



LOCALIZAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM *PSIDIUM GUAJAVA* 'PALUMA' E *NICOTIANA TABACUM* 'BEL - W3' DECORRENTE DA EXPOSIÇÃO AO OZÔNIO TROPOSFÉRICO NA CIDADE DE SÃO PAULO - BRASIL

Andrea Nunes Vaz Pedroso¹

Fernanda Tresmondi²; Edenise Segala Alves³

¹ Doutoranda pelo Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo. <u>andrea.nvpedroso@gmail.com</u>

² Mestranda pelo Programa de Pós - Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica de São Paulo.

³ Instituto de Botânica de São Paulo, Av. Miguel Estéfano, 3687, Água Funda, CEP 04301 - 012, São Paulo, SP, Brasil.

INTRODUÇÃO

Nos centros urbanos, o problema da poluição do ar constitui uma das mais graves ameaças à qualidade de vida de seus habitantes, fato esse agravado pelos veículos automotores que são os principais causadores dessa poluição em todo mundo. O Estado de São Paulo enfrenta uma situação particularmente preocupante por deter cerca de 40% da frota automotiva do país.

O ozônio (O₃) troposférico é um poluente secundário muito fitotóxico formado por meio de reações fotoquímicas na atmosfera, na presença de poluentes primários como óxidos de nitrogênio e compostos orgânicos voláteis (Freedman, 1995). Esse gás entra pela folha através dos estômatos e reage formando espécies ativas de oxigênio (EAO), causando um estresse oxidativo inicial (Pellinen *et al.*, 1999), podendo danificar moléculas vitais como proteínas, lipídeos e ácidos nucléicos.

Dentre as EAO formadas, se inclui o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que quando acumulado em certos tecidos foliares e em quantidades apropriadas, beneficia a planta, mediante a aclimação e a tolerância cruzada a estresses bióticos e abióticos (Soares & Machado, 2007). Peróxido de hidrogênio é um oxidante relativamente estável e sem carga, o que pode facilitar sua passagem através da camada bilipídica da membrana celular. Essa capacidade de se difundir rapidamente pela membrana celular favorece a rápida elicitação da resposta vegetal (Apostol *et al.*, 1989). A intensidade de ação biológica, no entanto, depende da eficiência do sistema celular antioxidante de capturar e neutralizar as EAO (Bray *et al.*, 2000).

O efeito tóxico do O₃ pode causar danos macroscópicos na vegetação como o aparecimento de sintomas visíveis nas folhas de espécies vegetais sensíveis (Novak *et al.*, 2003), alterações no crescimento (Ollinger *et al.*, 1997), além de

danos metabólicos como alteração na taxa fotossintética e condutância estomática (Paoletti *et al.*, 2007). Pode causar, também, senescência celular acelerada (Pell *et al.*, 1997; Iriti & Faoro, 2008), danos microscópicos caracterizados por protrusões pécticas nas paredes das células do mesofilo (Günthard - Goerg *et al.*, 2000; Vollenweider *et al.*, 2003), acúmulo de substâncias fenólicas, acompanhado de alterações no tamanho dos vacúolos e desarranjo de organelas (Vollenweider *et al.*, 2003; Dizengremel, 2001; Reig - Armiñana *et al.*, 2004).

Plantas que possuem a capacidade de responder de maneira específica a um determinado poluente são consideradas bioindicadoras, e têm sido muito empregadas em programas de biomonitoramento da qualidade do ar, fazendo das mesmas uma importante ferramenta alternativa para mapeamento espacial e temporal de riscos impostos pela poluição aérea aos sistemas biológicos (Arndt & Schweizer, 1991; Mulgrew & Williams, 2000).

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) é um dos mais significativos remanescentes de Mata Atlântica inserido em área urbana do país (Barbosa *et al.*, 2002). Alguns estudos realizados no local estabeleceram que a região é fortemente afetada por O₃ (Domingos *et al.*, 1998; Klumpp *et al.*, 1994; Domingos *et al.*, 2002). Na área do PEFI, as concentrações de O₃ podem alcançar níveis superiores a 102 ppb, ultrapassando não raramente o padrão horário de qualidade do ar (80 ppb) estabelecido pela resolução CONAMA Nº 3/1990 (CETESB, 2007).

No hemisfério norte há muitos estudos que avaliam sintomas macro e microscópicos em plantas submetidas ao ozônio (Günthardt - Goerg & Vollenweider, 2007), o primeiro passo no estabelecimento de plantas potencialmente indicadoras da presença desse gás. Algumas espécies de região temperada já foram selecionadas e protocoladas como bioindicadoras. A cultivar Bel - W3 de *Nicotiana tabacum* é consider-

ada sensível ao O₃, bem adaptada às condições desse hemisfério e amplamente utilizada para qualificação de níveis tóxicos de ozônio (Krupa & Manning, 1988; Heggestad, 1991; Klumpp *et al.*, 2001; Vergé *et al.*, 2002), uma vez que suas injúrias foliares (necroses intervenais) são facilmente observáveis e identificáveis. Essa cultivar foi utilizada nas condições tropicais no monitoramento do ozônio na região do Complexo Industrial de Cubatão (Domingos *et al.*, 1998) e mais recentemente em meio urbano (Domingos *et al.*, 2002; Sant'Anna *et al.*, 2008), porém mais estudos são necessários para se entender o seu comportamento quando exposta às condições climáticas da cidade de São Paulo.

No Brasil, contudo, estudos com plantas bioindicadoras ainda são incipientes e pouco se sabe sobre as respostas de espécies nativas. *Psidium guajava* 'Paluma' vem sendo investigada, sob condições experimentais quanto ao seu potencial bioindicador de ozônio. Quando submetida a esse gás responde com a formação de pontuações avermelhadas nas regiões intervenais das folhas adultas, observáveis somente na superfície adaxial, e com alterações nos tecidos foliares (Furlan, 2004; Pina *et al.*, 2007).

OBJETIVOS

Diante disso, este trabalho teve como objetivos: comparar, com base na anatomia foliar, as respostas ao estresse oxidativo causado pelo O₃ troposférico na cidade de São Paulo, em *Psidium guajava* 'Paluma' (espécie lenhosa) e *Nicotiana tabacum* Bel - W3 (espécie herbácea) e avaliar os mecanismos de defesa dessas espécies ao estresse oxidativo, por meio do acúmulo de espécies ativas de oxigênio (H₂O₂).

MATERIAL E MÉTODOS

1-Cultivo e manutenção das mudas

Mudas de *P. guajava* 'Paluma' foram obtidas de produtor especializado e transplantadas para vasos plásticos contendo substrato padronizado (Plantimax®), vermiculita e casca de coco 2:2:1). As mudas permaneceram em casa de vegetação com ar filtrado e controle de temperatura, por cerca de 15 dias para aclimação antes do início da exposição.

As mudas de *N. tabacum* Bel - W3 foram cultivadas a partir de sementes, em vasos plásticos, contendo substrato comercial Plantimax (Eucatex) e vermiculita fina, misturados na proporção de 3:1, respectivamente. As plantas de *N. tabacum* ficaram prontas para exposição, seguindo a recomendação do VDI (2003), quando apresentavam pelo menos sete folhas, em média, dois meses após a semeadura. A exposição de mudas dessas duas espécies, submetidas às mesmas condições ambientais, ocorreu concomitantemente, nos anos de 2007 e 2008, sendo que, cada exposição teve duração aproximada de 80 dias.

Após serem transplantadas para os respectivos vasos, nos quais ficaram até o final das exposições, as mudas das duas espécies foram mantidas em suportes com caixas plásticas que continham água e eram cobertas com telas de arame galvanizado. A irrigação das plantas foi realizada por capilaridade, por cordões que tinham uma das extremidades in-

seridas nos vasos na altura das raízes e a outra em contato com a água da caixa plástica (VDI, 2003).

As plantas foram expostas de forma a padronizar as condições a que estavam submetidas como temperatura, precipitação, velocidade do vento e irradiância. Cerca de 10 mudas, para cada estação do ano, permaneceram em casa de vegetação, com filtro de ar e controle de temperatura, e foram utilizadas como material de referência. Os dados de poluentes presentes no ambiente, foram monitorados por analisadores devidamente calibrados.

Para evitar o aparecimento de alterações que pudessem interferir na identificação dos sintomas provocados pelo O₃, como carência de nutrientes e herbivoria, as plantas foram adubadas mensalmente com 100 ml de solução de Peters N:P:K (10:10:10) para cada vaso e receberam solução acaricida Actara ®.

2-Coleta das amostras

Seis mudas de *P. guajava* foram retiradas semanalmente do local de exposição para coleta e análise das folhas. Dessas, foram retirados fragmentos de duas folhas adultas totalmente expandidas, dos terceiros e quartos nós, uma vez que a literatura informa serem essas as mais sensíveis ao ozônio (Novak *et al.*, 2003).

Para as coletas dos indivíduos de *N. tabacum* utilizou-se, o já bem definido protocolo VDI (2003) imposto para essa planta. As plantas permaneceram expostas por 14 dias, dos quais foram sorteados 3 dias, para a coleta de seis plantas, das quais foram retirados fragmentos das folhas 6 e 7 para análises.

3-Localização e contagem do acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Fragmentos de folhas frescas, com cerca de 1 cm², foram imersos em solução contendo 1mg mL⁻¹ de 3,3' - diaminobenzidina (DAB) - HCl, (pH 5,6 ajustado com hidróxido de sódio). Estes foram incubados em câmara escura por oito horas. Em seguida, os fragmentos foram clarificados em álcool a 95% (Iriti *et al.*, 2003; modificado). As células que apresentaram acúmulo de H₂O₂ adquiriram a coloração marrom. Como controle negativo acrescentou-se 10mM de ácido ascórbico à solução de DAB e não foram observadas células coradas em marrom.

Todas as amostras foram examinadas em microscópio equipado com câmera para captura de imagens e sistema semi-automático de medições-Olympus modelo BX41 - BF - III, com *software* de análise de imagens Image - ProExpress versão 4.0.1, Media Cybernetics.

Nas duas espécies estudadas buscou-se quantificar o acúmulo de H₂O₂. Em *N. tabacum* foi possível discriminar o tecido e o número de células com acúmulo enquanto que em *P. guajava* tal quantificação foi possível apenas nas células epidérmicas da superfície adaxial da folha. Nas células epidérmicas da superfície abaxial foi possível apenas registrar a presença de certo acúmulo na região do ostíolo, sem ser possível, contudo, discriminar o número de células. Nesse caso foi quantificado apenas o número de plantas, dentre as seis amostradas, com algum destaque quanto à coloração na região do ostíolo.

RESULTADOS

A espécie *P. guajava* apresenta folhas hipoestomáticas e mesofilo formado de parênquima paliçádico, cujas células são altas quando próximas da epiderme superior, diminuindo de altura à medida que se aproximam da epiderme inferior (Souza, 1971). Rutz (1895) e Soleder (1899) (*apud* Sousa, 1971) descrevem que abaixo da epiderme, na superfície adaxial da folha, encontram-se duas a três camadas que constituem uma hipoderme. A cultivar 'Bel - W3' de *N. tabacum* possui folha anfiestomática, o mesofilo é formado por uma camada única de parênquima paliçádico e com quatro a cinco camadas de parênquima lacunoso (Pedroso & Alves, 2008). Quando se compara a estrutura anatômica da folha das duas espécies, nota-se maior sensibilidade ao ozônio de *N. tabacum*, que apresenta estrutura mais frouxa, que facilita a difusão desse gás no interior da folha (Ferdinand *et al.*, 2000; Pedroso & Alves, 2008).

Na primavera de 2007 e no verão de 2008, as concentrações médias de O₃ na área de exposição foram baixas, apresentando valores médios de 0,02 ppm. Porém, verificando-se os valores diários, em certos períodos as concentrações atingiram 0,04 ppm, valor considerado "regular" pela Cetesb. Em *N. tabacum* o número de células com acúmulo de H₂O₂ foi maior no início da exposição e diminuiu ao longo do tempo nas coletas realizadas ao longo das exposições. Independentemente da intensidade do acúmulo, observou-se que o parênquima paliçádico foi aquele que mais acumulou H₂O₂, o que está de acordo com a literatura, que indica que esse é o tecido alvo preferencial das EAO (Reig - Armiñana *et al.*, 2004; Günthardt - Goerg & Vollenweider, 2007). Em *P. guajava*, os resultados mostraram que durante o verão as plantas apresentaram aumento do acúmulo de H₂O₂ nas células epidérmicas da superfície adaxial ao longo do tempo de exposição até o aparecimento dos sintomas visíveis, quando o acúmulo foi reduzido. Tais sintomas são decorrentes do aumento da produção de antocianina nos tecidos foliares, que por sua vez, tem alto poder antioxidante (Gould *et al.*, 2002), reagindo positivamente contra o estresse oxidativo. No entanto, pelo menos metade dos indivíduos acumulou H₂O₂ nas células epidérmicas da superfície abaxial, após 15 dias de exposição. Esse acúmulo esteve sempre localizado nas células estomáticas ou ao seu redor, que indica estresse oxidativo causado pelo poluente, já que os estômatos são o primeiro sítio de reação das EAO (Iriti *et al.*, 2006; Iriti & Faoro, 2008).

No outono e inverno, os valores médios de O₃ atingiram o valor de 0,02 ppm, porém em alguns meses do outono, esse valor foi inferior a 0,01 ppm. Nessas duas estações as espécies estudadas acumularam menores quantidades de H₂O₂, sendo que em alguns tecidos não houve acúmulo. De acordo com Taiz & Zeiger (2004), as folhas no período de frio apresentam inibição da fotossíntese, taxas respiratórias mais baixas e menor atividade metabólica, o que pode justificar essa menor produção de H₂O₂. No entanto, para saber se essa hipótese está correta, futuramente serão correlacionados os dados, já obtidos, de condutância estomática e taxas fotossintéticas.

Comparando-se as espécies estudadas, nota-se que elas responderam de maneira similar considerando as estações, ou seja, ambas acumularam mais H₂O₂ nos meses do ano

que apresentaram maiores concentrações de ozônio, embora a intensidade do acúmulo tenha sido maior no tabaco, reconhecidamente muito sensível ao poluente. Os resultados encontrados corroboram aqueles descritos por Iriti *et al.*, (2006) que avaliaram o acúmulo de H₂O₂ em duas espécies, uma sensível e outra tolerante e constataram que a sensível mesmo em baixas concentrações de O₃, apresentou comparativamente maior acúmulo de H₂O₂.

CONCLUSÃO

N. tabacum 'Bel - W3' e *P. guajava* 'Paluma' apresentaram uma linearidade em relação ao acúmulo de H₂O₂ bastante similar na maioria das amostragens que contemplaram as quatro estações do ano. No entanto, a cultivar 'Bel - W3' de *N. tabacum* apresentou comparativamente, maior número de células com acúmulo de H₂O₂, além disso, sua anatomia permitiu avaliar o acúmulo desse composto em todos tecidos foliares, possibilitando assim, verificar que o parênquima paliçádico foi o mais afetado, possivelmente por apresentar maior atividade fotossintética.

Em *P. guajava* foi possível observar menor acúmulo de H₂O₂ comparado à cultivar mais sensível, o que indica que esta espécie responde ao O₃ tolerando-o. Esse fato possivelmente está associado às características anatômicas foliares dessa espécie, que por apresentar mesofilo compacto e estômatos somente na superfície abaxial, dificultam a absorção e dissociação do gás dentro dos tecidos foliares, evitando danos causados pelo O₃.

A associação dos dados de condutância estomática e fotossíntese dessas plantas poderá auxiliar no entendimento das respostas dessas duas cultivares quando expostas em ambiente contaminado por O₃.

(As autoras agradecem a CAPES, pela bolsa de doutorado concedido a primeira autora, ao CNPq, pela bolsa de mestrado e de produtividade em pesquisa para a segunda e terceira autora respectivamente. A FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-Processo n^o 05/51169 - 9.)

REFERÊNCIAS

- Apostol, I., Heinstejn, P.F. & Low, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Phys.* **90**:109 - 116.
- Arndt, U & Schweizer, B. 1991. The use of bioindicators for environmental monitoring in tropical and subtropical countries. In: Ellenber, H (eds.) *Biological monitoring. Signals from the environment*. Vieweg, Eschborn. pp. 199 - 298.
- Barbosa, L.M.; Potomati, A.; Puccinini, A.A. 2002. O PEFI: Histórico e Legislação. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (orgs.) *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste à urbanização de São Paulo*. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo. pp. 17 - 28.
- Bray, E.A.; Bailey - Serres, J.; Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan BB, Gruissem W & Jones RL (eds.) *Biochemistry & Molecular Biology*

- of Plants. American Society of Plant Physiologists (USA), New York, pp. 1158 - 1203.
- Cetesb. 2007.** Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2006. Série Relatórios.
- Dizengremel, P. 2001.** Effects of ozone on the carbon metabolism of forest trees. *Plant Physiol. Biochem.* **39**: 729 - 742.
- Domingos, M., Klumpp, A & Klumpp, G. 1998.** Air pollution impact on the Atlantic Forest at the Cubatão region, SP, Brazil. *Cien e Cult* **50**: 230 - 236.
- Domingos, M., Bourotte, C., Klumpp, A., Klumpp, G. & Forti, M.C. 2002.** Impactos de poluição atmosférica sobre remanescentes florestais. In: Bicudo, D.C., Forti, M.C. & Bicudo, C.E.M. (orgs.) *Parque Estadual das fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação ameaçada pela urbanização de São Paulo*. Editora Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, São Paulo, pp. 221 - 249.
- Epstein, E. 1975.** Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Livros técnicos e científicos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Faoro, F. & Iriti, M. 2008.** Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: Key studies in Mediterranean conditions. *Environ. Pollut.* **157**:1470 - 1477.
- Ferdinand, J.A., Fredericksen, T.S., Kouterick, K.B. & Skelly, J.M. 2000.** Leaf morphology and ozone sensitivity of two open pollinated genotypes of black cherry (*Prunus serotina*) seedlings. *Environ. Pollut.* **108**: 297 - 302.
- Freedman, B. 1995.** Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2 ed. Academic Press Inc. San Diego.
- Furlan, C.M. 2004.** Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. e *Psidium guajava* L. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Gould, K.S.; Mckelvie, J.; Markham, K.R. 2002.** Do anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. *Plant Cell Environ* **25**: 1261 - 1269.
- Günthardt - Goerg, M.S., McQuattie, C.J., Maurer, S. & Frey B. 2000.** Visible and microscopic injury in leaves of five deciduous tree species related to current critical ozone levels. *Environ. Pollut.* **109**: 489 - 500.
- Gunthardt - Goerg, M.S. & Vollenweider, P. 2007.** Linking stress with macroscopic and microscopic leaf response in trees: New diagnostic perspectives. *Environ. Pollut.* **147**:467 - 488.
- Heggestad, H.E. 1991.** Origin of Bel - W3, Bel - C, and Bel - B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ. Pollut.* **74**: 264 - 291.
- Iriti, M., Belli, L., Nali, C., Lorenzini, G., Gerosa, G. & Faoro, F. 2006.** Ozone sensitivity of currant tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*), a potential bioindicator species. *Environ. Pollut.* **141**: 275 - 282.
- Iriti, M.; Rabotti, G.; Ascensao, A.; Faoro, F. 2003.** Benzothiadiazole - induced resistance modulates ozone tolerance. *J Agric Food Chem* **51**: 4308 - 4314.
- Klumpp, A., Klumpp, G. & Domingos, M. 1994.** Active biomonitoring at the Serra do Mar near the industrial complex of Cubatão, Brazil. *Environ. Pollut.* **85**: 109 - 16.
- 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). *Rev. Bras. Bot.* **24**: 511 - 518.
- Krupa, S.V. & Manning, W.J. 1988.** Atmospheric ozone: formation and effects on vegetation. *Environ. Pollut.* **50**: 101 - 137.
- Mulgrew, A. & Williams, P. 2000.** Biomonitoring of air quality using plants. WHO Collaborating Centre for Air Quality Management and Air Pollution Control/Federal Environmental Agency - Germany, Report 10, Berlin.
- Novak, K.; Skelly, J.M.; Schaub, M.; Kräuchi, N.; Hug, C.; Landolt, W.; Bleuler, P. 2003.** Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. *Environ. Pollut.* **125**: 41-52.
- Ollinger V. S., Aber, J. D., Reich, P. B. 1997.** Simulating ozone effects on forest productivity: Interactions among leaf, canopy, and stand - level processes. *Eco. Appl* **7**: 1237 - 1251.
- Paoletti, E., Nali, C. & Lorenzini, G. 2007.** Early responses to acute ozone exposure in two *Fagus sylvatica* clones differing in xeromorphic adaptations: Photosynthetic and stomatal processes, membrane and epicuticular characteristics. *Environ Monit Assess* **128**:93 - 108.
- Pedroso, A.N.V & Alves, E.S. 2008.** Anatomia foliar comparativa das cultivares de *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) sensível e tolerante ao ozônio. *Acta bot. bras.* **22** (1): 21 - 28.
- Pell, E.J., Schlagnhauser, C.D. & Arteca, R.N. 1997.** Ozone - induced oxidative stress: mechanisms of action and reaction. *Physiol. Plantarum* **100**: 264 - 273.
- Pellinen, P., Paiva, T. & Kangasjärvi, J. 1999.** Sub-cellular localization of ozone - induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *Plant J* **20** (3): 349 - 356.
- Pina, J.M.; Dias, A.P.S.; Rinaldi, M.C.S.; Moraes, R.M. 2007.** *Psidium guajava* Paluma é sensível às concentrações de ozônio verificadas em São Paulo. *Rev Bras Biocien* **5**: 42 - 44.
- Reig - Armñana, J., Calatayud, V., Cerveró, J., Garcia - Breijo, F.J., Ibars, A. & Sanz, M.J. 2004.** Effects of ozone on the foliar histology of the mastic plant (*Pistacia lentiscus* L.). *Environ. Pollut.* **132**: 321 - 331.
- Sant'Anna, S.M.R., Esposito, M.P., Domingos, M. & Souza, S.R. 2008.** Suitability of *Nicotiana tabacum* 'Bel W3' for biomonitoring ozone in São Paulo, Brazil. *Environ. Pollut.* **151**: 389 - 394.
- Sawyer, F.R.; Harley, R.A.; Cadle, S.H.; Norbeck, J.M.; Slott, R.; Bravo, H.A. 2000.** Mobile sources critical review: 1998 NARSTO assessment. *Atmospheric Environ* **34**: 2161 - 2181.
- Soares, A.M.S. & Machado, O.L.T. 2007.** Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Ver. Trópica Cien. Agrárias e Biológicas* **1**: 9 - 19.

Sousa, A.V.G. 1971. Contribuição ao estudo da anatomia foliar e da fisiologia de *Psidium guajava* Raddi. *Cien e Cult* **23**: 373 - 382.

Taiz, L. & Zieger, E. 2004. Fisiologia vegetal. 3ª ed. Artmed. Editora, Porto Alegre.

VDI - Verein Deutscher Ingenieure. 2003. Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Determination and evaluation of the phytotoxic effects of photooxidants. Method of the standardized tobacco exposure.

VDI 3957/6. VDI/DIN Handbuch Reinhaltung der Luft, Vol. 1a, Beuth, Berlin.

Vergé, X., Chapuis, A. & Delpoux, M. 2002. Bioindicator reliability: the example of Bel W3 tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Environ. Pollut.* **85**: 337 - 349.

Vollenweider, P., Ottiger, M. & Günthardt - Goerg. 2003. Validation of leaf ozone symptoms in natural vegetation using microscopical methods. *Environ. Pollut.* **124**: 101 - 118.