Klumpp, A., Krause, G.H.M. &

Tonneijck, A.E. G. 2004. Biomonitoring of air pollutants with plants – considerations for the future. *In*: Urban air pollution, bioindication and environmental awareness. A. Klumpp, W. Ansel. & G. Klumpp (eds). Cuvillier Verlag. Göttingen. pp. 337-73.

Dijak, M. & Ormrod, D.P. 1982. Some physiological and anatomical characteristics

associated with differential ozone sensitivity among pea cultivars. Environmental and Experimental Botany 22: 395-402.

Domingos, M., Klumpp, A., & Klumpp, G. 1998. Air pollution impact on the Atlantic

forest in the Cubatão, region, SP, Brazil. Ciência & Cultura. 50: 230-36.

Domingos, M., Bourette, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C. 2002. Impactos de

poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. *In*: Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo. D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.). Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo. pp. 221-49.

Eleftheriou, E.P. 1987. A comparative study of the leaf anatomy of olive trees growing in

the city and the county. Environmental and Experimental Botany 27: 105-17.

Epstein, E. 1975. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Editora da

Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esau, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Ed. Edgard Blücher, São Paulo.

- EuroBionet.** 2004. European Network for the Assessment of Air Quality by the Use of Bioindicator Plants. Klumpp, A., Ansel, W. & Klumpp, G. (eds.). University of Hohenheim.
- Evans, L.E. & Miller, P.R.** 1972. Comparative needle anatomy and relative ozone sensitivity of four pine species. *Canadian Journal of Botany* 50: 1067-71.
- Evans, L.S., Adamski II, J. H. & Renfro, J.R.** 1996. Relationships between cellular injury, visible injury of leaves, and ozone exposure levels for several dicotyledonous plant species at Great Smoky Mountains National Park. *Environmental and Experimental Botany* 36: 229-37.
- Fahn, A.** 1974. Plant anatomy. Second edition. Pergamon Press.
- Falla, J., Lava-Gilly, Henryon, M., Morlot, D. & Ferard, J.F.** 2000. Biological air quality monitoring: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 64: 627-44.
- Fenger, J.** 1999. Urban air quality. *Atmospheric Environment* 33: 4877-900.
- Ferreira, M.I., Petrenko, H., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.S., Moreira, A. & Saldiva, P.H.N.** 2000. *In situ* monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emissions of a solid waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* Stamen-Hair assay. *Journal of the Air & Waste Management Association* 50: 1852-56.
- Fink, S.** 1999. Pathological and regenerative plant anatomy. Gebrüder Borntraeger Berlin, Stuttgart.
- Freedman, B.** 1995. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2nd. Academic Press Inc. San Diego.
- Gerosa, G., Marzuoli, R., Bussotti, F., Pancrazi, M. & Ballarin-Denti, A.** 2003. Ozone sensitivity of *Fagus sylvatica* and *Fraxinus excelsior* young trees in relation to leaf structure and foliar ozone uptake. *Environmental Pollution* 125: 91-8.

- Glater, R.B., Solberg, R.A. & Scott, F.M.** 1962. A developmental study of the leaves on *Nicotiana glutinosa* as related to their smog-sensitivity. *American Journal of Botany* 49: 954-70.
- Gravano, E., Giulietti, V., Desotgiu, R., Bussotti, E., Grossoni, P., Gerosa, G. & Tani, C.** 2003. Foliar response of *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution* 121: 137-46.
- Guimarães, E.T., Domingos, M., Alves, E.S., Caldini, N., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., & Saldiva, P.H.N.** 2000. Detection of the genotoxic of air pollutants in around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environmental and Experimental Botany* 44: 1-8.
- Günthardt-Goerg, M.S.** 1996. Different responses to ozone of tobacco, poplar, birch and alder. *Journal of Plant Physiology* 148: 207-14.
- Günthardt-Goerg, M.S., McQuattie C.J., Maurer S. & Frey B.** 2000. Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environmental Pollution* 109, 489-500.
- Han, X. & Naeher, L.P.** 2006. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environmental International* 32: 106-20.
- Heagle, A. S. & Heck, W.W.** 1974. Predisposition of tobacco to oxidant air pollution injury by previous exposure to oxidants. *Environmental Pollution* 7: 247-52.
- Heath, R.L.** 1994. Possible mechanisms for the inhibition of photosynthesis by ozone. *Photosynthesis Research* 39: 439-51.
- Heggstad, H.E.** 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-91.

- Heggestad, H.E. & Middleton, J.T.** 1959. Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury. *Science* 129: 208-9.
- Klumpp, A.** 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In*: Indicadores ambientais: conceitos e aplicações. N.B. Maia, H.L. Martos & W. Barella (org.). Editora EDUC.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomin, A.** 2001. Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica*. 24: 511-18.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Calatayud, V., Carrec, J.P., He, S., Peñuelas, J., Ribas, A., Ro-Poulsen, H., Rasmussen, S., Sanz, M.J. & Vergne, F.** 2006. *Tradescantia micronucleus* test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environmental Pollution* 139: 515-22.
- Klumpp, A., Hintemann, T., Lima, J.S. & Kandeler, E.** 2003. Bioindication of air pollution effects near a copper smelter in Brazil using mango trees and soil microbiological properties. *Environmental Pollution* 126: 313-21.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M.** 1994. Plants as bioindicators of air pollution at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environmental Pollution* 85: 109-16.
- Kolb, T.E. & Matyssek, R.** 2001. Limitations and perspective about scaling ozone impacts in trees. *Environmental Pollution* 115: 373-93.
- Kraus, J.E. & Arduin, M.** 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J.** 1988. Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environmental Pollution* 50: 101-37.

- Lake, J.A., Quick, W.P., Beerling, D.J. & Woodward, E.L.** 2001. Signals from mature to new leaves. *Nature* 411: 154.
- Larcher, W.** 2000. *Ecofisiologia vegetal*. RiMa, São Carlos.
- Ledbetter, M.C., Zimmerman, P.W. & Hitchcock, A.E.** 1959. The histopathological effects of ozone on plant foliage. *Contributions from Boyce Thompson Institute* 20: 275-82.
- Lersten, N.R. & Curtis, J.D.** 1988. Secretory reservoirs (ducts) of two kinds in Giant Ragweed (*Ambrosia trifida*, Asteraceae). *American Journal of Botany* 75 (9): 1313-23.
- Lima, J.F., Fernández, E.B. & Fawcett, W.N.** 2000. *Mangifera indica* and *Phaseolus vulgaris* in the bioindication of air pollution in Bahia, Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 275-78.
- Liu, S. & Reddley, B.** 1999. *Atmospheric chemistry and global change*. G.P. Brasseur, J.J. Orlando & G.S. Tyndall (eds.). Oxford University Press.
- Manning, W.J. & Feder, W.A.** 1980. *Biomonitoring air pollutants with plants*. Applied Science Publishers Ltd., London.
- Manning, W.J., Godzik, B. & Musselman, R.** 2002. Potential bioindicators plant species for ambient ozone in forested mountain areas of central Europe. *Environmental Pollution* 119: 283-90.
- Masuch, G., Franz, J.T. Kicinski, H.G. & Kettrup, A.** 1992. Histological and biochemical differences of slightly and severely injured spruce needles of two stands in Northrhine Westphalia. *Environmental and Experimental Botany* 32: 163-82.
- Metcalfe, C.R. & Chalk, L.** 1950. *Anatomy of dicotyledons leaves, stem, and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Volume II. Oxford Press.

Moraes, R.M., Klumpp, A., Furlan, C.M., Klumpp, G., Domingos, M., Rinaldi, M.C.S.

& Modesto, I.F. 2002. Tropical fruit trees as bioindicators of industrial air pollution in southeast Brazil. *Environment International*. 28. 367-74.

O'Brien, T.P. & McCully, M.E. 1965. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. *Protoplasma* 59: 368-73.

Ojamperä, K. & Huttunen, S. 1989. Ozone fumigation accelerates surface erosion on Norway spruce needles. *Air pollution and forest decline*. J.B. Bucher & I. Bucher-Wallis. (eds.) 14th International Meeting for Specialists in Air Pollution Effects on Forest Ecosystems, Birmensdorf. pp. 490-92.

Oredonvici, T., Skelly, J.M., Ferdinand, J.A. Savage, J.E., Sanz, M.J. & Smith, G.C.

2003. Response of native plants of northeastern United States and southern Spain to ozone exposures; determining exposure/response relationships. *Environmental Pollution* 125: 31-40.

Pääkkönen, E., Metsärinne, S., Holopainen, T. & Kärenlampi, L. 1995. The ozone sensitivity of birch (*Betula pendula*) in relation to the developmental stage of leaves. *New Phytologist* 132: 145-54.

Pääkkönen, E., Holopainen, T. & Kärenlampi, L. 1997. Differences in growth, leaf senescence and injury, and stomatal density in birch (*Betula pendula* Roth) in relation to ambient levels of ozone in Finland. *Environmental Pollution* 96: 117-27.

Pääkkönen, E., Günthardt-Goerg, M.S. & Holopainen, T. 1998. Responses of leaf processes in a sensitivity birch (*Betula pendula* Roth) clone to ozone combined with drought. *Annals of Botany* 82: 49-59.

Pasqualini, S., Piccioni, C., Reale, L., Ederli, L., Torre, G.D. & Ferranti, F. 2003.

Ozone-induced cell death in tobacco cultivar Bel W3 plants. The role of programmed cell death in lesion formation. *Plant Physiology* 133: 1122-34.

- Povilatis, B.** 1962. A histological study of the effects of weather fleck on leaf tissues of flue-cured tobacco. *Canadian Journal of Botany* 40: 327-30.
- Prado-Filho, J.F.** 1993. Uso de bioindicadores para monitoramento do ar. *Ambiente*. 7 (1): 57-64.
- Radford, A.E., Dickinson, W.C., Massey, J.R. & Bell, C.R.** 1974. Vascular plant systematics. Harper & Row Publishers.
- Reig-Armiñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., Garcia-Breijo, F.J., Ibars, A. & Sanz, M.J.** 2004. Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environmental Pollution* 132: 321-31.
- Richter, H.G.** 1981. Anatomia des sekundaren xylems und der Rinde der Lauraceae. Sonderbande des Natur. Vereins Hamburg 5. Paul Parey, Hamburg.
- Schaub, M., Skelly, J.M., Zhang, J.W., Ferdinand, J.A., Savage, J.E., Stevenson, R.E., Davis, D.D. & Steiner, K.C.** 2005. Physiological and foliar symptoms response in the crowns of *Prunus serotina*, *Fraxinus Americana* and *Acer rubrum* canopy trees to ambient under forest conditions. *Environmental Pollution* 133: 553-67.
- Sharma, G.K. & Butter, J.** 1975. Environmental pollution: leaf cuticular patterns in *Trifolium pratense* L. *Annals of Botany* 39: 1087-90.
- Sharma, G.K.** 1989. Cuticular and morphological dynamics in *Salix nigra* L. and *Quercus alba* L. in relation to air pollution. Air pollution and forest decline. J.B. Bucher. & I, Bucher-Wallis. (eds.) 14th International Meeting for Specialists in Air Pollution Effects on Forest Ecosystems, Birmensdorf. pp. 527-29.
- Silva, L.C., Azevedo, A.A., Silva, E.A.M. & Oliva, M.A.** 2005a. Effects of simulated acid rain on the growth of five species Brazilian tree species and anatomy of the most sensitivity species (*Joannesia principes*). *Australian Journal of Botany* 53: 789-96.

- Silva, L.C., Oliva, M.A., Azevedo, A.A., Araújo, J.M. & Aguiar, R.M.** 2005b. Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in restinga plants: *Eugenia uniflora* and *Clusia hilariana*. *Water, Air, and Soil Pollution* 168: 129-43.
- Smith, G., Coulston, J., Jepsen, E. & Prichard, T.** 2003. A national ozone biomonitoring program – results from field surveys of ozone sensitive plants in Northeastern Forest (1994-2000). *Environmental Monitoring and Assessment* 87: 271-91.
- Soda, C., Bussotti, F., Grossoni, P., Barnes, J., Mori, B. & Tani, C.** 2000. Impacts of urban levels of ozone on *Pinus halepensis* foliage. *Environmental and Experimental Botany* 44: 69-82.
- Strittmatter, C.G.D.** 1973. Nueva tecnica de diafanizacion. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 15: 126-29.
- Swanson, E.S., Thomson, W.W. & Mudd, J.B.** 1973. The effect of ozone on leaf cell membranes. *Canadian Journal of Botany* 51: 1213-19.
- Taiz, L. & Zieger, E.** 2004. *Fisiologia vegetal*. 3ª ed. Artmed Editora, Porto Alegre.
- van Tienhoven, A.M. & Scholes, M.C.** 2003. Air pollution impacts on vegetation in South Africa. *In: Air pollution impacts on crops and forests a global assessment*. L. Amberson, M. Ashmore & F. Murray (eds). vol 4.
- VDI-Verein Deutscher Ingenieure.** 1999. Biological measuring techniques for the determination and avaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/1. VDI/DIN Handbtch Reinhaltung der Luft, vol 1a, Beuth, Berlin.
- Vergé, X., Chapuis, A. & Delpoux, M.** 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environmental Pollution* 118: 337-49.

- Viskari, E.L., Holopainen, T. & Kärenlampi, L.** 2000. Responses of spruce seedlings (*Picea abies*) to exhaust gas under laboratory conditions – II ultrastructural changes and stomatal behaviour. *Environmental Pollution* 107: 99-107.
- Weinstein, L.H., Davison, A.W. & Arndt, U.** 1998. Fluoride. *In: Recognition of air pollution injury to vegetation. A pictorial atlas.* R.B. Flager (eds). 2ed. Pittsburg (EUA), Air & Waste Management Association.
- Zeiger, E.** 2002. The effect of air pollution on plants. www.plantphys.net/article.php?ch=e&id=262 (acessado em 12 de setembro de 2005).
- Zimmermann, M.H.** 1983. Xylem structure and ascent sap. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg New York, Tokyo.