

PATRICIA GIAMPAOLI

**Análises químicas e fisiológicas em plantas
de *Aechmea fasciata* e *Tillandsia usneoides*:
estudo de viabilidade para
biomonitoramento de poluentes atmosféricos
do polo Industrial de Paulínia, SP**

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

SÃO PAULO

2015

PATRICIA GIAMPAOLI

**Análises químicas e fisiológicas em plantas
de *Aechmea fasciata* e *Tillandsia usneoides*:
estudo de viabilidade para
biomonitoramento de poluentes atmosféricos
do polo Industrial de Paulínia, SP**

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

ORIENTADOR: DR. ARMANDO REIS TAVARES

CO-ORIENTADOR: DRA. MARISA DOMINGOS

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Giampaoli, Patricia

G432a Análises químicas e fisiológicas em plantas de *Aechmea fasciata* e *Tillandsia usneoides*: estudo de viabilidade para biomonitoramento de poluentes atmosféricos do polo Industrial de Paulínia, SP / Patricia Giampaoli -- São Paulo, 2015.

124 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015

Bibliografia.

1. Poluição atmosférica . 2. Bromeliaceae. 3. Biomonitoramento. I. Título.

CDU: 502.55

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Armando Reis Tavares, pela oportunidade e confiança desde minha iniciação científica. Pela paciência, orientação e dedicação. Por estar sempre à disposição para minhas dúvidas, minhas ideias e minhas inseguranças. Por acreditar em mim desde o começo!
Pelas dicas de vinho e viagem!

À minha Co-orientadora Dra. Marisa Domingos, por estar sempre disposta à discussões, por corrigir meus erros, sugerir caminhos e pela oportunidade de trabalhar e adquirir experiência profissional no campo da pesquisa e monitoramento ambiental. Pelo exemplo profissional e pessoal. Pela paciência e por toda a dedicação!

Ao Instituto de Botânica e funcionários do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, pela infraestrutura e oportunidades adquiridas para a realização deste trabalho.

À Capes pelas bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior e a Bolsa de estudos concedidas no final dessa jornada.

Ao Dr. Eduardo D. Wannaz pela oportunidade que me concedeu na Universidad Nacional de Córdoba. Pela simpatia, conhecimento e experiência que esteve disposto a dividir comigo.
Gracias!

Aos pesquisadores e estudantes da Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Dra. Maria Luisa Pignata, Dra. Hebe Carreras, Dra. Cláudia González, Prof. Gustavo Gudino, Carlos, Ivan, Julieta, Ana Carolina, Calorina Cid, Carolina Mateos, Andrés, Flory, Corina, Denis, Fernanda e Gaby. Por sua simpatia, amizade e alegria. Por me receberem em seu país, seu laboratório e suas casas. Por me ajudarem a conhecer e adorar essa “municipalidade” linda. Los extraño mucho!

Ao The Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela infraestrutura e oportunidade para realização de parte desse estudo.

Aos produtores Spagnol Plantas Ornamentais (Cordeirópolis) e EcoFlora (Holambra), por cederem as plantas de *Tillandia usneoides* e *Aechmea fasciata*, respectivamente, para a realização desse estudo.

Aos pesquisadores e professores Dra. Márcia I. M. Lopes, Dr. Eduardo P. C. Gomes, Dra. Miriam S. Rinaldi, Dra. Silvia Ribeiro, Dra. Regina Moraes e Dra. Carla Ferraguti, pela disposição e paciência para sanar dúvidas e sugerir caminhos de estudo e análises. Pela gentileza e nobreza, por me ensinarem mais do que livros poderiam.

Aos alunos e funcionários do Núcleo de Pesquisa em Ecologia, terrestres e aquáticos, pela companhia e auxílio. Em especial às “Panteras” Amarelas Celsa de Souza, Maria Auxiliadora

Pinto Costa da Silva, Marli Rodrigues Batalha e Valdenice Soares Silva Amorim, pelas coletas, tortas, sanduíches e ajuda durante minhas análises.

Aos amigos Pedro, Marisia, Jéssica, Jeniffer, Yukio, Giselle, Maurício e Poliana, por estarem presentes nessa jornada, compartilharem experiências e conhecimento e alegrarem meu dia a dia.

Aos amigos do “Projeto Paulínia”, Carla Zuliani, Patricia Bulvovas, Andressa, Cristiane, Leonardo, Marcela e Solange, por me ajudarem a crescer como pessoa e profissional, por compartilharem os medos, ansiedades e alegrias. Pelas saídas de campo, pelos atolamentos, picadas de abelha e levantamento de peso. Por ser o melhor grupo de trabalho que uma pessoa possa desejar.

À Ane, Marcelle, Marisia e Ana Paula, por disponibilizarem seu tempo nos dias de coleta e me ajudarem na maratona de análises bioquímicas das minhas plantas, por chegarem cedo e saírem tarde. Sem vocês esse resultado não seria possível.

Ao Ricardo Nakazato, por ter a paciência de me ajudar em todas as perguntas sobre gráficos, tabelas e estatísticas. Por responder TODAS as minhas mensagens de whatsapp e e-mails. Eu sei que foram muitas.

Ao Leonardo, Nauê, Monaly, Jeniffer, Cleyton, Lucas e Tais, pelas músicas, karaokês, bares, cinema, teatros e risos.

Agradeço em especial, à minha família, Eduardo, Marisa e Priscila, por respeitarem meus horários, meus prazos e estarem sempre ao meu lado, me incentivando. Por compartilharem dos meus momentos de dúvida e estarem sempre dispostos a sugerir soluções. Pelos conhecimentos prontamente repassados que me ajudaram a completar essa etapa.

ABREVIATURAS

AA - Ácido Ascórbico	Mn - Manganês
AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados	MP - Material Particulado
APX - Ascorbato peroxidase	MP₁₀ - Material Particulado acima de 10 μm
ARIE - área de relevante interesse	N - Nitrogênio
B - Boro	NADPH - fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
Ca - Cálcio	NO₂ - Dióxido de nitrogênio
CAM - Metabolismo Ácido das Crassuláceas	NO_x - Óxidos de nitrogênio
Cl <i>a</i> - Clorofila a	Ni - Níquel
Cl <i>b</i> - Clorofila b	O₂[•] - Radical superóxido
Co - Cobalto	O₃ - Ozônio
CO - Monóxido de Carbono	OH[•] - Radical hidroxila
CO₂ - Dióxido de Carbono	¹O₂ - Oxigênio Singlete
Cr - Cromo	P - Fósforo
Cu - Cobre	Pb - Chumbo
DHA - Dehidroascorbato	PCA - Análise de Componentes Principais
DTNB - Ácido 5,5-ditiobis 2-nitrobenzóico	REPLAN - Refinaria do Planalto Paulista
DTT - Ditiotreitól	RMC - Região Metropolitana de Campinas
ERO - Espécie reativa de oxigênio	RMSP - Região Metropolitana de São Paulo
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético	S - Enxofre
Fe - Ferro	Sr - Estrôncio
Ga - Gálio	SO_x - Óxidos de Enxofre
GR - Glutathiona redutase	SOD - Superóxido dismutase
GSH - Glutathiona Reduzida	TCR - Taxa de crescimento negativo
GSSG - Glutathiona Oxidada	TBA - Ácido tiobarbitúrico
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio	UV - Ultravioleta
HPDC - Hidroperóxido Dieno Conjugado	V - Vanádio
HPLC - Cromatografia líquida de alta performance	Zn - Zinco
H₃PO₄ - Ácido fosfórico	
ICA - Índice de Contaminação Atmosférica	
K - Potássio	
K₂HPO₄ - Fosfato de Potássio Dibásico Anidro	
LPO - Lipoperoxidação	
Mg - Magnésio	

Resumo

Os poluentes atmosféricos afetam a saúde humana, a flora, fauna e patrimônios históricos e modernos. O monitoramento desses poluentes pode ser realizado por meio de estimativas das concentrações ambientais usando métodos físico-químicos e matemáticos ou via monitoramento biológico (biomonitoramento). Plantas podem apresentar alterações fisiológicas, químicas e estruturais que indiquem estresse imposto por poluentes atmosféricos. Diversas plantas têm sido utilizadas no biomonitoramento ambiental e, mais recentemente, muitas espécies de bromélias têm sido alvo de estudos com esse objetivo. Bromélias epífitas não apresentam contato direto com o solo e são capazes de refletir as condições do ambiente, apresentando maior capacidade de acúmulo de elementos químicos que as espécies arbóreas. No entanto pouco se sabe sobre suas reações metabólicas. Neste estudo objetivou-se avaliar duas espécies de bromélias epífitas quanto sua capacidade biomonitora na Região Metropolitana de Campinas (RMC), sujeita a diversas fontes poluidoras que contribuem para o alto aporte de poluentes atmosféricos e assim estabelecer um protocolo de biomonitoramento, com bromélias, eficiente para a região. Para tanto, espécimes de *Tillandsia usneoides* e *Aechmea fasciata* foram distribuídas em cinco pontos da RMC por 22 meses e ciclos de 12 semanas (8 exposições). A cada exposição foram quantificados os teores de nutrientes e metais traços, e variações em parâmetros fisiológicos. A partir desses resultados, um índice de contaminação atmosférica foi elaborado para melhor descrever o gradiente de poluição da região. Os resultados mostraram a alta capacidade bioacumuladora de metais da espécie *Aechmea fasciata*, sendo muitas vezes mais eficiente do que a espécie *Tillandsia usneoides*. Marcadores fisiológicos individuais não apresentaram correlação direta com a poluição local em ambas as espécies, mas a variação dos parâmetros clorofila, peroxidação lipídica e teores de glutathione mostraram maior sensibilidade das plantas expostas em comparação às plantas referência. A associação dos parâmetros fisiológicos e químicos mostrou ser uma alternativa eficaz para o monitoramento ambiental, indicando que a espécie *Aechmea fasciata* como a mais adequada para aplicação do índice desenvolvido.

Palavras chave: poluição atmosférica, bromélias, monitoramento ambiental

Abstract

Air pollutants may affect human health, historical and modern buildings and environmental in general. The monitoring of these pollutants can be accomplished through environmental concentrations estimates using physico-chemical and mathematical methods or via biological monitoring (biomonitoring). Plants can present physiological, structural and chemical changes that indicate stress imposed by air pollutants. Several plants have been used in environmental biomonitoring and, more recently, many species of bromeliads have been the subject of studies with this goal. Epiphytic bromeliads do not have direct contact with soils and are able to reflect the environment conditions, showing greater ability to accumulation of chemical elements than the tree species. However little is known about their metabolic reactions. This study aimed to evaluate the biomonitor capacity of two epiphytic bromeliads species exposed in the Metropolitan Region of Campinas (MRC), subject to various pollutant sources that contribute to the high amount of air pollutants and, thus, establish an efficient Biomonitoring Protocol, with bromeliads, for the region. For this, *Tillandsia usneoides* and *Aechmea fasciata* specimens were distributed in five points of MRC in 12-week cycles for 22 months (8 expositions). At the end of every exposition levels of nutrients, trace metals and variations in physiological parameters were quantified. From these results, an atmospheric pollution index was designed to better describe the gradient of pollution in the region. The results showed the high biocumulator capacity of metal of *Aechmea fasciata* species, being many times more efficient than *Tillandsia usneoides*. Individual physiological markers showed no direct correlation with the local pollution in both species, but the variation of chlorophyll parameters, lipid peroxidation and glutathione levels showed greater sensitivity of plants exposed compared to reference plants. The association of physiological and chemical parameters proved to be more effective alternative for environmental monitoring, indicating the species *Aechmea fasciata* as best suited for the application of the developed index.

Key words: atmospheric pollution, bromeliads, environmental monitoring.

Índice

Capítulo I – Introdução e descrição geral do biomonitoramento ativo	6
1. Introdução	6
2. Descrição geral do biomonitoramento ativo	11
2.1. Caracterização da área de estudo	11
2.2. Desenho experimental	13
2.3. Caracterização de poluentes atmosféricos.....	17
2.4. Etapas experimentais finais	19
3. Referências	21
Capítulo II – Acúmulo de nutrientes e metais pesados em bromélias epífitas expostas na Região Metropolitana de Campinas	27
1. Introdução	27
2. Material e métodos	29
2.1. Análises nutricionais	30
2.2. Teores de metais traço	30
2.3. Background do ambiente e fator de enriquecimento.....	31
2.4. Análises estatísticas.....	32
3. Resultados e Discussão	32
4. Conclusões	44
5. Referências bibliográficas	45
Capítulo III – Determinação de marcadores fisiológicos de estresse ambiental em bromélias epífitas expostas na Região Metropolitana de Campinas.....	51
1. Introdução	51
2. Material e Métodos	54
2.1. Análises biométricas	54
2.2. Conteúdo de Ácido Ascórbico	55

2.3. <i>Conteúdo de Glutathiona</i>	55
2.4. <i>Teores de pigmentos</i>	56
2.5. <i>Teores de HPDC</i>	56
2.6. <i>Teores de MDA</i>	56
2.7. <i>Análises estatísticas</i>	57
3. Resultados e Discussão	58
3.1. <i>Análises biométricas</i>	58
3.2. <i>Parâmetros bioquímicos</i>	59
3.3. <i>Análise integrada das respostas bioquímicas de T. usneoides e A. fasciata</i>	71
4. Conclusões	78
5. Referências bibliográficas.....	79
Capítulo IV – Proposição de modelo preditivo para Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) no monitoramento de regiões afetadas por diversas fontes de poluição	88
1. Introdução	88
2. Material e métodos.....	91
3. Resultados e discussão	94
4. Conclusões	107
5. Referências.....	108
Capítulo V – Considerações Finais	112
Apêndice 1	114

Capítulo I – Introdução e descrição geral do biomonitoramento ativo

1. Introdução

O crescente desenvolvimento urbano e industrial, ao emitir poluentes, tem sido responsável por alterações ao ambiente natural. Em regiões urbanas e industriais, estão entre os poluentes mais significativos os gases dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e ozônio (O₃), e material particulado com diversos compostos e elementos adsorvidos, como nitratos e sulfatos, e metais pesados (CETESB 2010). Fertilizantes químicos inorgânicos, transportados de lavouras pelas águas de chuva para córregos e rios tornam-se um dos principais distribuidores de partículas tóxicas que afetam várias espécies (Oliveira 2012).

Os poluentes atmosféricos podem por em risco a saúde humana, afetam a flora e a fauna, e danificam patrimônios históricos e modernos (Klumpp *et al.* 2001). Em São Paulo, por exemplo, os poluentes veiculares contribuem para o aumento da mortalidade e morbidade, em especial por doenças respiratórias e cardiovasculares (Toledo & Nardocci 2011).

A qualidade do ar pode ser avaliada por meio da estimativa da carga de poluentes emitidos por diferentes fontes poluidoras em dada região, de medidas das concentrações ambientais dos principais poluentes usando métodos físico-químicos e do uso de modelos matemáticos para descrever a dispersão de poluentes na região. A qualidade do ar, assim, pode ser descrita em nível local, regional, nacional e mesmo global (Klumpp *et al.* 2001, CETESB 2010), o que permite determinar e avaliar normas e valores limites para concentrações de poluentes no ar, por órgãos de gestão pública, como a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB).

Os poluentes são reconhecidamente tóxicos às plantas, podendo causar alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais, tanto indicadoras de distúrbios, quanto da intensificação de defesas contra o estresse imposto por poluentes atmosféricos (Emberson *et al.* 2001, Emberson *et al.* 2003). Essas alterações podem ser úteis para a avaliação do ambiente no qual as plantas são expostas, técnica denominada biomonitoramento.

O biomonitoramento pode ser definido como a observação contínua de uma área geográfica, com a ajuda de organismos adequados que refletem as alterações do meio ao

longo do tempo e espaço. As informações relevantes no biomonitoramento podem ser deduzidas a partir de quaisquer mudanças no comportamento do organismo monitor (composição e/ou riqueza de espécies, desempenho fisiológico e/ou ecológico e morfologia) ou a partir das concentrações de substâncias específicas nos tecidos (Wolterbeek 2002).

O biomonitoramento com plantas possibilita a delimitação de áreas atingidas pela contaminação por poluentes, sua classificação entre vários níveis de poluição e a avaliação dos riscos impostos à fauna e à vegetação local (Ellenberg 1991). As alterações nas plantas bioindicadoras podem ser visíveis ou não, sendo decorrentes de efeitos diretos ou indiretos dos poluentes e outros estresses ambientais sobre moléculas vitais (lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos) e da intensidade das respostas indicadoras de distúrbios, determinada pela capacidade das plantas tolerarem o estresse imposto pelos poluentes. O biomonitoramento também pode fornecer informações sobre o padrão geográfico e a tendência temporal da concentração de poluentes no meio ambiente (Ellenberg 1991, Arndt *et al.* 1995).

Segundo Ellenberg (1991) e Markert *et al.* (2003) as plantas bioindicadoras podem ser diferenciadas em três grupos principais: bioindicadoras, biomonitoras e plantas testes. Plantas bioindicadoras são indicadores de reação, ou seja, que respondem à ação dos poluentes com danos visíveis ou alterações anatômicas e fisiológicas; as biomonitoras são indicadores de acumulação, sendo relativamente resistentes aos poluentes aéreos, o que proporciona o acúmulo de substâncias tóxicas nos tecidos foliares sem a ocorrência de distúrbios visíveis. Os organismos testes são altamente padronizados e utilizados em bioensaios de toxicologia, como no caso da espécie *Tradescantia pallida*, que apresenta variação na frequência de mutações gênicas quando expostas à poluição (Klumpp 2001, Ferreira *et al.* 2007).

Plantas "sensíveis" ou indicadoras "cumulativas" podem ser usadas em dois métodos de amostragem: monitoramento "ativo" ou "passivo". O monitoramento ativo envolve a exposição intencional e padronizada de plantas em segmentos do ambiente por determinados períodos de tempo. O monitoramento passivo é baseado na avaliação comparativa de reações de estresse em organismos selecionados existentes na área de estudo em questão e, geralmente, envolve geoestatística e a aplicação de sistemas de informação geográfica (Klumpp *et al.* 2001, Markert *et al.* 2003).

Diversas espécies vegetais têm sido utilizadas como biomonitoras ou indicadoras de contaminação atmosférica de poluentes. Muitas estão padronizadas para estudos que avaliam poluentes específicos: como *Nicotiana tabacum* Bel W3 e *Psidium guajava* cv. Paluma para O₃ (Klumpp *et al.* 2001, Dias *et al.* 2007, Pina *et al.* 2007, Klumpp *et al.* 2006), *Lolium multiflorum* para SO₂ (Klumpp *et al.* 2001, Rodrigues & Raya-Rodriguez 2012) e elementos traços (Klumpp *et al.* 2009), líquens para metais pesados (Raposo Jr *et al.* 2007, Fioreze & Santos 2014), entre outros.

Os primeiros estudos com bromélias visando à avaliação do impacto da poluição ambiental surgiram nas primeiras décadas do século XX (Saiki *et al.* 2004). Atualmente os estudos se intensificaram, sendo amplamente explorados no Brasil (Figueiredo *et al.* 2004, Figueiredo *et al.* 2007, Elias *et al.* 2006, Elias *et al.* 2008, Aquino *et al.* 2011, Giampaoli *et al.* 2012, Ferreira 2014) e na Argentina (Pignata *et al.* 2002, Wannaz & Pignata 2006, Bermudez *et al.* 2009). Os estudos conduzidos no Brasil, particularmente com as bromélias epífitas, têm se baseado unicamente na análise do acúmulo foliar dos elementos.

A maioria das bromélias, incluindo as utilizadas neste estudo, apresentam reações de assimilação do carbono do tipo CAM (Metabolismo Ácido das Crassulaceas), com abertura de estômatos majoritariamente durante a noite ou nas primeiras horas da manhã (Londers *et al.* 2005, Loeschen *et al.* 1993, Laube & Zotz 2003, Popp *et al.* 2003, Londers *et al.* 2005). Plantas com metabolismo CAM apresentam mecanismo diferenciado de aquisição, armazenamento transitório e concentração de CO₂, com base na síntese de ácidos orgânicos, onde o CO₂ é fixado no escuro, durante a noite, e liberado durante o dia (Lüttge 2008). O mecanismo aumenta a eficiência no uso da água, proporcionando elevada vantagem na sobrevivência em ambientes secos.

Plantas epífitas, como muitas bromélias, não apresentam contato direto com o solo e formam um compartimento especial do ecossistema nos estudos de ciclagem de elementos químicos, sendo capazes de refletir as condições do ambiente, uma vez que retiram suas principais fontes de nutrição do ar, e apresentam maior capacidade de acúmulo de elementos químicos que as espécies arbóreas (Elias *et al.* 2008).

Tillandsia usneoides (L.) L., conhecida popularmente como barba de velho ou barba de bode, é uma espécie epífita largamente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais e está adaptada a regiões mais secas e quentes (MacIntire *et al.* 1952,

Benzing & Bermudes 1991). A espécie não apresenta sistema radicular, dependendo do ar para retirada de água e nutrientes via tricomas em formato de escamas existentes nas folhas, sendo classificada como epífita atmosférica. Apresenta alta superfície de exposição, aumentando seu potencial para acumular elementos atmosféricos (Malm *et al.* 1998, Figueiredo *et al.* 2001, Nogueira 2006, Calasans & Malm 1997). Sua capacidade para acumular metais como Al, As, Cr, Fe, Mo, Sb, Ti, V e Zn, indica o potencial promissor da espécie como biomonitora de poluição atmosférica, como concluído por Aquino *et al.* (2011), ao expor plantas de *Tillandsia usneoides* em diferentes locais ao longo da Serra do Mar em Cubatão/SP.

Recentemente, além de *T. usneoides*, outras espécies de *Tillandsia* têm apresentado capacidade bioindicadora. Graciano *et al.* (2003) estudaram duas espécies do gênero *Tillandsia* e concluíram que a *Tillandsia recurvata* (L.) L. acumula enxofre e tolera níveis locais de contaminação aérea sem apresentar danos morfológicos. Wannaz & Pignata (2006) avaliaram a capacidade biomonitora para material particulado de quatro espécies de *Tillandsia* (*Tillandsia capillaris* Ruiz & Pav., *Tillandsia permutata* A. Cast., *Tillandsia tricholepis* Baker e *Tillandsia retorta* Griseb. ex Baker), apresentando uma escala de eficiências para as mesmas. Pesquisadores da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, têm estudado plantas do gênero *Tillandsia* como ferramentas na elaboração de índices de danos fisiológicos por poluentes atmosféricos (Pignata *et al.* 2002, Wannaz & Pignata 2006)

Os estudos com epífitas biomonitoras abriram precedentes para a análise de outras espécies epífitas, em especial da família Bromeliaceae. Elias *et al.* (2006) estudaram onze espécies de bromélias nativas do Parque Estadual Carlos Botelho, SP, para determinação de elementos químicos, concluindo que *Canistropsis billbergioides* (Schult. f.) Leme mostrou-se promissora para a biomonitoramento de elementos químicos na Mata Atlântica. Vinterhalter & Vinterhalter (1994), Mercier & Kerbauy (1997), Vervaeke *et al.* (2002), Cueva *et al.* (2006) e Tavares *et al.* (2008) conduziram estudos *in vitro* e *ex vitro* com várias plantas do gênero *Aechmea*, avaliando a nutrição, germinação de pólen e multiplicação *in vitro*. Giampaoli *et al.* (2012) e Zampieri *et al.* (2012) analisaram a capacidade de acúmulo de Zn e Cu e os distúrbios causados ao sistema antioxidante em plantas de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro*, concluindo que a espécie apresenta capacidade de acúmulo dos metais sem apresentar

danos visíveis ou desequilíbrio nutricional nas plantas, abrindo precedentes para mais estudos com espécies desse gênero.

Aechmea fasciata é uma planta ornamental, com inflorescências que alteram a coloração de azul claro para rosa avermelhada ao longo da floração (Benzing 1980, Benzing 2000). A espécie apresenta tanque, é originária da região tropical e subtropical da América Central e América do Sul, encontrada em diversos habitats (Smith & Downs 1974). Muitos dos estudos com a espécie foram realizados *in vitro* e objetivaram descrever a espécie sob aspectos taxonômicos e fisiológicos (nutrição, germinação de pólen e métodos adequados de desenvolvimento) (Vinterhalter & Vinterhalter 1994, Vervaeke *et al.* 2002, Cueva 2006). A espécie apresenta crescimento mais rápido e alta capacidade de regeneração por estresse hídrico, quando comparada com plantas do gênero *Tillandsia*; portanto, podendo ser uma alternativa para estudos de biomonitoramento atmosférico na região tropical.

Assim, o potencial bioindicador de *A. fasciata* foi analisado no presente estudo utilizando os princípios do biomonitoramento ativo, comparando-o com o de uma espécie de bromélia padronizada como bioimonitora (*Tillandsia usneoides*), quando expostas na Região Metropolitana de Campinas, Estado de São Paulo, que tem sido contaminada por poluentes atmosféricos emitidos por fontes urbanas, industriais e agrícolas.

1.1. Objetivos Gerais

1) Avaliar comparativamente a capacidade acumuladora das espécies *Aechmea fasciata* e *Tillandsia usneoides*, determinando a eficiência da *Aechmea fasciata* como bioimonitora para acúmulo de metais;

2) Determinar as possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas (indicadores do sistema de defesa vegetal) causada por poluentes nas espécies estudadas;

3) Determinar, entre as duas espécies de bromélias, qual é a mais adequada para estimar quantitativamente o nível de contaminação atmosférica na região de estudo, por meio da elaboração de índice de contaminação atmosférica (ICA), com base nas alterações químicas e fisiológicas relevantes medidas em plantas expostas na região de estudo.

2. Descrição geral do biomonitoramento ativo

2.1. Caracterização da área de estudo

O biomonitoramento foi realizado em parte da Região Metropolitana de Campinas (RMC), pertencente ao Estado de São Paulo (latitudes 22°30' e 23°15'S e longitudes 46°30' e 47°00'W). A região ocupa área de aproximadamente 3.673 km², sendo formada por dezenove municípios.

A RMC está incluída na faixa de vegetação abrangida pelo Domínio Atlântico, sendo referida como Mata Atlântica *sensu lato* (*s.l.*), se estendendo por seis municípios (Americana, Campinas, Cosmópolis, Holambra, Jaguariúna e Paulínia). O clima da região é marcado por estações secas e chuvosas. Atualmente, as áreas de vegetação remanescente, Floresta Estacional Semidecidual, estão fragmentadas em pequenas áreas residuais, em sua maioria isoladas. Parte dos remanescentes de vegetação nativa está inserida em unidades de conservação como a Área de Relevante Interesse Ecológico Mata de Santa Genebra. Contudo, a maior parte da área de estudo é marcada por atividades agrícolas, em especial cultivos de cana-de-açúcar, milho e citros (Figura 1).

A RMC situa-se no planalto paulista em zona intertropical, caracterizada por duas estações marcantes: período úmido com elevadas temperaturas, e seco com temperaturas mais amenas e menor pluviosidade (Viscente 2005), apresentando diferenças significativas na intensidade e direções dos ventos entre as estações (Figura 2).

O desenvolvimento de atividades econômicas na RMC foi marcado pela instalação do pólo petroquímico de Paulínia, cidade que dista cerca de 130 km da cidade de São Paulo, localizada na região Centro-Sudeste do Estado, em latitude 22°45'47"S e longitude 47°09'07"W com área de 154 km², na qual 2/3 com ocupação urbana (Gutjahr 2008, Prezotti & Tresmondi 2006). O desenvolvimento acelerado da região causou impacto ambiental significativo e, como consequência, o transporte por meio de veículos movidos a combustível fóssil foi intensificado, contribuindo também para o declínio da qualidade do ar (Carmo & Hogan 2006).

A região apresenta histórico de elevadas concentrações de óxidos de enxofre (SO_x), óxidos de nitrogênio (NO_x), ozônio (O₃), bem como material particulado (MP), nos quais elementos tóxicos, como metais pesados, podem estar aderidos (Carmo & Hogan 2006, CETESB 2009, CETESB 2010). Esses poluentes são oriundos de

diferentes usos da terra (urbanas, industriais e agrícolas), conforme mostra a figura 1. A figura 2 apresenta a direção e velocidade dos ventos na RMC, no período de estudo.

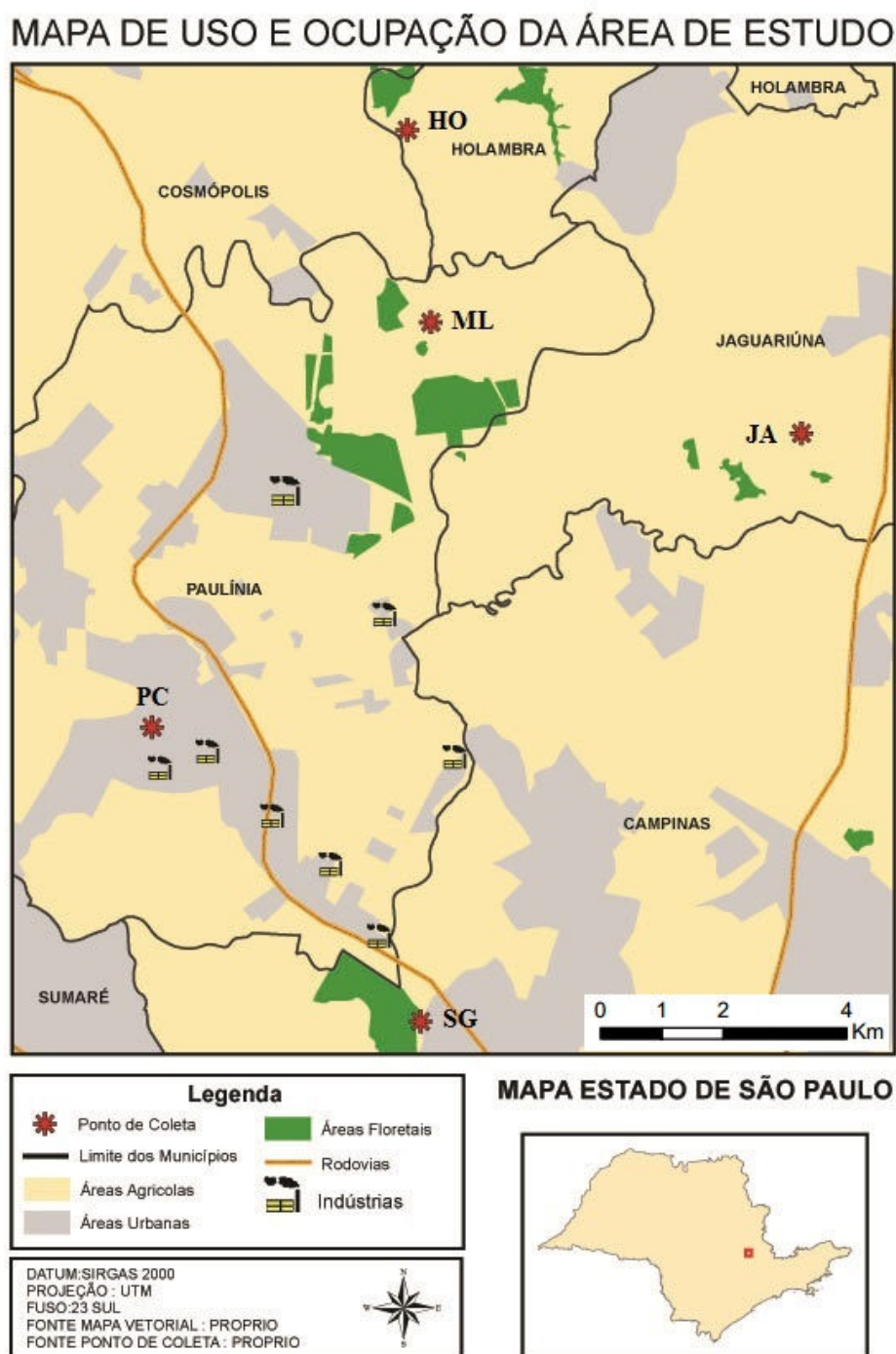


Figura 1. Mapa da área de estudo e entornos com destaque dos pontos onde foi realizado o biomonitoramento ativo e distribuição das principais fontes de poluentes da região. Posição dos locais de exposição: HO (Holambra), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia) e SG – Mata de Santa Genebra (Campinas). Imagem produzida pelo geógrafo Marco Aurélio Formentin Serra (2014).

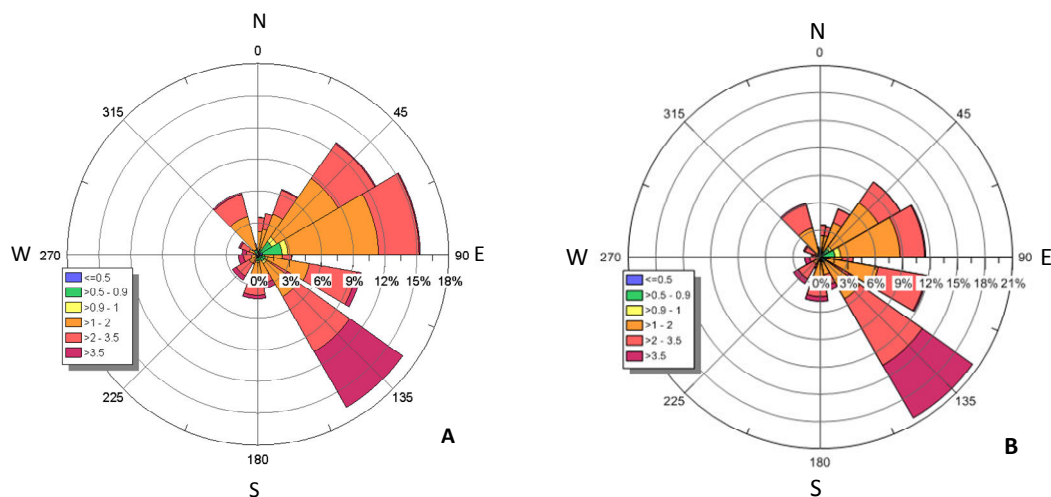


Figura 2. Direção e velocidade dos ventos ($\text{m m}^2 \text{s}^{-1}$) na RMC durante o período de estudo. A - no período seco; B - no período úmido. Dados cedidos pela Refinaria do Planalto Paulista, da Petrobrás (S22 43.932 W47 08.261), localizada no Pólo Industrial de Paulínia.

2.2. Desenho experimental

O biomonitoramento foi realizado em cinco locais da RMC, contidos em uma área circular com raio de 10 km (314 km^2), cujo ponto central foi demarcado no Pólo Petroquímico de Paulínia (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1. Localização e coordenadas dos locais de exposição para realização do estudo.

Pontos		Município da RMC	Coordenadas geográficas
1	SG	Campinas	22°49'22.65"S 47°06'17.38"O
2	ML	Paulínia	22°41'52.19"S 47° 6'10.27"O
3	JA	Jaguariúna	22°43'3.78"S 47°01'50.71"O
4	PC	Paulínia	22°46'13.4"S 47°09'25.3"O
5	HO	Holambra	22°39'48.25"S 47°06'26.71"O

O biomonitoramento ativo foi realizado com as espécies de bromélias epífitas *Tillandsia usneoides* e *Aechmea fasciata* (Figura 3), comuns em toda América Latina e amplamente utilizadas na ornamentação de ambientes. As plantas de *T. usneoides* foram obtidas de produtor comercial em Cordeirópolis (Spagnol Plantas Ornamentais) e as de

A. fasciata em Holambra (Ecoflora), garantindo a padronização das plantas e evitando a retirada de exemplares presentes na natureza.



Figura 3. Cultivo de *T. usneoides* em Cordeirópolis (acima). Estufa climatizada (esq.) e detalhe das plantas (dir.). Cultivo de plantas de *A. fasciata* em Holambra (acima). Estufa climatizada (esq.) e detalhe das plantas (dir.).

As plantas de *A. fasciata* adquiridas do produtor foram transferidas para vasos individuais contendo casca de *Pinnus* compostada como substrato. As mudas permaneceram em casa de vegetação por três meses, com irrigação diária e adubação semanal com $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de Peters® (N:P:K 20:20:20) até atingirem tamanho adequado para exposição. Ao atingirem peso de no mínimo 30 g, com tanque o formado, foram identificadas e transferidas para os locais de estudo.

As mudas de *T. usneoides* foram adquiridas 6 meses antes do início do experimento e mantidas em casa de vegetação com irrigação diária para aclimação. Na véspera da exposição, as plantas foram subdivididas em amostras mistas de 50 g e amarradas com linha de nylon.

O biomonitoramento ativo consistiu de oito épocas de exposição (E1 a E8, tabela 2) consecutivas em cada local de estudo, abrangendo, no total, 22 meses (junho/2012 a abril/2013). Cada exposição foi iniciada com cinco amostras mistas de *T. usneoides* e cinco indivíduos de *A. fasciata* em cada local, onde permaneceram por 12 semanas suspensas sob estrutura de PVC com tela de sombrite de aproximadamente 50% (Figura 4). As plantas de *T. usneoides* permaneceram amarradas na tela do sombrite com fio de nylon e foram mergulhadas em água ultrapura na data de troca e nas semanas posteriores durante o período de exposição. As plantas de *A. fasciata* foram distribuídas em suportes numerados feitos de garrafas PET transparentes suspensas por fios de nylon. Para evitar proliferação de larvas e mosquitos transmissores de doença parte do copo das plantas e o fundo das garrafas foram preenchidos com areia lavada em água Mili-Q e esterilizadas em autoclave. Após a transferência, o tanque das plantas foi preenchido com água ultrapura. As plantas foram regadas com água ultrapura semanalmente, durante todo o período de estudo. Após cada período de exposição, as plantas foram levadas em sacos transparentes para análises no Núcleo de Ecologia do Instituto de Botânica e substituídas por novos exemplares.

Conforme descrito na tabela 2, três experimentos de exposição foram realizados nas estações secas e cinco nas estações úmidas. A determinação do clima de cada estação foi feita em função da comparação dos valores médios da precipitação histórica dos locais da RMC, cedidos pela Cetesb e Cepagri, e os dados observados ao longo dos 22 meses de experimento. Valores cuja somatória da exposição fosse acima de 200 mm foram considerados de clima úmido e até 200 mm foram considerados de clima seco.

Tabela 2. Cronograma de exposições das espécies *T. usneoides* e *A. fasciata* ao longo do período de experimentação.

Exposição	Estação	Clima	Início	Troca/ coleta
E1	Inv/2011	Seco	22/06/2011	14/09/2011
E2	Pri/ 2011	Úmido	14/09/2011	13/12/2011
E3	Ver/2011	Úmido	13/12/2011	29/02/2012
E4	Out/ 2012	Úmido	29/02/2012	23/05/2012
E5	Inv/ 2012	Seco	23/05/2012	14/08/2012
E6	Pri/ 2012	Seco	14/08/2012	06/11/2012
E7	Ver/2012	Úmido	06/11/2012	23/01/2013
E8	Out/ 2013	Úmido	23/01/2013	17/04/2013



Figura 4. A - Estrutura de PVC sob sombrite de 50% montada no ponto de Campinas – Reserva de Santa Genebra (SG) com as plantas expostas. B - *Tillandsia usneoides*. C - *Aechmea fasciata*.

Foram obtidos dados de temperatura, umidade relativa e radiação solar para cada local e durante cada período de 12 semanas (tabela 3). Observa-se que a temperatura, umidade relativa e radiação solar variaram pouco entre as coletas e que o principal marcador do clima da região é a precipitação, seguida pela radiação solar.

Tabela 3. Dados de precipitação e valores médios de temperatura, umidade relativa e radiação solar global dos locais da RMC, durante o período de estudo (junho/2012 a abril/2013). Fontes: CETESB (<http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/32-qualar>) e CEPAGRI (<http://www.cpa.unicamp.br/atualizacoes-regulares.html>)

Local	Fontes de poluição	Precipitação (mm, seco/úmido)	Temperatura (°C, seco/úmido)	Umidade Relativa (%), seco/úmido)	Radiação solar média (W, m ² , seco/úmido)	
1	SG	Urbano/ Agrícola	415,1 (141,8/492,0)	22,7 (21,0/23,6)	71,11 (77,9/67,1)	283,9 (127,86/439,86)
2	ML	Industrial/ Agrícola	353,6 (143,5/467,4)	26,3 (25,6/24,6)	76,9 (69,4/76,5)	187,0 (171,5/202,2)
3	JA	Agrícola	338,3 (149,8/437,0)	23,2 (20,4/23,9)	78,8 (74,6/76,7)	149,5 (123,8/175,1)
4	PC	Urbano	191 (52,1/370,7)	23,9 (24,9/23,7)	77,8 (69,4/77,4)	217,7 (180,4/255,0)
5	HO	Agrícola	320 (145,0/430,0)	25,3 (26,5/25,4)	79,6 (74,9/79,7)	-

Locais: SG – Mata de Santa Genebra (Campinas), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia) e HO (Holambra).

2.3. Caracterização de poluentes atmosféricos

Estações de monitoramento da qualidade do ar da CETESB forneceram informações de concentração diária de poluentes para a Campinas Centro, Paulínia-Centro e Paulínia-Sul, sendo utilizadas como referência para os pontos localizados em Campinas e Paulínia (SG e PC respectivamente). Juntamente com esses dados e para os locais sem estação de monitoramento (ML, HO e JA), as concentrações dos poluentes (O₃ e NO₂) na atmosfera foram monitoradas por amostragens passivas por equipe do Núcleo de Pesquisa em Ecologia do Instituto de Botânica. Estes foram utilizados para caracterização da contaminação atmosférica ao longo dos oito experimentos realizados em campo.

A amostragem passiva dos poluentes foi realizada com o uso de amostrador cilíndrico comercialmente disponível para coleta de partículas (Millipore®), com 33 mm de altura e 19 mm de raio interno, no qual foram depositados papel de filtro de celulose (Whatman® N° 41) com raio igual ao raio interno do amostrador e impregnado com a solução de o azul de índigo, para as amostragens de O₃, e trietanolamina 11% em combinação com etilenoglicol 3,6%, acetona 25% e um conversor contendo CrO₃ para as amostragens de NO₃, como sugerido por Machado *et al.* (2008) e Garcia *et al.*

(2010). No segundo ano de experimento os amostradores de O₃ foram substituídos pelos descritos por Ogawa (2001).

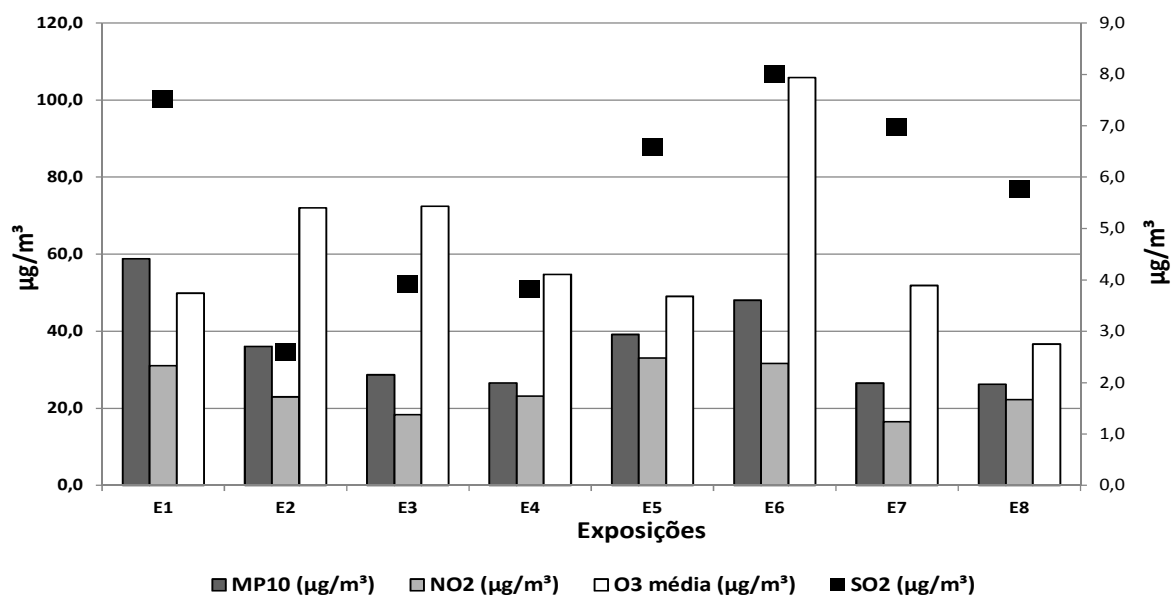
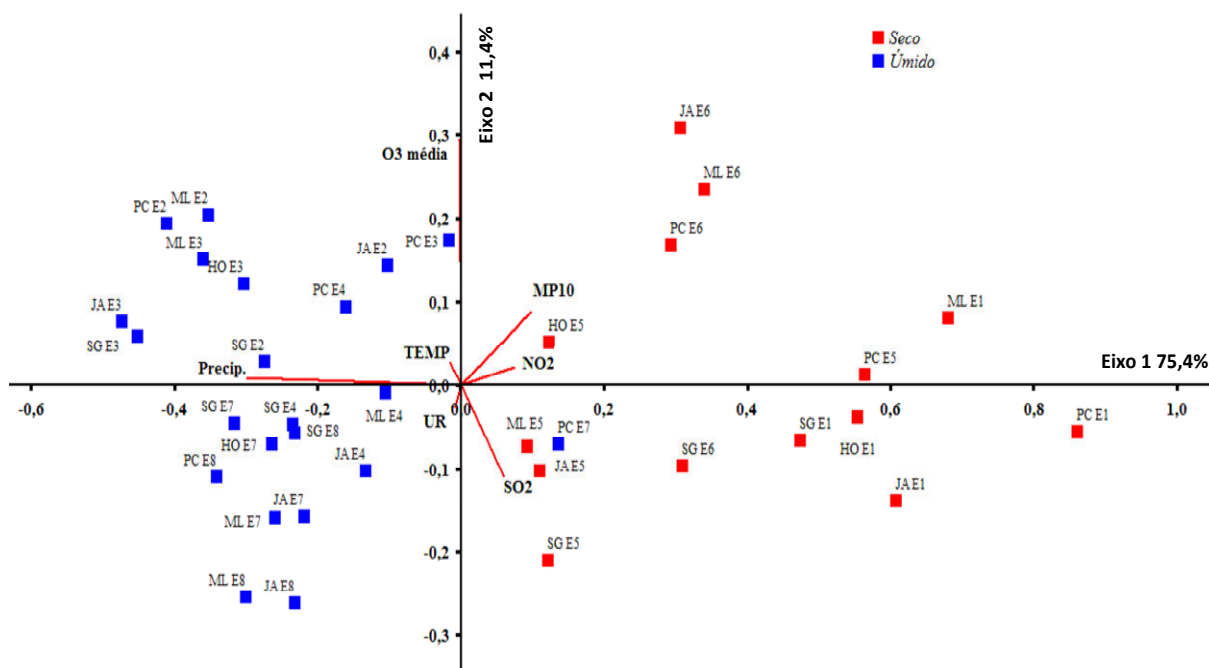


Figura 5. Valores médios de poluentes SO₂, NO₂, O₃ e MP₁₀ avaliados nos pontos de estudo ao longo do período de estudo. E1, E5 e E6 ocorreram no período seco e E2, E3, E4, E7 e E8 no período úmido. Barras correspondem ao eixo primário (esquerda) e pontos ao eixo secundário (direita). Dados obtidos por estações de monitoramento da Cetesb e amostradores de captação passiva utilizados pelo grupo de pesquisa do Núcleo de Ecologia do Instituto de Botânica.

A análise conjunta dos pontos permitiu a descrição geral das concentrações de poluentes presentes na RMC em cada experimento de exposição, como apresentado na figura 5. A análise mostrou a presença dominante de O₃ na região, com variação ao longo do tempo, seguido pelos teores de MP₁₀. Os menores valores foram observados para as concentrações de SO₂ (eixo secundário da figura), com maiores valores no período úmido do primeiro ano de estudo (E2, E3 e E4). As concentrações de NO₂ apresentaram pouca variação ao longo do estudo, sendo maiores nos períodos secos (E1, E5 e E6).

A caracterização da distribuição espacial e temporal dos poluentes (SO₂, NO₂, O₃ e MP₁₀) e clima (temperatura, umidade relativa e precipitação) avaliados nos pontos de estudo da RMC ao longo do período de experimento foi realizada utilizando-se a análise de componentes principais (PCA).

A PCA resumiu 75% dos dados de clima e poluição no primeiro eixo com valores significativos ($p < 0,01$) e confirmam a separação temporal da variação de poluentes e clima, sendo as maiores concentrações de material particulado (MP) e óxidos de enxofre e nitrogênio (SO_2 e NO_2) associados às exposições no clima seco (Figura 6).



Eixo	MP ₁₀	NO ₂	O ₃	SO ₂	TEMP	Precip.	UR	p
1	0,2953	0,2241	-0,0073	0,1819	-0,0500	-0,9090	-0,0255	0,0005
2	0,2698	0,0653	0,8938	-0,3315	0,0836	0,0279	-0,0798	0,8265

Figura 6. Análise de componentes principais (PCA) distribuindo espacialmente e temporalmente dos poluentes (SO_2 , NO_2 , O_3 e MP_{10}) e clima (temperatura, umidade relativa e precipitação), avaliados nos pontos de estudo na RMC ao longo do período de estudo. Locais de exposição: HO (Holambra), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia) e SG – Mata de Santa Genebra (Campinas).

2.4. Etapas experimentais finais

Ao final de cada experimento de exposição, as plantas foram analisadas quanto a:

- Concentrações foliares e enriquecimento foliar de nutrientes (N, K, P, S, Ca, Mg, B, Cu, Mn, Zn e Fe) e metais traços (Ni, V, Co, Pb e Cr). A descrição dos

métodos analíticos e, a apresentação e discussão de resultados dessa etapa experimental estão no Capítulo 2;

- Variações dos teores de metabólitos fisiológicos e químicos de plantas expostas aos ambientes poluídos; a descrição dos métodos analíticos e a apresentação e discussão de resultados dessa etapa experimental estão no Capítulo 3;
- A proposição de Índice de Contaminação Atmosférica, com base nas respostas químicas e fisiológicas mais relevantes, será apresentada e discutida no Capítulo 4.
- As considerações finais e conclusões gerais desse estudo estão apresentadas no Capítulo 5.

3. Referências

- Aquino, S.M.F., Almeida, J.R., Cunha, R.R.R.S.B. & Lins, G.A.** 2011. Bioindicadores vegetais: uma alternativa para monitorar a poluição atmosférica. *Revista Internacional de Ciências* 1: 77-94.
- Arndt, U., Flores, F. & Weinstein, L.** 1995. Fluoride Effects on Plants. Diagnosis of Injury in the Vegetation of Brazil. Editora da Universidade, Porto Alegre.
- Benzing, D.H. & Bermudes, D.** 1991 Epiphytic bromeliads as air quality monitors in south Florida. *Selbyana* 21: 46-53.
- Benzing, D.H.** 1980. The biology of the bromeliads. Mad River Press, Eureka.
- Benzing, D.H.** 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptive radiation. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bermudez, G., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L.** 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celsa* in Argentina. *Environmental Research* 109: 6-14.
- Calasans, C.F. & Malm, O.** 1997. Elemental mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L.). *Science of the Total Environment* 208: 165-177.
- Carmo, R.L. & Hogan, D.J.** 2006. Questões ambientais e riscos na Região Metropolitana de Campinas. Disponível em: <http://cendoc.nepo.unicamp.br/textos/publicacoes/livros/vulnerabilidade/arquivos/arquivos/vulnerab> (acesso em 26-XII-2014).
- CETESB - Companhia Ambiental do estado de São Paulo** 2009. Relatório da qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatório. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- CETESB - Companhia Ambiental do estado de São Paulo** 2010. Relatório da qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatório. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

- Cueva, A., Espinosa, C. & Jordan, M.** 2006. Efficient *in vitro* multiplication of *Aechmea* "Little Harv" and *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch. Propagation of Ornamental Plants 6: 165-169.
- Dias, A.P.S., Rinaldi, M.C.S. & Moraes, R.M.** 2007. Alterações bioquímicas associadas a injúrias foliares visíveis em plantas jovens de *Psidium guajava* 'Paluma' mantidas em ambiente contaminado por ozônio. Hoehnea 34: 231-238.
- Elias C., Fernandes E.A.N., França E.J. & Bacchi M.A.** 2006. Seleção de epífitas acumuladoras de elementos químicos na Mata Atlântica. Biota Neotropica 6: 1-9.
- Elias, C., Fernandes, E.A., França, E.J., Bacchi, M.A. & Tagliaferro, F.S.** 2008. Native bromeliads as biomonitors of airborne chemical elements in a Brazilian restinga forest. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 278: 423-427.
- Ellenberg, H.** 1991. Biological monitoring: signals from the environment. H. Ellenberg Ed., Vieweg, Braunschweig.
- Emberson, L., Ashmore, M. & Murray, F.** 2003. Air pollution impacts on crops and forests: a global assessment. Imperial College Press, London.
- Emberson, L.D., Ashmore, M.R., Murray, F., Kuylenstierna, J.C., Percy, K.E., Izuta, T. & Domingos, M.** 2001. Impacts of air pollutants on vegetation in developing countries. Water, Air, and Soil Pollution 130: 107-118.
- Ferreira, G.G.P.** 2014. *Tillandsia Usneoides* (L.) como ferramenta de monitoramento de poluição atmosférico para metais-traço nos municípios de Campinas e Paulínia, estado de São Paulo, SP, Brasil. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental 18: 254-272.
- Ferreira, M. I., Domingos, M., Gomes, H. D. A., Saldiva, P. H. & De Assuncao, J. V.** 2007. Evaluation of mutagenic potential of contaminated atmosphere at Ibirapuera Park, São Paulo–SP, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. Environmental Pollution 145: 219-224.
- Figueiredo, A.M.G., Alcalá, A.L., Ticianelli, R.B., Domingos, M. & Saiki, M.** 2004. The use of *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator of air pollution in São Paulo, Brazil. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 259: 59-63.

Figueiredo, A.M.G., Nogueira, C.A., Saiki, M., Milian, F.M. & Domingos, M. 2007. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor. *Environmental Pollution* 145: 279-292.

Figueiredo, A.M.G., Saiki, M., Ticianelli, R.B., Domingos, M., Alves, E.S. & Market, B. 2001. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 249: 391-395.

Fioreze, M. & Santos, E.P. 2014. Avaliação da qualidade do ar na área urbana de Frederico Westphalen, RS, através da determinação de Sr, Zr, Br, Cu e Z em amostras de líquens. *Tecno-Lógica* 17: 129-135.

Garcia, G., Allen, A.G. & Cardoso, A.A. 2010. Development of a sensitive passive sampler using indigotrisulfonate for the determination of tropospheric ozone. *Journal of Environmental Monitoring* 12: 1325-1329.

Giampaoli, P., Tresmondi, F., Lima, G.P.P., Kanashiro, S., Alves, E.S., Domingos, M. & Tavares, A.R. 2012. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. *Biologia Plantarum* 56: 83-88.

Graciano, C., Fernández, L.V. & Caldiz, D.O. 2003. *Tillandsia recurvata* L. as a bioindicator of sulfur atmospheric pollution. *Ecología Austral* 13: 3-14.

Gutjahr, M.R. 2008. Avaliações da qualidade do ar em Paulínia-SP. *Boletim Goiano de Geografia* 24: 55-68.

Klumpp, A. 2001. Utilização de bioindicadores de poluição em condições temperadas e tropicais. *In*: N.B. Maia, H.L. Martos & W. Barrella (Eds.). *Indicadores ambientais: conceitos e aplicações*. EDUC/COMPED/INEP, São Paulo, pp.77-94.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G. & Fomin, A. 2001 Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede européia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet). *Revista Brasileira de Botânica* 24(suplemento): 511-518.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp G., Vergne, M.J., P., Sifakis, N., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas, A., Peñuelas, J., Kambezidis, H., He, S., Garrec, J.P. &

- Calatayud, V.** 2006. Ozone pollution and ozone biomonitoring in European cities Part II. Ozone-induced plant injury and its relationship with descriptors of ozone pollution. *Atmospheric Environment* 40: 7437-7448.
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Breuer, J., Vergne, P., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Artola, A.R., Peñuelas, J., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V.** 2009. Airborne trace element pollution in 11 European cities assessed by exposure of standardized ryegrass cultures. *Atmospheric Environment* 43: 329-339.
- Laube, S. & Zotz, G.** 2003. Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology* 17: 598-604.
- Loeschen, V.S., Martin, C.E., Smith, M. & Eder, S.L.** 1993. Leaf anatomy and CO₂ recycling during Crassulacean acid metabolism in twelve epiphytic species of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *International Journal of Plant Sciences* 100-106.
- Londers, E., Ceusters, J., Vervaeke, I., Deroose, R. & De Proft M.P.** 2005. Organic acid analysis and plant water status of two *Aechmea* cultivars grown under greenhouse conditions: implications on leaf quality. *Scientia Horticulturae* 105: 249-262.
- Lüttge, U.** 2008. Crassulacean acid metabolism. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- Machado, C.M.D., Cardoso, A.A. & Allen, A.G.** 2008. Atmospheric Emission of Reactive Nitrogen during Biofuel Ethanol Production. *Environmental Scientific Technology* 42: 381-385.
- MacIntire, W.H., Hardin, L.J. & Hester W.** 1952. Measurement of atmospheric fluorine-analysis of rain waters and Spanish moss exposures. *Industrial & Engineering Chemistry* 44: 1365-1370.
- Malm, O., de Freitas Fonseca, M., Hissnauer Miguel, P., Rodrigues Bastos, W. & Neves Pinto, F.** 1998. Use of epiphyte plants as biomonitors to map atmospheric mercury in a gold trade center city, Amazon, Brazil. *Science of the Total Environment* 213: 57-64.
- Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister H.G.** 2003. Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. *In*: B.A. Markert, A.M. Breure & H.G. Zechmeister (eds.). *Bioindicators & Biomonitors: Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp. 3-39.

- Mercier, H. & Kerbauy, G.B.** 1997. Micropropagation of Ornamental Bromeliads (Bromeliaceae). *In*: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry: high tech and micropropagation VI. Springer-Verlag, Berlin, pp. 43-57.
- Nogueira, C.A.** 2006. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of Sao Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor.
- Ogawa.** 2001. Protocol for ozone measurement using the ozone passive sampler badge. Disponível em <http://ogawausa.com/wp-content/uploads/2014/04/proozone.pdf> (acesso em 26-XII-2014).
- Oliveira, D.** 2012. Poluição química. Disponível em www.coladaweb.com/quimica/quimica-ambiental/poluicao-quimica. (acesso em 26-XII-2014).
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Plá, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution* 120: 59-68.
- Pina, J.M. & Moraes, R.M.** 2007. Ozone-induced foliar injury in saplings of *Psidium guajava* 'Paluma' in São Paulo, Brazil. *Chemosphere* 66: 1310-1314.
- Popp, M., Janett, H.P., Lüttge, U. & Medina, E.** 2003. Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytologist* 157: 649-656.
- Prezotti, P.R. & Tresmondi, A.C.** 2006. Inventário de emissões de compostos orgânicos voláteis de uma indústria petroquímica: tanques e emissões fugitivas. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia* 3: 58-72.
- Raposo Jr, J.L., Ré-Poppi, N. & Honda, N.K.** 2007. Avaliação da concentração de alguns íons metálicos em diferentes espécies de líquens do cerrado Sul-Mato-Grossense. *Química Nova* 30: 582-587.
- Rodrigues, M. & Raya-Rodriguez, M.** 2012. Ecological risk analysis using the vegetable Bioindicator *Lolium multiflorum*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 7: 9-13.

- Saiki, M., Smodis, B., Pigmata, M.L., Toro, E.C., Bangfa, N.I., Market, B., Nyarko, B.J.B., Arunachalan, J., Garty, J., Vutchkov, M., Wolterbeek, H.T., Freitas, M.C., Lucaciu, A. & Fronstasyeva, M.** 2004. Validation and application of plants as biomonitors of trace element atmospheric pollution. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49: 3-13.
- Smith, L.B. & Downs, R.J.** 1974. Pitcairnoideae. (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monographs* 14: 1-658.
- Tavares, A.R., Giampaoli, P., Kanashiro, S., Aguiar, F.F.A. & Chu, E.P.** 2008. Efeito da adubação foliar com KNO_3 na aclimatização de bromélia cultivada *in vitro*. *Horticultura Brasileira* 26: 175-179.
- Toledo, G.I.F.M. & Nardocci, A.C.** 2011. Poluição veicular e saúde da população: uma revisão sobre o município de São Paulo (SP), Brasil. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 14: 445-454.
- Vervaeke, I., Parton, E., Maene, L., Deroose, R. & De Proft, M. P.** 2002. Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. *Euphytica* 124: 75-83.
- Vsiciente, A.K.** 2005. Eventos extremos de precipitação na Região Metropolitana de Campinas. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Vinterhalter, B. & Vinterhalter, D.** 1994. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae* 57: 253-263.
- Wannaz, E.D. & Pignata, M.L.** 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.
- Wolterbeek, B.** 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* 120: 11-21.
- Zampieri, M.C.T., Saiki, M., Tavares, A.R. & Pinna, G.F.D.A.M.** 2012. Accumulation of mineral nutrients in *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith (Bromeliaceae) contaminated with zinc during *in vitro* culture. *Hoehnea* 39: 379-385.

Capítulo II – Acúmulo de nutrientes e metais pesados em bromélias epífitas expostas na Região Metropolitana de Campinas

1. Introdução

Poluentes atmosféricos como dióxido de enxofre (SO₂), óxidos de nitrogênio (NO_x) e Material Particulado (MP) podem afetar direta ou indiretamente plantas, animais ou o meio ambiente em geral (Wellburn 1990, Kaiser *et al.* 1993, Manninen & Huttunen 2000, Cape *et al.* 2003, Fürst *et al.* 2003, Mitchell *et al.* 2004). Klumpp *et al.* (2002), ao estudarem os efeitos da poluição atmosférica industrial em Cubatão, SP, mostraram que plantas submetidas a altas concentrações de poluentes apresentaram perdas de cátions, como potássio (K⁺), cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺), por lixiviação das superfícies foliares. Segundo Cape *et al.* (1990), Linder (1995), Rautio *et al.* (1998a, b), Turunen *et al.* (1995) e Cape (2009) os desequilíbrios nutricionais podem ser evidenciados por alterações nas razões entre as concentrações foliares de nitrogênio (N) e enxofre (S²⁻) e as de macronutrientes.

A análise de teores de macro e micronutrientes, essenciais para as plantas, também pode evidenciar o acúmulo de elementos, quando acima dos valores considerados normais, passando a ser considerados poluentes. Este é o caso, por exemplo, de N, S, ferro (Fe²⁺), cobre (Cu²⁺) e zinco (Zn²⁺).

Fe, Cu e Zn são também classificados como metais pesados, que são elementos químicos com densidade superior a 4,5 g cm⁻³. Além desses micronutrientes, metais pesados como cádmio (Cd²⁺), cromo (Cr³⁺), cobalto (Co³⁺), mercúrio (Hg²⁺), molibdênio (Mo²⁻), níquel (Ni³⁺), chumbo (Pb²⁺), e alguns elementos mais leves como o alumínio (Al³⁺), arsênio (As³⁺) e selênio (Se²⁻) podem ser tóxicos às plantas, entre outros organismos, sendo alvos de estudos ecotoxicológicos.

A toxicidade dos metais pode ser decorrente da sua ligação com os grupos sulfídricos de proteínas, levando à degradação da estrutura, inibição da atividade de enzimas ou o deslocamento de um elemento essencial na composição das mesmas, resultando em efeitos de deficiência (Hall 2002, Bermudez *et al.* 2009, Cape 2009). A distribuição dos metais de origem antropogênica no ambiente pode ocorrer pela

emissão, dispersão e deposição do MP, ao qual estão aderidos. O diâmetro aerodinâmico do MP condiciona os processos de dispersão e deposição. As partículas podem ser denominadas ultrafinas (diâmetro aerodinâmico $\leq 0,1 \mu\text{m}$), finas (até $2,5 \mu\text{m}$ - $\text{MP}_{2,5}$) e grossas ($> 2,5 \mu\text{m}$). Contudo, para estabelecimento da qualidade do ar sob ponto de vista de proteção da saúde humana, são monitoradas partículas com diâmetro de até $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) ou até $10 \mu\text{m}$ (MP_{10}) (Pope *et al.* 2009).

Existem pelo menos dez mecanismos distintos que diminuem a toxicidade dos metais em plantas acumuladoras, entre os quais o armazenamento nos vacúolos e a sua complexão com substâncias orgânicas (Rengel 1997). Muitas plantas tropicais vêm sendo estudadas quanto ao seu potencial bioacumulador. Como é o caso de *Psidium guajava* cv. Paluma e *Tibouchina pulchra* (Moraes *et al.* 2002, Domingos *et al.* 2003, Nakazato 2014).

Atualmente, várias bromélias são utilizadas como indicadoras de qualidade do ar, devido à alta capacidade de acumular elementos tóxicos e, em sua maioria, sem demonstrarem danos visíveis. Bromélias do gênero *Tillandsia* são consideradas biomonitoras por acúmulo de metais, em especial Hg, Cu e Zn, e têm sido utilizadas em estudos em São Paulo (Figueiredo *et al.* 2001, 2007), Chile (Cortés 2004) e Argentina (Wannaz & Pignata 2006; Bermudez *et al.* 2009), entre outros. Nesses estudos são identificados diferentes graus de acúmulo de nutrientes e metais nas plantas, bem como seu uso para mapear fontes e distribuição desses elementos na área de estudo.

Uma das principais espécies de *Tillandsia* utilizadas em estudos de monitoramento de metais é a *Tillandsia usneoides*, popularmente conhecida como barba de bode. Figueiredo *et al.* (2001) observaram que a concentração de elementos como Al, As, Cr, Fe, Mo, Sb, Ti, V e Zn tendem a aumentar em plantas de *T. usneoides* expostas em locais com crescentes graus de poluição. Amado-Filho *et al.* (2002), em estudo controlado com plantas de *T. usneoides* em sala com ar enriquecido por mercúrio (Hg) constataram que partículas de Hg foram absorvidas principalmente pelas escamas, superfícies de caule e folhas da *T. usneoides*. A distribuição das escamas ao longo da superfície das folhas da espécie facilita a retenção de partículas atmosféricas na epiderme (Vianna *et al.* 2011). Mais recentemente, Ferreira (2014) utilizou plantas de *T. usneoides* para associar os metais absorvidos pela espécie às fontes de poluição em pontos de Campinas e Paulínia. Sutton *et al.* (2014) concluíram que *T. usneoides* retém mercúrio (Hg) nos tecidos, independentemente da concentração de ar e pode ser

utilizada para detecção de padrões de concentração atmosférica em longos períodos de tempo e numa ampla escala geográfica.

Contudo, há que se considerar a possibilidade de *T. usneoides* não se aclimatar bem às condições ambientais da região de monitoramento, ressaltando a necessidade de busca de novas plantas bioindicadoras, como tem ocorrido na atualidade em relação às espécies de bromélias. Elias *et al.* (2008) avaliaram 11 espécies de Bromélias e concluíram que a *Aechmea coelestis*, *Nidularium innocentii*, *Nidularium krisgreeniae*, *Vriesea carinata*, *Billbergia amoena* e *Canistropsis billbergioides* são capazes de acumular altas concentrações de diferentes metais. Giampaoli *et al.* (2012) testaram plantas de *Aechmea blanchetiana* sob condições controladas de crescimento em meios enriquecidos com Cu e Zn, concluindo que a espécie também apresenta potencial bioacumulador de metais.

O potencial bioindicador de *Aechmea fasciata*, bromélia originária da região tropical e subtropical da América Central e do Sul, sendo encontrada em diversos habitats (Smith & Downs 1974), pode ser testado em regiões tropicais, por ser uma planta ornamental de fácil cultivo, apresentar crescimento rápido e alta capacidade de regeneração ao estresse hídrico, quando comparada com plantas do gênero *Tillandsia* (Vinterhalter & Vinterhalter 1994, Vervaeke *et al.* 2002, Cueva *et al.* 2006). Assim, o presente estudo visou avaliar comparativamente a capacidade acumuladora de nutrientes e metais nas espécies de bromélias epífitas *T. usneoides* e *A. fasciata*, expostas a diferentes fontes poluidoras (industriais, urbanas e agrícolas) na região metropolitana de Campinas (RMC), e determinar se a espécie *A. fasciata* pode ser utilizada como biomonitora.

2. Material e métodos

Plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* (n=5, cada) foram expostas em cinco pontos da Região Metropolitana de Campinas (RMC), em ciclos de 12 semanas durante 22 meses, totalizando 8 exposições (3 realizadas em período seco e 5 em período úmido). As plantas permaneceram sob tela de polietileno (sombrite) 50% e foram irrigadas com água deionizada semanalmente, conforme descrito no Capítulo I.

Ao final de cada exposição, as plantas foram coletadas para análise e substituídas por novas, provenientes de produtores da região. Três indivíduos foram

separados para análises preliminares no início de cada exposição (tempo zero). As plantas obtidas dos produtores foram mantidas em estufa do Núcleo de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

2.1. Análises nutricionais.

A análise nutricional foi realizada em amostras secas em estufa com renovação e circulação de ar (Marconi M035) a 60 °C e moídas em micro-moinho de bola de ágata (Pulverisette 0, Fritsch, Alemanha). As amostras pulverizadas foram divididas em dois frascos de acrílico contendo, quando possível, 2,0 g de material seco cada, sendo uma parte encaminhada ao Departamento de Ciências de Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da USP (ESALQ) para análise de macro (N, K, P, S, Ca e Mg) e micronutrientes (B, Cu, Mn, Zn e Fe) por espectrometria de absorção atômica e outra parte armazenada para a análise dos teores de metais traços.

2.2. Teores de metais traço

As análises dos teores dos metais traço (Ni, V, Co, Pb e Cr) foram realizadas em parceria com o Dr. Eduardo D. Wannaz da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, com apoio financeiro do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE) da CAPES.

No laboratório da Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, amostras mistas dos indivíduos expostos foram preparadas segundo metodologia de Wannaz *et al.* (2011) com modificações. Pesou-se 0,250 g de amostras secas e pulverizadas, para posterior redução a cinzas em forno elétrico Endef (mufla) sob 400 °C por 4h. Em seguida as cinzas foram dissolvidas em solução de ácido nítrico (HNO₃) 21,5% por no mínimo 4 h. A solução resultante foi centrifugada por 20 minutos a 3.500 rpm. Uma alíquota de 450 µL de sobrenadante foi separada e mantida em temperatura ambiente na qual adicionou-se 50 µL de Ga 100 ppm, para padronização. Em placas de acrílico transparentes foram depositados 5 µL da solução com gálio e mantidas em caixas fechadas após secagem. As amostras foram analisadas por Fluorescência de Reflexão Total de Raio-X (TXRF) no Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) em Campinas, SP, Brazil, cujo os limites de detecção do método foram Pb (0,45 ppm), Co (0,45 ppm), Ni (0,10 ppm), Sr (0,50 ppm), V (0,60 ppm) e Cr (0,50 ppm) com R² acima de 0,95 em todos os casos. Amostras padronizadas de Tobacco Leaves (CTA-OTL-1), de ICTJ e CRM 281 e Hay grass IAEV-V-100 foram avaliadas como controle de

qualidade. As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em mg kg^{-1} de massa de matéria seca.

2.3. Background do ambiente e fator de enriquecimento

Os menores níveis detectáveis (backgrounds) de cada elemento químico avaliado na região foram determinados em função de concentrações foliares para ambas as espécies, seguindo o método desenvolvido por Erhardt *et al.* (1996) e adotado pelo VDI (2003) e Klumpp *et al.* (2009). No método, também conhecido como um processo iterativo de avaliação, os backgrounds foram definidos como os menores valores detectados nas plantas nos locais da área em estudo e indicaram a menor concentração passível do ambiente com baixo impacto de poluição.

Inicialmente, os valores da média e desvio padrão de cada elemento foram calculados para cada planta exposta nos locais da RMC (SG, ML, PC, JA e HO), ao longo de todo o período de estudo (8 exposições). Neste capítulo, para simplificar o método de avaliação proposto e atingir o objetivo descrito cada local de exposição foi considerado uma réplica dos dados da RMC. Subsequentemente, os valores calculados foram utilizados na fórmula:

$$L_f = X + (1,96 * DP)$$

Onde L_f é o valor base de cálculo (limiar de filtro), X o valor médio para o local, 1,96 corresponde ao valor do “t de Student” para 95% de confiabilidade dos dados e DP representa o desvio padrão do total de dados. O limiar de filtro determina o valor máximo a ser utilizado no cálculo do Background, eliminando outlier acima do limite. Dessa forma, foram removidos do total de dados os valores maiores que L_f e o procedimento foi repetido até que não houvesse valores excedendo o limiar de filtro. A média aritmética dos valores restantes, somada ao desvio padrão final, foi utilizada como valor de referência, para definir a o valor mínimo detectável de cada elemento em um ambiente com mínima interferência antropogênica (Bc_{RMC}).

Uma vez que as espécies estudadas possuem crescimento lento, suculência e concentrações naturais de alguns dos elementos estudados utilizadas para seu desenvolvimento, as quantidades que efetivamente foram acrescidas à planta durante cada exposição foram calculadas pela razão entre os teores encontrados nas plantas expostas e os teores das plantas do tempo zero (T_0) – antes de serem expostas –

denominado fator de enriquecimento, $FE=C_{Local}/C_{T0}$. Os elementos cuja razão excedeu 1,0 foram considerados enriquecidos.

2.4. Análises estatísticas

O teste de Shapiro-Wilks indicou não haver distribuição normal dos dados de concentração e de enriquecimento para cada elemento analisado, portanto os dados foram submetidos a análises de variância não-paramétrica (teste de Mann-Whitney) para comparação entre as duas espécies e entre os períodos seco e úmido, com o auxílio do software estatístico Sigma Plot 11. Análises não-paramétricas entre os locais foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis para diferenciação espacial do FE pelo programa estatístico Info Stat.

Os resultados de enriquecimento que obtiveram significância estatística entre as espécies e períodos de exposição (seco e úmido), após serem padronizados, foram avaliados por análise multivariadas de agrupamentos (Cluster) e análise de componentes principais (PCA) com auxílio dos softwares Statistica e PCOrd 6.0 respectivamente. As análises objetivaram encontrar afinidades entre os elementos, possivelmente marcadores de fontes de poluição, e a variação destes entre locais e espécies.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 apresenta as concentrações médias dos nutrientes e metais avaliados nas espécies, juntamente com os valores de background (Bc_{RMC}) para cada elemento. A concentração média dos elementos medidos nas plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* decresceu na ordem: $N > Ca > K > S > Fe > Mg > P > Zn > Sr > Mn > Pb > Cu > B > Co > V > Cr > Ni$, com pouca variação entre as espécies. O gradiente deu-se, principalmente, devido às concentrações de macronutrientes, que são essenciais para o desenvolvimento das plantas, seguido pelos valores de micronutrientes e demais metais, com exceção de Fe e Sr.

As plantas de *T. usneoides*, nos períodos úmido e seco, apresentaram valores de N, Ca, S, B, Cu, Fe, Zn, Ni e Co significativamente mais altos do que plantas de *A. fasciata*. Comparações feitas para cada planta entre os dois períodos, indicaram maior sazonalidade na concentração dos elementos em plantas de *T. usneoides* do que em plantas de *A. fasciata*, uma vez que as concentrações dos elementos obtidos pelas plantas de *T. usneoides* foram estatisticamente maiores que o $Bc_{(RMC)}$ dado pela espécie

no período úmido. Ainda, os maiores valores de Ni, Zn e Mg foram observados no período úmido e B, Mn, P e N no período seco para plantas de *T. usneoides*, enquanto apenas N teve maiores valores no período úmido para *A. fasciata* e B, Mg e Ca para o período seco (Tabela 1). Ao agregarmos os valores de background ambiental à variação na concentração obtida nas duas espécies, observa-se que os elementos com valores de background do ambiente (Bc_{RMC}), posicionados sobre a mediana ou à sua esquerda, são P, Ni, Cu, Sr e Pb em *T. usneoides* e N, K, Cr, Pb, V e Mn em *A. fasciata*. Os resultados mostram que pelo menos 50% das amostras analisadas apresentaram concentrações superiores aos valores mínimos do ambiente dos elementos destacados (Figura 1).

A maioria dos estudos que utilizam ou propõem valores de background para comparação são voltados para detecção de valores limites de solo, sedimentos ou ambientes aquáticos (Rodrigues *et al.* 2009), sendo pouco utilizados em biomonitoramento. Contudo, Klumpp *et al.* (2009), utilizaram o background no monitoramento ambiental de países na Europa, determinando os menores valores confiáveis dos elementos encontrado em um ambiente considerado com pouca ou nenhuma interferência antrópica. Nakazato (2014) foi pioneiro no Brasil ao utilizar o background de plantas referência como ferramenta de comparação, em estudos na região industrial de Cubatão. Ambos, apesar de utilizarem diferentes metodologias e usos, provaram que o cálculo de background permite caracterizar o nível de contaminação ambiental a partir da concentração basal ambiental e analisar a eficiência da espécie biomonitora utilizada.

Em vista desses resultados, pode-se associar o maior aporte de poluentes durante a época seca, uma vez que nesse período os valores obtidos para a maioria dos elementos foram maiores do que o valor de Bc , principalmente nas plantas de *A. fasciata*. Este fato está de acordo com os dados de caracterização do ambiente (Capítulo 1) e resultados de Ferreira (2014) que utilizou plantas de *Tillandsia usneoides* para estudos de monitoramento na mesma área, e que sugere, como principal fator, a deposição seca transportada por ventos noroestes.

Ainda, deve-se considerar que a variação nas concentrações medidas nas plantas mantidas nos locais de estudo não exclui o valor basal das folhas, ou seja, a concentração presente naturalmente na planta, de modo que não indica o nível real de absorção ou retenção na superfície foliar de elementos oriundos da poluição. Assim, as concentrações que foram efetivamente acrescidas à planta durante o período de

exposição foram obtidas a partir do cálculo do fator de enriquecimento (FE) de cada elemento na planta (Figura 2).

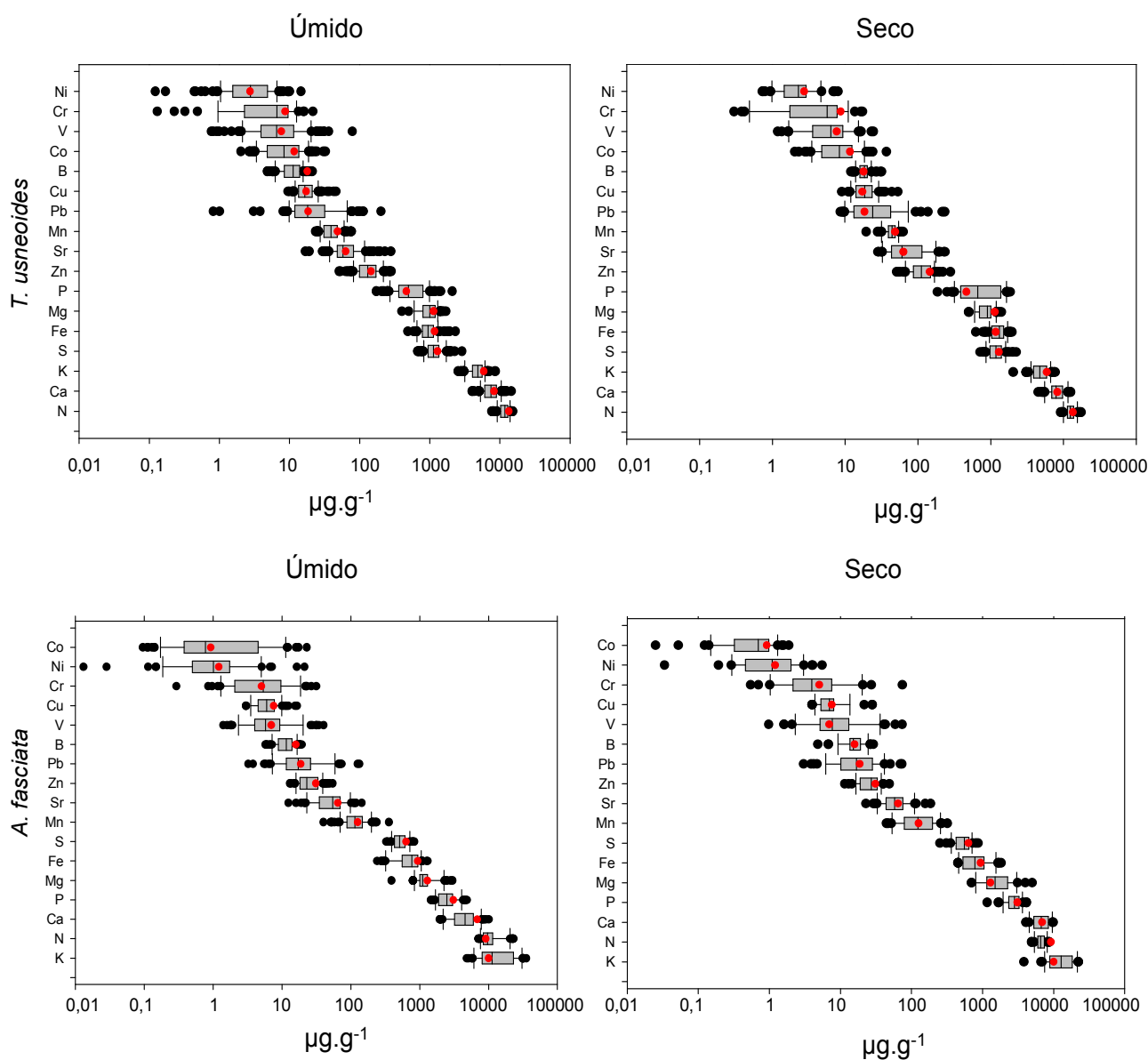


Figura 1. Variação na concentração de elementos ($\mu\text{g g}^{-1}$), em plantas de *T. usneoides* e *Aechmea fasciata* expostas em todos os locais de biomonitoramento da RMC, durante os períodos seco e úmido. A linha que divide os retângulos indica a mediana; o retângulo delimita os 25% dos dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); a barra de erro mostra os valores menores situados entre os percentis de 10 e 25 ou maiores entre os de 75 e 90; os círculos representam os valores extremos (abaixo do percentil de 10 ou acima do de 90). Pontos vermelhos indicam os valores de background da região (BG_{RMC}) para cada elemento.

Os padrões de enriquecimento diferem dos de concentração, apresentando maiores valores de enriquecimento para os metais e o gradiente $Fe > V > Co > Zn > N > Mn > P > Cu > Ni > Mg > Ca > K > S > Pb > B > Cr > Sr$ para plantas de *T. usneoides* e $Cr > Fe > Pb > Ni > Co > V > Cu > Zn > Sr > Mn > B > N > Mg > S > Ca > P > K$ para plantas de *A. fasciata*. Os gradientes de enriquecimento variaram pouco entre as estações secas e úmidas. Ainda, é possível verificar, em pelo menos um dos períodos, não houve enriquecimento em relação ao T0 de Sr, Ca e Cr na maioria das amostras de *T. usneoides* e de K, P, Cr, S, N e Mg na maioria das amostras de *A. fasciata* (Figura 2). Por outro lado, 50% ou mais de amostras de *T. usneoides*, em pelo menos um dos períodos, foram enriquecidas de Fe, Zn, Mn, N, Ni e Co, fato que ocorreu para Zn, Co, Cu, Ni, V, Pb, Fe e Cu no caso de *A. fasciata* (Figura 2).

Os resultados do FE indicam enriquecimento em ambos os períodos, com maior eficiência de acúmulo (valores superiores) durante o período úmido, apesar de que os valores de concentração dos elementos terem sido maiores no período seco e associado ao aporte de MP. O que pode explicar essa diferença é, no caso da *T. usneoides*, a presença de escamas em sobreposição ao longo de sua superfície, essencial para absorção de água e nutrientes e diminuição de sua vulnerabilidade à evapotranspiração por ação do vento (Billings 1904). *A. fasciata*, assim como a *T. usneoides*, também apresenta a superfície foliar cobertas de escamas em ambas as faces, com a função de regular a perda de água (Sanches 2009), contudo os altos valores de FE, independente do período de exposição (seco ou úmido) na espécie pode estar associado à presença do tanque em forma de roseta nas plantas, que permite o acúmulo de água por longos períodos e garante a absorção mais eficiente de nutrientes e água quando comparada à *T. usneoides*.

Os maiores valores de FE, em ambas as espécies, foram observados para metais pesados, incluindo alguns considerados essenciais à planta como o Zn. Os valores de FE foram estatisticamente superiores em plantas de *A. fasciata*, em especial no período úmido, tendo apresentado valores quase cinco vezes maiores do que as plantas de *T. usneoides* para os elementos Cr, Fe, Pb, Ni e V. A análise estatística entre as espécies indicou valores significativamente maiores na maioria dos metais traços para plantas de *A. fasciata* e de macronutrientes para plantas de *T. usneoides* (Tabela 1).

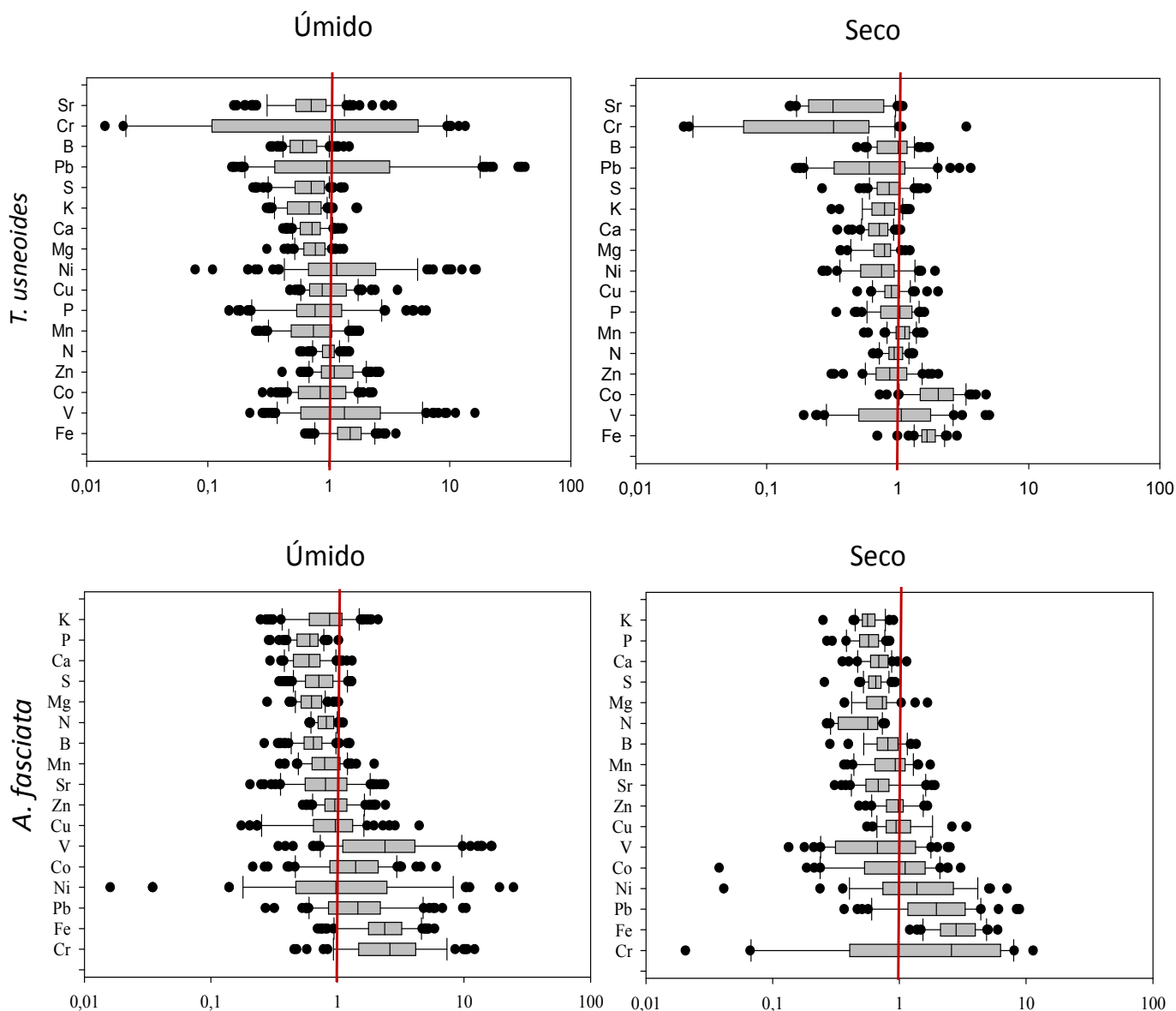


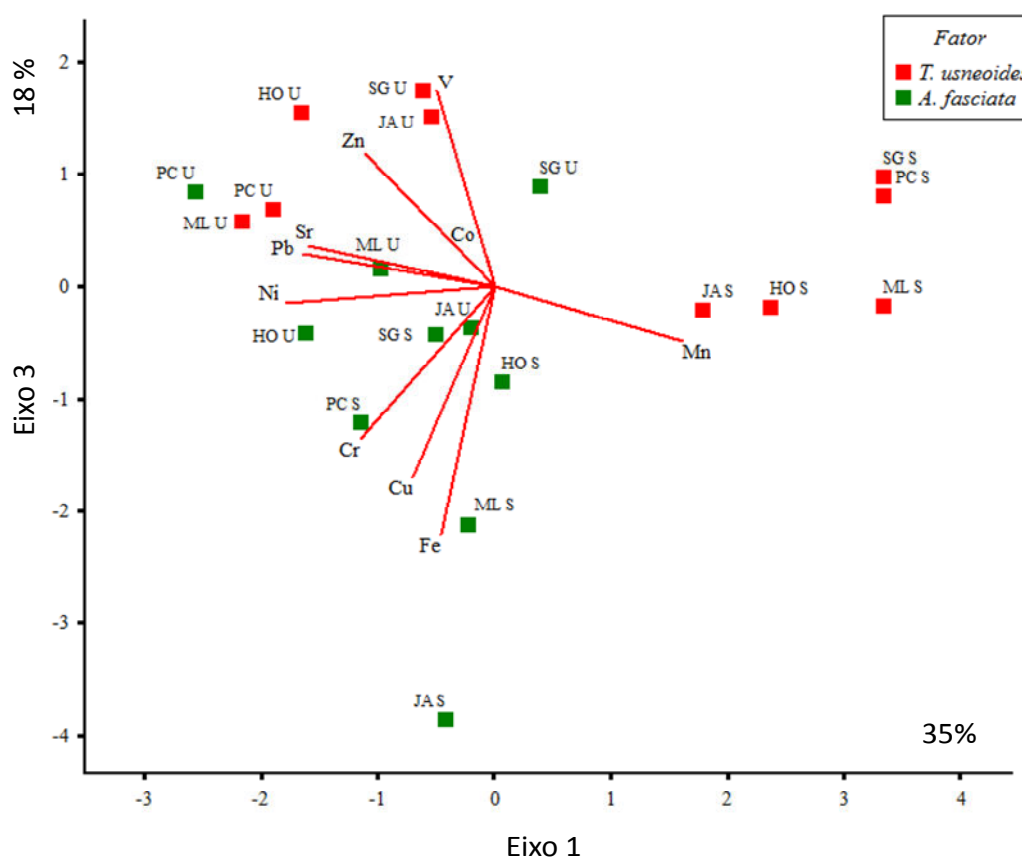
Figura 2. Valores de enriquecimento de nutrientes e metais em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* expostas em todos os locais de biomonitoramento da RMC durante o período de experimento. A linha que divide os retângulos indica a mediana; o retângulo delimita os 25% dos dados acima e abaixo da mediana (percentis de 25 e 75); a barra de erro mostra os valores menores situados entre os percentis de 10 e 25 ou maiores entre os de 75 e 90; os círculos apontam os valores extremos (abaixo do percentil de 10 ou acima do de 90). Valores acima de 1,0 (destacados pela linha vermelha) representam acúmulo do elemento em relação ao estado inicial da planta (T0).

Tabela 1. Concentração e fator de enriquecimento (FE) de nutrientes e metais traços em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* nos períodos seco e úmido na RMC.

Elemento	Período	<i>T. usneoides</i>		<i>A. fasciata</i>	
		Concentração	<i>T. usneoides</i>	<i>A. fasciata</i>	Fator de Enriquecimento (FE)
K	Úmido	4,9 a	15,3 a *	0,67 b	0,71 a *
	Seco	4,9 a	13,7 a *	0,90 a *	0,59 b
N	Úmido	11,6 b *	11,3 a	1,00 a *	0,92 a
	Seco	12,7 a *	6,7 b	0,99 a *	0,51 b
Ca	Úmido	7,8 a *	4,8 b	0,75 a *	0,60 b
	Seco	8,2 a *	6,8 a	0,77 a	0,70 a
P	Úmido	0,6 b	2,6 a *	1,22 a *	0,65 a
	Seco	0,9 a	2,8 a *	1,17 b *	0,57 a
Mg	Úmido	1,0 a	1,3 b *	0,78 a *	0,61 b
	Seco	0,9 b	1,8 a *	0,86 a *	0,74 a
Fe	Úmido	979,1 b *	739,0 a	1,54 b	2,40 a *
	Seco	1305,5 a *	853,4 a	1,76 a	3,13 a *
S	Úmido	1,2 a *	0,5 a	0,71 b	0,68 a
	Seco	1,2 a *	0,5 a	0,86 a *	0,65 a
Mn	Úmido	40,9 b	123,8 a *	0,82 b	0,86 b
	Seco	44,0 a	143,5 a *	1,20 a *	0,92 a
Sr	Úmido	70,9 a *	55,8 a	0,80 a	0,92 a
	Seco	81,1 a	64,2 a	0,49 b	0,80 a *
Zn	Úmido	141,5 a *	25,9 a	1,26 a *	0,97 a
	Seco	117,3 b *	27,2 a	0,88 b	1,00 a
Pb	Úmido	28,4 a	25,1 a	4,77 a	1,77 a *
	Seco	45,6 a *	21,2 a	0,74 b	2,47 a *
B	Úmido	11,2 b *	11,8 b	0,66 b	0,70 b
	Seco	18,7 a *	16,2 a	0,93 a	0,82 a
V	Úmido	9,2 a	8,6 a	2,27 a	3,60 a *
	Seco	7,6 a	12,8 a	1,89 a	0,85 b
Cu	Úmido	17,9 a *	6,5 a	1,06 a	1,06 a
	Seco	20,0 a *	9,0 a	0,92 a	1,24 a
Cr	Úmido	6,7 a	7,3 a	3,17 a	3,84 a *
	Seco	5,8 a	8,0 a	2,37 a	3,54 a *
Ni	Úmido	3,5 a *	2,1 a	2,25 a	2,47 a
	Seco	2,9 a *	1,5 a	0,84 b	1,77 a *
Co	Úmido	9,6 a *	3,2 a	0,98 b	7,92 a *
	Seco	9,6 a *	0,7 a	1,97 a *	1,16 b

Letras comparam valores entre estações do ano para cada espécie. (*) comparam valores entre espécies

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada a partir da correlação dos valores de enriquecimento, permitindo a visualização da afinidade entre os elementos e as espécies. A variabilidade total dos dados foi explicada pelo primeiro (35%) e terceiro eixo (18%) de componentes ($p < 0,05$). A PCA separou claramente os períodos de exposição (“S” – período seco e “U” – período úmido), bem como as afinidades específicas das plantas para cada elemento. V, Zn, Sr e Pb foram associados principalmente as amostras de *T. usneoides* no período úmido. Ni, Cr, Cu e Fe foram associados as amostras de *A. fasciata* em ambos os períodos de análise. Co e Mn foram pouco associados às amostras, sendo o último relacionado apenas com amostras de *T. usneoides* do período seco (Figura 3).



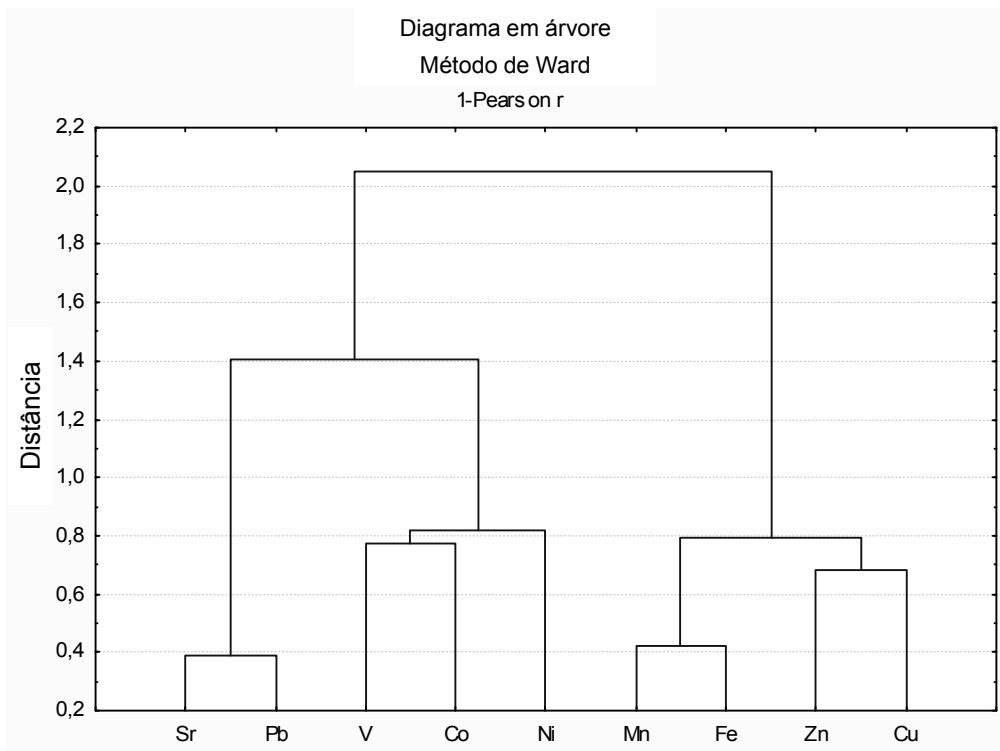
Eixo	Cu	Fe	Mn	Zn	Ni	Co	Pb	Sr	V	Cr	p
1	-0,3406	-0,2271	0,787	-0,543	-0,8767	-0,0352	-0,805	0,7805	0,2401	-0,562	0,0005
3	-0,5946	-0,7735	-0,1675	0,4142	-0,0491	0,0992	0,1036	0,1252	0,6101	-0,4744	0,0095

Figura 3. Análise de Componentes Principais (PCA) com valores de enriquecimento dos metais acumulados por plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* expostas na RMC. Locais de exposição: HO (Holambra), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia) e SG – Mata de Santa Genebra (Campinas).

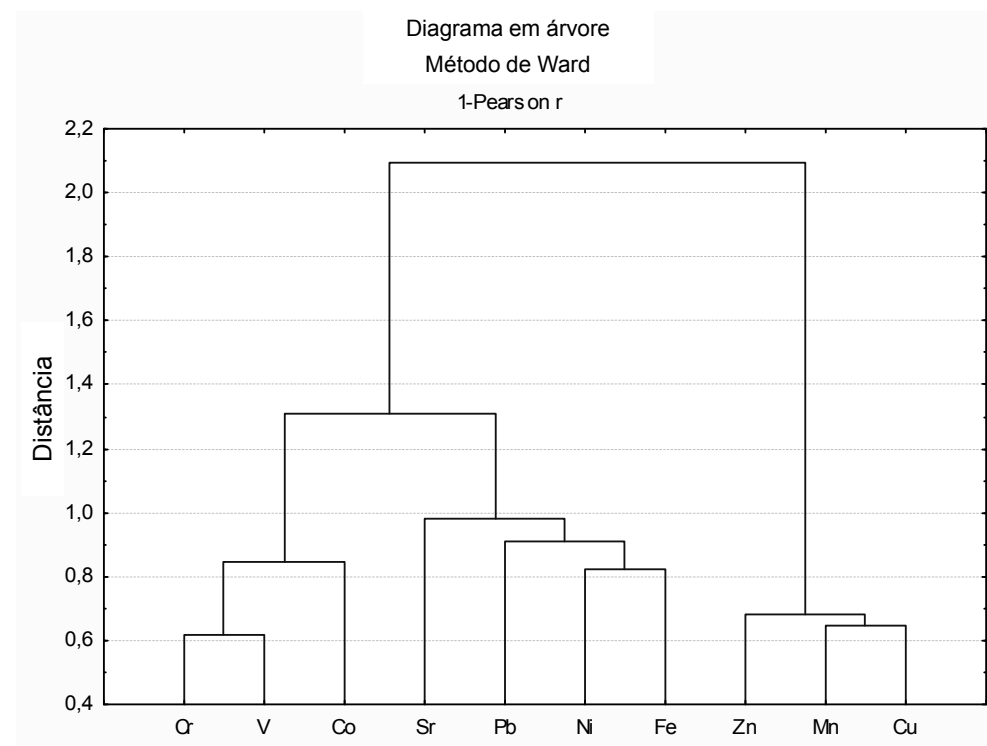
A análise da PCA indicou a maior associação entre Pb, Zn, Sr, Mn e V com *T. usneoides* e Fe, Cu, Cr, e Ni com *A. fasciata*, assemelhando-se aos resultados das comparações estatísticas entre as espécies, que indicaram diferenças significativas no acúmulo de Cr, Sr, Ni, Pb, V e Fe para *A. fasciata* e Zn e Co para *T. usneoides* dependendo do período (úmido ou seco). A presença de amostras de *A. fasciata* proveniente dos pontos ML, SG e PC, sob influência de poluentes urbanos e/ou industriais (descrito no capítulo 1), pode explicar a diferenciação entre as espécies.

A análise estatística do FE entre os locais de estudo mostrou pouca diferença espacial, estando presente para os valores de S e Zn em plantas de *A. fasciata*. Os maiores valores de S foram obtidos em plantas expostas em PC e os menores em SG no período seco. Padrão semelhante foi observado para os valores de Zn no período seco e no período úmido. As plantas de *T. usneoides* apresentaram variação espacial para os elementos Co, Fe e P no período seco, com maiores concentrações em ML e PC. No período úmido houve diferença estatística para Fe e N com maiores concentrações em ML, PC e HO, respectivamente. Os pontos de ML e PC são os locais mais próximos ao pólo industrial, indicando maior influência dessa fonte no aporte dos elementos citados.

A análise de agrupamento (Cluster) feita em cada espécie com as concentrações dos elementos considerados enriquecidos (FE), apresentou separação entre os elementos considerados nutrientes e metais pesados, mas dentro desses grupos os metais enriquecidos foram separados em três subgrupos apresentando pouca diferença entre as espécies (Figura 4).



T. usneoides



A. fasciata

Figura 4. Análise de agrupamento (Cluster) da concentração dos metais que enriqueceram em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* ao longo do experimento.

Nas plantas de *A. fasciata* a subdivisão diferenciou-se principalmente pela inserção de Cr dentro da análise e pelo agrupamento de Fe e Ni com Sr e Pb. Para *A. fasciata* Zn, Mn e Cu formaram um subgrupo; Sr, Pb, Ni e Fe outro e Cr, V e Co o terceiro. Os resultados do agrupamento de elementos em plantas de *T. usneoides* separam melhor as origens de cada elemento, apresentando Sr, Pb, V, Co e Ni de um lado e Mn, Fe, Zn e Cu do outro, separando ainda Mn e Fe, de Cu e Zn. O agrupamento calculado para plantas de *A. fasciata* foi semelhante ao apresentado por *T. usneoides*, com exceção do Fe.

A presença de V e Ni em altas concentrações no ambiente é característica de regiões próximas à indústria petroquímica (Calvo *et al.* 2013, Nakazato *et al.* 2015). Contudo, diversos autores associam o Ni com tráfego de veículos pesados, como carros, ônibus e caminhões, juntamente com Zn, Cu, V, Pb e Cr (Bosco *et al.* 2005, Rajsic *et al.* 2008, Nagajyoti *et al.* 2010, Markert *et al.* 2011, Santos 2013). Essa característica dos elementos deve-se à origem dos poluentes oriundos da queima de óleos, muitos deles lubrificantes (Calvo *et al.* 2013), que são usados tanto em atividades industriais quanto na manutenção e utilização de veículos automotores. O Zn e Cu também são utilizados em pastilhas de freio e pneus, e o seu desgaste contribui em larga escala na contaminação atmosférica de grandes centros urbanos (Figueiredo *et al.* 2004, Hillenbrand *et al.* 2005).

As concentrações de Fe, Mn e Sr podem estar associadas à poeira mineral, principalmente por re-suspensão do solo e geralmente é considerada natural (Figueiredo *et al.* 2004, Watson *et al.* 1998). O Fe e Mn, juntamente com o Cr, Ni, Pb, Zn e Cu, podem indicar fonte poluidora de origem agrícola, uma vez que vários estudos identificaram valores que superaram os limites de referência desses elementos em amostras de vinhaça (Ribeiro *et al.* 2010, Fuess 2013, Christofollett 2013). A vinhaça, ou vinhoto, é o principal resíduo resultante da produção do etanol, e apresenta elevada concentração de matéria orgânica, macro e micronutrientes, características ácidas e corrosivas, e potencial poluidor (Fuess 2013). Sua reutilização como fertilizante em plantações, principalmente de cana-de-açúcar, é prática comum da Região Metropolitana de Campinas. Altas concentrações de Co, Cr e Pb também apresentam origem em queimas de rejeitos, carvão e indústrias (Calvo *et al.* 2013), e neste estudo podem ser associadas, a presença de agricultura canavieira no entorno da maioria dos

pontos estudados, sendo a prática de queimada da palhagem nas lavouras e limpeza das áreas para pastagem comum na região.

A segunda análise de agrupamento evidenciou a marcante variação sazonal no acúmulo de nutrientes pelas plantas, mas apresentou pouca variação espacial (Figura 5). Nas duas espécies formaram-se dois grupos principais, em função do período seco e úmido e, em cada grupo, juntaram-se subgrupos dos locais de acordo com a sua variação. Não houve agrupamento padronizado, apresentando reorganizações dos locais em cada subgrupo. Apenas HO e SG em plantas de *T. usneoides* estiveram associados ao mesmo subgrupo em cada período. Os resultados mostram que a grande quantidade de fontes de poluição, associadas ao relevo plano (Capítulo 1), não permite a distinção clara entre os locais de estudo.

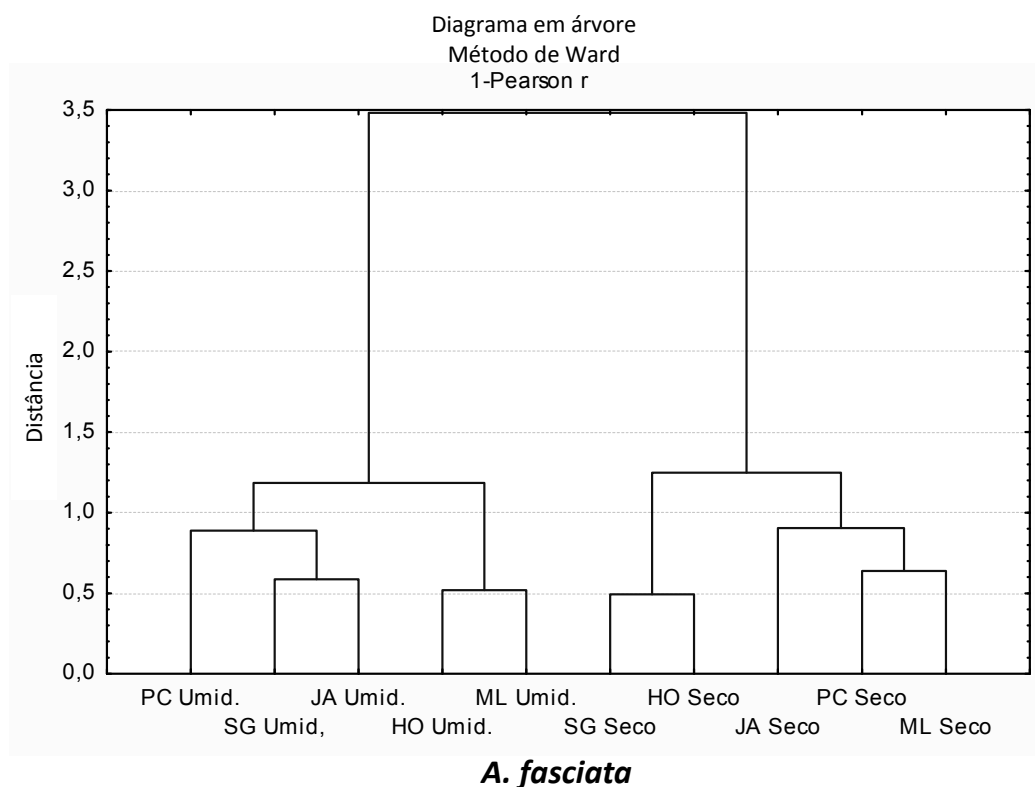
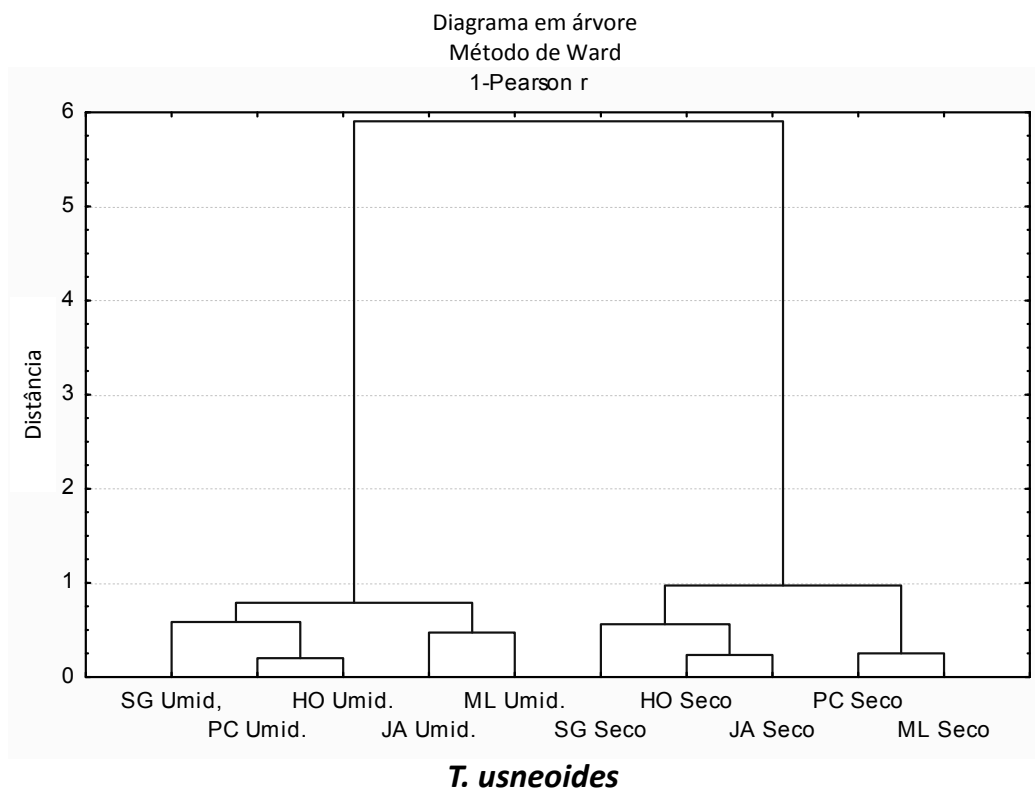


Figura 5. Análise de agrupamento (Cluster) dos pontos de coleta em função da FE em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* no período de experimentação. Locais de exposição: HO (Holambra), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia) e SG – Mata de Santa Genebra (Campinas).

4. Conclusões

As plantas de *T. usneoides* mostraram ser boas indicadoras de poluição por acúmulo de metais traço. As plantas de *A. fasciata* apresentassem eficiência semelhante às plantas de *T. usneoides*; sendo em muitos aspectos superiores à *T. usneoides*, provando ser capaz de acumular maiores quantidades de alguns metais (Ni, Pb, V, Cu, Fe, Cr e Co) do que *T. usneoides*.

Os resultados mostram, que, embora o acréscimo de elementos (FE) nos tecidos foliares das espécies ocorra tanto na estação seca, quanto na úmida, a eficiência de absorção aumenta no período úmido, devido, principalmente, às características morfológicas das espécies (contato direto com a atmosfera, alta densidade de escamas em sua superfície e, no caso de *A. fasciata*, contato mais prolongado com água de precipitação no tanque).

A *A. fasciata* mostrou ser uma alternativa eficiente no monitoramento de ambientes pela capacidade de acúmulo principalmente de metais traço como Cr, Co, Ni, Pb e V, sendo estes últimos conhecidos marcadores de fontes industriais de poluição.

5. Referências bibliográficas

Amado Filho, G.M., Andrade, L.R., Farina, M. & Malm, O. 2002. Hg localisation in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), an atmospheric biomonitor. Atmospheric Environment 36: 881-887.

Bermudez, G., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L. 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. Environmental Research 109: 6-14.

Billings, F. 1904. A study of *Tillandsia usneoides*. Botanical Gazette 38: 99-121.

Bosco, M.L., Varrica, D. & Dongarrá G. 2005. Case study: Inorganic pollutants associated with particulate matter from an area near a petrochemical plant. Environmental Research 99: 18-30.

Calvo, A.I., Alves, C., Castro, A., Pont, V., Vicente, A.M. & Fraile, R. 2013. Research on aerosol sources and chemical composition: Past, current and emerging issues. Atmospheric Research 120 -121: 1-28.

Cape, J.N. 2009. Plants as accumulators of atmospheric emissions. Developments in Environmental Sciences 9: 61-98.

Cape, J.N., Fowler, D. & Davison, A. 2003. Ecological effects of sulfur dioxide, fluorides, and minor air pollutants: recent trends and research needs. Environment International 29: 201-211.

Cape, J.N., Freer-Smith, P.H., Paterson, I.S., Parkinson, J.A. & Wolfenden, J. 1990. The nutritional status of *Picea abies* (L) Karst. across Europe, and implications for forest decline. Trees 4: 211-224.

Christofoletti, C.A. 2013 Avaliação da toxicidade de resíduos industriais e urbanos aplicados na agricultura. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

Cortés, E. 2004. Investigation of air pollution in Chile using biomonitors. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 262: 169-276.

- Cueva, A., Espinosa, C. & Jordan, M.** 2006. Efficient *in vitro* multiplication of *Aechmea* "Little Harv" and *Tillandsia cyanea* Linden ex K. Koch. Propagation of Ornamental Plants 6: 165-169.
- Domingos, M., Klumpp, A., Rinaldi, M.C.S., Klumpp, G., Modesto, I.F., Delitti & W.B.C.** 2003. Combined effects of air and soil pollution by fluoride emissions on *Tibouchina pulchra* Cogn., at Cubatão, SE Brazil, and their relations with aluminium. Plant and Soil 249: 297-308.
- Elias, C., Fernandes, E.A., França, E.J., Bacchi, M.A. & Tagliaferro, F. S.** 2008. Native bromeliads as biomonitors of airborne chemical elements in a Brazilian restinga forest. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 278: 423-427.
- Erhardt, W., Hopker, K.A. & Fischer, I.** 1996. Verfahren zur Bewertung von immissionsbedingten Stoffanreicherungen in standardisierten Graskulturen. Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung 8: 237-240.
- Ferreira, G.G.P.** 2014. *Tillandsia usneoides* (L.) como ferramenta de monitoramento de poluição atmosférico para metais-traço nos municípios de Campinas e Paulínia, estado de São Paulo, SP, Brasil. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental 18: 254-272.
- Figueiredo, A.M.F., Nogueira, C.A., Saiki, M., Milian, F.M. & Domingos, M.** 2007. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L. as biomonitor. Environmental Pollution 145: 279-292.
- Figueiredo, A.M.F., Saiki, M., Ticianelli, R.B., Domingos, M., Alves, E.S. & Markert, B.** 2001. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 249: 391-395.
- Figueiredo, A.M.G., Alcalá, A.L., Ticianelli, R.B., Domingo, M. & Saiki, M.** 2004. The use of *Tillandsia usneoides* L. as bioindicator of air pollution in São Paulo, Brazilian Journal of Chemical Engineering 259: 59-63.
- Fuess, L.T.** 2013. Potencial contaminante e energético da vinhaça: riscos de contaminação ao solo e recursos hídricos e recuperação de energia a partir da digestão

anaeróbia. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

Fürst A., Smidt S. & Herman F. 2003. Monitoring the impact of sulphur with the Austrian bioindicator grid. *Environmental Pollution* 125: 13-19.

Giampaoli, P., Tresmondi, F., Lima, G.P.P., Kanashiro, S., Alves, E.S., Domingos, M. & Tavares, A.R. 2012. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. *Biologia Plantarum* 56: 83-88.

Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1-11.

Hillenbrand, T., Toussaint, D., Böhm, E., Fuchs, S., Scherer, U., Rudolphi, A., Hoffmann, M., Kreißig, J. & Kotz, C. 2005. Discharges of copper, zinc and lead to water and soil analysis of the emission pathways and possible emission reduction measures. Fraunhofer Institute for Systems and Innovation Research ISI, Fraunhofer.

Kaiser W., Dittrich A. & Heber U. 1993. Sulfate concentrations in Norway spruce needles in relation to atmospheric SO₂. A comparison of trees from various forests in Germany with trees fumigated with SO₂ in growth chambers. *Tree Physiology* 12: 1-13.

Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Breuer, J., Vergne, P., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Artola, A.R., Peñuelas, J., He, S., Garrec, J.P. & Calatayud, V. 2009. Airborne trace element pollution in 11 European cities assessed by exposure of standardized ryegrass cultures. *Atmospheric Environment* 43: 329-339.

Klumpp, A., Domingos, M. & Klumpp, G. 2002. Foliar nutrient contents in tree species of the Atlantic Rain Forest as influenced by air pollution from the industrial complex of Cubatão, SP - Brazil. *Water, Air and Soil Pollution* 133: 315-333.

Linder S. 1995. Foliar analysis for detecting and correcting nutrient imbalances in Norway spruce. *Ecological Bulletins* 44: 178-190.

Manninen, S. & Huttunen, S. 2000. Response of needle sulphur and nitrogen concentrations of Scots pine versus Norway spruce to SO₂ and NO₂. *Environmental Pollution* 107: 421-436.

- Markert, B., Wuenschmann, S., Fraenzle S., Figueiredo, A.M.G., Ribeiro, A.P. & Wang, M.** 2011. Bioindication of atmospheric trace metals - With special references to megacities. *Environmental Pollution* 159: 1991-1995.
- Mitchell, R.J., Sutton, M.A., Truscott, A.M., Leith, I.D., Cape, J.N., Pitcairn, C.E.R. & Van Dijk, N.** 2004. Growth and tissue nitrogen of epiphytic Atlantic bryophytes: effects of increased and decreased N deposition. *Functional Ecology* 18: 322-329.
- 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: 367-374.
- Nagajyoti, P.C., Lee, K.D. & Sreekanth, T.V.M.** 2010. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8: 199–216.
- Nakazato, R.K.** 2014. Caracterização de riscos a Floresta Atlântica associados à contaminação atmosférica por elementos tóxicos, no entorno de uma refinaria de petróleo, em Cubatão/São Paulo, com plantas acumuladoras. Tese de Doutorado. Instituto de Botânica, São Paulo.
- Nakazato, R.K., Rinaldi, M.C.S. & Domingos, M.** 2015. Will technological modernization for power generation at an oil refinery diminish the risks from air pollution to Atlantic Rainforest in Cubatão, SP, Brazil? *Environmental Pollution* 196: 489-496.
- Pope C.A., Ezzatti, M. & Dockery D.W.** 2009. Fine particulate air pollution and life expectancy in the United States. *New England Journal of Medicine* 360: 376-386
- Rajšić, S., Mijić, Z., Tasić, M., Radenković, M. & Joksić, J.** 2008. Evaluation of levels and sources of trace elements in urban particulate matter. *Environmental Chemistry Letters* 6: 95-100.
- Rajšić, S., Mijić, Z., Tasić, M., Radenković, M. & Joksić, J.** 2008. Evaluation of the levels and sources of trace elements in urban particulate matter. *Environmental Chemistry Letters* 6: 95-100.
- Rautio P., Huttunen S. & Lamppu J.** 1998b. Seasonal foliar chemistry of northern scots pines under sulphur and heavy metal pollution. *Chemosphere* 37: 271-287.

- Rautio, P. Huttunen, S. & Lamppu J.** 1998a. Effects of sulphur and heavy metal deposition on foliar chemistry of Scots pines in Finnish Lapland and on the Kola Peninsula. *Chemosphere* 36: 979-984.
- Rengel, Z.** 1997. Mechanisms of plant resistance to toxicity of aluminium and heavy metals. *In: Mechanisms of environmental stress resistance in plants* (AS Basra & RK Basra, eds.). Hardwood Academic Publishers, Newark, pp. 241-276.
- Ribeiro, B.T., Lima, J.M., Guilherme, L.R.G. & Julião, L.G.F.** 2010. Lead sorption and leaching from an Inceptisol sample amended with sugarcane vinasse. *Scientia Agricola* 67: 441-447.
- Rodrigues, A.S.L. & Nalini Jr, H.A.** 2009. Valores de background geoquímico e suas implicações em estudos ambientais. *Revista Escola de Minas* 62: 155-165.
- Sanches, L.V.C.** 2009. Desenvolvimento de *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) em função de diferentes saturações por bases no substrato e modo de aplicação da fertirrigação. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Santos, E.D.** 2013. Contribuição ao estudo de poluição ambiental por metais pesados: a área do banhado da Estiva dos Pregos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Smith, L.B. & R.J. Downs** 1974. Flora neotropica. Monograph no 14 (Pitcairnioideae) (Bromeliaceae). Hafner Press, New York.
- Sutton, K.T., Cohen, R.A. & Vives, S.P.** 2014 Evaluating relationships between mercury concentrations in air and in Spanish moss (*Tillandsia usneoides* L.). *Ecological Indicators* 36: 392-399.
- Turunen, M., Huttunen, S., Back, J. & Lamppu, J.** 1995. Acid-rain-induced changes in cuticles and Ca distribution in Scots pine and Norway spruce seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* 25: 1313-1325.
- VDI - Verein Deutscher Ingenieure.** 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants. Fundamentals and aims. VDI 3957/2. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, v.1. 1a, Berlin.

Vervaeke, I., Parton, E., Maene, L., Deroose, R. & De Proft, M. P. 2002. Pollen tube growth and fertilization after different *in vitro* pollination techniques of *Aechmea fasciata*. *Euphytica* 124: 75-83.

Vianna, N.A., Gonçalves, D., Brandão, F., de Barros, R.P., Amado Filho, G.M., Meire, R.O. & Andrade, L.R. 2011. Assessment of heavy metals in the particulate matter of two Brazilian metropolitan areas by using *Tillandsia usneoides* as atmospheric biomonitor. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 416-427.

Vinterhalter, B. & Vinterhalter, D. 1994. True-to-the type *in vitro* propagation of *Aechmea fasciata* Baker. *Scientia Horticulturae* 57: 253-263.

Wannaz, E.D. & Pignata, M.L. 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.

Wannaz, E.D., Carreras, H.A., Pérez, C.A. & Pignata, M.L. 2011 Relationship between trace elemental composition in *Fraxinus pennsylvanicabark* and the incidence of some respiratory diseases in Córdoba, Argentina. *International Journal of Environment and Health* 5: 60-71.

Watson, J. G., Fujita, E. M., Chow, J. C., Zielinska, B. Z., Richards, L. W., Neff, W. & Dietrich, D. 1998. Northern Front Range Air Quality Study Final Report. Desert Research Institute, Reno.

Wellburn, A.R. 1990. Why are atmospheric oxides of nitrogen usually phytotoxic and not alternative fertilizers? *New Phytologist* 115: 395-429.

Capítulo III – Determinação de marcadores fisiológicos de estresse ambiental em bromélias epífitas expostas na Região Metropolitana de Campinas

1. Introdução

As alterações ocasionadas direta ou indiretamente pelos poluentes atmosféricos ou por outras condições ambientais estressantes em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos resultam em diferentes sinais indicadores de perturbação nas plantas, que se iniciam ao nível ultra-estrutural e metabólico (Bussotti *et al.* 2005, Gravano *et al.* 2004), passam para o nível estrutural (Günthardt-Goerg & Vollenweider 2007) e fisiológico, podendo culminar em sintomas visíveis e em alterações de parâmetros de crescimento (Klumpp *et al.* 1994, Alvarez *et al.* 1998, Manning *et al.* 2002, Gravano *et al.* 2003, Oredonvici *et al.* 2003).

Extremos de temperatura, estresse mecânico, luminosidade intensa, ventos, herbicidas e poluentes atmosféricos como O₃, NO_x, SO₂ e material particulado podem intensificar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são altamente nocivas às moléculas vitais. A produção excessiva de EROs, pode originar a condição de estresse às plantas e distúrbios de natureza oxidativa passam a ocorrer, sendo este mecanismo indireto da ação de fatores de estresse sobre as plantas. As plantas podem tolerar o estresse, neutralizando as EROs por intermédio do sistema de defesa antioxidante, que envolve metabólitos e enzimas distribuídos entre os compartimentos celulares, e assim, manter o equilíbrio pró-oxidante x antioxidante. O mecanismo evita danos oxidativos às células em decorrência de processos fisiológicos naturais. (Bray *et al.* 2000, Dat *et al.* 2000, Mittler 2002, Dizengremel *et al.* 2008, Paolletti *et al.* 2009, Castagna & Ranieri 2009, Potters *et al.* 2010).

A ação das EROS nos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), presentes em membranas celulares e lipoproteínas, inicia um processo em cadeia conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). A LPO é, basicamente, a incorporação de oxigênio molecular a um AGPI, que requer oxigênio na forma ativada (por exemplo o oxigênio singlete - ¹O₃) produzindo hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Este pode causar a destruição da estrutura das membranas, falência dos

mecanismos de troca de metabólitos e, por fim, levar à morte celular (Lima & Abdalla 2001). Estruturalmente, verificam-se, entre muitos outros efeitos, o acúmulo de peróxido de hidrogênio e o aumento do número de células mortas nos tecidos foliares (Iriti & Faoro 2008). As principais metodologias utilizadas para a avaliação da LPO e seus efeitos em sistemas biológicos medem a formação de produtos secundários, gerados durante as diferentes fases do processo. A oxidação dos AGPIs é acompanhada pela formação de hidroperóxidos dienos conjugados (HPDC), por exemplo, e estes podem ser detectados pela absorção no UV (Halliwell & Gutteridge 1999). Outra técnica utilizada é o teste do malondialdeído (MDA), que é formado como produto secundário durante a oxidação de AGPI peroxidados, em especial o ácido araquidônico. A sua condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formam produtos, que podem ser determinados por absorção no visível ou por fluorescência (Lima & Abdalla 2001).

Os poluentes também podem ocasionar danos ao fotossistema dos vegetais, resultando na degradação da clorofila e redução da eficiência fotoquímica do PSII (Castagna *et al.* 2001, Moraes *et al.* 2004), com conseqüente redução do crescimento e produção de biomassa das plantas. Pereira *et al.* (2012) mostraram que em plantas de *Salvinia* expostas ao estresse por Cr houve aumentos nas concentrações das clorofilas *a* e *b* e antocianinas totais; entretanto, as concentrações de carotenóides não foram alteradas.

Em plantas tolerantes ao estresse oxidativo, ocorre à intensificação da atividade de enzimas antioxidativas como a superóxido dismutase (SOD), que converte O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e as catalases, que reduzem o H_2O_2 em água. Podem ser intensificadas as reações de oxi-redução do ácido ascórbico e da glutathione, catalisadas por diferentes enzimas, como ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR), que também promovem a redução de H_2O_2 em água (Halliwell & Gutteridge 1989, Bray *et al.* 2000, Dizengremel *et al.* 2008, Castagna & Ranieri 2009, Potters *et al.* 2010). O potencial redox de ácido ascórbico e da glutathione, determinado pela estimativa das razões entre as formas reduzida e total, também auxiliam na determinação do nível de tolerância de plantas ao estresse oxidativo (Burkey *et al.* 2006, Paolletti *et al.* 2008). Plantas capazes de manter altos níveis de ácido ascórbico mesmo sob ação de poluentes são consideradas tolerantes (Kuddus *et al.* 2011). Espécimes sensíveis de *Rhizobium leguminosarum* apresentaram níveis de glutathione inalterados em condições de estresse, enquanto que em espécimes tolerantes a esses valores aumentaram consideravelmente,

mostrando que o aumento da síntese de GSH estaria envolvido na tolerância de metais na espécie (Figueira *et al.* 2005).

Plantas do gênero *Tillandsia* são consideradas potenciais biomonitoras, apropriadas para climas tropicais e subtropicais, devido suas características fisiológicas (metabolismo CAM), ampla distribuição geográfica e alta capacidade acumuladora de nutrientes e metais. Contudo, além da capacidade de acúmulo de elementos traços também devem ser medidos parâmetros fisiológicos, uma vez que estes podem influenciar a captação de elemento e, conseqüentemente, deteriorar a qualidade da pesquisa (Smodi *et al.* 2004).

Tillandsia usneoides (L.) L., tem sido utilizada como bioacumuladora de poluição atmosférica, devido à sua necessidade absorver água e nutrientes diretamente do ar, acumulando poluentes presentes no ambiente (Calasans & Malm 1997). Entretanto, poucos estudos avaliam sua capacidade monitora em função de mudanças fisiológicas/metabólicas e pouco se sabe sobre seu sistema antioxidante, metabolismo secundário ou a eventual participação desses sistemas no processo de aclimação da espécie aos estresses ambientais.

Aechmea fasciata, por se tratar de bromélia epífita com características semelhantes à *Tillandsia usneoides* (fisiologia CAM, presença de escamas foliares e adaptação a ambientes tropicais) e por outras espécies do mesmo gênero terem apresentado características bioindicadoras (Elias *et al.* 2008, Giampaoli *et al.* 2012) é uma boa candidata para estudo de potencial biomonitor. A espécie apresenta crescimento mais rápido que o de *T. usneoides*, alta capacidade de regeneração ao estresse hídrico e fácil reprodução *in* e *ex vitro*, tornando-a viável para utilização com propósitos científicos.

Embora o metabolismo CAM das espécies estudadas favoreça o desenvolvimento das plantas em ambientes estressantes, não apresentando influência direta dos poluentes na condutância estomática e/ou no surgimento de cloroses foliares (Nyman *et al.* 1990, Benzing *et al.* 1992), alguns trabalhos mostraram que poluentes podem ocasionar deformação de estruturas epidérmicas de bromélias epífitas. Strehl & Arndt (1989) observaram danos nas células centrais de escamas de *Tillandsia aeranthus* e *Tillandsia recurvata*, após fumigação com SO₂. Alves *et al.* (2008) encontraram deformações estruturais nas escamas de *Tillandsia usneoides* expostas em ambientes com alta concentração de O₃.

Deste modo, este estudo objetivou determinar possíveis alterações bioquímicas e fisiológicas, ocorrentes em *Tillandsia usneoides* e *Aechmea fasciata*, que possam vir a ser utilizadas como marcadoras de estresse por poluentes atmosféricos.

2. Material e Métodos

Plantas das espécies *Tillandsia usneoides* e *Aechmea fasciata* foram expostas em cinco locais da Região Metropolitana de Campinas (RMC) (ML – Fazenda Meia Lua e PC – Paulínia Centro: Paulínia; JA: Jaguariúna; HO: Holambra; SG – Mata de Santa Genebra: Campinas), sob tela de sombreamento 50%, por 22 meses em ciclos de 12 semanas, totalizando 8 exposições (3 em período seco e 5 em período úmido) com irrigação semanal, como descrito no capítulo I. A cada exposição, cinco plantas de cada espécie foram mantidas em casa de vegetação pertencente ao Núcleo de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica, São Paulo/SP, sob condições ótimas de temperatura e umidade (REF) para fins de referência.

Ao término de cada exposição, as plantas foram coletadas para análise e substituídas por novas, originadas de produtores da região (tempo zero). As plantas do tempo zero foram mantidas em estufa agrícola de vidro no Núcleo de Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica e avaliadas a cada início de exposição.

As análises foram realizadas nos laboratórios do Núcleo de Ecologia do Instituto de Botânica, São Paulo/SP.

2.1. Análises biométricas

As plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata*, após o período de exposição, foram trazidas do campo separadamente em sacos plásticos transparentes e subdivididas em amostras para as análises fisiológicas e bioquímicas. As plantas foram pesadas em balança analítica de precisão para registro dos valores de massa de matéria fresca; posteriormente, inseridas em sacos de papel kraft e mantidas em estufa com circulação e renovação de ar (Marconi MA0035) sob 60 °C até peso constante, para obtenção da massa de matéria seca e análise de razões entre massas de matéria seca e fresca (MS/MF).

A taxa de crescimento relativo para as plantas expostas foi calculada pela equação:

$$\text{TCR} = [(\text{Ln}_2 - \text{Ln}_1) / t_2 - t_1]$$

Onde $\text{Ln}_2 - \text{Ln}_1$ = logaritmo natural do valor final – logaritmo valor inicial (T0); $t_2 - t_1$ = número de dias expostos (Benincasa 2003). Os resultados foram expressos em $\text{g}^{-1} \text{dia}^{-1}$ (grama seca adquirida em função das gramas do T0 por dia de exposição).

Nas plantas de *A. fasciata* foram contabilizados o número inicial e final de folhas.

2.2. Conteúdo de Ácido Ascórbico

O conteúdo de ácido ascórbico total, reduzido (AA) e oxidado (DHA) foi obtido, segundo o método de López *et al.* (2005), na manhã seguinte da coleta, a partir de amostras de 3 plantas frescas de cada espécie, em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com modificações para cada espécie. Amostras de 0,30 g de material fresco de *A. fasciata* e 0,50 g de *T. usneoides* foram homogeneizadas em 6,0 mL de solução HPO_3 6% contendo 0,5 mM EDTA. Após centrifugação a 10.000 rpm por 10 min à 2 °C, o sobrenadante foi filtrado em papel filtro Whatman n° 41 e diluído em solução 1:4 em de água deionizada. A solução foi filtrada em filtro Milex com 0,22 μm de diâmetro e injetada no HPLC para leitura dos teores de AA. Alíquota do extrato anteriormente filtrado foi completamente reduzida com a adição de DTT (0,2%), K_2HPO_4 (45%) e H_3PO_4 (2M), e mantida no escuro por 10 min. A solução resultante foi injetada no HPLC para obtenção dos teores de ácido ascórbico total (AA_{total}). O teor de ácido ascórbico oxidado (DHA) foi determinado pela subtração dos valores dos teores de AA_{tot} e AA. Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de massa de matéria seca.

2.3. Conteúdo de Glutathione

O conteúdo de glutathione reduzida (GSH) foi obtido de 0,5 g de 3 plantas previamente congeladas à -80 °C. As amostras foram trituradas em solução de tampão fosfato de potássio e ácido sulfosalicílico (0,1%), centrifugadas a 11.000 rpm por 15 min, a 2 °C e lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda $\lambda = 412 \text{ nm}$ (Israr *et al.* 2006) com modificações. Do sobrenadante extraído na centrifugação foram

utilizados 250 μL em solução contendo EDTA (0,5 mM) e DTNB (0,3 mM) e lida à $\lambda = 412$ nm após exposição à luz por 5 min. Após a primeira leitura, as amostras foram totalmente reduzidas com solução de NADPH e a enzima glutathiona reductase (GR); após período, de exposição à luz por 20 min. A segunda leitura foi realizada em comprimento de onda $\lambda = 412$ nm e o conteúdo de glutathiona oxidada (GSSG) obtido pela diferença das duas leituras.

As amostras foram realizadas em duplicata e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ massa de matéria seca.

2.4. Teores de pigmentos

Os conteúdos de pigmentos fotossintetizantes foram obtidos de amostras de tecido foliar previamente congeladas de cinco plantas, onde 0,150 g de massa de matéria fresca foram trituradas em 10,0 mL de álcool etílico 96%, centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. a 2 °C e lidas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Japão) em comprimentos de onda $\lambda = 649$ nm (clorofila *a*) e 665 nm (clorofila *b*) segundo Carreras & Pignata (2001) e Pignata *et al.* (2002). Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de massa de matéria seca.

2.5. Teores de HPDC

Para a análise dos teores de HPDC foi utilizado o mesmo extrato etanólico da determinação dos teores de pigmentos, onde alíquota dos extratos foi diluída na proporção 1:15 em álcool 96% e lido em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800, Japão) em comprimento de onda $\lambda = 234$ nm. Os teores de HPDC foram calculados segundo Levin & Pignata (1995) partir da constante $\varepsilon = 2,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de massa de matéria seca.

2.6. Teores de MDA

A análise de peroxidação lipídica foi realizada se considerado os teores de malonaldeído (MDA) contidos nas folhas das espécies expostas segundo as metodologias propostas por Heath & Packer (1968) e Buege & Aust (1978), com

modificações. Amostras de 0,350 g de folhas previamente congeladas de três plantas das espécies selecionadas aleatoriamente em cada exposição, foram homogeneizadas manualmente com 2,6 mL de solução de ácido tricloroacético 0,1% e PVPP 20%. O extrato obtido foi centrifugado à 10.000 rpm por 5 min. em temperatura ambiente. Em seguida 250 µL de sobrenadante foram adicionados a 1,0 mL da solução de ácido tricloroacético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,5% e mantida em banho-maria por 30 min. a 90 °C, e posterior resfriamento em cuba com gelo por 5 min. As amostras resfriadas foram centrifugadas por 10 min. a 10.000 rpm e o extrato lido em espectrofotômetro (Gênese 10S UV-Vis, Thermo Scientific – USA) em comprimentos de onda $\lambda = 535$ e 600 nm. As análises foram realizadas em duplicata e os teores de MDA calculados a partir da constante $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nMol g⁻¹ de massa de matéria seca.

2.7. Análises estatísticas

Tendo em vista que o teste de Shapiro-Wilks indicou não haver distribuição normal dos dados, optou-se por utilizar métodos não paramétricos para as comparações estatísticas (teste de Mann-Whitney para comparação entre períodos seco e úmido de exposição, e teste de Kruskal-Wallis para comparação entre áreas de estudo, seguido do teste Dunn's de comparações múltiplas), com o auxílio do software estatístico Sigma Stat 11.0. Em seguida foi realizada a análise de componentes principais (PCA) para indicar a afinidade dos parâmetros estudados com as espécies e locais de exposição com o programa estatístico PCOrd 6.0. A matriz contendo todos os resultados, após padronização pelo programa Statistica, foi utilizada na realização da análise de agrupamento (dendrograma pelo método de Ward e a distância medida por análise de variância de 1 Pearson-r) a fim de indicar as possíveis relações entre os parâmetros, bem como sequências temporais e espaciais.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análises biométricas

Os valores de MS/MF para *T. usneoides* expostas na RMC foram significativamente menores aos observados nas plantas referência durante o período úmido e, embora tenham sido observados altos valores da razão nas plantas expostas em JA, não variaram estatisticamente no período seco. Quando avaliada a variação entre os locais, as plantas de *T. usneoides* diferiram apenas entre SG, ML e HO, sendo os menores valores encontrados em HO. Para a espécie *A. fasciata*, as plantas expostas na RMC diferiram das plantas referência em ambos os períodos de exposição, sendo os maiores valores observados nas plantas expostas em PC (Tabela 1).

Plantas de *T. usneoides* apresentaram crescimento lento, com taxa de crescimento relativo (TCR) 50% menor que a observada para *A. fasciata*. A espécie não apresentou diferença na TCR entre os locais, contudo os valores foram estatisticamente superiores no período seco do que no período úmido. *A. fasciata* apresentou no período úmido os maiores valores de TCR em SG e os menores em PC. No período seco, a espécie apresentou valores significativamente maiores para plantas expostas em REF, ML e JA, embora as plantas expostas em todos os locais apresentassem valores de TCR superiores aos das plantas no período úmido (Tabela 1). Apesar de não significativos, os menores valores de número de folhas, em *A. fasciata* foram observados nas plantas expostas em PC em ambas as épocas de exposição (Tabela 1).

Muitas espécies com fisiologia CAM têm a expressão do metabolismo consideravelmente reforçada durante as estações secas, com aumentos significativos na acidez titulável durante a noite, redução na fotossíntese durante o dia e aumento da fixação de CO₂ no escuro (Borland *et al.* 1992, Borland *et al.* 1996). Além disso, plantas CAM transpiram principalmente durante a noite (Osmond 1978) e a capacidade transpiratória da planta pode ser limitada ou interrompida sob condições de alta umidade no ar (De Proft 2006). No caso específico de *A. fasciata*, foi verificado que a espécie não tolera umidade próxima da capacidade de campo do substrato, quando no processo de cultivo comercial (Sanchez 2009), o que pode explicar em parte a menor taxa de crescimento da espécie expostas tanto no local de referência (REF) quanto nos locais da RMC no período úmido em comparação com o seco.

O metabolismo CAM, associado com o maior aporte de material particulado e NO₂ durante o período seco (dados apresentados no capítulo 1), sugerem que a disponibilização de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, também presentes nos poluentes avaliados no estudo, induziram o aumento de massa de matéria seca e do crescimento em relação ao estado inicial. Dados semelhantes foram observados por Moraes *et al.* (2002) em plantas de *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae), expostas em Cubatão.

Tabela 1. Dados médios de crescimento (MS/MF - razão massa de matéria seca/fresca, TCR - taxa de crescimento relativo e NF - número de folhas) das plantas expostas em RMC e referência (REF).

Período	Local	<i>T. usneoides</i>			<i>A. fasciata</i>		
		MS/MF	TCR g.g ⁻¹ .dia ⁻¹ ms	NF	MS/MF	TCR g.g ⁻¹ .dia ⁻¹ ms	NF
SECO	REF	0,278	0,006 *	-	0,175	0,014 *	10
	ML	0,247	0,007 *	-	0,179 * b	0,014 *	10
	JA	0,407	0,007	-	0,200 *ab	0,014 *	9
	HO	0,240	0,007 *	-	0,225 *ab	0,011	9
	SG	0,264	0,007 *	-	0,195 *ab	0,011	9
	PC	0,285	0,007 *	-	0,295 * a	0,008	9
ÚMIDO	REF	0,362 *	0,004	-	0,224 *	0,006	10
	ML	0,279 *a	0,004	-	0,156 ab	0,007 ab	10
	JA	0,269 ab	0,003	-	0,154 b	0,007 ab	10
	HO	0,242 b	0,005	-	0,141 b	0,009 ab	10
	SG	0,281 a	0,004	-	0,145 ab	0,008 a	10
	PC	0,277 ab	0,004	-	0,179 a	0,006 b	9

(*) indicam valores significativamente maiores do que os do outro período de coleta; letras distintas indicam diferença estatística entre os locais da RMC. Locais de exposição: HO (Holambra), ML – Fazenda Meia Lua (Paulínia), JA (Jaguariúna), PC (centro de Paulínia), SG – Mata de Santa Genebra (Campinas) e Plantas Referência – expostas no Instituto de Botânica, SP (REF).

3.2. Parâmetros bioquímicos

A Tabela 2 resume os dados das análises estatísticas dos parâmetros bioquímicos analisados nas espécies *T. usneoides* e *A. fasciata*, destacando as diferenças significativas entre os períodos de exposição e locais de estudo.

Os resultados dos teores de AA, DHA e AA/AA_{total} foram significativamente maiores no período seco, principalmente para as plantas de *T. usneoides*, enquanto os demais parâmetros (GSH, GSSG, GSH/GSH_{total}, Cl *a*, Cl *b*, Cl *b/a*, HPDC e MDA) apresentaram valores significativamente maiores no período úmido.

As plantas de *T. usneoides* apresentaram variabilidade espacial para os parâmetros AA/AA_{total}, GSH, GSSG, GSH/GSH_{total}, Cl *b*, HPDC e MDA, em sua maioria no período úmido, com exceção das razões e dos teores de MDA. As plantas de *A. fasciata* apresentaram variações espaciais para os parâmetros AA, GSH, GSH/GSH_{total}, Cl *a*, HPDC e MDA nos períodos úmido e seco.

Tabela 2: Parâmetros fisiológicos das plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* entre os períodos seco e úmido (teste de Mann-Whitney) e entre locais de exposição (teste de Kruskal-Wallis).

Elemento	Espécie	Seco						Úmido					
		REF	ML	JA	HO	SG	PC	REF	ML	JA	HO	SG	PC
AA (mg g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	0,79a*	1,15a*	0,62a	0,87a	0,95a*	1,07a	0,21a	0,34a	0,32a	0,56a	0,50a	0,73a
	<i>A. fasciata</i>	1,09b	1,78ab	2,77a	1,98ab	2,57a*	2,71ab	0,70b	1,98ab	2,39ab	1,80ab	1,03ab	2,53a
DHA (mg g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	0,11a	0,22a	0,29a*	0,40a*	0,50a	0,60a*	0,06a	0,06a	0,06a	0,09a	0,08a	0,07a
	<i>A. fasciata</i>	0,45a	0,65a	0,55a	0,66a	0,40a	0,98a*	0,27a	0,39a	0,27a	0,48a	0,55a	0,13a
AA/AAtotal	<i>T. usneoides</i>	1,38a*	1,22ab	0,55b	0,73ab	1,35ab	0,64b	0,76a	0,77a	0,86a	0,89a	0,83a	0,95a*
	<i>A. fasciata</i>	0,76a	0,87a	0,88a	0,75a	0,90a*	0,82a	0,76a	0,84a	0,91a	0,78a	0,74a	0,87a
GSH (μmol g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	0,82b	1,77a	2,19a	1,98a	2,18a	1,75a	1,18c*	1,88b	2,65ab	2,34ab	1,92b	3,28a*
	<i>A. fasciata</i>	2,04a	1,97a	3,40a	2,41a	2,81a	3,42a	3,38b*	7,55a*	7,82a*	8,34a*	7,88a*	7,11a*
GSSG (μmol g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	5,83a	6,16a	5,04a	5,60a	6,26a	4,63a	5,05b	6,27a	5,89ab	6,54a*	5,73ab	5,46ab
	<i>A. fasciata</i>	9,25a	8,14a	8,88a	8,11a	8,56a	3,88a	6,51a	8,13a	7,98a	7,64a	7,08a	6,66a
GSH/GSHtotal	<i>T. usneoides</i>	0,13c	0,23b	0,33a	0,26ab	0,27ab	0,28ab	0,18c*	0,23bc	0,29ab	0,25bc	0,24bc	0,37a
	<i>A. fasciata</i>	0,18b	0,17b	0,27ab	0,23b	0,25ab	0,53a	0,40a*	0,48a*	0,52a*	0,52a*	0,56a*	0,51a
Cl a (mg g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	1,41a	1,29a	1,23a	1,01a	0,96a	0,84a	1,04a*	1,16a	1,43a	1,43a	1,63a	1,03a
	<i>A. fasciata</i>	2,30a	1,66a	1,25a	1,38a	1,63a	1,10a	2,32b	2,86ab*	3,14ab*	2,96ab*	3,30a*	2,37ab*
Cl b (mg g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	0,77a	0,61a	0,36a	0,70a	0,44a	0,59a	0,91b	1,23ab	1,73ab*	1,72ab	1,76a*	1,90b
	<i>A. fasciata</i>	1,19a	0,87a	0,87a	0,78a	1,02a	0,73a	2,11a*	2,56a*	3,62a*	2,87a*	3,07a*	2,19a*
Cl b/a	<i>T. usneoides</i>	0,65a	0,53a	0,47a	0,79a	0,48a	0,72a	0,75a	0,91a*	1,07a*	1,00a*	1,05a*	0,80a
	<i>A. fasciata</i>	0,69a	0,60a	0,80a	0,63a	0,85a	1,95a	0,94a*	0,88a*	1,10a	0,93a*	0,96a	0,90a
HPDC (μmol g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	22,8,a	27,8a	20,5a	30,4a	23,5a	21,7a	12,7c*	16,4bc*	24,8a	20,6ab*	16,6bc*	23,5ab
	<i>A. fasciata</i>	17,4b	31,9a	31,4a	29,6a	28,9b	34,9a	16,0b	28,7a	33,2a	42,9a	52,4a	45,7a
MDA (nmol g ⁻¹ ms)	<i>T. usneoides</i>	34,1c	59,5ab	64,8ab	116a	75,5ab	55,5bc*	40,4c*	64,0b	75,0a	81,8a	47,8bc*	72,2a
	<i>A. fasciata</i>	139,7a	174,9a	173,5a	152,8a	177,0a	153,4a	131,6b	186,2a	177,0a	188,0a	177,3a	164,8ab

Letras comparam valores entre locais de exposição para cada espécie.

(*) comparam valores entre períodos de exposição (seco e úmido) para cada espécie;

3.2.1. Defesas antioxidantes

As maiores concentrações de ácido ascórbico e glutathiona foram observadas nas plantas de *A. fasciata* em ambos os períodos de exposição e apresentaram variação espacial nas espécies (Figura 1).

Os valores de AA e DHA foram estatisticamente maiores no período seco para as espécies, observando-se maiores valores de AA em plantas expostas em SG e de DHA em plantas expostas em PC. *A. fasciata* também apresentou valores significativamente maiores de AA em relação à referência quando expostas em JA no período úmido e JA e SG no período seco, apresentando maior atividade antioxidante nas plantas expostas nas áreas (Tabela 2). Os teores de AA foram superiores aos de DHA em todos os períodos de exposição, indicando a rápida capacidade de recuperação do sistema antioxidante da planta, repondo o substrato necessário para degradação das EROs.

A razão AA/AA_{total} variou entre 0,7 e 0,9 para as espécies durante o período úmido e apenas para *A. fasciata* no período seco. Valores menores (entre 0,5 e 0,7) foram observados em plantas de *T. usneoides* expostas em JA e PC durante o período seco. Os valores de razão próximos de 1,0 indicam maior nível de tolerância a ambientes hostis, por apresentarem maiores concentrações de AA, em detrimento dos níveis de DHA, e a maior capacidade de reposição de substrato para proteção antioxidante (Keller & Schwager 1977). Bray *et al.* (2000) afirmaram que plantas tolerantes a altas concentrações de metais pesados tendem a apresentar altos teores de moléculas e atividade antioxidantes.

Plantas de *T. usneoides* apresentam naturalmente alta atividade antioxidante devido a presença de AA e caroteno na composição química do seu acervo metabólico (Witherup *et al.* 1995) e por isso também vem sendo avaliada segundo seu potencial medicinal (Vieira & Keplan 2013). Por outro lado, não há histórico de estudos metabólicos dessa natureza em plantas de *A. fasciata*.

Burkey *et al.* (2006) determinaram que a síntese de quantidades suficientes de AA, a manutenção do estoque de AA e/ou a capacidade de acumular AA no apoplasto das folhas são os três principais aspectos do metabolismo do ácido ascórbico que contribuíram para elevar a eficiência das defesas de plantas silvestres (*Rudbeckia*

laciniata L., *Verbesina occidentalis* Walt. e *Asclepias exaltata* L.) nativas dos EUA contra o estresse de ozônio. Baixos teores de AA, e consequente aumento do DHA, estão correlacionados com o aumento da susceptibilidade das plantas a condições ambientais adversas além da poluição do ar (Keller & Schwager 1977). O ascorbato está presente nas paredes celulares das folhas, e vários estudos sugerem que a molécula fornece a primeira linha de defesa contra o O₃ e o SO₂ (Castillo & Greppin 1988, Takahama *et al.* 1992, Luwe *et al.* 1993).

Aumentos na atividade antioxidante em plantas com fisiologia CAM, principalmente nos períodos secos, podem ocorrer devido ao estresse hídrico e aos maiores níveis de radiação solar (González-Salvatierra *et al.* 2010). Entretanto, a presença de sombrite e irrigação semanal das plantas expostas (Capítulo 1) diminuíram essa possibilidade de ocorrência de estresse hídrico às plantas no presente estudo. Segundo Guzy & Heath (1993), maiores concentrações foliares de ácido ascórbico indicam menor sensibilidade da planta à poluição. Assim, os menores valores de AA observados no período seco indicam maior estresse das plantas nesse período e menor sensibilidade nas plantas de *A.fasciata*.

As reações envolvendo AA em plantas mais sensíveis do que espécies de bromélias, como *Nicotiniana tabacum* (Bel W3) e *Ipomoea nil* (Scarlat O'Hara), são importantes para conferir maior tolerância contra o estresse oxidativo, em especial pelos induzidos por O₃ (Dafré-Martinelli *et al.* 2011, Dias *et al.* 2011). Segundo os autores, plantas com danos foliares visíveis são caracterizadas por baixos níveis de AA e DHA, resultados não observados nas plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata*. Plantas de *Aechmea blanchetiana* submetidas ao estresse por metais pesados, em ambiente controlado, apresentaram alterações significativas nos teores de AA, com o aumento da concentração de Cu, relacionado à elevação da tolerância da espécie a metais pesados (Giampaoli *et al.* 2012). O que pode justificar os maiores teores durante o período úmido em plantas de *A. fasciata*.

Os valores de glutatona oxidada (GSSG), ao contrário do observado para os teores de AA, foram superiores aos valores de glutatona reduzida (GSH) para as duas espécies. Os valores de GSH das plantas de ambas as espécies expostas nos pontos da RMC diferiram estatisticamente das plantas referência nos dois períodos de exposição. Enquanto os teores de GSSG das plantas de *T. usneoides* expostas em HO e ML foram

estatisticamente superiores aos das plantas referência, e apenas no período úmido, os teores de GSSG não diferiram nas plantas de *A. fasciata*.

A razão GSH/GSH_{total} das plantas de *T. usneoides* expostas nos locais da RMC não diferiu estatisticamente entre os períodos úmido e seco, mas diferiu significativamente das plantas referência no período úmido. No período seco, as plantas de *T. usneoides* expostas em PC e JA diferiram significativamente das plantas referência; em PC, foram observados os maiores valores em comparação aos demais locais de exposição. As plantas de *A. fasciata* apresentaram maiores variações entre os períodos seco e úmido, sendo estatisticamente superiores no período úmido. Apenas no período seco foi observada variação espacial na razão, sendo os maiores valores também observados em PC, que diferiram estatisticamente das plantas referência. Os resultados podem estar diretamente relacionados com a capacidade de acúmulo foliar de metais dessas espécies (dados incluídos no Capítulo II). Diversos trabalhos associaram teores de metais com concentrações foliares de glutathiona.

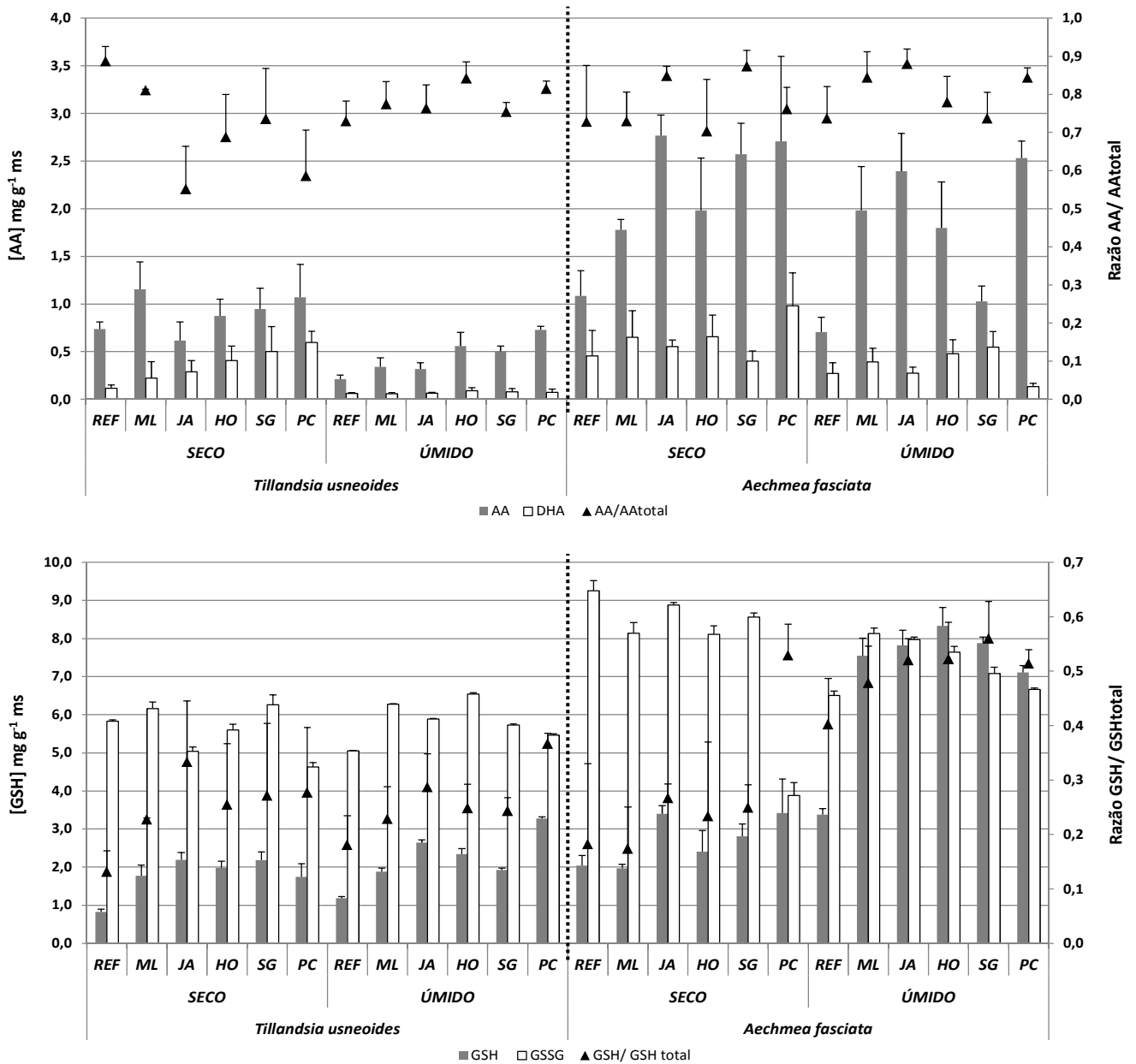


Figura 1. Concentrações de ácido ascórbico (A) e glutationa (B) em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* expostas em RMC nas épocas seca e úmida ao longo do período de experimento. Ácido ascórbico reduzido (AA); ácido ascórbico oxidado (DSH); razão entre ácido ascórbico e teores totais (AA/AA_{total}); glutationa reduzida (GSH); glutationa oxidada (GSSG) razão ente glutationa reduzida e teores totais (GSH/GSH_{total}). Barras representam erro padrão da média.

Guimarães *et al.* (2008) afirmam que, de modo geral, plantas sujeitas à presença do Cd podem apresentar declínio nos níveis de glutationa. Resultados semelhantes foram obtidos por Gallego *et al.* (1996) em flores de girassol, cujos teores de GSH diminuíram consideravelmente nos tratamentos foliares com Fe, Cu e Cd quando

comparados aos controles correspondentes, enquanto os valores de GSSG não foram alterados. Santos *et al.* (2011) observaram que plantas de *Brachiaria decumbens* submetidas a contaminação de Cd e Zn apresentaram redução de GSH, provavelmente devido à sua utilização para a síntese de fitoquelatinas. As fitoquelatinas são sintetizadas a partir da glutathione (GSH) com auxílio da fitoquelatina sintase, que é ativada pela presença de metais pesados (Grill *et al.* 1989). Souza *et al.* (2013) realizaram estudos sobre mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas e dentre os muitos meios de aumento de tolerância aos metais como Hg, Pb e Cd está o sequestro e/ou quelatização dos mesmos por fitoquelatinas.

No metabolismo antioxidante do ciclo ascorbato-glutathione, baixos valores de GSH estão associados a altos níveis de AA (Soares & Machado 2007), uma vez que a enzima responsável pela redução do DHA em AA é a mesma que reduz GSH e GSSG. Assim, a manutenção dos níveis de AA nas plantas deste estudo pode ter retardado a produção de GSH e portanto aumento dos valores de GSSG. Contudo, a razão GSH/GSH_{total} nas plantas de *A. fasciata* aumentaram no período úmido em todos os locais, devido principalmente ao aumento de GSH nesse período, indicando a maior atividade de defesa da espécie no período úmido. Altos níveis de GSH estão associados com o aumento do estresse oxidativo, provavelmente pela maior atividade da enzima glutathione reductase (GR), enzima envolvida na manutenção de elevados índices de GSH/GSSG (Meloni *et al.* 2003). Além disso, o aumento de GSH e da razão GSH/GSSG é altamente influenciado pela exposição a estresses causados por metais, salinidade, temperatura e seca em diferentes espécies de plantas vasculares (Gill *et al.* 2013), indicando a grande sensibilidade da molécula para diversos tipos de estresse.

3.2.2. Teores de pigmentos

As plantas de *T. usneoides* foram levadas à campo com valores médios de 2,10 mg gs⁻¹ de Cl *a* e 0,46 mg gs⁻¹ de Cl *b* no período seco, e 1,01 mg gs⁻¹ e 0,90 mg gs⁻¹ de Cl *a* e Cl *b*, respectivamente, no período úmido. As plantas de *A. fasciata* apresentaram, em média, valores de Cl *a* e Cl *b* de 2,67 e 0,92 mg gs⁻¹ no período seco e de 3,24 e 1,73 mg gs⁻¹ no período úmido, antes de serem levadas à campo.

As espécies apresentaram valores significativamente maiores no período úmido para a maioria dos locais avaliados (Tabela 2). Os teores de Cl *a* em *T. usneoides* não diferiram estatisticamente dos encontrados nas plantas referência nos períodos seco e úmido. Na espécie, os teores de Cl *b* foram maiores que os de Cl *a* em todos os locais de exposição exceto em PC (local urbano) no período úmido, local que diferiu significativamente das plantas expostas em SG (local urbano/agrícola). As concentrações Cl *a* nas plantas de *A. fasciata* indicaram diferença significativa apenas no período úmido, destacando a diferença entre as plantas expostas em SG e REF. No período seco, embora não tenha sido observada diferenças estatísticas espaciais, os maiores teores de Cl *a* foram observados nas plantas REF em detrimento das demais. Os teores de Cl *b* foram semelhantes aos observados em *T. usneoides* (Figura 2).

A razão Cl *b/a* variou entre os locais e períodos, acompanhando a variação das concentrações das clorofilas *a* e *b*. Os maiores valores de razão foram observados no período úmido para as espécies estudadas, sendo que as plantas expostas na RMC diferiram das plantas referência. Ao contrário do observado para o período úmido, as plantas referência apresentaram maiores valores de razão dos que as expostas em RMC.

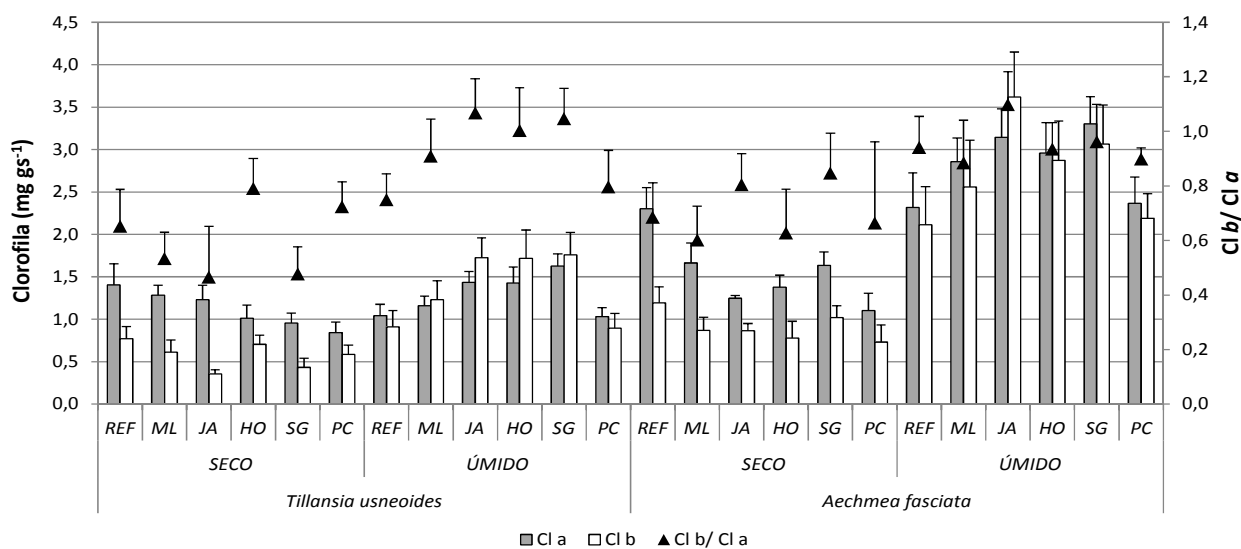


Figura 2. Teores de Clorofila *a* (Cl *a*), Clorofila *b* (Cl *b*) e razão entre clorofilas (Cl *b/a*) em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* expostas em RMC nas épocas seca e úmida ao longo do período de experimento. Barras representam erro padrão da média.

Análises de clorofilas e carotenoides têm sido utilizadas como indicadoras de estresse em plantas, por causas variadas como exposição à herbicidas (Meschede *et al.*

2011), exposições à metais pesados (Santos *et al.* 2011) e O₃ (Juozaitytė *et al.* 2007). A fonte interna de CO₂ fornecida pela fixação noturna de CO₂ em ácido málico fornece proteção mais adequada contra a fotoinibição aos tecidos fotossintéticos das plantas CAM, em especial as adaptadas às altas radiações (Adam & Osmond 1988), entretanto, embora as plantas expostas em campo estivessem sob a proteção do sombrite, a variação da luminosidade nos locais de exposição foi maior do que nas plantas referência podendo ter influenciado na variação espacial observada. Folhas e cloroplastos adaptados tanto para altas radiações quanto para baixas, “de sol” e “de sombra”, desenvolveram adaptações bioquímicas e morfológicas especiais, apresentando, no caso de folhas “de sol” alta capacidade fotossintética e maiores valores na razão Cl *a/b* (ou declínio na razão Cl *b/a*), do que as “de sombra” (Lichtenthaler *et al.* 1981). Folhas “de sol” também são caracterizadas por possuir maior espessura, maior valores totais de clorofila, menor área foliar específica e menores concentrações de água (Lichtenthaler *et al.* 2007). Robinson & Osmond, (1994) indicaram o declínio na proporção de Cl *b/a* como um dos gradientes de cloroplastos “de sol” dentro do limbo foliar em algumas espécies CAM. Plantas adaptadas à alta radiação podem apresentar valores mais elevados de Cl *b* (ou valores reduzidos de Cl *a*), em resposta à poluição do ar, como descrito por Moraes (1999) com plantas jovens de *Tibouchina pulchra* (Melastomataceae), expostas perto de refinaria de petróleo em Cubatão (SP).

Assim, as variadas fontes de poluição nos locais de estudo, e a variação de radiação entre os períodos seco e úmido, em especial no ponto SG, podem explicar os resultados do para o conteúdo de clorofilas (com valores de Cl *b* excedendo os de Cl *a* e excedendo os valores observados nas plantas referência).

Os maiores valores de clorofila no período úmido não corresponderam ao maior crescimento das plantas, que ocorreu no período seco, contudo Moraes *et al.* (2002) trabalhando com *Tibouchina pulchra*, expostas à poluição aérea de Cubatão, afirmaram que plantas expostas à presença de NO_x podem apresentar incremento da concentração de clorofila sem necessariamente em aumento na assimilação do carbono. No estudo o oposto foi observado, indicando que o aumento dos pigmentos nas plantas estudadas pode estar mais relacionado à proteção contra estresse ambiental do que ao crescimento. Assim como os resultados de glutatona, os teores de clorofila apresentaram maiores concentrações e valores de razão no período úmido, e nos locais de exposição da RMC.

Isso evidencia a provável interação entre o mecanismo de defesa antioxidante e a atividade do fotossistema.

3.2.3. Produtos da Peroxidação Lipídica

Os maiores valores de concentração de HPDC e MDA foram observados em plantas de *A. fasciata*, mostrando maior susceptibilidade da espécie ao estresse oxidativo, resultando na maior ocorrência de peroxidação lipídica do que o observado em plantas de *T. usneoides*. As espécies não apresentaram variação sazonal significativa dos parâmetros (Figura 3).

As plantas de *T. usneoides* apresentaram maior variação espacial das concentrações de HPDC e MDA do que *A. fasciata* (Tabela 2). Para *A. fasciata* os menores valores de HPDC foram observados em plantas expostas em REF durante o período úmido e em REF e SG durante o período seco. No caso das concentrações de MDA apenas o período seco apresentou variação espacial, com os menores valores na REF e os maiores nos pontos próximos à agricultura (ML, JA, HO e SG). *T. usneoides* apresentou os menores valores de HPDC no período seco para plantas expostas em REF, seguido de ML e SG. Os maiores valores foram observados em plantas expostas em JA. Os resultados de MDA para a espécie variou em ambos os períodos de exposição, apresentando os menores valores em plantas expostas em REF e PC no período úmido, e para REF, ML e SG no período seco.

Embora a variação sazonal nos níveis de MDA e HPDC tenha sido mais marcante em plantas de *T. usneoides*, nas plantas de *A. fasciata* os valores foram superiores ao de *T. usneoides* e as plantas expostas em RMC apresentaram resultados significativamente maiores que as plantas referência (Tabela 2). Diversos autores associam lesões de membranas e alterações nas concentrações de MDA com danos causados pela exposição a poluentes, em especial O₃ (Ranieri *et al.* 1996, Calatayud *et al.* 2002). Tiwari *et al.* (2006) mostraram que o nível de peroxidação lipídica foi maior nas folhas de *Dacus carota* var. Pusa Kesar (cenoura) cultivadas em câmaras sem ar filtrado, em comparação com aqueles em câmaras de ar filtrado, confirmando que o estresse oxidativo foi causado pela presença de SO₂, NO₂ e O₃, enquanto Wannaz *et al.*

(2003) mostraram correlação positiva entre teores de SO₂ e concentração de HPDC e MDA em folhas de *Schinus areira* L. (aroeira).

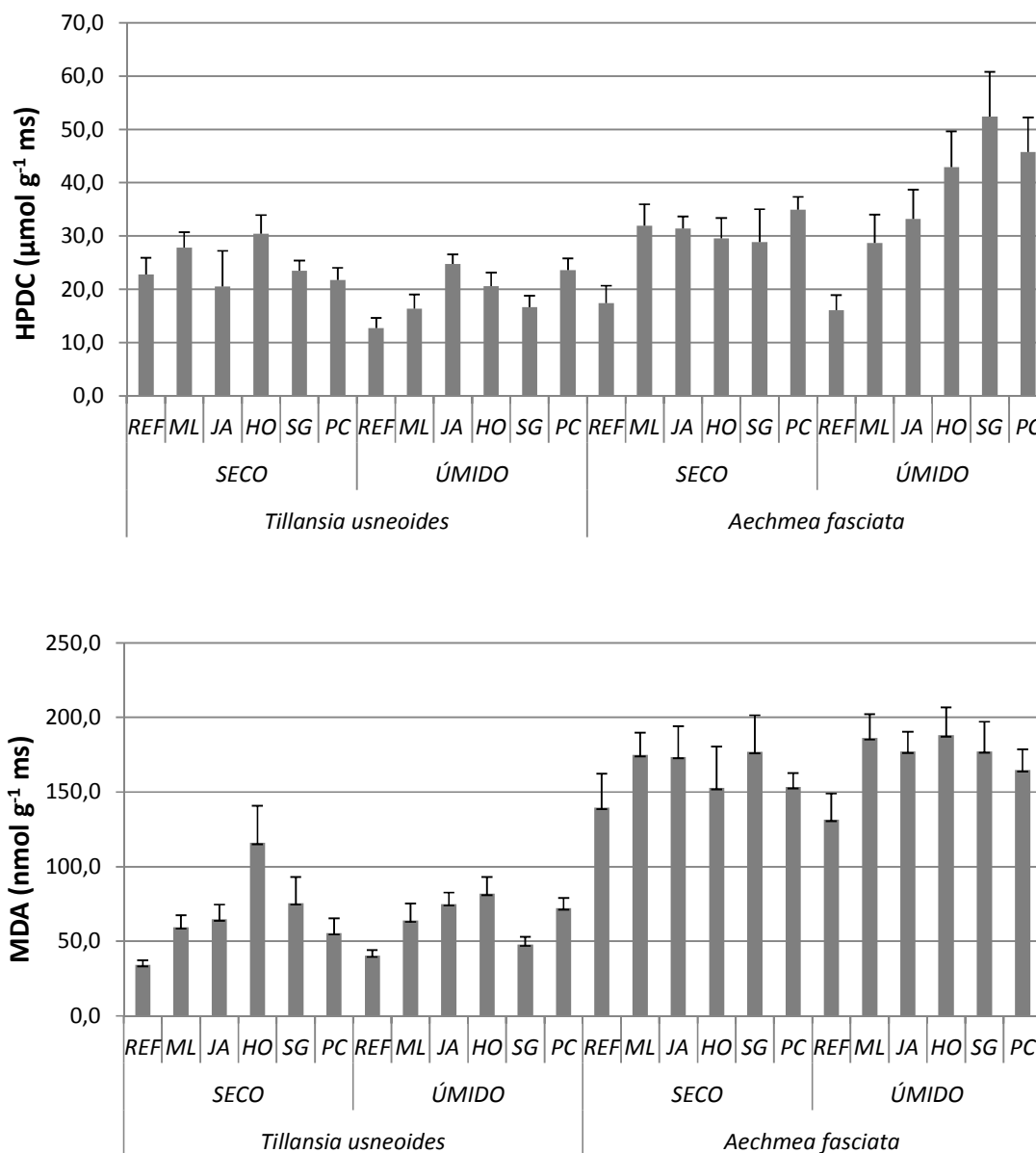


Figura 3. Concentrações de hidroperóxido dienos conjugados (HPDC) e malonaldeído (MDA) em plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* expostas em RMC nas épocas seca e úmida ao longo do período de experimento. Barras representam erro padrão da média.

Produtos da peroxidação lipídica como MDA e HPDC são importantes ferramentas no monitoramento da poluição, sendo considerados indicadores sensíveis de poluição veicular. O MDA é mais eficiente que o HPDC uma vez que o aumento significativo do HPDC em geral é acompanhado de injúrias foliares (Klumpp *et al.* 2000, Lima & Abdalla 2001). Nesse estudo, entretanto, os teores de HPDC parecem tão indicativos quanto os de MDA, visto que ambos apresentaram, diferenciação entre as plantas mantidas em região de estudo e as plantas referência, destacando regiões com influência de fontes urbanas de poluição no caso das plantas de *A. fasciata*.

Plantas de *T. usneoides* expostas em ambientes com diferentes fontes de poluição no México mostraram que o aumento na concentração de MDA e a diminuição dos teores de clorofila, resultantes do aumento das concentrações de Ca e Pb nos tecidos da planta, foi devido ao estresse por metais (Granados & Romero 2012). Estes dados não estão totalmente de acordo com o observado neste estudo, uma vez que os teores de clorofila não parecem estar diretamente ligados aos metais, tendo de fato aumentado no período úmido, período em que houve maior eficiência de acúmulo de metais nas plantas (vide capítulo 2). Entretanto, os resultados de MDA apresentam variação espacial semelhante entre os períodos, e, embora o FE tenha sido maior no período úmido, o enriquecimento de metais ocorreu em ambos os períodos de exposição, o que pode explicar a pequena variação sazonal entre os locais.

3.3. Análise integrada das respostas bioquímicas de *T. usneoides* e *A. fasciata*

As respostas fisiológicas das espécies foram analisadas de forma integrada por meio de análises de componentes principais (PCA) e de dendograma de agrupamentos (Cluster) após padronização por transformação logarítmica (\log_{10}).

No caso da PCA, 77% da variabilidade total das respostas fisiológicas das espécies foram explicados pelos dois primeiros eixos ($p < 0,01$), havendo a separação entre os períodos seco e úmido, como havia sido observado na descrição de cada parâmetro separadamente. MS/MF, GSSG e Cl *a* foram as variáveis mais associadas ao eixo 1 e DHA, TCR e AA ao eixo 2, corroborando a associação dos resultados de clorofila e glutatona mencionadas anteriormente (item 3.2.2).

As unidades amostrais de *A. fasciata* expostas no período úmido, localizadas no lado positivo do eixo 1, foram caracterizadas por altos teores de MDA, HPCD,

função da sazonalidade e locais estudados. Para as plantas de *T. usneoides* (Figura 5), foram observados agrupamentos distintos entre os períodos de exposição. No período seco (Figura 5A), destacaram-se três grupos: TCR, AA e DHA formaram o primeiro, MDA, HPDC e Cl *b* formaram o segundo e GSH, GSSG, MS/MF e Cl *a* formaram o terceiro. Assim como sugerido nas análises individuais e confirmado pela PCA, as variações de clorofila (Cl *a*) estão intimamente ligadas às variações de glutathione, enquanto a associação da Cl *b* com os produtos da peroxidação lipídica indicando que o pigmento pode estar atuando como defesa. No período úmido, formaram-se três grupos distintos, com um total de 4 subgrupos. O primeiro subgrupo associou as formas oxidadas da glutathione e o ácido ascórbico com o TCR, o segundo agrupou MDA e AA, o terceiro MS/MF com HPDC e GSH e o quarto agrupou dos dados de clorofila. Dentre os parâmetros a razão MS/MF foi isolada dentro do subgrupo.

A associação da taxa de crescimento com os parâmetros de ácido ascórbico em ambos os períodos estão de acordo com estudos que sugerem que a cadeia de atividades do ácido ascórbico é aumentada em folhas cultivadas em alta intensidade de luz e a baixas temperaturas, bem como evidências de que o ácido ascórbico presente nas paredes das células tem ligações com o metabolismo de expansão celular, em especial o DHA, uma vez que se acredita que enzima ascorbato oxidase (AO) possui importante papel nessa expansão (Smirnoff 1996).

As dissociações entre os grupos do período seco e úmido, possivelmente correspondem ao menor estresse imposto às plantas no período úmido, como as análises individuais apontaram. No período úmido as associações permaneceram entre “semelhantes”, como no caso das formas oxidadas de glutathione e ascorbato associadas entre si, e as formas reduzidas das mesmas associadas com produtos da peroxidação lipídica.

O agrupamento dos parâmetros da espécie *A. fasciata* apresentou a mesma influência sazonal das plantas de *T. usneoides*, contudo as associações entre as variáveis estudadas foram distintas (Figura 6). Para o período seco foram observados três agrupamentos principais: AA e MS/MF no primeiro, GSSG, DHA e HPDC no segundo e TCR, GSH, MDA, Cl *a* e Cl *b* no terceiro. No período úmido o dendograma formou cinco agrupamentos principais, isolando MS/MF e HPDC em um grupo cada, associando AA e MDA, como visto para as plantas de *T. usneoides* no mesmo período, TCR, DHA e GSH, e GSSG, Cl *a* e Cl *b*. Assim como observado para as plantas de *T.*

usneoides houve maior dissociação dos parâmetros no período úmido, o que pode estar relacionado a menos estresse nesse período.

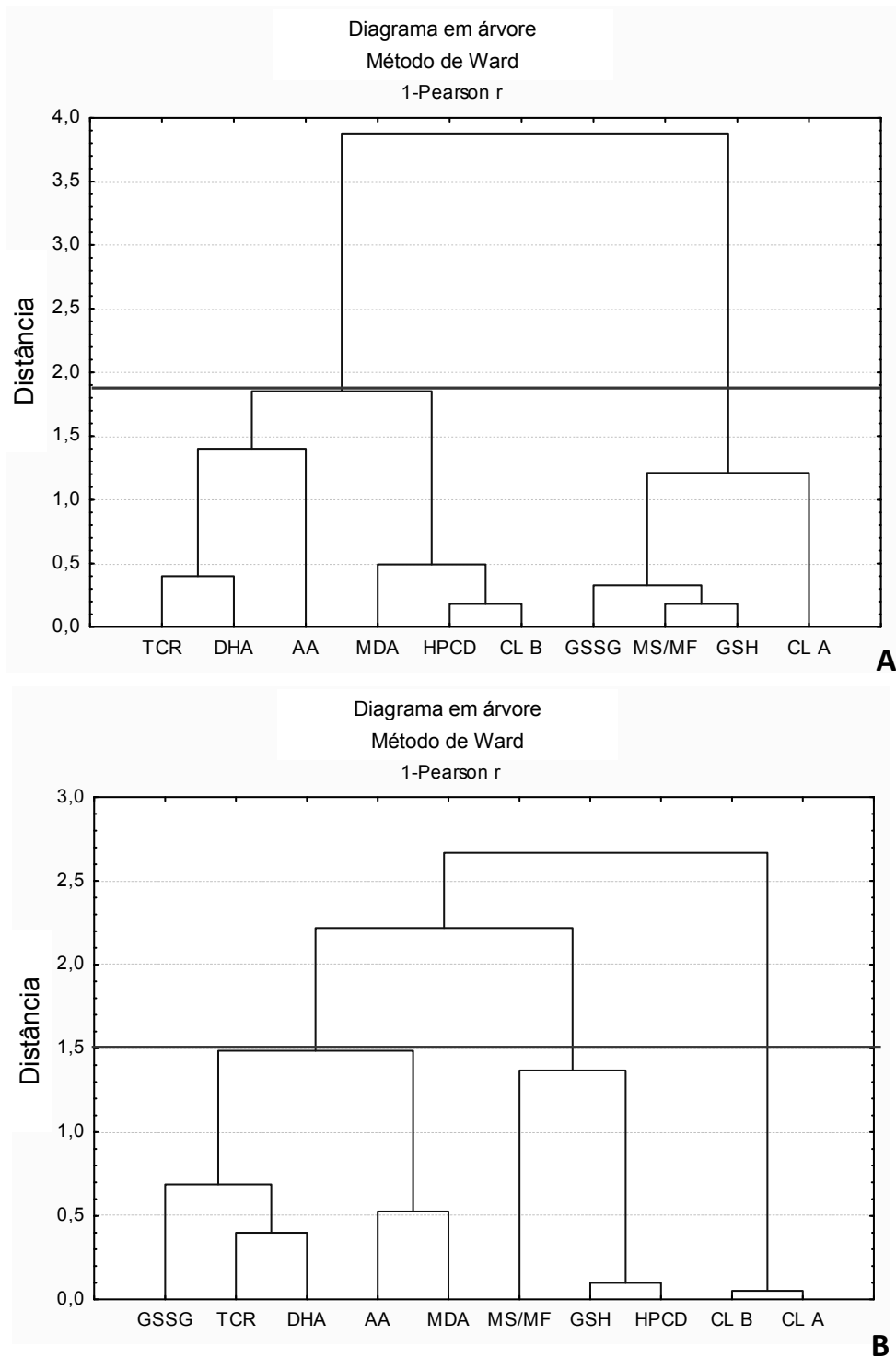


Figura 5. Dendograma da análise de agrupamento dos parâmetros fisiológicos de plantas de *T. usneoides* ao longo do período de experimentação. A - Período seco; B - Período úmido. A linha escura demarca a “linkage distance” da análise.

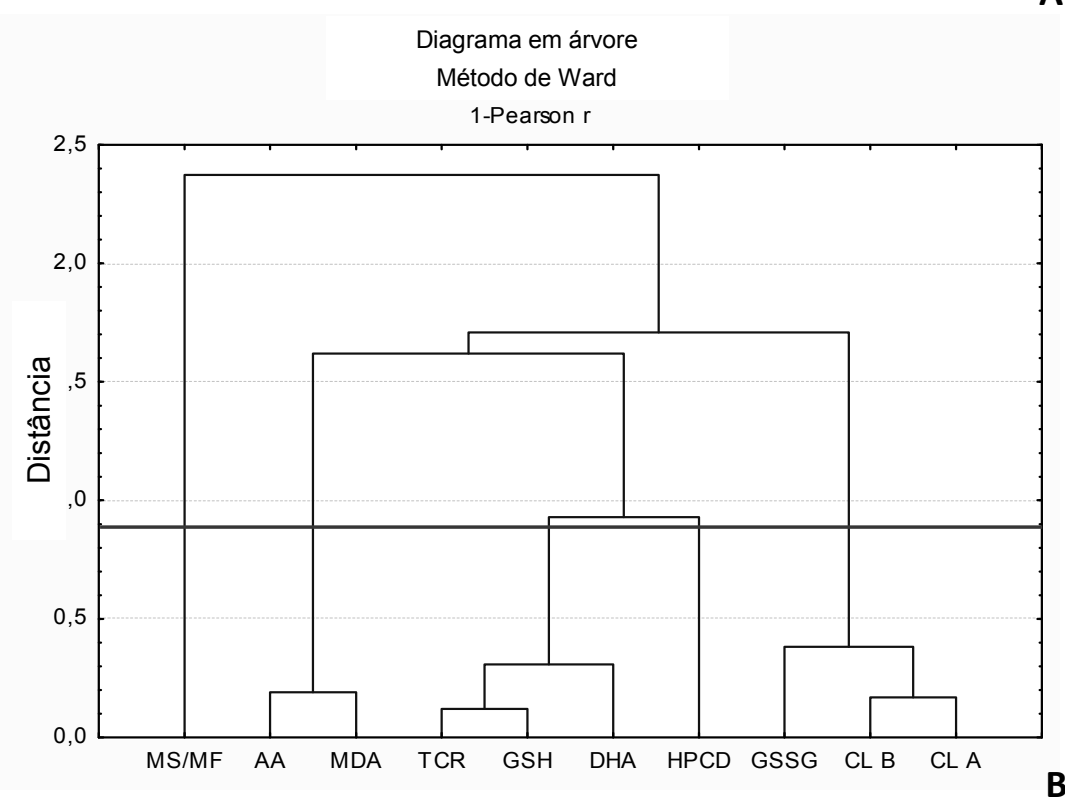
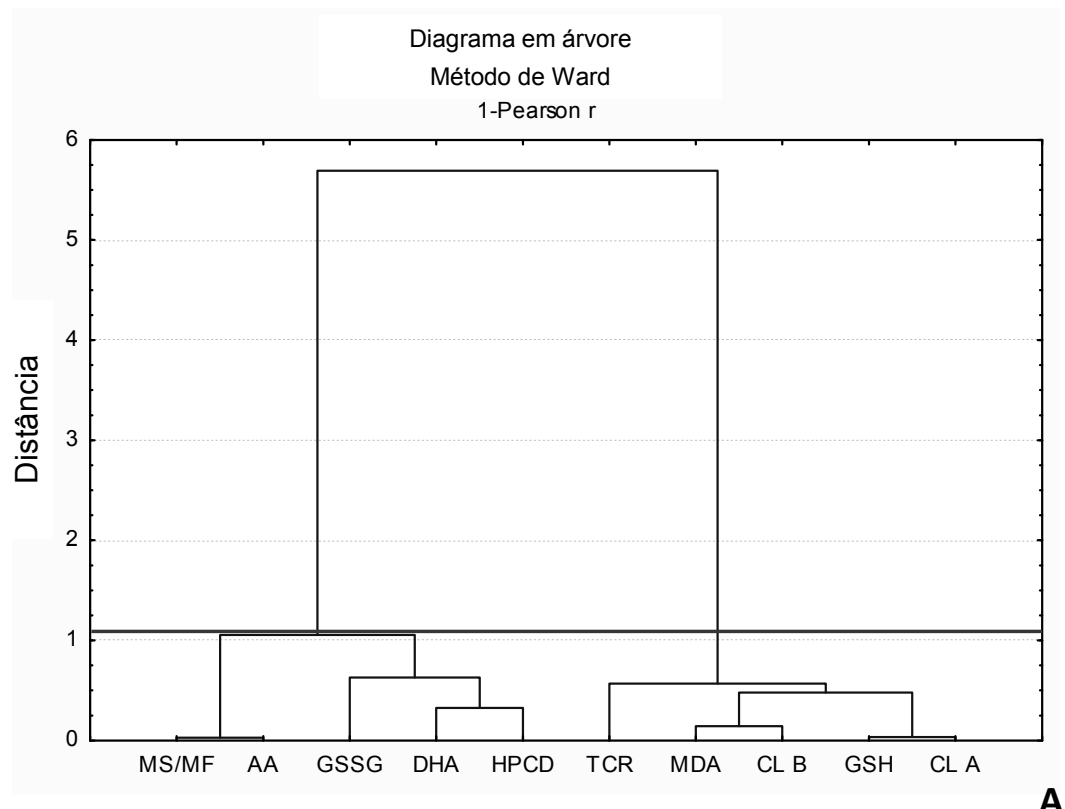


Figura 6. Análise de agrupamento dos parâmetros fisiológicos em plantas de *A. fasciata* ao longo do período de experimento. A: Período seco; B: Período úmido. A linha escura demarca a “linkage distance” da análise.

Os dados mostram a influência sazonal nas respostas dos parâmetros fisiológicos, o mesmo sendo evidenciado ao aplicar-se a análise de agrupamento (dendograma) para encontrar possíveis variações espaciais e sazonais (Figura 7). Contudo, os resultados evidenciaram poucos agrupamentos nítidos para os locais. As plantas de *T. usneoides* (Figura 7A) expostas no PC e ML, por exemplo, mostraram variações similares nos marcadores fisiológicos, indicando que os fatores de estresse nesses dois locais, mais próximos do polo industrial, afetaram do mesmo modo as plantas expostas, tanto no período seco como no úmido. A associação mostra a pequena variação entre os locais, em função das fontes poluidoras. O dendograma de *A. fasciata* mostrou a variação sazonal distinta em cada período, indicando maior proximidade entre ML e JA.

A RMC apresenta diversas fontes poluidoras (urbana, industrial e agrícola), com mudanças na direção dos ventos ao longo do dia, topografia plana e pequena variação de temperatura e umidade entre os locais (Tresmond & Tomaz 2004, Boian & Andrade 2012) o que torna a região bastante uniforme, facilitando a dispersão de poluentes, e pode explicar a pouca variação espacial de marcadores fisiológicos de estresse medidos nas espécies.

No entanto, a variação sazonal dos marcadores fisiológicos, determinada principalmente pelo volume de precipitação nos períodos seco e úmido, foi evidenciada. Para *T. usneoides*, a sazonalidade foi demonstrada para TCR, AA e DHA e para *A. fasciata* para GHS, GSSG, Cl a, Cl b e HPDC.

As espécies estudadas possuem estratégias distintas, especialmente no que diz respeito ao potencial de tolerar o estresse oxidativo e crescer na área de estudo. A análise biométrica indica que o melhor indicador de crescimento sazonal de *T. usneoides* é a TCR, enquanto a razão MS/MF apresenta melhor distinção espacial. Para a espécie *A. fasciata* a razão MS/MF parece ser mais eficiente tanto como indicador espacial como sazonal, tendo a TCR apresentado variação sazonal apenas no período úmido para a espécie. As análises fisiológicas apresentam maior sensibilidade das atividades do ácido ascórbico e MDA nas plantas de *T. useoides* e das atividades de glutathiona e HPDC nas plantas de *A. fasciata*.

As análises estatísticas e de agrupamento indicam que a maioria dos parâmetros estudados são mais sensíveis em plantas de *A. fasciata*, apresentando maiores concentrações dos mesmos em comparação com a *T. usneoides* e maior variabilidade

sazonal em alguns casos, sugerindo que esta a *A. fasciata* mais passível de reagir às variações na contaminação atmosférica.

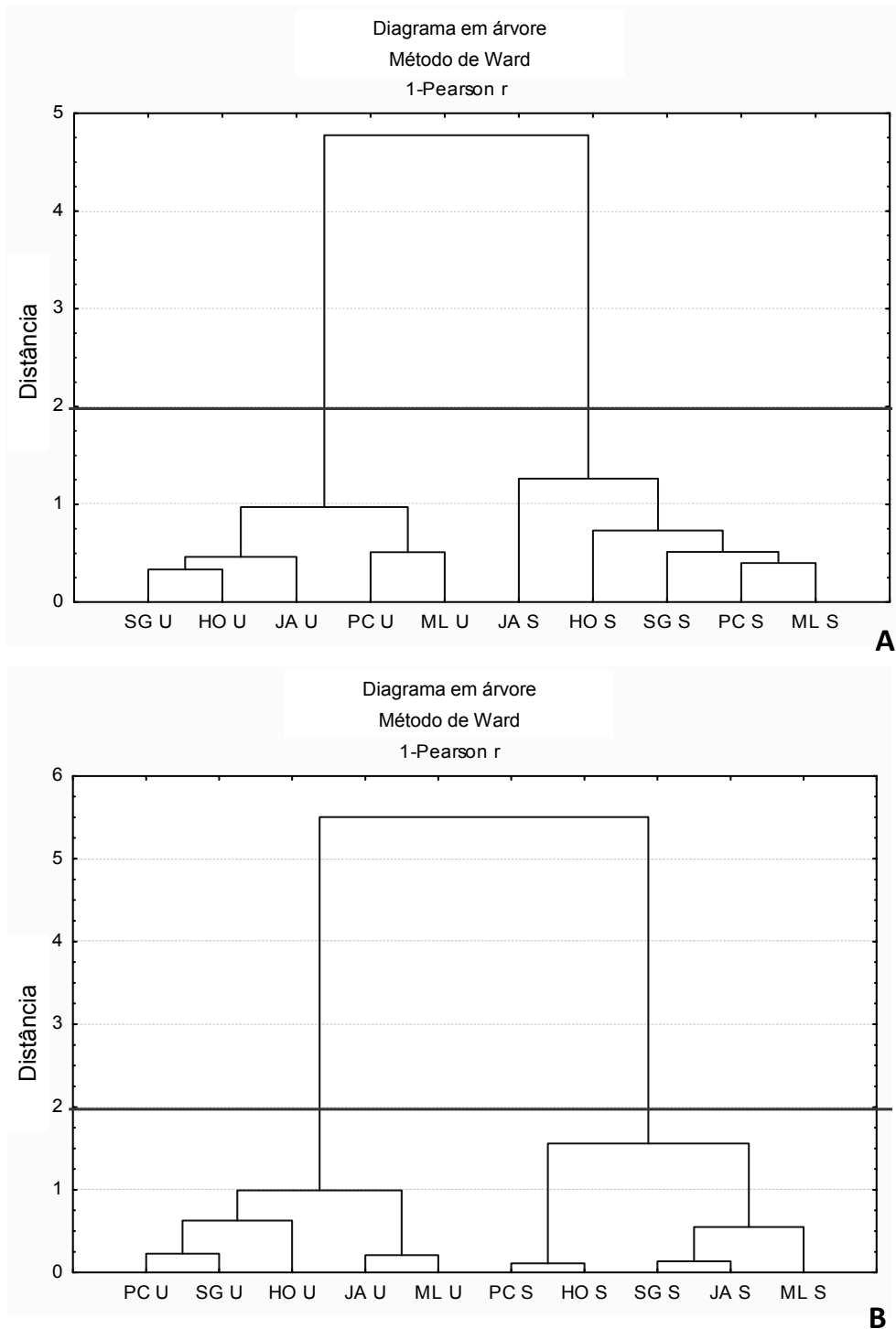


Figura 7. Análise de agrupamento espacial em função dos parâmetros fisiológicos em plantas de *T. usneoides* (A) e *A. fasciata* (B) nos períodos seco e úmido. A linha vermelha demarca a “linkage distance” da análise. Letras seguidas das siglas dos locais representam o período de exposição, úmido (U) e seco (S).

4. Conclusões

As análises individuais dos parâmetros estudados indicaram maiores teores de moléculas antioxidantes e fotossintetizantes em plantas de *A. fasciata*. A variação espacial dos parâmetros de AA e AA/AA_{total} no período seco mostram maior influência do aporte geral de poluentes dessa época no metabolismo de defesa das plantas, enquanto que a variação espacial no período úmido de GSH, GSSG e HPCD esta associada à maior eficiência de acúmulo de metais traços no período (vide capítulo 2).

As variações dependentes entre níveis de AA e GSH indicam forte correlação na atividade antioxidante do ciclo ascorbato-glutationa e os estresses ambientais, e embora os níveis de AA isoladamente não tenham sido marcadores espaciais significativos para as plantas de *T. usneoides*, foram marcadores sazonais. Assim sugere-se que o ciclo deva ser melhor estudado em ambas as espécies, acrescentando avaliação de enzimas modeladoras da reposição das moléculas mencionadas, como a DHAR e a GR, responsáveis pela reposição de de AA e GSH na sua forma reduzida.

Embora não tenha sido possível associar um parâmetro fisiológico diretamente com o estresse da planta, dentre os marcadores fisiológicos das plantas de *T. usneoides*, destacam-se o HPDC, MDA e Cl *b*, devido à variabilidade tanto sazonal como espacial.

A análise de PCA e os resultados estatísticos indicam que a maior sensibilidade fisiológica de *Aechmea fasciata*, com variações espaciais e sazonais dos teores de AA, GSH, Cl *a* e HPDC. Segundo as análises de agrupamento cluster, a espécie foi capaz de distinguir em PC, único local sem ação direta de fontes de poluição agrícola, diferenciaram-se das plantas expostas nas demais áreas de estudo em ambos os períodos. Portanto, *Aechmea fasciata* apresenta maior viabilidade para o monitoramento ambiental em função dessas variáveis.

5. Referências bibliográficas

- Adams, W.W. & Osmond, C.B.** 1988. Internal CO₂ supply during photosynthesis of sun and shade grown CAM plants in relation to photoinhibition. *Plant Physiology* 86: 117-123.
- Alvarez, D., Laguna, G. & Rosas, I.** 1998. Macroscopic and microscopic symptoms in *Abies religiosa* exposed to ozone in a forest near Mexico City. *Environmental Pollution* 103: 251-259.
- Alves, E.S., Moura, B.B. & Domingos, M.** 2008. Structural analysis of *Tillandsia usneoides* L. exposed to air pollutants in São Paulo City-Brazil. *Water, Air and Soil Pollution* 189: 61-68.
- Benincasa, M.M.P.** 2003. Análise de crescimento de plantas (Noções Básicas). Jaboticabal: FUNEP 41 p.
- Benzing, D.H., Arditti, J., Nyman, L.P., Temple, P.J. & Bennett, J.P.** 1992. Effects of ozone and sulfur dioxide on four epiphytic bromeliads. *Environmental and Experimental Botany* 32: 25-32.
- Boian, C. & Andrade, M.F.** 2012. Characterization of ozone transport among Metropolitan Regions. *Revista Brasileira de Meteorologia* 27: 229-242.
- Borland, A.M., Griffiths, H., Maxwell, C., Broadmeadow, M.S.J., Griffiths, N.M. & Barnes, J.D.** 1992. On the ecophysiology of the Clusiaceae in Trinidad: expression of CAM in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season and characterization of three endemic species. *New Phytologist* 122: 349-357.
- Borland, A.M., Griffiths, H., Maxwell, C., Fordham, M.C. & Broadmeadow, M.S.J.** 1996. CAM induction in *Clusia minor* L. during the transition from wet to dry season in Trinidad: the role of organic acid speciation and decarboxylation. *Plant, Cell & Environment* 19: 655-664.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E.** 2000. Responses to abiotic stress. *In*: Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L., eds. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists 1158–1203.

- Buege, J.A. & Aust, S.D.** 1978. The thiobarbituric acid assay. *Methods Enzymol* 52: 306-307.
- Burkey, K.O., Neufeld, H.S., Souza, L., Chappelka, A.H. & Davison, A.W.** 2006. Seasonal profiles of leaf ascorbic acid content and redox state in ozone-sensitive wildflowers. *Environmental Pollution* 143: 427-434.
- Bussotti, F., Agati, G., Desotgiu, R., Matteini, P. & Tani, C.** 2005. Ozone foliar symptoms in woody plant species assessed with ultrastructural and fluorescence analysis. *New Phytologist* 166: 941-955.
- Calatayud, A., Ramirez, J.W., Iglesias, D.J. & Barreno, E.** 2002. Effect of O₃ on photosynthetic CO₂ exchange, chlorophyll a fluorescence and antioxidant systems in lettuce leaves. *Physiologia Plantarum* 116: 308-316.
- Calasans, C.F. & Malm, O.** 1997. Elemental mercury contamination survey in a chloralkali plant by the use of transplanted Spanish moss, *Tillandsia usneoides* (L.). *Science of the Total Environment* 208: 165-177.
- Carreras, H.A. & Pignata, M.L.** 2001. Comparison among air pollutants, meteorological conditions and some chemical parameters in the transplanted lichen *Usnea amblyoclada*. *Environmental Pollution* 111: 45-52.
- Castagna, A., Nali, C., Ciompi, S., Lorenzini, G., Soldatini, G.F. & Ranieri, A.** 2001. Ozone exposure affects photosynthesis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) plants. *New Phytologist* 152: 223-229.
- Castagna, A. & Ranieri, A.** 2009. Detoxification and repair process of ozone injury: From O₃ uptake to gene expression adjustment. *Environmental Pollution* 157: 1461-1469.
- Castilho, F.J. & Greppin, H.** 1988. Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany* 28: 231-238.
- Dafré-Martinelli, M., Nakazato, R.K., Dias, A.P., Rinaldi, M. & Domingos, M.** 2011. The redox state of *Ipomoea nil* Scarlet O'Hara' growing under ozone in a subtropical area. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1645-1652.

- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.
- De Proft, M.** 2006. Leaf damage in CAM bromeliads: a hydrophysiological approach. Dissertação de Mestrado. Katholieke Universiteit Leuven, Leuven.
- Dias, A.P., Dafre, M., Rinaldi, M. & Domingos, M.** 2011. How the redox state of tobacco ‘Bel-W3’ is modified in response to ozone and other environmental factors in a sub-tropical area? *Environmental Pollution* 159: 458-465.
- Dizengremel, P., Le Thiec, D., Bagard, M. & Jolivet, Y.** 2008. Ozone risk assessment for plants: central role of metabolism-dependent changes in reducing power. *Environmental Pollution* 156: 11-15.
- Elias, C., Fernandes, E.A., França, E.J., Bacchi, M.A. & Tagliaferro, F.S.** 2008. Native bromeliads as biomonitors of airborne chemical elements in a Brazilian restinga forest. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 278: 423-427.
- Figueira, E.M.D.A.P., Gusmão Lima, A.I. & Pereira, S.I.A.** 2005. Cadmium tolerance plasticity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*: glutathione as a detoxifying agent. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 7-14.
- Gallego, S.M., Benavides, M.P. & Tomaro, M.L.** 1996. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151-159.
- Giampaoli, P., Tresmondi, F., Lima, G.P.P., Kanashiro, S., Alves, E.S., Domingos, M. & Tavares, A.R.** 2012. Analysis of tolerance to copper and zinc in *Aechmea blanchetiana* grown *in vitro*. *Biologia Plantarum* 56: 83-88.
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I. & Tuteja, N.** 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.
- González-Salvatierra, C., Luis Andrade, J., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K. & Manuel Peña-Rodríguez, L.** 2010. Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. *Journal of Plant Physiology* 167: 792-799.

- Granados, Y.P. & Romero, P.R.** 2012. Contribuciones al conocimiento de la ecotoxicología y química ambiental en México. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Jiutepec.
- Gravano, E., Bussotti, F., Strasser, R. J., Schaub, M., Novak, K., Skelly, J. & Tani, C.** 2004. Ozone symptoms in leaves of woody plants in open-top chambers: ultrastructural and physiological characteristics. *Physiologia Plantarum* 121: 620-633.
- Gravano, E., Giulietti, V., Desotgiu, R., Bussotti, F., Grossoni, P., Gerosa, G. & Tani, C.** 2003. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. *Environmental Pollution* 121: 137-146.
- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L. & Zenk, M.H.** 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86: 6838-6842.
- Guimarães, M.D.A., Santana, T.A., Silva, E.V., Zenzen, I.L. & Loureiro, M.E.** 2008. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas* 2: 58-68.
- Günthardt-Goerg, M.S. & Vollenweider, P.** 2007. Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: new diagnostic perspectives. *Environmental Pollution* 147: 467-488.
- Guzy, M.R. & Heath, R.L.** 1993. Responses to ozone of varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *New Phytologist* 124: 617-625.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C.** 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed., Clarendon Press, Oxford.
- Heath R.L. & Parker L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189 -198.
- Iriti, M. & Faoro, F.** 2008. Oxidative stress, the paradigm of ozone toxicity in plants and animals. *Water, Air, and Soil Pollution* 187: 285-301.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R. & Sarkar, D.** 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere* 65: 591-598.

- Juozaitytė, R., Ramaškevičienė, A., Sliesaravičius, A., Brazaitytė, A., Duchovskis, P. & Burbulis, N.** 2007. Growth and physiological features of pea (*Pisum sativum* L.) of different morphotypes under ozone exposure. *Biologija* 53: 71-71.
- Keller, T. & Schwager, H.** 1977. Air pollution and ascorbic acid. *European Journal of Forest Pathology* 7: 338-350.
- 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: 109-116.
- Klumpp, G., Furlan, C.M., Domingos, M. & Klumpp, A.** 2000. Response of stress indicators and growth parameters of *Tibouchina pulchra* Cogn. exposed to air and soil pollution near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Science of the Total Environment* 246: 79-91.
- Kuddus, M., Kumari, R. & Ramteke, P.W.** 2011. Studies on air pollution tolerance of selected plants in Allahabad city, India. *Journal of Environmental Research and Management* 2: 42-46.
- Levin, A.G. & Pignata, M.L.** 1995. *Ramalina ecklonii* as a bioindicator of atmospheric pollution in Argentina. *Canadian Journal of Botany* 73: 1196-1202.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., Do"ll, M., Fietz, H.J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D. & Rahmsdorf, U.** 1981. Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis Research* 2: 115-141.
- Lichtenthaler, H.K., Ač, A., Marek, M.V., Kalina, J. & Urban, O.** 2007. Differences in pigment composition, photosynthetic rates and chlorophyll fluorescence images of sun and shade leaves of four tree species. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 577-588.
- Lima, E.S. & Abdalla, D.S.P.** 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 37: 293-303.
- Lopez, A., Montañó, A., Garcia, P. & Garrido, A.** 2005. Note: quantification of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fresh olives in commercial presentations of table olives. *Food Science*. 11: 199-204.

- Luwe, M.W.F., Takahama, U. & Heber, U.** 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacea oleraceae* L.) leaves. *Plant Physiology* 101: 969-976.
- Manning, W.J., Godzik, B. & Musselman, R.** 2002. Potential bioindicator plant species for ambient ozone in forested mountain areas of central Europe. *Environmental Pollution* 119: 283-290.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. & Cambraia, J.** 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 49: 69-76.
- Meschede, D., Velini, E., Carbonari, C. & Silva, J.** 2011. Alteração fisiológica da cana-de-açúcar pela aplicação de glyphosate e sulfometuron-methyl. *Planta Daninha* 29: 413-419.
- Mittler, R.** 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Moraes, R.M.** 1999. Fotossíntese líquida e respostas bioindicadoras da poluição aérea em indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), em Cubatão, SP. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Moraes, R.M., Delitti, W.B.C. & Moraes, J.A.P.V.** 2000. Respostas de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. à poluição aérea de Cubatão, SP: fotossíntese líquida, crescimento e química foliar. *Revista Brasileira de Botânica* 23: 443-449.
- 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: 367-374.
- Moraes, R.M., Furlan, C.M., Bulbovas, P., Domingos, M., Meirelles, S.T., Salatino, A. & Sanz, M.J.** 2004. Photosynthetic responses of tropical trees to short-term exposure to ozone. *Photosynthetica* 42: 291-293.
- Nyman, L.P., Benzing, D.H., Temple, P.J. & Arditti, J.** 1990. Effects of ozone and sulfur dioxide on two epiphytic orchids. *Environmental and Experimental Botany* 30: 207-213.

- Orendovici, 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.
- Osmond, C.B.** 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annual Review of Plant Physiology* 29: 379-414.
- Paoletti, E., Contran, N., Manning, W.J., Castagna, A., Ranieri, A. & Tagliaferro, F.** 2008. Protection of ash (*Fraxinus excelsior*) trees from ozone injury by ethylenediurea (EDU): Roles of biochemical changes and decreased stomatal conductance in enhancement of growth. *Environmental Pollution* 155: 464-472.
- Paoletti, E., Contran, N., Manning, W.J. & Ferrara, A.M.** 2009. Use of the antiozonant ethylenediurea (EDU) in Italy: Verification of the effects of ambient ozone on crop plants and trees and investigation of EDU's mode of action. *Environmental Pollution* 157: 1453-1460.
- Pereira, P.F., Antunes, F., Braga, V.F., Resende, C.F., Ribeiro, C. & Peixoto, P.H.P.** 2012. Liposoluble and hydrosoluble pigments in salvinia under chromium toxicity. *Planta Daninha* 30: 697-703.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Plá, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution* 120: 59-68.
- Potters, G., Horemans, N. & Jansen, M.A.** 2010. The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 292-300.
- Ranieri, A., D'Ilrso, G., Nali, C., Lorenzini, G. & Soldatini, G.F.** 1996. Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum* 97: 381-387.
- Robinson, S.A. & Osmond, C.B.** 1994. Internal gradients of chlorophyll and carotenoid pigments in relation to photoprotection in thick leaves of plants with Crassulacean Acid Metabolism. *Functional Plant Biology* 21: 497-506.

- Sanches, L.V.C.** 2009. Desenvolvimento de *Aechmea fasciata* (Bromeliaceae) em função de diferentes saturações por bases no substrato e modo de aplicação da fertirrigação. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Santos, F.S.D., Amaral Sobrinho, N.M.B.D., Mazur, N., Garbisu, C., Barrutia, O. & Becerril, J.M.** 2011. Antioxidative response, phytochelatin production and photoprotective pigments composition of *Brachiaria decumbens* Stapf plants exposed to Cd and Zn. *Química Nova* 34: 16-20.
- Smirnoff, N.** 1996. Botanical briefing: the function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Smodiš, B., Pignata, M.L., Saiki, M., Cortés, E., Bangfa, N., Markert, B. & Frontasyeva, M.** 2004. Validation and application of plants as biomonitors of trace element atmospheric pollution—a co-ordinated effort in 14 countries. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49: 3-13.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T.** 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica—Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 9-19.
- Souza, E.P.D., Silva, I.D.F.D. & Ferreira, L.E.** 2013. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. *Current Agricultural Science and Technology* 17: 167-173.
- Strehl, T. & Arndt, U.** 1989. Alterações apresentadas por *Tillandsia aeranthos* e *T. recurvata* (Bromeliaceae) expostas ao HF e SO₂. *Iheringia* 39: 3-17.
- Takahama, U. & Oniki, T.** 1992. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. *Plant and Cell Physiology* 33: 379-387.
- Tiwari, S., Agrawal, M. & Marshall, F.M.** 2006. Evaluation of ambient air pollution impact on carrot plants at a sub urban site using open top chambers. *Environmental Monitoring and Assessment* 119: 15-30.
- Tresmondi, A.C.C.L. & Tomaz, E.** 2004. Air pollution and influence of sources on Paulínia (Brazil) and surroundings. *International Journal and Environment Pollution* 22: 490-505.

Vieira, B.M. & Kaplan, M.A.C. 2013. *Tillandsia usneoides* (L.) L.(Bromeliaceae): Aspectos Químicos e Farmacológicos. Revista Fitos Eletrônica 6:6-17.

Wannaz, E.D., Zygadlo, J.A. & Pignata, M.L. 2003. Air pollutants effect on monoterpenes composition and foliar chemical parameters in *Schinus areira*. Science of the Total Environment 305: 177-193.

Witherup, K.M., McLaughlin, J.L., Judd, R.L., Ziegler, M.H., Medon, P.J. & Keller, W.J. 1995. Identification of 3-hydroxy-3-methylglutaric acid (HMG) as a hypoglycemic principle of Spanish moss (*Tillandsia usneoides*). Journal of Natural Products 58: 1285-1290.

Capítulo IV – Proposição de modelo preditivo para Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) no monitoramento de regiões afetadas por diversas fontes de poluição

1. Introdução

A avaliação das condições ambientais tem sido, cada vez mais, de extrema importância para a manutenção da qualidade de vida e do meio ambiente. Muitos estudos têm associado doenças respiratórias e óbitos infantis e adultos com os níveis de poluição atmosférica, em especial material particulado e óxidos resultantes da queima de combustíveis fósseis (Sunyer *et al.* 2000, Clancy *et al.* 2002, Stieb *et al.* 2002, Gouveia *et al.* 2006, Wannaz *et al.* 2011, Amancio *et al.* 2014).

No Brasil, desde 1981, a CETESB utiliza índices de qualidade (de água e ar) denominados IQAs baseados no Índice Basal de Poluentes (do inglês Pollutant Standard Index - PSI) elaborado pela EPA (US Environmental Protection Agency, EUA) e testado no Canadá e Holanda (CETESB 1992, CETESB 2003, EPA 1998), que são elaborados a partir da coleta de dados abióticos do ambiente, como concentração de MP₁₀, fumaça inalável, SO₂, NO_x, teores de matéria orgânica, pH, entre outros. Por dependerem de valores obtidos por meio de equipamentos de captação físico-química nem sempre existem dados disponíveis de todos os poluentes em todas as épocas do ano e em todos os pontos de monitoramento, tornando o monitoramento menos homogêneo e mais inconstante.

O monitoramento utilizando plantas como indicadoras de poluição do ar é uma possibilidade viável de avaliação da ação sinérgica de poluentes, baseado em respostas fisiológicas e bioquímicas que determinam a resistência e susceptibilidade das plantas ao ambiente (Lakshmi *et al.* 2009). Contudo, a sensibilidade e as respostas das plantas aos poluentes do ar são variáveis, devido à interferência de fatores como a idade e estágio de desenvolvimento da planta, tempo de exposição ao poluente, condições edáficas e climáticas, entre outros. Assim, são poucos os casos em que é possível encontrar relação linear entre a dose de poluente e o efeito na planta exposta em campo (Moraes 1999, Lakshmi *et al.* 2009).

Para indicar o nível de tolerância ou sensibilidade de plantas com potencial bioindicador, variações em parâmetros considerados indicativos de estresse por ação de poluentes, como teores de moléculas antioxidantes, poliaminas e atividade de algumas enzimas, entre outros, geralmente são avaliados individualmente; contudo, a combinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos gera resultados mais eficazes que esses parâmetros geram separadamente (Kuddus *et al.* 2011).

É possível determinar o nível de tolerância de plantas bioindicadoras utilizando o Índice de Tolerância à Poluição Aérea (do inglês Air Pollution Tolerance Index – APTI), elaborado por Singh & Rao (1983). Nele, foram incluídos quatro fatores (ácido ascórbico, teor de clorofila total, pH do extrato de folha e teor relativo de água) para determinar se a planta é tolerante ou sensível às condições do ambiente estudado. O índice tem sido utilizado principalmente em áreas industrializadas (Lakshmi *et al.* 2008, Kuddus *et al.* 2011, Babu *et al.* 2013). A determinação do APTI proporciona um método confiável para a determinação de grande variedade de plantas quanto à susceptibilidade aos poluentes do ar, permitindo o planejamento para determinar possíveis medidas de controle da região estudada (Kuddus *et al.* 2011).

Nas últimas décadas estudos realizados por pesquisadores da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, mostram que a análise de riscos biológicos associados à contaminação atmosférica, utilizando espécies biomonitoras, pode ser mais precisa a partir de índices que relacionam o acúmulo de elementos com as alterações fisiológicas, bioquímicas e estruturais das plantas biomonitoras. González & Pignata (1994) desenvolveram um índice de contaminação atmosférica, denominado CI (do inglês Contamination Index) utilizando o líquen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) como organismo biomonitor, com o intuito de evidenciar os diferentes níveis de poluição no Estado de Córdoba, Argentina, e correlacioná-los às principais fontes de aporte desses poluentes (equação 1). O índice foi proposto com base em diferentes parâmetros bioquímicos, entre os quais teores de pigmentos, conteúdo de malondialdeído (MDA), teores de enxofre total (S) e feofitinas. González *et al.* (1996) repetiram o estudo em Córdoba, acrescentando, aos parâmetros originais, os teores de hidroperóxido dienos conjugados (HPDC) para indicar a ocorrência de peroxidação lipídica, aumentando a explicabilidade e confiança do modelo anteriormente proposto. Deste estudo surgiu o Índice de Poluição - PI (do inglês Pollution Index, equação 2).

$$\text{(Equação 1) CI} = [(P_{\alpha}/C_{\alpha})+(S_T/S_F)] \times [(MDA_T/MDA_F)]$$

$$\text{(Equação 2) PI} = [(P_{\alpha}/C_{\alpha})+(S_T/S_F)] \times [(MDA_T/MDA_F)] \times (HPDC_T/HPDC_F)]$$

Onde: P_{α} : feofitina α ; C_{α} : clorofila α , T : teores de amostras expostas; F : teores de amostras frescas/iniciais; e os resultados foram obtidos em função de matéria seca.

Pignata *et al.* (2002) propuseram uma variação dessa abordagem, utilizando plantas da bromélia *Tillandsia capillaris*, espécie vascular, epífita e criaram um índice de contaminação atmosférica para Córdoba denominado Índice de Danos Foliare (do inglês Foliar Damage Index – FDI, equação 3). Neste, foram utilizados a razão entre clorofilas a e b ($Cl\ b/Cl\ a$), teores de enxofre total (S), teores de malondialdeído (MDA) e hidroperóxido dienos conjugados ($HPDC$) e a razão entre a massa de matéria seca e fresca das plantas (PS/PF). Dessa forma, os valores de FDI relacionam-se com diferentes níveis de qualidade do ar refletidos por teores de metais/nutrientes e os efeitos de poluentes atmosféricos gasosos na seguinte equação:

$$\text{(Equação 3) FDI} = [(Cl\ b/Cl\ a)+(S/S_{\text{basal}})] \times [(MDA/MDA_{\text{basal}})] \times (HPDC/HPDC_{\text{basal}})] \times [PS/PF]$$

Onde “basal” corresponde ao valor obtido de plantas coletadas em local considerado não contaminado.

O índice agrega os resultados de cada parâmetro biológico individual, gerando um único valor estimado, capaz de distinguir e comparar a variação espacial e temporal do nível de contaminação atmosférica na região monitorada (Pignata *et al.* 2002, Wannaz & Pignata 2006, Bermudez *et al.* 2009). O processo de elaboração do índice levou em conta parâmetros químicos que apresentavam valores mais elevados na presença de maiores aportes de poluentes atmosféricos (Pignata *et al.* 2013). A abordagem é interessante e inovadora, visto que as reações indicadoras de aumento de tolerância ou de distúrbios latentes acabam por afetar a relação linear entre a concentração do contaminante na atmosfera e o nível de acúmulo nos tecidos vegetais, que seria esperada quando se pretende monitorar rotineiramente a qualidade do ar utilizando espécies vegetais.

A escolha de espécies epífitas para a elaboração do índice deve-se, principalmente, à sua capacidade de adaptação às condições climáticas extremas e ao seu padrão de desenvolvimento. As plantas epífitas, em especial as bromélias, apresentam dois tipos de morfologia das folhas: folhas com bainhas amplas e imbricadas, formando um tanque onde se acumulam água e detritos, posteriormente absorvidos por escamas (*A. fasciata*, por exemplo); e folhas estreitas e densamente cobertas por escamas que absorvem água e nutrientes quando sua superfície está úmida (*T. usneoides*, por exemplo) (Benzing *et al.* 1976, Benzing 2000). Essas adaptações permitem que as plantas permaneçam em boas condições fisiológicas durante os períodos de exposição nos locais de estudo e reflitam o estado da atmosfera.

Contudo, é possível supor que índices como os descritos anteriormente podem não ser eficientes em ambientes com características geográficas distintas e regidas por condições climáticas diferentes das descritas para Córdoba, como é o caso da Região Metropolitana de Campinas. Em Córdoba as estações são mais marcadas, com clima tendendo a semiárido, redução da circulação de massa de ar e frequentes inversões térmicas no inverno e outono, além da topografia irregular com morfologia côncava (Pignata *et al.* 2013). Na região da RMC, as variações climáticas ocorrem principalmente em função da precipitação, com pequenas variações de temperatura, ventos predominantes da direção SW-NE e topografia plana (ver capítulo 1). Assim, para que seja possível o uso de índices como os mencionados anteriormente, é preciso que eles sejam elaborados levando em conta as peculiaridades de cada local de estudo.

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo, utilizar modelos matemáticos preditivos para propor um índice de contaminação atmosférica mais abrangente para a RMC, utilizando bromélias epífitas biomarcadoras, a partir de conhecimentos adquiridos com os profissionais da Universidad Nacional de Córdoba, visando a mapear de forma precisa o nível de contaminação atmosférica, em caráter regional, especialmente em locais onde ocorrem fragmentos de vegetação nativa.

2. Material e métodos

O conhecimento preliminar para a elaboração do Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) foi obtido na Faculdade de Ciências Exactas, Físicas e Naturales da Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, sob a supervisão dos Drs. Eduardo D.

Wannaz e Maria Luiza Pignata. O estágio foi viabilizado por bolsa concedida no âmbito do Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (CAPES) (set à dez/2013).

O Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) para a RMC foi desenvolvido utilizando 34 variáveis, 5 abióticas (MP₁₀, NO₂, O₃, SO₂, Precipitação) e 29 bióticas (marcadores químicos: concentração de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Ni, Co, Pb, Sr e V; resultados descritos no capítulo 2; e marcadores fisiológicos: Cl *a*, Cl *b*, Cl *b/a*, HPCD, MDA, AA, DHA, AA/DHA, GSH, GSSG, GSH/GSSG, MS/MF e TCR; resultados inclusos no Capítulo 3) medidos nas espécies de bromélias epífitas *Tillandsia usneoides* e *Aechmea fasciata*, expostas na região metropolitana de Campinas sob influência de diversas fontes de poluição, por dois anos, ao longo de 8 exposições com duração de 12 semanas cada (ver detalhes no capítulo 1).

A primeira etapa de elaboração do índice consistiu na determinação de associações qualitativas entre as variáveis bióticas medidas nas plantas de ambas as espécies ao longo do período experimental e variáveis abióticas (precipitação, NO₂, O₃, SO₂ e MP₁₀). A primeira etapa foi realizada com dados originados em cada um dos oito experimentos realizados no local PC, onde existe uma estação de monitoramento de qualidade do ar e climática. As associações foram encontradas por meio de análise fatorial, empregando o método de componentes principais, sem rotação dos eixos. Os fatores foram destacados por autovalores > 2,0 e somente os marcadores bióticos e abióticos extraídos em cada fator por *factor loadings* > 0,6 foram considerados relevantes para a proposição do ICA. O número de fatores retidos/finais foi também determinado com base na fração de explicação da variância total e na variabilidade das variáveis individuais.

A análise fatorial foi realizada em separado para marcadores fisiológicos e químicos por espécie, utilizando a mesma matriz de dados ambientais. Todas as matrizes foram padronizadas antes das análises a fim de evitar vieses decorrentes de diferenças nas magnitudes dos dados. A análise calcula o número mínimo de elementos necessários para explicar a covariação observada entre os descritores e auxilia na escolha de variáveis que representam melhor as condições estudadas (Hair *et al.* 1998, Legendre & Legendre 2012).

A segunda etapa de análise de dados consistiu na proposição de equações multilíneas preditivas da variação na concentração de poluentes no local PC a partir das variações nos marcadores químicos e fisiológicos destacados como relevantes nas

análises fatoriais. As equações foram propostas por meio da técnica de regressão multilinear *stepwise backward*, utilizando o programa estatístico Sigma Stat 11.0. Os poluentes, tratados individualmente (NO₂, SO₂, MP₁₀ e O₃) ou associados por somatórias de suas concentrações (NO₂+SO₂, MP₁₀+NO₂+SO₂, MP₁₀+NO₂+SO₂+O₃ e NO₂+SO₂+O₃), foram escolhidos como variáveis dependentes e os marcadores fisiológicos e químicos relevantes foram escolhidos como variáveis independentes. A precipitação foi incluída como variável independente por ser a variável meteorológica que melhor caracterizou a sazonalidade climática na região de estudo e apresentar evidente influência na concentração dos poluentes na região. Esta se mostrou também biologicamente importante devido ao metabolismo epifítico das espécies e a influência determinante da presença de água no seu desenvolvimento. Buscaram-se equações para cada variável dependente, com e sem precipitação como variável independente. A análise de regressão foi iniciada com todas as variáveis independentes e consistiu na remoção passo a passo daquelas que não explicaram significativamente a variação da variável dependente analisada. Ao final, propuseram-se equações preditivas multilineares mais explicativas das oscilações na concentração dos poluentes com base no produto entre os valores variáveis bióticas e seus respectivos coeficientes de correlação, como representado na equação abaixo:

$$Y_{(E)} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_nx_n$$

Onde:

$Y_{(E)}$ - variável dependente estimada (poluentes);

b_0 - Coeficiente de intersecção dos eixos;

b_1, b_2, b_n - Coeficiente de regressão;

x_1, x_2, x_n - variável independente (fisiológicas e químicas).

Como os valores de x variam, os valores correspondentes para Y aumentam ou diminuem dependendo do sinal que acompanha b (Systat Software 2008). As equações mais representativas, para cada espécie, foram utilizadas para mapear a distribuição espacial e sazonal dos poluentes na região de estudo, utilizando como base os dados provenientes do biomonitoramento conduzido ao longo dos 22 meses nos locais de estudo, com o auxílio do programa Surfer 8.

3. Resultados e discussão

As tabelas 1 e 2 apresentam os resultados da análise fatorial exploratória realizada com dados ambientais e parâmetros fisiológicos e químicos (nutrientes e metais pesados marcadores) nas plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata*, respectivamente.

A análise fatorial, denominada dessa forma pela primeira vez por Spearman em 1904, tem como base a proposta de que correlações de valores testes podem ser explicados por um fator em comum e ao combinar com outros fatores que refletem as qualidades de testes individuais, explicar a covariância entre descritores (Legendre & Legendre 2012). A função primária é extrair as informações essenciais dos dados, que não são percebidas na análise individual de cada caso (Queiroz *et al.* 2007).

A interpretação da matriz da análise fatorial depende dos valores do *factor loading*, correlação entre cada variável e o fator em que está disposta, e a necessidade ou não de aplicar a rotação dos fatores. A rotação de fatores é realizada baseando-se na intersecção dos vetores nos quais as variáveis são dispostas no gráfico, podendo existir diversas rotações, sendo a Varimax a mais usada. O uso da matriz sem a rotação (*unrotated*) tende a extrair os fatores por ordem de importância, e as variáveis mais significativas se agrupam entre os primeiros fatores, enquanto a rotação permite a melhor redistribuição das variáveis entre os fatores e simplifica o processo (Hair *et al.* 1998). Como o objetivo do uso da análise fatorial nesse estudo foi identificar as variáveis que melhor se correlacionaram e não substituí-las por novas variáveis resumidas (fator), optou-se pelo uso dos resultados da matriz sem rotação.

A análise das plantas de *T. usneoides* extraiu 3 fatores, tanto para os dados fisiológicos quanto para os químicos, os quais explicaram 60,4% e 57,5% da variabilidade dos dados respectivamente. Para os dados fisiológicos, o fator 1 explicou 27,9% da variância total, o fator 2 explicou 19,2% da variância total e o fator 3 representou aproximadamente 13% da variância, destacando (em vermelho na Tabela 1) ao todo 6 variáveis. Para os dados químicos, o fator 1 explicou 28,9% da variância total, o fator 2 explicou 15% e o fator 3 13%, destacando no total 9 variáveis. Em ambos os casos, os poluentes avaliados foram separados em dois grupos, tendo o O₃ sido isolado dos demais, por não haver associação significativa das variáveis químicas com o O₃ (Tabela 1).

Na análise os poluentes gasosos NO₂ e SO₂ e o MP₁₀ foram relacionados primeiramente com os teores foliares de DHA, N, B, Cu, Fe, Mn e a TCR, enquanto que a precipitação foi oposta a esses parâmetros, sugerindo que maiores aportes de poluição alteraram o desenvolvimento da planta, embora estas apresentem aumento da forma oxidada do ácido ascórbico e consequentemente diminuição da forma reduzida, indicando estresse oxidativo. A razão MS/MF foi negativamente correlacionada com os teores de MDA e AA (fator 2), indicando que a produção de massa das plantas da espécie *T. usneoides* diminuiu com o aumento dos valores dos indicadores oxidativos. Nas análises das variáveis químicas, o fator 2 indicou a correlação negativa, ou seja, inversamente proporcional, entre os teores de S e de P e Sr. O fator 3 de ambas as análises ressaltou a correlação residual da Cl b e do Co entre as variáveis.

Tabela 1. Resultados da análise fatorial das variáveis químicas, biológicas e ambientais referentes às plantas de *T. usneoides* expostas em PC. Variáveis com valores > 0,60 estão evidenciados em vermelho; valores < 0,5 não foram considerados.

<i>T. usneoides</i>	Fator 1	Fator 2	Fator 3	<i>T. usneoides</i>	Fator 1	Fator 2	Fator 3
Fisiológicas e ambientais	MP ₁₀	-0,601	AA -0,803	MP ₁₀	0,545		
	NO ₂	-0,851	GSSG -0,516	O ₃	0,596		
	SO ₂	-0,772	MDA -0,621	Cl b	0,633		
	Precip.	0,760	MS/MF 0,816	Cl b/Cl a	-0,540		
	Cl a	0,549					
	DHA	-0,664					
	GSH	0,575					
	TCR	-0,744					
Químicas e ambientais	MP ₁₀	-0,725	P 0,628	O ₃	-0,579		
	NO ₂	-0,790	Mg -0,501	K	-0,587		
	SO ₂	-0,875	S -0,616	Ca	0,585		
	Precip.	0,729	Sr 0,662	Co	-0,618		
	N	-0,704		Pb	0,572		
	B	-0,684					
	Cu	-0,697					
	Fe	-0,622					
Mn	-0,757						
Expl.Var	4,751	3,260	2,260	Expl.Var	5,790	3,067	2,643
Var. total (%)	27,945	19,177	13,295	Var. total (%)	28,948	15,333	13,217
Var. acum (%)	27,945	47,122	60,417	Var. acum (%)	28,948	44,281	57,498

Para *A. fasciata* foram extraídos quatro fatores para as análises fisiológicas e três fatores para as análises químicas, resumindo 79% e 71,9% dos dados respectivamente (Tabela 2). Os valores dos *factor loadings* foram maiores dos que os observados nas plantas de *T. usneoides*. A maioria dos dados foi resumida no primeiro fator, representando mais de 35% dos dados fisiológicos, e mais de 28% dos dados químicos, associando a maioria das variáveis ambientais, incluindo os teores de O₃ para os dados fisiológicos, ao contrário do observado para *T. usneoides*. Nos demais fatores foram resumidos 17,5, 15 e 11% dos dados fisiológicos, destacando no total 12 variáveis, e 26 e 17% dos dados químicos, destacando o total de 8 variáveis.

Os teores de pigmentos, HPCD e GSSG associaram-se negativamente com os poluentes e positivamente aos valores de precipitação. O aumento da precipitação foi positivamente relacionado com o aumento da TCR (fator 3), mas negativamente associado com a razão MS/MF. Essa associação indica que o aumento da precipitação proporciona o maior desenvolvimento da planta e diminui a razão da massa de matéria seca em relação à fresca (MS/MF).

Os resultados de AA e GSH, formas reduzidas, e a razão entre AA/DHA apresentaram alta correlação positiva, indicando resultados concomitantes entre si e negativamente relacionados com os poluentes (Fator 1 x Fator 2), podendo ser um bom indicador. Os valores de MDA foram concomitantes com os teores DHA (Fator 3), embora não tenha atingido valores acima de 0,6. Em relação à matriz nutricional, o MP₁₀ foi diferenciado dos poluentes NO₂ e SO₂, enquanto os teores de O₃ não apresentaram influência nas variações nutricionais das plantas da espécie. Os nutrientes/metais mais significativos foram N, K, B, P, Ca, Mn e Cu.

Tabela 2. Resultados das componentes na análise fatorial (sem rotação) das variáveis químicas, biológicas e ambientais referentes às plantas de *A. fasciata* expostas em PC. Valores >0,60 de cada fator estão evidenciados em vermelho; valores <0,5 não foram considerados.

<i>A.fasciata</i>	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	<i>A.fasciata</i>	Fator 1	Fator 2	Fator 3		
Fisiológicas e ambientais	MP ₁₀	-0,798	GSH 0,731	CIB/ CIA 0,634	Precip. 0,662	Químicas e ambientais	SO ₂	-0,727	MP ₁₀ 0,774	P -0,504
	NO ₂	-0,730	AA 0,824	GSSG -0,523	CIB/ CIA -0,516		N	0,883	NO ₂ 0,678	Ca -0,711
	O ₃	-0,619	AA/DHA 0,726	DHA -0,710	TCR 0,824		K	0,920	Precip. -0,738	Cu -0,723
	SO ₂	-0,748		MDA -0,583			Fe	-0,514	P 0,542	Zn -0,644
	Precip.	0,606					Mn	0,604	Mg 0,593	
	CL A	0,843					V	-0,635	B 0,613	
	CL B	0,664							Mn 0,557	
	HPCD	0,657							Co -0,650	
	GSH	0,541								
	GSSG	0,643								
	MDA	0,591								
	MS/MF	-0,875								
Expl.Var	6,369	3,152	2,696	2,033	Expl.Var	5,013	4,377	3,478		
Var. tot (%)	35,384	17,509	14,980	11,297	Var. tot. (%)	23,871	20,845	16,563		
Var. acum (%)	35,384	52,893	67,873	79,170	Var. acum. (%)	23,871	44,716	61,279		

Corroborando as observações de Pignata *et al.* (2002) em Córdoba, Argentina, as concentrações de S nas plantas do gênero *Tillandsia* foram correlacionadas com as variações nos poluentes atmosféricos da região de estudo, contudo a correlação não foi encontrada para as plantas de *A. fasciata*.

A análise fatorial exploratória indicou 15 e 20 variáveis significativas (*factor loading* $\geq 0,6$), entre as 29 variáveis bióticas, para as plantas de *T. usneoides* e *A. fasciata* respectivamente, as quais foram incluídas nas análises de regressão multilinear (stepwise backward).

A regressão stepwise seleciona variáveis independentes para o desenvolvimento de uma equação de regressão linear múltipla, a partir de uma lista de variáveis elegíveis que permitem presumir a ação de uma variável dependente, de acordo com a contribuição de cada variável ao modelo. Usando o método stepwise, é possível evitar a interferência de variáveis externas, subestimando ou superestimando a especificação do modelo (Hair *et al.* 1998, Systat Software 2008). A Análise de Regressão Stepwise assume a associação entre uma ou mais variáveis independentes (no caso, metabólitos ou elementos químicos medidos na planta) e uma variável dependente (no caso, um poluente ou uma associação de poluentes), que se encaixa na equação geral para um plano multidimensional. Dentre as vantagens do desenvolvimento de equações por esse método, é a possibilidade de associá-las a um poluente específico ou a um conjunto deles e o amplo leque de variáveis aos quais podemos dispor para a avaliação.

Os critérios para escolha dos modelos preditivos mais representativos foram: proposição de equações lineares com distribuição normal e igualdade de variâncias (ou seja, a obtenção de $p > 0,05$ nos respectivos testes), maior nível de significância do modelo preditivo proposto ($p < 0,001$) e os mais altos valores de coeficiente de determinação para stepwise (R^2). As tabelas 3 e 4 apresentam a síntese dos resultados das análises de regressão para as espécies *T. usneoides* e *A. fasciata*, respectivamente.

Apesar da proposição de maior número de equações viáveis com as variáveis bióticas monitoradas na espécie *T. usneoides*, para estimativa da contaminação atmosférica, os modelos preditivos foram menos explicativos, ou seja, obtiveram-se os menores valores de R^2 . A característica marcante das equações elaboradas para a espécie foi a elevação dos valores de R^2 com a adição da variável Precipitação. Os menores valores de R^2 foram observados nas equações elaboradas em função do O_3 , sugerindo pequena influência desse poluente nos distúrbios das plantas e indicando que a espécie não é adequada para monitoramento da poluição por O_3 , em função da avaliação dos resultados fisiológicos e nutricionais. Em contrapartida, os altos valores de R^2 das equações em função de SO_2 sugerem que o monitoramento contínuo desse poluente pode ser realizado do biomonitoramento com a espécie.

Nas plantas de *T. usneoides*, a principal variável associada à estimativa dos poluentes foi a DHA, sempre associada positivamente nas equações, seguida pelas variáveis MDA e TCR. Os dados de MDA apresentam majoritariamente associação negativa com os poluentes, enquanto os dados de TCR apresentam correlação negativa quando associados aos dados de O₃, e correlação positiva com os demais poluentes. Dentre as variáveis químicas, os principais elementos associados nas equações são P, S, Mn, Fe e N, com correlações negativas e positivas variando em função da associação dos poluentes.

Tabela 3. Resultados dos critérios de escolha da representatividade das equações experimentais para o Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) utilizando plantas de *T. usneoides*.

<i>T. usneoides</i>		Normalidade	Igualdade	Variáveis utilizadas	R ²	p*
MP ₁₀	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+DHA) (-N) (+P)	0,857	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+DHA)(+P) (-Cu)	0,767	<0,001
NO ₂	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (-MDA) (-S) (+B) (+Mn)	0,763	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(-MDA) (+P) (-S) (+B) (+Mn) (-Sr)	0,742	<0,001
SO ₂	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+AA) (+TCR) (+N) (-P) (-S) (+B) (+Mn) (-Sr)	0,911	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+AA) (+DHA) (+TCR) (+N) (-P) (-S) (+B) (+Mn) (-Sr)	0,924	<0,001
O ₃	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+AA) (+MDA) (-TCR) (+N) (+Fe) (-Mn)	0,695	<0,001
	S/ precip	✓		(+Cl b) (+Fe) (+Mn)	0,552	<0,001
NO ₂ +SO ₂	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (-MDA) (+P) (-S) (+Fe) (+Mn)	0,812	<0,001
	S/ precip	✓		(+DHA) (-MDA) (+P) (+Fe)	0,726	<0,001
NO ₂ +SO ₂ +MP ₁₀	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+DHA) (-MDA) (+P) (+S) (+Fe)	0,882	<0,001
	S/ precip		✓	(+DHA) (-MDA) (+P)	0,761	<0,001
NO ₂ +SO ₂ +O ₃	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (-AA) (-TCR) (-S) (+Fe)	0,720	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(-AA) (+DHA) (+Fe) (+Mn)	0,591	<0,001
NO ₂ +SO ₂ +MP ₁₀ +O ₃	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+DHA) (+MS/MF) (-TCR) (-N) (+P) (+Fe)	0,797	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+DHA) (+Fe) (-Mn)	0,566	<0,001

Linhas destacadas em vermelho foram eliminadas da seleção, visto que os dados não tinham distribuição normal ou igualdade de variância. Células contornadas de azul destacam maiores valores de R² para cada espécie.

Equações preditivas das concentrações de poluentes mais explicativas (com maiores valores de R^2) foram propostas com as variáveis bióticas medidas nas plantas de *A. fasciata*, não apresentando variação no nível de explicabilidade em função da adição ou remoção da variável Precipitação. Contudo, a utilização da espécie para a avaliação do gradiente de NO_2 isolado ou em associação com o O_3 , não é indicada.

As variáveis fisiológicas mais frequentes nos modelos foram Cl *a*, Cl *b*, HPDC e MS/MF. Os dados de Cl *a* e HPDC correlacionaram-se positivamente com as variáveis dependentes, enquanto os de Cl *b* relacionaram-se negativamente. Os dados de MS/MF apresentaram, em sua maioria, correlação positiva, excetuando na associação da somatória de poluentes sem a presença de O_3 . Os principais elementos químicos associados foram N, B e Mn, com correlação negativa para N e positiva ou negativa para B e Mn, variando com a associação de cada poluente.

Os dados de Precipitação (Precip.), em ambas as espécies, foram negativamente relacionados na equação, resultado semelhante ao obtido por Ferreira (2014), que observou que a maioria dos metais-traço acumulados por *T. usneoides* na região de Paulínia e Campinas apresentou correlação positiva para emissões de MP_{10} e O_3 , e negativa com temperatura e pluviosidade.

Tabela 4. Resultados dos critérios de escolha da representatividade das equações experimentais para o Índice de Contaminação Atmosférica (ICA) utilizando plantas de *A. fasciata*.

<i>A. fasciata</i>		Normalidade	Igualdade	Variáveis utilizadas	R ²	p*
MP₁₀	C/ precip	✓	✓	(-Precip) (+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (+MS/MF) (+TCR) (-N) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn) (-Co)	0,974	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-GSH) (-GSSG) (+MS/MF) (-N) (+K) (-Ca) (+Cu) (+Mn) (-Co)	0,979	<0,001
NO₂	C/ precip		✓	(+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-AA/DHA) (+TCR) (-N) (+K) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn)	0,983	<0,001
	S/ precip		✓	(+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-AA/DHA) (+TCR) (-N) (+K) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn)	0,981	<0,001
SO₂	C/ precip			(-Precip) (+Cl b/a) (-AA) (+DHA) (+MS/MF) (+K) (+Ca) (-B) (+Cu) (-Mn) (+Zn)	0,980	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl b/a) (-AA/DHA) (+MS/MF) (-TCR) (-N) (+K) (+Ca) (-B) (+Cu) (-Mn) (+Zn)	0,973	<0,001
O₃	C/ precip	✓	✓	(-Precip) (+Cl a) (+MS/MF) (-N) (-Ca) (-B) (+Mn) (-Co)	0,915	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl a) (-Cl b) (+MS/MF) (-N) (-Ca) (-B) (+Mn) (-Co)	0,919	<0,001
NO₂+SO₂	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-AA) (+DHA) (+TCR) (-N) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn)	0,988	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-AA/DHA) (+TCR) (-N) (-Ca) (+K) (+B) (+Cu) (+Mn)	0,985	<0,001
NO₂+SO₂+MP₁₀	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-MS/MF) (+TCR) (-N) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn) (+Co)	0,985	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (-GSH) (-GSSG) (+MS/MF) (-N) (+K) (-Ca) (+B) (+Cu) (+Mn)	0,981	<0,001
NO₂+SO₂+O₃	C/ precip		✓	(-Precip.) (+Cl a) (-Cl b) (+MS/MF) (-N) (-Ca) (-Mn) (+Co)	0,927	<0,001
	S/ precip		✓	(+Cl a) (-Cl b) (+MS/MF) (-N) (+K) (-Ca) (+Mn)	0,925	<0,001
NO₂+SO₂+MP₁₀+O₃	C/ precip	✓	✓	(-Precip.) (+Cl a) (-Cl b) (+HPDC) (+MS/MF) (-N) (-Ca) (-B) (+Mn) (-Co)	0,956	<0,001
	S/ precip	✓	✓	(+Cl b/a) (+MS/MF) (-N) (+K) (-Ca) (+Mn)	0,956	<0,001

Linhas destacadas em vermelho foram eliminadas da seleção, visto que os dados não tinham distribuição normal e/ou igualdade de variância. Células contornadas de azul destacam maiores valores de R² para cada espécie.

Para melhor avaliar a credibilidade dos índices, as concentrações estimadas de O₃ e MP₁₀, a partir das equações multilíneas mais explicativas (R² = 0,979 e 0,919 respectivamente) obtidas com variáveis bióticas medidas nas plantas de *A. fasciata*, foram comparadas com os dados disponíveis pela em três estações de monitoramento da CETESB sediadas na região metropolitana de Campinas (tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre resultados dos índices de contaminação atmosférica (ICA – MP₁₀ e O₃) das plantas de *A. fasciata* e os dados ambientais disponibilizados pela CETESB nos pontos mais próximos da região de estudo.

Clima	Local	MP ₁₀ (µg m ³)	ICA _{MP10} (µg m ³)	Razão de correlação	O ₃ (µg m ³)	ICA _{O3} (µg m ³)	Razão de correlação
Úmido	Paulínia Centro	28,17	28,40	1,01	64,47	65,15	1,01
	Campinas Centro	26,93	33,14	1,23	-	-	-
	Paulínia - Sul	27,96	27,86	1,00	52,42	65,76	1,25
Seco	Paulínia Centro	43,70	40,67	0,93	67,21	76,26	1,13
	Campinas Centro	37,88	39,56	1,04	-	-	-
	Paulínia - Sul	50,34	45,30	0,90	53,15	70,52	1,33
Regressão linear (seco + úmido)	Paulínia Centro		0,97			0,97	
	Campinas Centro		0,72			-	
	Paulínia - Sul		0,78			0,63	

Os dados indicam alta correlação entre as concentrações estimadas com as equações e as concentrações atmosféricas dos poluentes, em especial para MP₁₀, que apresentou grande influência na área estudada (vide capítulo 1). Os altos valores de correlação indicam que o uso da equação elaborada com os dados obtidos em PC é aplicável aos demais pontos de coleta, com aproximação mínima de 63% entre os resultados no caso da avaliação do ozônio. Essa variação é esperada, ocorrendo principalmente devido a reações químicas que ocorrem na atmosfera e a instabilidade de alguns poluentes, que não são consideradas na captação pontual das estações de monitoramento (Tadamo *et al.* 2010).

No Brasil, o monitoramento ambiental com o uso de simulações de dispersão de poluentes utilizando modelos computacionais ISCST3 (Industrial Source Complex, Short Term, 3ª geração) e AERMOD (American Meteorological Society/Environmental Protection Agency Regulatory Model) é utilizado na área de licenciamentos ambientais (Rosa 2012). Nos estudos, os resultados são frequentemente subestimados ou superestimados, como no caso de estudos realizados em vários pontos da RMC utilizando o modelo ISCST3, e que apresentaram diferenças relativas de 52% entre a máxima concentração horária de NO_x simulada e a observada na estação de monitoramento Paulínia-Centro e de 57% para a estação Paulínia-Sul (Tadamo *et al.* 2010). Rosa (2012), que avaliou a modelagem da concentração de SO₂ na Região de Candiota-RS com o AERMOD, obteve valores subestimados das concentrações em 20%. Assim, a comparação entre esses dados e os apresentados no presente estudo

sugere que o uso do modelo aplicado no monitoramento com bromélias epífitas é uma alternativa adequada para a avaliação ambiental da região.

Com base nos resultados das tabelas 3 e 4, foram selecionadas três equações para representar o gradiente de contaminação atmosférica da RMC, de acordo com os maiores valores de R^2 e sua representatividade. Foram duas para *A. fasciata* e uma para *T. usneoides*.

Para *A. fasciata*:

$$(1) (MP_{10}+SO_2+NO_2)_E = 75,4 - (0,04*Precip) + (3,8*Cl_a) - (6,5*Cl_b) + (0,1*HPCD) + (24,2*MS/MF) + (751,1*TCR) - (3,1*N) - (1,7*Ca) + (0,5*B) + (1,1*Cu) + (0,1*Mn) - (0,7*Co) [R^2=0,985]$$

$$(2) (O_3)_E = 96,9 + (4,5*Cl_a) - (3,3*Cl_b) + (87,9*MS/MF) - (2,2*N) - (3,5*Ca) - (1,7*B) + (0,1*Mn) - (1,6*Co) [R^2=0,919]$$

Para *T. usneoides*:

$$(3) (SO_2)_E = -2,06 + (0,88*AA) + (0,89*DHA) + (183,8*TCR) + (0,53*N) - (1,38*P) - (1,42*S) + (0,07*B) + (0,07*Mn) - (0,02*Sr) [R^2=0,924]$$

A figura 1 apresenta as concentrações estimadas de poluentes a partir das três equações selecionadas, separadas por locais (ML, JA, HO, SG e PC) e clima (seco e úmido). Os maiores valores foram obtidos para o período seco, destacando variações espaciais. Esses resultados estão de acordo com os dados fornecidos pela CETESB descritos mais detalhadamente no capítulo 1 e salientam a presença de inversão térmica que potencializam a concentração de poluentes no período seco, que coincide com o inverno (Carmo & Hogan 2006). Embora não tenham apresentado diferença espacial estatisticamente significativa, durante o período seco os menores valores dos ICA 1 e ICA 2 foram observados nas plantas em SG, e os maiores em PC, enquanto os menores valores do ICA 3 foram observados nas plantas em PC.

Ainda, o gráfico ressalta as altas concentrações de O_3 na região, proporcionalmente maiores que os demais poluentes, sendo compatível com a literatura. O poluente é a principal fonte de degradação ambiental da RMC seguido pelo Material Particulado, com contribuição de vários municípios que compõe a RMC, como Paulínia e Americana (divisa com Holambra e Paulínia – vide mapa do capítulo 1), além do

tráfego que corta a região, seguindo as estradas de importância regional/nacional, como a Anhanguera e a Bandeirantes (Carmo & Hogan 2006, CETESB 2007).

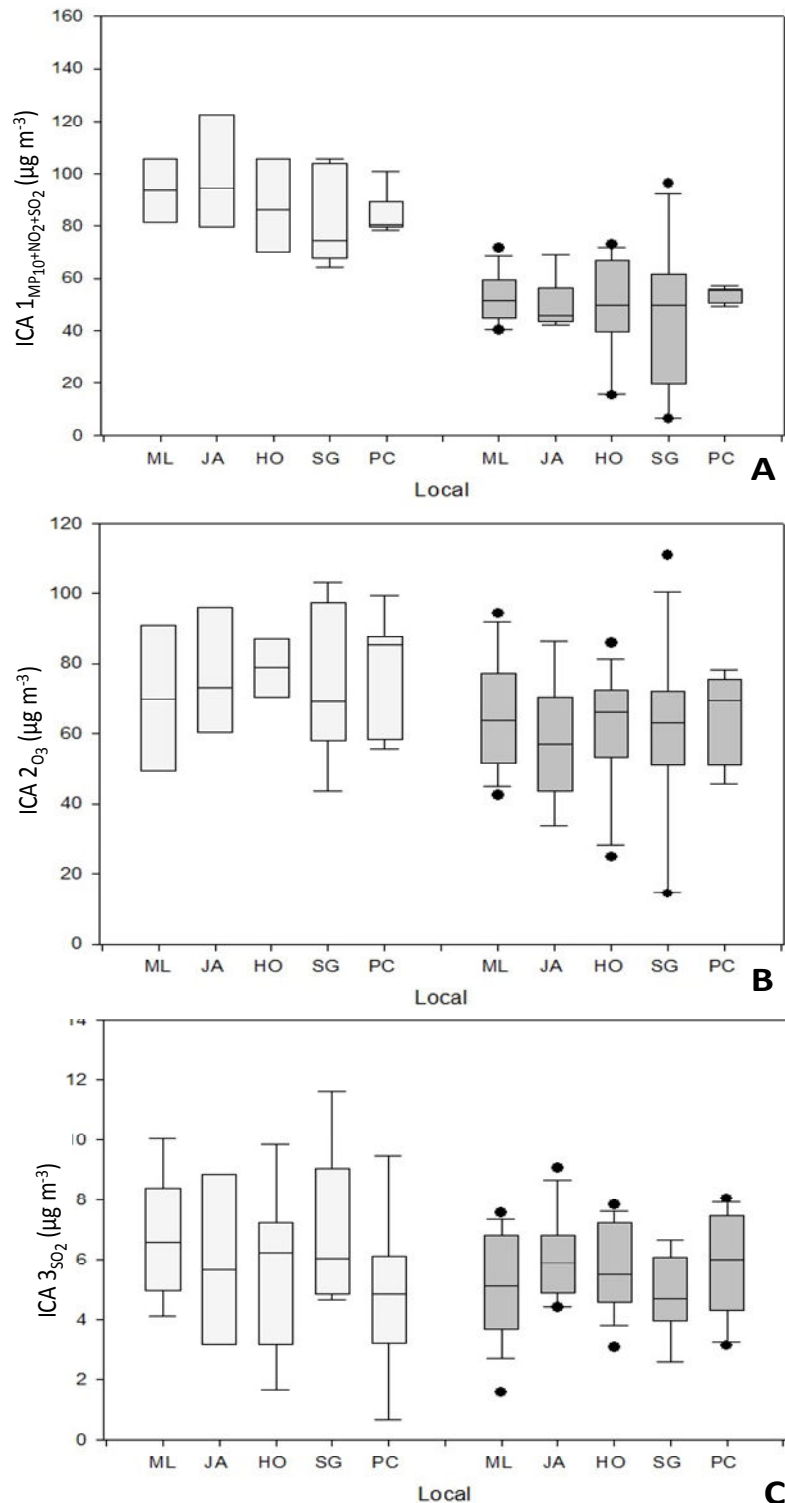


Figura 1. Médias sazonais das concentrações estimadas de MP₁₀+SO₂+NO₂ (ICA1 - A) e O₃ (ICA2 - B), a partir de variáveis bióticas medidas em plantas de *A. fasciata* e de SO₂ (ICA3 - C), a partir de variáveis bióticas medidas em *T. usneoides*, nos pontos de exposição da RMC.

A Figura 2 apresenta a distribuição espacial das concentrações estimadas de poluentes na região de estudo com base nos três índices selecionados, nos períodos úmido e seco. As figuras evidenciam a marcação sazonal dos dados, em especial para os teores de O₃. A pequena variação da direção e velocidade dos ventos indica que o principal fator de variação dos poluentes é o aumento da pluviosidade e diminuição da dispersão dos poluentes. No período seco (Figuras 2A e 2E), a somatória dos poluentes primários (MP₁₀, NO₂ e SO₂) abrangeram quase todos os pontos de coleta, formando um gradiente crescente no sentido sudeste-noroeste, e apresentando maiores concentrações em JA e ML. No período úmido, esse ICA (1) gerou maiores valores estimados de contaminação atmosférica em JA, ML e PC (Figura 2B), enquanto o ICA (3), que estimou a distribuição espacial e sazonal de SO₂, indicou maiores valores em HO e JA (Figura 2F).

O ICA (2) indicou maiores concentrações de O₃ em SG e PC no período seco (Figura 2C), seguido por HO, ML e JA. No período úmido, esses dados se invertem, ocorrendo estimativamente maiores concentrações de O₃ em JA e ML.

Os altos valores dos ICAs em JA na maioria dos casos, e em ML, SG e HO e arredores no caso dos valores de ICA(3) e ICA(1), podem ser explicados pela contribuição elevada dos veículos movidos a óleo diesel na região, como caminhões de transporte de cana-de-açúcar e máquinas de colheita automática, responsáveis por 69,15% do total de emissões de NO_x da região (Carmo & Hogan 2006), pela ressuspensão de material do solo e por queimadas de pastos e lavouras, práticas comuns na época seca, que coincide com o inverno (julho a setembro) e com a época de colheita da cana-de-açúcar, quando também ocorre aumento significativo das concentrações de óxidos de carbono (CO_x) (Bermann 2008, Candido & Nunes 2010, Tadamo *et al.* 2010, Ueda & Tomaz 2011) e pela aplicação de agrotóxicos e vinhaça na região.

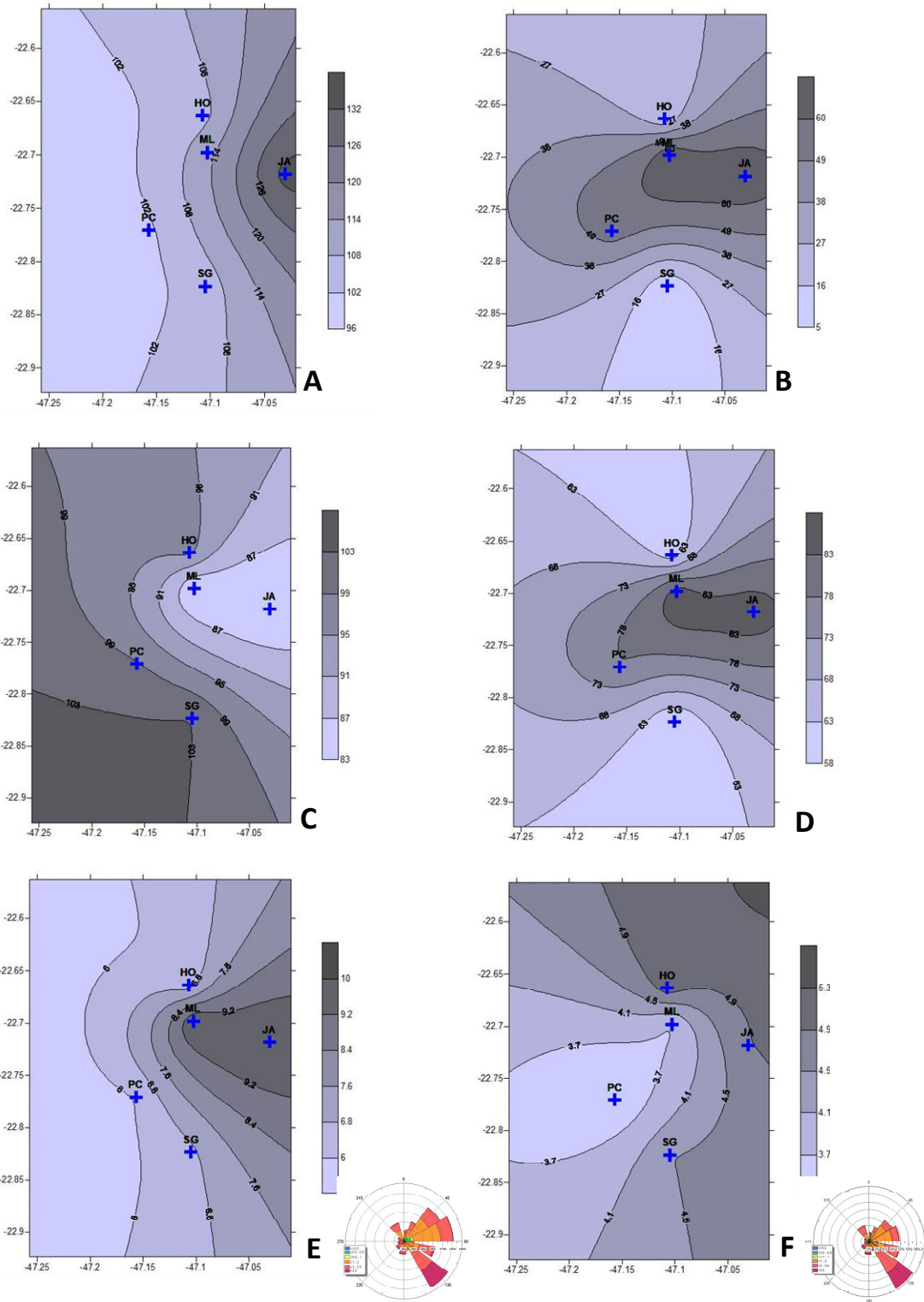


Figura 2: Distribuição espacial do gradiente de contaminação atmosférica produzido pelos Índices de Contaminação Atmosférica (ICA) nos pontos de estudo da RMC com plantas de *A. fasciata* (A-D) e *T. usneoides* (E e F). A: ICA(1) – $(MP_{10}+SO_2+NO_2)_E$ no período seco; B: ICA(1) – $(MP_{10}+SO_2+NO_2)_E$ no período úmido; C: ICA(2) – $(O_3)_E$ no período seco; D: ICA(2) – $(O_3)_E$ no período úmido; E: ICA(3) – $(SO_2)_E$ no período seco; F: ICA(3) – $(SO_2)_E$ no períodos úmido.

Segundo o relatório técnico da Embrapa (Luiz *et al.* 2004), em 1995 a RMC tinha mais de 50.000 hectares de plantação de cana-de-açúcar, 42.000 hectares de pastos e 32.000 hectares de plantação de citros e milho. Neles, mais de 300.000 litros de agrotóxicos (herbicidas e fertilizantes) eram aplicados. Atualmente as áreas cultivadas e pastagem aumentaram consideravelmente, como indicado na Figura 4 do Capítulo 1, e alguns estudos ainda alertam para danos ambientais causados produtos químicos como agrotóxicos e a vinhaça (Machado 2009). A vinhaça, subproduto da cana-de-açúcar utilizado amplamente para fertirrigação dos solos na região, é rico em matéria orgânica e nutrientes como K, Ca e S (Alvarenga e Queiroz 2009), e metais como Fe, Mn, Zn e Cu (Silva & Orlando Filho 1981, Ramalho e Sobrinho 2001).

Além da contribuição das atividades agrícolas e urbanas da região, e do contato constante com material particulado provenientes de rodovias como a Anhanguera e a Bandeirantes (Carmo & Hogan 2006, Machado 2009) a cidade de Campinas também apresenta o acréscimo de poluentes como MP_{10} e O_3 provenientes da cidade de São Paulo, em função das condições meteorológicas da região (com direção do vento predominante de sul e sudeste - o que ocorre praticamente o ano todo), e da transição topográfica de plateau na RMSP à depressão em RMC (Miranda & Tomaz 2008, Boian & Andrade 2012), explicando os altos valores de poluentes durante o período seco (Figura 2A, 2C, 2E) no ponto SG.

A análise dos gráficos B, D e F da Figura 2 sugerem a maior influência das emissões de NO_2 do que SO_2 no período úmido. O NO_2 , juntamente com os compostos orgânicos voláteis (COV), é um dos principais precursores do O_3 (Blacet 1952, Seinfeld *et al.* 2008), ambos emitidos por fontes estacionárias (indústrias) e móveis (veículos) de queima de combustível fóssil. A correlação é evidenciada pela similaridade observada entre as figuras 2B e 2D. Ainda, no período seco observa-se maior influência de SO_2 na composição dos aportes de poluentes quando comparados ao período úmido, (Figuras 2A e 2E).

4. Conclusões

Além dos critérios de escolha mencionados para a eleição das equações, optou-se pelas três equações descritas anteriormente por apresentarem a representação mais ampla da distribuição dos poluentes da região, uma vez que as variadas fontes encontram-se distribuídas pela região. Contudo, como indicado nas tabelas 3 e 4, é possível avaliar cada poluente separadamente com moderada precisão e alta confiabilidade. Assim, as demais equações obtidas nesse estudo e que preencheram os critérios pré-estabelecidos estão descritas no Apêndice 1.

A espécie *A. fasciata* apresenta maior sensibilidade aos poluentes, sendo capaz de avaliar as condições ambientais com mais de 98% de confiabilidade. *T. usneoides* é indicada para a mesma avaliação, no entanto, obtendo no máximo 88% de confiabilidade, com exceção da avaliação de poluentes sulfurados, cuja confiabilidade é de mais de 90%.

A avaliação conjunta dos dados químicos e fisiológicos das espécies provou ser mais eficiente para avaliação espacial da região do que a análise das variáveis individuais.

O índice indicou variações sazonais e espaciais, destacando o ponto JA como o mais afetado pela poluição e indicando a grande influência das atividades agrícolas na qualidade ambiental da região.

5. Referências

Alvarenga, R.P. & Queiroz, T.R. 2009. Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. *In:* B.F. Giannetti, C.M.V.B. Almeida & S.H. Bonila International Workshop Advances in Cleaner Production, São Paulo.

Amancio, C.T. & Nascimento, L.F. 2014. Environmental pollution and deaths due to stroke in a city with low levels of air pollution: ecological time series study. *São Paulo Medical Journal* 132: 353-358.

Babu, G.B., Parveen, S.N., Kumar, K.N. & Reddy, M.S. 2013. Evaluation of Air Pollution Tolerance Indices of Plant Species Growing in the Vicinity of Cement Industry and Yogi Vemana University Campus. *Indian Journal of Advances in Chemical Science* 2: 16-20.

Benzing, D.H., Henderson, K., Kessel, B. & Sulak, J. 1976. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. *American Journal of Botany* 63: 1009-1014.

Benzing, D.H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press, Cambridge.

Bermann, C. 2008. Crise ambiental e as energias renováveis. *Ciência e Cultura* 60: 20-29.

Bermudez, G., Rodriguez, J.H. & Pignata, M.L. 2009. Comparison of the air pollution biomonitoring ability of three *Tillandsia* species and the lichen *Ramalina celastri* in Argentina. *Environmental Research* 109: 6-14.

Blacet, F.E. 1952. Photochemistry in the lower atmosphere. *Industrial & Engineering Chemistry* 44: 1339-1342.

Boian C. & Andrade M.F. 2012. Characterization of ozone transport among Metropolitan Regions. *Revista Brasileira de Meteorologia* 27: 229-242.

Candido, D.H. & Nunes, L.H. 2010. Distribuição espacial dos fragmentos de vegetação arbórea da região metropolitana de Campinas: Uma análise com uso de ferramentas do geoprocessamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana* 5: 82-105.

Carmo, R.L. & Hogan, D.J. 2006. Questões ambientais e riscos na Região Metropolitana de Campinas. *In:* J.M.P. Cunha (Org.). *Novas Metrôpoles Paulistas - População, Vulnerabilidade e Segregação*. Núcleo de Estudos de População - NEPO/Unicamp, Campinas, pp. 581-604.

CETESB - Companhia Ambiental do estado de São Paulo. 1992. Relatório de qualidade atmosférica no estado de São Paulo – 1991. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/agua/aguas-superficiais/aguas-interiores/documentos/indices/01.pdf> Acessado em 26/12/2014.

CETESB - Companhia Ambiental do estado de São Paulo. 2003. Relatório da qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatório. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

CETESB - Companhia Ambiental do estado de São Paulo 2007. Relatório da qualidade do ar no estado de São Paulo. Série Relatório. Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.

Clancy, L., Goodman, P., Sinclair, H. & Dockery, D.W. 2002. Effect of air-pollution control on death rates in Dublin, Ireland: an intervention study. *The Lancet* 360: 1210-1214.

EPA. 1998. Guideline for reporting of daily air quality – Pollutant Standards Index (PSI). Disponível em <http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t1/memoranda/rprtguid.pdf> (acessado em 26/12/2014).

Ferreira, G.G.P. 2014. *Tillandsia usneoides* (L.) como ferramenta de monitoramento de poluição atmosférico para metais-traço nos municípios de Campinas e Paulínia, estado de São Paulo, SP, Brasil. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental* 18: 254-272.

González, C.M. & Pignata, M.L. 1994. The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulphur and heavy metals in a transplanted lichen. *Chemistry and Ecology* 9: 105-113.

González, C.M., Casanovas, S.S. & Pignata, M.L. 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Córdoba, Argentina. *Environmental Pollution* 91: 269-277.

Gouveia, N., Freitas, C.U.D., Martins, L.C. & Marcilio, I.O. 2006. Respiratory and cardiovascular hospitalizations associated with air pollution in the city of São Paulo, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 22: 2669-2677.

Hair Jr., J.F., Anderson, R.E, Tatham, R.L & Black, W.C. 1998. *Multivariate Data Analysis*. Prentice Hall Inc., New Jersey.

Kuddus, M., Kumari, R. & Ramteke, P.W. 2011. Studies on air pollution tolerance of selected plants in Allahabad city, India. *Journal of Environmental Research and Management* 2: 42-46.

Lakshmi, P.S., Sravanti, K.L. & Srinivas, N. 2009. Air pollution tolerance index of various plant species growing in industrial areas. *The Ecoscan* 2: 203-206.

Legendre, P. & Legendre, L.F. 2012. *Numerical ecology*. Elsevier Science BV, Amsterdam.

Luiz, A.J.B., Neves, M.C. & Dynia, J.F. 2004. Implicações potenciais na qualidade das águas subterrâneas das atividades agrícolas na Região Metropolitana de Campinas, SP. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna.

- Machado, M.H.F.** 2009. A relevância das áreas protegidas para a gestão sustentável das metrópoles brasileiras: o caso da região metropolitana de Campinas. PUC. Disponível em http://www.elecs2013.ufpr.br/wp-content/uploads/anais/2009/2009_artigo_011.PDF Acessado em 26/XII/2014.
- Miranda, R. & Tomaz, E.** 2008. Characterization of urban aerosol in Campinas, São Paulo. *Brazilian Atmospheric Research* 87: 147-157.
- Moraes, R.M.** 1999. Fotossíntese líquida e respostas bioindicadoras da poluição aérea em indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* Cogn. (Melastomataceae), em Cubatão, SP. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Pignata, M.L., González, C.M., Carreras, H.A. & Wannaz, E.D.** 2013. Guía para el muestreo de líquenes y plantas epífitas que se emplean como biomonitores de acumulación de metales pesados y elementos traza en Latinoamérica. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.
- Pignata, M.L., Gudiño, G.L., Wannaz, E.D., Plá, R.R., González, C.M., Carreras, H.A. & Orellana, L.** 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Environmental Pollution* 120: 59-68.
- Queiroz, P.G.M., Jacomino, V.M.F. & Menezes, M.A.B.C.** 2007. Composição elementar do material particulado presente no aerossol atmosférico do município de Sete Lagoas, Minas Gerais. *Química Nova* 30: 1233-1239.
- Ramalho, J.F.G.P. & Sobrinho, N.M.B.A.** 2001. Metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso de resíduos agroindustriais. *Revista Floresta e Ambiente* 8: 120-129.
- Rosa, A.F.M.** 2012. Modelagem da Concentração de Dióxido de Enxofre na Região de Candiota-RS utilizando o modelo AERMOD. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Seinfeld, J.H., Pandis, S.N. & Noone, K.** 2008. Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change. *Physics Today* 51: 88-90.
- Silva, G.D.A. & Orlando Filho, J.** 1981. Caracterização da composição química dos diferentes tipos de vinhaça no Brasil. PLANALSUCAR, Piracicaba.
- Singh S.K. & Rao, D.N.** 1983. Evaluation of the plants for their tolerance to air pollution Proc. Symp on Air Pollution control held at IIT, Delhi 218-224.
- Stieb, D.M., Judek, S. & Burnett, R.T.** 2002. Meta-analysis of time-series studies of air pollution and mortality: effects of gases and particles and the influence of cause of death, age, and season. *Journal of the Air & Waste Management Association* 52: 470-484.
- Sunyer, J., Schwartz, J., Tobías, A., Macfarlane, D., Garcia, J. & Antó, J.M.** 2000. Patients with chronic obstructive pulmonary disease are at increased risk of death

associated with urban particle air pollution: a case-crossover analysis. *American Journal of Epidemiology* 151: 50-56.

Systat Software 2008. Manual de análises estatísticas do Softwer Sigma Stat 8.0. Systat Software, Inc., San Jose.

Tadano, Y.S., Mazza, R.A. & Tomaz, E. 2010. Modelagem da dispersão de poluentes atmosféricos no Município de Paulínia (Brasil) empregando o ISCST3. *In: Proceedings of the XXXI Iberian-Latin-American Congress on Computational Methods in Engineering*, Buenos Aires, pp. 8125-8148.

Ueda, A.C. & Tomaz, E. 2011. Inventário de emissão de fontes veiculares da Região Metropolitana de Campinas, São Paulo. *Química Nova* 34: 1496-1500.

Wannaz, E.D., Carreras, H.A., Perez, C.A. & Pignata, M.L. 2011. Relationship between trace elemental composition in *Fraxinus pennsylvanica* bark and the incidence of some respiratory diseases in Cordoba, Argentina. *International Journal of Environment and Health* 5: 60-71.

Wannaz, E.D. & Pignata, M.L. 2006. Calibration of four species of *Tillandsia* as air pollution biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 53: 185-209.

Capítulo V – Considerações Finais

A utilização de bromélias epífitas como bioindicadoras da contaminação atmosférica é uma realidade e seu uso é cientificamente aceito como instrumento essencial para o monitoramento ambiental.

A espécie *Tillandsia usneoides* e outras espécies do mesmo gênero têm-se mostrado adequada para o biomonitoramento, sendo utilizada em diversos estudos, mas suas limitações, como o crescimento lento, a dificuldade de cultivo e a necessidade de retirada de amostras da natureza vêm sendo um empecilho para a continuidade dos estudos. O uso de bromélias dessa espécie comercialmente cultivadas, como no caso das utilizadas nesse estudo, provou ser adequada para atender algumas das necessidades citadas.

No presente estudo, o potencial bioindicador da espécie *Aechmea fasciata* foi estabelecido, ao compara-lo criticamente ao de *T. usneoides*. Ambas as espécies foram consideradas tolerantes ao estresse tendo, provavelmente, influência do metabolismo CAM característico das espécies. Os resultados mostraram que, apesar de mais sensível ao ambiente quando comparada à *T. usneoides*, a estrutura formadora de tanque da *A. fasciata* a torna mais eficiente na captação de nutrientes e na interação com o ambiente. A espécie apresenta maior capacidade de acúmulo de metais nos tecidos foliares e maiores variações de parâmetros fisiológicos e químicos em situação de estresse, não apresentando, contudo, danos visíveis.

A avaliação conjunta dos vários parâmetros marcadores do ambiente mostrou-se mais eficaz do que o uso de parâmetros individuais em ambas as espécies. Contudo, alguns parâmetros destacaram-se na avaliação do estresse das plantas, como os teores de pigmentos e os metabólicos resultantes da peroxidação lipídica (HPDC e MDA) e os teores de N, S, Fe e Mn, em especial para as plantas de *A. fasciata*.

Smoldis *et al.* (2004) afirmaram que não existe um bioindicador universal, apenas vários bioindicadores regionais e sua determinação depende das condições climáticas dentro de regiões investigadas. Após 10 anos de estudo a premissa permanece. Segundo os autores, quando são utilizados vários organismos em uma pesquisa, estes devem ser objeto de intercalibração visando produzir resultados comparáveis. No presente estudo, os resultados das duas espécies foram semelhantes, apresentando melhor ou pior desempenho, dependendo dos parâmetros avaliados.

Ainda, a complexidade da área de estudo, cuja topografia plana e a direção quase constante dos ventos permitindo a maior dispersão dos poluentes; assim como as diferentes fontes de poluição conjugadas (urbana, industrial e agrícola), pode ser amenizada pelo uso da associação de parâmetros indicadores de estresse em uma equação matemática.

Os resultados obtidos no estudo mostram a espécie *A. fasciata* como boa indicadora de contaminação atmosférica, em especial como bioacumuladora de metais traços e marcadores de fontes poluidoras. Ainda, dentre as espécies estudadas, sugere-se o uso das plantas de *A. fasciata* também pelos modelos multilíneares preditivos das concentrações de poluentes, com base em variáveis bióticas, que foram mais explicativos do que os propostos com variáveis bióticas de *T. usneoides*. A somatória de concentrações de poluentes primários na região de estudo pode ser estimada com 98,5% de explicabilidade, medindo-se teores de Precipitação, Cl_a, Cl_b, HPCD, MS/MF, TCR, N, Ca, B, Cu, Mn e Co. A contaminação por O₃ (92% explicabilidade), por sua vez, pode ser deduzida a partir de medidas de Cl_a, Cl_b, MS/MF, N, Ca, B, Mn e Co. Embora a Precipitação seja uma variável ambiental condicional na região e para o metabolismo de plantas epífitas, os resultados apresentados no Capítulo 4, no desenvolvimento das equações matemáticas, indicam que a *A. fasciata* é menos afetada pela sazonalidade.

Além disso, a *A. fasciata* apresenta fácil propagação e cultivo, e ampla distribuição nas Américas, o que facilita seu processo de adaptação. Ressaltamos, ainda, que as plantas de *A. fasciata* precisam estar em um estágio não, ou seja, quando o tanque estiver completamente formado, como as utilizadas nesse estudo. O uso de plantas com maiores pesos (mínimo 35,0 g) e altura foliar incidirá a melhor capacidade de armazenamento de água no tanque e no melhor desempenho das plantas para o biomonitoramento.

A *T. usneoides* apresentou alta explicabilidade (> 92%) para o índice de avaliação das concentrações de SO₂, sendo indicada primeiramente para avaliação deste poluente e secundariamente para a avaliação dos demais poluentes.

Smodiš, B., Pignata, M.L., Saiki, M., Cortés, E., Bangfa, N., Markert, B. & Frontasyeva, M. 2004. Validation and application of plants as biomonitors of trace element atmospheric pollution a co-ordinated effort in 14 countries. Journal of Atmospheric Chemistry 49: 3-13.

Apêndice 1

Equações elaboradas durante o estudo, além das apresentadas no manuscrito, cujo o R² indicou mais de 80% de confiabilidade (em relação à presença ou ausência da variável Precipitação, foram elegidas as equações com maiores R² dentre as opções):

Tillandsia usneoides:

$$(4) \text{MP}_{10} + \text{SO}_2 + \text{NO}_2 = 70,4 - (0,04 * \text{Precip.}) + (20,6 * \text{DHA}) - (1,2 * \text{MDA}) + (14,8 * \text{P}) + (9,2 * \text{S}) + (0,01 * \text{Fe}) \quad [\text{R}^2 = 0,882]$$

$$(5) \text{NO}_2 + \text{SO}_2 = 24,44 - (0,019 * \text{Precip.}) - (0,13 * \text{MDA}) + (7,41 * \text{P}) - (5,59 * \text{S}) + (0,007 * \text{Fe}) + (0,31 * \text{Mn}) \quad [\text{R}^2 = 0,812]$$

Aechmea fasciata

$$(1) \text{MP}_{10} = 48,59 + (3,64 * \text{Cl } a) - (4,2 * \text{Cl } b) + (0,05 * \text{HPDC}) - (0,324 * \text{GSH}) - (0,26 * \text{GSSG}) + (16,43 * \text{MS/MF}) - (3,6 * \text{N}) + (0,75 * \text{K}) - (1,78 * \text{Ca}) + (0,58 * \text{Cu}) + (0,103 * \text{Mn}) - (0,52 * \text{Co}) \quad [\text{R}^2 = 0,979]$$

$$(2) \text{NO}_2 = 22,79 + (1,93 * \text{Cl } a) - (3,84 * \text{Cl } b) + (0,06 * \text{HPDC}) - (0,06 * \text{AA/DHA}) + (287,44 * \text{TCR}) - (2,61 * \text{N}) + (0,305 * \text{K}) - (0,773 * \text{Ca}) + (0,88 * \text{B}) + (0,6 * \text{Cu}) + (0,082 * \text{Mn}) \quad [\text{R}^2 = 0,983]$$

$$(3) \text{SO}_2 = 5,13 + (0,76 * \text{Cl } b/a) - (0,03 * \text{AA/DHA}) + (4,08 * \text{MS/MF}) - (75,06 * \text{TCR}) - (0,5 * \text{N}) + (0,24 * \text{K}) + (0,27 * \text{Ca}) - (0,11 * \text{B}) + (0,2 * \text{Cu}) - (0,012 * \text{Mn}) + (0,038 * \text{Zn}) \quad [\text{R}^2 = 0,973]$$

$$(4) \text{NO}_2 + \text{SO}_2 = 36,97 - (0,025 * \text{Precip.}) + (1,5 * \text{Cl } a) - (3,22 * \text{Cl } b) + (0,05 * \text{HPDC}) - (0,89 * \text{AA}) + (1,66 * \text{DHA}) + (352,49 * \text{TCR}) - (1,53 * \text{N}) - (0,39 * \text{Ca}) + (0,5 * \text{B}) + (0,66 * \text{Cu}) + (0,035 * \text{Mn}) \quad [\text{R}^2 = 0,988]$$

$$(5) \text{MP}_{10} + \text{SO}_2 + \text{NO}_2 + \text{O}_3 = 176,8 - (0,06 * \text{Precip.}) + (7,76 * \text{Cl } a) - (8,26 * \text{Cl } b) + (0,155 * \text{HPDC}) + (131,9 * \text{MS/MF}) - (5,14 * \text{N}) - (4,57 * \text{Ca}) - (1,3 * \text{B}) + (0,245 * \text{Mn}) - (1,45 * \text{Co}) \quad [\text{R}^2 = 0,956]$$