

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
UENF

AMANDA DE OLIVEIRA FERREIRA

**Aspectos estruturais da folha de *Tillandsia stricta* Sol
(Bromeliaceae) tendo em vista sua aplicação como
bioindicadora de poluição atmosférica**

**Orientadores: Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha
Flávio Costa Miguens (*in memoriam*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Mestre.

Campos dos Goytacazes - Rio de Janeiro
Novembro/ 2019

Aspectos estruturais da folha de *Tillandsia stricta* Sol
(Bromeliaceae) tendo em vista sua aplicação como
bioindicadora de poluição atmosférica

AMANDA DE OLIVEIRA FERREIRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, para obtenção do grau de Mestre.

Aprovada em 29/11/2019
Comissão Examinadora:



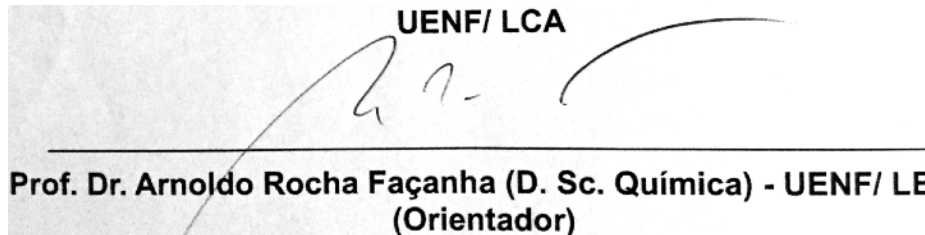
Prof. Dr. Manildo Marcião de Oliveira (D. Sc. Ciências) - IFF/ Cabo Frio



Prof^a Dra. Camilla Ribeiro Alexandrino (D. Sc. Biociências e Biotecnologia)
UENF/ LBCT



Prof. Dr. Carlos Eduardo Veiga de Carvalho (D. Sc. Geociências)
UENF/ LCA



Prof. Dr. Arnaldo Rocha Façanha (D. Sc. Química) - UENF/ LBCT
(Orientador)

*Aos que acreditam na
educação como agente
transformador da
sociedade.*

Agradecimentos

Aos meus pais e amigos por me darem força durante todo o mestrado.

Ao Dr. Arnaldo Rocha Façanha por aceitar orientar este trabalho.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar deste momento.

Ao Dr. Flávio Costa Miguens (*in memoriam*) por todo o conhecimento passado. Este foi último trabalho orientado durante sua carreira.

À Juliana Ribas, que foiçam amiga essencial nos momentos difíceis.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Tecidual pela utilização de sua infraestrutura.

Às agências de fomento: FAPERJ, CNPq e CAPES pelos financiamentos que permitiram a realização deste trabalho.

A todos os que contribuíram para a minha formação.

ÍNDICE

Lista de figuras e tabelas	VIII
Resumo	X
Abstract	XI
1. Introdução	1
2. Objetivos	8
3. Metodologia	9
3.1. Identificação da espécie estudada	9
3.2. Preparo de amostras das folhas de <i>Tillandsia stricta</i> por microscopia eletrônica de varredura	9
3.3. Preparo de amostras das folhas de <i>Tillandsia stricta</i> por microscopia óptica.....	11
3.4. Análises histológicas	11
4. Resultados	12
4.1. Morfologia das folhas de <i>T. stricta</i> por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura	12
4.2. Análises histológicas	13
5. Discussão	27
6. Conclusões	32
7. Referências	34
Material Suplementar	42

Lista de figuras e tabelas

FIGURA 1. Esquema da organização das escamas epidérmicas e vista frontal das escamas epidérmicas.....	2
FIGURA 2. <i>Tillandsia stricta</i> em hábitat natural.....	10
FIGURA 3. Amostra de folha de <i>Tillandsia stricta</i>	10
FIGURA 4. Corte transversal da folha de <i>Tillandsia stricta</i> corado com azul de toluidina evidenciando a estrutura da escama epidérmica.....	16
FIGURA 5. Detalhe da asa de uma escama epidérmica.....	16
FIGURA 6. Corte transversal da folha de <i>Tillandsia stricta</i> corado com azul de toluidina mostrando as células epidérmicas.....	17
FIGURA 7. Imagem de MEV mostrando um <i>pit connection</i>	17
FIGURA 8. Imagem da epiderme da folha de <i>Tillandsia stricta</i> em corte transversal	18
FIGURA 9. Detalhe dos estômatos na epiderme.....	18
FIGURA 10. Corte transversal mostrando os estômatos abaixo do nível da epiderme.....	19
FIGURA 11. Imagem de MEV mostrando um estômato parcialmente coberto por uma escama epidérmica	19
FIGURA 12. Imagem de MEV mostrando esferas de sílica nas células epidérmicas, espectro pontual, análise quantitativa e mapas de espectrometria de raio-X das esferas de sílica.....	20
FIGURA 13. Corte de material fresco mostrando o mesofilo foliar.....	21
FIGURA 14. Corte de material fresco evidenciando o feixe vascular circundado por fibras.....	21
FIGURA 15. Imagens mostrando ráfide no mesofilo foliar, ráfides unidas por substância ligante, idioblasto com ráfide e corte transversal mostrando os feixes vasculares.....	22
FIGURA 16. Material fresco corado com safranina e azul de Astra.....	23
FIGURA 17. Visão panorâmica de corte transversal de material fresco submetido a teste histoquímico com cloreto férrico.....	23
FIGURA 18. Corte transversal de material fresco submetido à vanilina clorídrica.....	23
FIGURA 19. Corte transversal de material fresco submetido à tricloreto de antimônio.....	23
FIGURA 20. Corte transversal de material fresco submetido ao reagente de Dragendorff.....	24

FIGURA 21. Detalhe do amido no escudo de uma escama epidérmica.....	24
FIGURA 22. Corte de material fresco submetido à vermelho de rutênio.....	24
FIGURA 23. Detalhe de mucilagem nas escamas epidérmicas	24
FIGURA 24. Detalhe de mucilagem nos estômatos	25
FIGURA 25. Substâncias lipídicas identificadas no mesófilo identificadas por Sudan IV.....	25
FIGURA 26. Detalhe da natureza lipídica da cutícula da folha de <i>Tillandsia stricta</i>	25
FIGURA 27. Inclusões lipídicas no mesofilo foliar reveladas pelo tetróxido de ósmio	25
FIGURA 28. Corte transversal submetido à teste com sulfato azul do Nilo.....	26
FIGURA 29. Lipídios ácidos e neutros identificados por sulfato azul do Nilo nas escamas epidérmicas	26
FIGURA 30. Visão geral de corte transversal submetido ao reagente azul de Alcian	26
FIGURA 31. Detalhe de mucopolissacarídeos nos feixes vasculares revelados por azul de Alcian	26
FIGURA 32. Detalhe da parede das células epidérmicas não coradas pelo reagente azul de Coomassie	27
Tabela 1. Reagentes utilizados e respectivas referências.....	12
Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos.....	14

Resumo

A família Bromeliaceae é dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae, sendo composta por 51 gêneros e cerca de 3475 espécies, que estão distribuídas desde o Estado da Virginia nos Estados Unidos até a Argentina. A espécie *Tillandsia stricta* pertence à subfamília Tillandsioideae e ocorre desde a Venezuela até o norte da Argentina. No Brasil, esta espécie não ocorre apenas nos estados da região Norte. As espécies do gênero *Tillandsia* tem sido usadas como biomonitor de material particulado atmosférico. Contudo, a interação entre as partículas e a planta deve ser considerada. Em virtude disso, o estudo das características anatômicas e fisiológicas desta espécie representa a construção da base de conceitos sobre esta espécie bem como sobre este gênero. Exemplos de folhas de *Tillandsia stricta* foram coletadas no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e submetidas à análise por microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura e ensaios histoquímicos. A maior parte dos grupos químicos foram identificados nas escamas epidérmicas. Esferas de sílica na superfície das células epidérmicas e ráfides em idioblastos foram identificadas por microscopia eletrônica de varredura. A natureza anfipática das escamas epidérmicas permite concluir que estas estruturas são essenciais para a sobrevivência de *Tillandsia stricta*, já que a água e os gases adentram o mesofilo através delas. A sílica tem um papel fundamental na reflexão da luz e como nutriente para a planta. Estudos futuros utilizando técnicas mais sofisticadas como proteômica e genômica são necessários para aprimorar os conhecimentos sobre esta espécie e responder questões relacionadas à interação desta espécie com o material particulado atmosférico e características evolutivas que permitem a sobrevivência da planta em seu habitat.

Palavras-chave: Bromeliaceae, *Tillandsia stricta*, escamas epidérmicas, microscopia.

Abstract

The Bromeliaceae family is divided into three subfamilies: Pitcairnioideae, Bromelioideae and Tillandsioideae, consisting of 51 genera and about 3475 species, which are distributed from Virginia in the United States to Argentina. The species *Tillandsia stricta* belongs to the subfamily Tillandsioideae and occurs from Venezuela to northern Argentina. In Brazil, this species does not occur only in the states of the northern region. *Tillandsia* species have been used as a biomonitor of atmospheric particulate matter. However, these plants are used as deposition surface of the pollutant particles and the interaction between them and the plant is not considered. Because of this, the study of the anatomical and physiological characteristics of this species represents the construction of the basis of concepts about this species as well as about this genus. Specimens of *Tillandsia stricta* leaves were collected on the campus of Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro and submitted to analysis by light microscopy, scanning electron microscopy and histochemical assays. Most of the chemical groups were identified in the trichomes. Silica spheres on the surface of epidermal cells and raphides in idioblasts were identified by scanning electron microscopy. The amphipathic nature of epidermal scales allows us to conclude that these structures are essential for the survival of *Tillandsia stricta*, since water and gases enter the mesophyll through them. Silica plays a key role in light reflection and as a plant nutrient. Future studies using more sophisticated techniques such as proteomics and genomics are needed to improve knowledge of this species and answer questions related to the interaction of this species with atmospheric particulate matter and evolutionary characteristics that allow the plant to survive in its habitat.

Key words: Bromeliaceae, *Tillandsia stricta*, trichomes, microscopy.

1. Introdução

1.1. Família Bromeliaceae

Bromeliaceae é uma família neotropical composta por 51 gêneros e cerca de 3475 espécies, que estão distribuídas desde o Estado da Virginia nos Estados Unidos até a Argentina. A única exceção é a espécie *Pitcairnia feliciana* (A. Chevalier) Harms & Mildbraed, que ocorre no oeste da África. No Brasil há 46 gêneros e 1344 espécies (Jacques-Félix, 2000; Christenhusz & Byng, 2016; Flora do Brasil 2020).

A família Bromeliaceae é dividida em três subfamílias: Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae e foi considerada, pela primeira vez, como um grupo taxonômico pelo botânico Antoine de Jussieu. O gênero *Tillandsia* pertence à subfamília Tillandsioideae. Apesar da importância ecológica das espécies pertencentes à família Bromeliaceae, o representante mais conhecido desta família é *Ananas comosus* L. (Merr), o abacaxi, que pertence à subfamília Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Smith & Downs, 1979; Dahlgren, 1985; Males, 2016).

Bromeliáceas apresentam folhas longas, que podem ter bainhas amplas ou estreitas, com padrão de venação paralelo, estômatos dispostos paralelamente ao maior eixo da folha e em cripta. No mesófilo foliar pode ocorrer parênquima paliçádico e parênquima lacunoso (Chase, 2004). Aparentemente, algumas plantas do gênero *Tillandsia* são xerófitas e apresentam neotenia, ou seja, a manutenção de características juvenis na forma adulta do ser vivo. As espécies da família Bromeliaceae, em sua maioria, são epífitas e; popularmente, são consideradas parasitas (Benzing, 2000; Males, 2016).

As espécies da família Bromeliaceae possuem folhas hipoestomáticas ou anfiestomáticas. Os estômatos podem estar no mesmo nível da epiderme, acima das células epidérmicas ou posicionados em nível inferior. A epiderme é unisseriada com cutícula delgada e células epidérmicas com formato retangular, paredes anticlinais sinuosas ou onduladas. É comum a presença de

corpos de sílica. A parede das células epidérmicas é lignificada (Proença e Sajo, 2007).

As escamas epidérmicas estão distribuídas pela superfície foliar em fileiras ou de forma não organizada. Em espécies das subfamílias Pitcairnioideae e Bromelioideae, não há distinção entre as células da asa e as do disco central das escamas epidérmicas. Enquanto que, em indivíduos da subfamília Tillandsioideae, as escamas epidérmicas são formadas por duas partes: o pedículo, que está inserido na epiderme, e o escudo, que é formado por quatro células centrais, oito células pericentrais, dezesseis células subperiféricas e as sessenta e quatro células da asa (Figura 1). As escamas epidérmicas estão presentes em ambas as faces da folha (Pierce, 2007; Proença e Sajo, 2007).

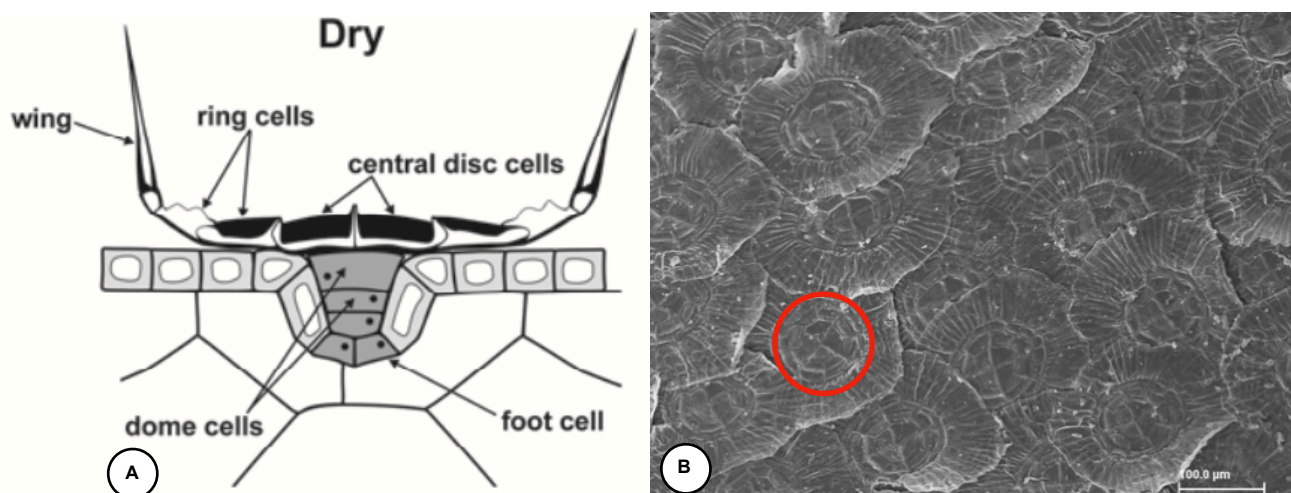


Figura 1. (A) Esquema mostrando a organização das células das escamas epidérmicas. (Adaptado de Pierce, 2007). **(B)** Vista frontal da superfície adaxial de uma folha de *T. stricta*. É possível ver a justaposição das escamas epidérmicas formando uma densa camada que cobre totalmente a superfície foliar. A área circunscrita corresponde às células centrais do escudo.

No mesofilo foliar há parênquima armazenador de água (hidrênquima) com células arredondadas, aclorofiladas e paredes delgadas. O parênquima clorofiliano é formado por células arredondadas e braciiformes. Há canais de ar distribuídos entre os feixes vasculares. Em indivíduos da subfamília Bromelioideae há grupos de fibras espalhados pelo mesofilo e que são lignificados (Proença e Sajo, 2007; Voltolini *et al.*, 2009).

O gênero *Tillandsia*, assim como outras epífitas, obtêm seus nutrientes a partir do ar e da precipitação da chuva e orvalho (Billings, 1904; Brighigna *et al.*, 1988). Para conseguir absorver o máximo possível de água e extrair os nutrientes necessários à sua sobrevivência, as plantas epífitas são providas de escamas epidérmicas na superfície de suas folhas. O número de escamas epidérmicas varia com a espécie e as características fisiológicas da planta (Benzing, 2000). Sendo assim, estas plantas servem como depósito de partículas atmosféricas e os compostos que compõem as partículas, se forem solúveis; se dissolverão sobre as folhas das plantas, sendo, provavelmente, absorvidos (Billings, 1904).

Benzing (2000) classificou as espécies da família Bromeliaceae em cinco tipos: o primeiro tipo inclui bromeliáceas terrestres da subfamília Pitcairnoideae e algumas da subfamília Bromelioideae com raízes usadas para suprimento de água e nutrientes. O tipo II abrange plantas terrestres da subfamília Bromelioideae que formam reservatório de água e matéria orgânica no interior de sua roseta, devido as bainhas foliares imbricadas. O terceiro tipo engloba plantas terrestres ou epífitas da subfamília Bromelioideae, predominantemente com metabolismo CAM, que formam reservatório de água e matéria orgânica em suas rosetas e apresentam escamas epidérmicas com pouca capacidade de absorver água e nutrientes do ar. O tipo IV são epífitas da subfamília Tillandsioideae que formam reservatório de água e matéria orgânica e algumas do gênero *Brocchinia*, com metabolismo predominantemente C₃, com alta densidade de escamas epidérmicas na base das folhas que são eficazes na assimilação de água e nutrientes e as raízes são usadas como suporte. O tipo V inclui as espécies suculentas da subfamília Tillandsioideae com metabolismo CAM, epífitas ou rupícolas, que não formam reservatório de água e matéria orgânica, com altas densidades de escamas epidérmicas peltadas por toda a folha com função de absorver água e nutrientes. As raízes são exclusivamente usadas como suporte para a fixação. *Tillandsia stricta* atende às características descritas para o tipo V.

Males (2016) destaca a importância do parênquima armazenador de água na capacidade do gênero *Tillandsia* do tipo V resistir ao estresse hídrico.

A diversidade de características apresentadas pelas bromeliáceas gera questionamentos sobre as razões que explicam a evolução destas plantas, principalmente no que diz respeito à resposta ao estresse hídrico e como isto está relacionado à presença ou ausência de reservatório de água e matéria orgânica em suas rosetas, ao parênquima armazenador de água, à densidade de escamas epidérmicas foliares, à presença de raízes absorventes ou apenas fixadoras, ao micro-ecossistema que se forma na superfície das folhas, e como essa interação influencia o desenvolvimento da planta, o tipo de metabolismo e as estratégias de economia de água. Devido a essas características adaptativas, espécies da família Bromeliaceae vem sendo adotadas como modelo de estudo evolutivo (Benzing, 2000; Males, 2016; Males *et al.*, 2017; Males, 2017).

Plantas do gênero *Tillandsia* tem sido utilizadas como biomonitoras de poluentes atmosféricos. Estes poluentes podem ser classificados em primários, como os óxidos de enxofre e de nitrogênio, dióxido de carbono ou secundários, como ozônio, ácido nítrico e ácido sulfúrico. Há outros tipos de poluentes atmosféricos, como os compostos orgânicos voláteis e material particulado em suspensão, que são partículas na ordem de micrômetros e nanômetros. Muitos elementos químicos tóxicos compõem estas partículas e podem ser absorvidos pelas plantas. Contudo, ainda é necessário compreender como estes poluentes interagem com as folhas destas plantas.(Freedman, 1995; Calasans & Malm, 1997; Brighigna *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2016; Schreck *et al.*, 2016).

1.2. Morfo-anatomia foliar do gênero *Tillandsia*

As espécies do gênero *Tillandsia*, em sua maioria, são epífitas; porém espécies rupícolas também estão incluídas neste gênero. No Brasil são encontradas 86 espécies de *Tillandsia*, das quais 49 são endêmicas. O tamanho das plantas é variável, de cerca de 3 cm (*Tillandsia bryoides*) a 1 m de altura (*Tillandsia grandis*) (Smith & Downs, 1977; Gardner, 1986; Flora do Brasil, 2020).

Uma das características mais pronunciadas das espécies do gênero *Tillandsia* é a presença de escamas epidérmicas distribuídas pela superfície foliar. Estas estruturas secretam substâncias como mucilagem, auxiliam na absorção de água e nutrientes e protegem a planta da radiação solar (Papini *et al.*, 2010; Pierce *et al.*, 2001).

O escudo das escamas epidérmicas apresenta células centrais vivas que auxiliam no transporte de água para as células do pedículo. As substâncias de natureza hidrofílica secretadas pelas chamadas *dome cells* facilitam a entrada da água para o mesófilo foliar (Figura 1 A). Mudanças ultraestruturais ocorrem nas células das escamas epidérmicas quando submetidas ao estresse hídrico (Brighigna *et al.*, 1988; Papini *et al.*, 2010).

Stefano e colaboradores (2008), ao analisarem a densidade de escamas epidérmicas de 37 espécies de *Tillandsia*, concluíram que *Tillandsia tectorum* exibiu a maior densidade de escamas epidérmicas por milímetro quadrado. O número de escamas epidérmicas é influenciado pelo habitat da planta, pela capacidade de armazenamento de água no hidrênquima, pela microfauna que se forma na superfície das folhas, pela capacidade de formar reservatório de água e matéria orgânica na roseta, caso a disposição das folhas permita que a roseta seja formada. Apesar de algumas exceções, as espécies que exibiram as maiores densidades de escamas epidérmicas vivem em locais de alta incidência solar, corroborando a função protetora das escamas epidérmicas.

Tillandsia stricta é uma espécie nativa do Brasil, epífita e não endêmica. É comumente encontrada em troncos e galhos de árvores assim como em fios de alta tensão e cercas, matas, campos rupestres e caatinga. Sua distribuição geográfica é desde a Venezuela até norte da Argentina. No Brasil, ocorre da Bahia até o Rio Grande do Sul. Suas folhas são aciculadas e eretas. A floração acontece durante todo o ano com pico em agosto (Fiorato, 2009; Flora Brasil 2020).

Tillandsia recurvata, planta comum nas regiões nordeste, sudeste e sul brasileiras tem entre 8 e 12 cm de altura, folhas resistentes, aciculadas e recurvadas, caule inconspícuo e raízes rígidas. A parede das células epidérmicas é sinuosa, as folhas são anfiestomáticas, estômatos em cripta e

não há parênquima armazenador de água. A alta densidade de escamas epidérmicas também está presente nesta espécie, característica comum no gênero *Tillandsia* (Vasconcelos *et al.*, 2013).

A anatomia de *Tillandsia bonita* foi descrita por Versieux e colaboradores (2013). Esta espécie foi descoberta no estado de Mato Grosso do Sul, é rupícola, com filotaxia espiralada e folhas com coloração avermelhada. As escamas epidérmicas estão presentes em ambas as faces da folha e as células epidérmicas tem paredes espessas, sinuosas e com corpos de sílica. O parênquima armazenador de água que ocupa 1/3 do mesofilo é formado por células alongadas, enquanto 2/3 é ocupado por parênquima clorofiliano e células de parênquima armazenador de água situadas abaixo dos feixes vasculares colaterais. Idioblastos contendo ráfides foram observados em células parenquimáticas do mesofilo. Os estômatos estão presentes apenas na face abaxial e são tetracíticos.

Tillandsia imperialis, planta nativa do México, El Salvador e Honduras e usada pelos habitantes destes países como remédio contra doenças respiratórias, teve sua anatomia brevemente descrita. As folhas desta espécie apresentam epiderme pouco espessa com tricomas em ambas as faces e são hipoestomáticas. Os estômatos são tetracíticos. Corpos de sílica estão presentes apenas nas células epidérmicas abaxiais e tanino nas células hipodérmicas da região basal da folha (Vite-Posadas *et al.*, 2011).

Scatena e Segecin (2005), ao comparar a anatomia foliar de 12 espécies de *Tillandsia*, concluíram que das espécies estudadas, apenas *Tillandsia streptocarpa* apresentou folhas anfiestomáticas e células epidérmicas recobertas por cutícula com agregados de cera. *Tillandsia pohliana*, *Tillandsia recurvata* e *Tillandsia tenuifolia* apresentaram células epidérmicas com paredes sinuosas, enquanto nas espécies *Tillandsia loliacea*, *Tillandsia tricholepis* e *Tillandsia usneoides* as células epidérmicas exibiram paredes onduladas. A presença de canais de ar no mesofilo não foi observada nas espécies *Tillandsia croata*, *Tillandsia recurvata*, *Tillandsia streptocarpa*, *Tillandsia tenuifolia*. A presença de estômatos apenas na face abaxial e de sinuosidades

nas paredes das células epidérmicas não são esperadas em plantas xeromorfas como as espécies estudadas (Proença & Sajo, 2007).

O uso de plantas do gênero *Tillandsia* como biomonitores de poluição atmosférica não deve considerar as folhas apenas como superfícies de deposição ou mesmo como superfícies inertes, uma vez que alterações anatômicas e fisiológicas ocorrem devido à absorção de elementos químicos tóxicos presentes nos poluentes.

O número de células do escudo das folhas de *Tillandsia usneoides* foi alterado após 8 semanas de exposição ao ozônio, em razão do estresse oxidativo promovido por este composto. Ao submeter as folhas de *Tillandsia capillaris* a diferentes concentrações de íons bivalentes dos elementos cobre, chumbo, níquel e zinco, a produção de malondialdeído foi aumentada e o metal absorvido em maior quantidade foi o níquel. Aumento na produção de enzimas antioxidantes e necrose no tecido foliar de exemplares de *Tillandsia albida* foi observado após dois meses de irrigação das plantas com soluções de cloreto de cádmio e níquel (separado e combinado) (Alves *et al.*, 2008; Wannaz *et al.*, 2011; Kováčik *et al.*, 2012).

Desse modo, o estudo das características anatômicas das espécies do gênero *Tillandsia* é necessário para a compreensão da fisiologia destas plantas. Assim, perguntas como: Quais são as características adaptativas que garantem o sucesso destas plantas em locais com períodos de pouca chuva? Como estas plantas se defendem da radiação solar a fim de evitar a perda de água? Qual é a relação entre estas características e os poluentes atmosféricos? devem ser respondidas.

Este trabalho tem o intuito de responder estas perguntas utilizando *Tillandsia stricta* como objeto de estudo a fim de somar informações sobre esta espécie às informações que já são conhecidas em relação a outras espécies do mesmo gênero.

2. Objetivos

Caracterizar a anatomia e a histologia das folhas de *Tillandsia stricta*, estabelecendo relação entre as características anatômicas e a composição de poluentes atmosféricos identificados sobre as folhas de *Tillandsia stricta*.

2.1. Objetivos específicos

- Determinar as características anatômicas da folha de *Tillandsia stricta* coletada no *campus* da UENF;
- Identificar grupos químicos presentes nos tecidos das folhas de *Tillandsia stricta*.
- Determinar características anatômicas que sejam adaptativas para períodos secos;
- Relacionar a anatomia ao material particulado encontrado sobre as folhas de *Tillandsia stricta*.

3. Metodologia

3.1. Identificação da espécie estudada

A espécie estudada foi coletada no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e identificada pela professora Andrea Ferreira da Costa (Departamento de Botânica - Museu Nacional/UFRJ). Uma exsicata foi feita e depositada no Herbário da UENF com o número H11015.

3.2. Preparo de amostras das folhas de *Tillandsia stricta* por microscopia eletrônica de varredura

Dez indivíduos *T. stricta* (figura 2) foram coletados no campus da UENF (21°45'42.4"S|41°17'28.6"W). De cada exemplar foi retirada uma folha completamente expandida (entre 12 e 15 cm, figura 3), totalizando 10 folhas. Estas foram cortadas com o auxílio de lâmina de barbear e de cada folha foram obtidos 2 fragmentos de cada parte da folha: ápice, região mediana e base. Alternativamente, um fragmento da região mediana foi raspada com uma lâmina de barbear para que os tricomas fossem retirados e as esferas de sílica fossem expostas. Os fragmentos foram colocados em uma solução fixadora de tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH ~ 7,2), glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4% por 12 horas. Então, os fragmentos foram lavados em solução tampão cacodilato de sódio 0,05 M e deu-se início a série de desidratação em acetona na seguinte sequência: 25%, 50%, 70%, 90%, 100% (3 vezes). Cada etapa da série de desidratação durou 12 horas. Em seguida, os fragmentos foram submetidos ao ponto crítico de CO₂ e aderidos com cola de prata e fita de cobre a um suporte de alumínio e cobertos com aproximadamente 10 nm de platina e visualizados em um Microscópio Eletrônico de Varredura ZEISS EVO 40 XVP, 10 kV, elétrons secundários. (Pireda *et al.*, 2018).



Figura 2. *Tillandsia stricta* no tronco de uma árvore no campus da UENF.



Figura 3. Folha de *Tillandsia stricta*.

3.3. Preparo de amostras das folhas de *Tillandsia stricta* por microscopia óptica

Os dez indivíduos coletados para realizar a etapa acima, também foram utilizados para fazer cortes para microscopia óptica. Cada folha foi cortada com o auxílio de uma lâmina de barbear e de cada delas foram obtidos dois fragmentos da porção mediana. Os fragmentos foram colocados em uma solução fixadora de tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH ~ 7,2), glutaraldeído 2,5% e formaldeído 4% por 12 horas. A pós-fixação foi feita utilizando tetróxido de ósmio 1% diluído na mesma solução tampão. Então, os fragmentos foram lavados em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05 M durante 2 horas e iniciou-se a série de desidratação em acetona na seguinte sequência: 25%, 50%, 70%, 90%, 100% (3 vezes). Após a etapa de desidratação, os fragmentos foram infiltrados gradualmente em resina epóxi (EMS) e emblocados na mesma resina por 48 horas, em estufa a 60 C. Cortes semifinos em torno de 1 µm, foram corados com azul de toluidina e observados em um microscópio óptico ZEISS Axioplan usando câmera MOTIC e software nativo. (Pireda *et al.*, 2018).

3.4. Análises histológicas

Para as análises histoquímicas, cortes transversais de material fresco da região mediana de três folhas completamente expandidas (entre 12 e 15 cm, figura 2), de cada um dos dez indivíduos coletados, foram feitos com o auxílio de uma lâmina de barbear. Os cortes foram submetidos a vários reagentes a fim de identificar grupos químicos presentes nos tecidos da folha de *T. stricta*. Os reagentes, os grupos químicos e as referências estão na tabela 1. Para evidenciar a epiderme e os estômatos, fragmentos da porção mediana da folha de *T. stricta* foram colocados em uma solução 1:1 de ácido acético glacial e água oxigenada durante 4 dias. Em seguida, a epiderme foi retirada e corada com fucsina básica.

Tabela 1. Reagentes utilizados em histoquímica e respectivas referências

Reagente	Grupo químico	Referência
Cloreto férrico/ Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	Johansen, 1940
Floroglucina ácida	Lignina	Johansen, 1940
Azul de Coomassie	Proteínas totais	Fisher, 1968
Azul de Alcian	Mucopolissacarídeos ácidos	Pearse, 1980
Vanilina clorídrica	Taninos	Gardner, 1975; Mace & Howell, 1974
Tetróxido de ósmio 0,1%	Lipídios insaturados	Ganter & Jollès, 1969
Lugol	Amido	Jensen, 1962
Sudan IV	Substâncias lipídicas	Pearce e Samad, 1980
Vermelho de rutênio	Pectina/mucilagem	Chamberlain, 1932
Tricloreto de antimônio	Esteroides	Hardman & Sofowora, 1972; Mace <i>et al.</i> , 1974
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	Svendsen & Verpoorte, 1983
Sulfato azul do Nilo 1%	Lipídios ácidos e neutros	Cain, 1947; Ganter & Jollès, 1969

4. Resultados

4.1. Morfologia das folhas de *T. stricta* por microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura

A superfície foliar de *T. stricta* é totalmente coberta por escamas epidérmicas assimétricas em ambas as faces. As escamas epidérmicas são formadas por duas partes: o pedículo, que é constituído de células vivas e está inserido na epiderme e, o escudo, que é constituído por quatro células centrais vivas, vinte e quatro células do anel (oito células subperiféricas e dezesseis células periféricas) e sessenta e quatro células da asa. As células da asa se justapõem umas às outras e apresentam capacidade de movimento. (Figuras 4 e 5).

Os cortes transversais mostraram que as folhas de *T. stricta* são dorsiventrals, hipoestomáticas e apresentam epiderme unisseriada com células de parede espessas, sinuosas e lignificadas. Depressões nas paredes celulares das células epidérmicas chamadas de *pits apertures* estão evidenciadas em imagens de microscopia óptica e microscopia eletrônica de

varredura (Figuras 6, 7 e 8). Os estômatos são anomocíticos e estão localizados abaixo do nível da epiderme (Figuras 9, 10 e 11). Cada célula epidérmica abriga uma esfera de sílica (Figura 12). No mesofilo foliar, 1/3 é ocupado por tecido parenquimático com células alongadas e que armazenam água. Os feixes vasculares colaterais e parcialmente circundados por fibras, alternados com canais de ar foram evidenciados pela coloração dupla de safranina e azul de Astra (Figuras 13 e 14). Idioblastos contendo ráfides de oxalato de cálcio foram observados (Figura 15 A, B, C) e cortes longitudinais mostraram os feixes vasculares (Figura 15 D).

4.2. Análises histológicas

A coloração dupla de safranina e azul de Astra revelou que a parede das células das escamas epidérmicas e das células epidérmicas são lignificadas (Figura 16).

Os testes histoquímicos realizados com cloreto férrico, vanilina clorídrica, tricloreto de antimônio e reagente de Dragendorff mostraram que compostos relacionados à defesa da planta, como compostos fenólicos, esteroides (pertence à classe dos triterpenos) e alcaloides estão concentrados nas escamas epidérmicas, principalmente nas células do pedículo, embora também tenham sido identificados nas células do escudo (Figuras 17, 18, 19 e 20).

O teste histoquímico feito com floroglucina ácida revelou que a lignina não é sintetizada como um metabólito secundário. Os resultados obtidos a partir do teste com lugol indicaram a presença de amido nas células epidérmicas e nas escamas epidérmicas, principalmente nas células do pedículo (Figura 21).

Substâncias pécticas, evidentemente, foram identificadas nas paredes das células do mesofilo, das células epidérmicas e do pedículo das escamas epidérmicas e a coloração intensa do reagente vermelho de rutênio revelou a presença destas substâncias nas células do escudo das escamas epidérmicas. A presença de mucilagem foi identificada em toda a escama epidérmica, tanto

no pedículo quanto no escudo e também nas células estomáticas (Figuras 22, 23 e 24).

Substâncias lipídicas foram evidenciadas nas células do pedículo das escamas epidérmicas e sobre a epiderme formando uma cutícula sem ornamentação (Figuras 25 e 26), enquanto lipídios insaturados foram identificados nas células tanto do pedículo quanto do escudo das escamas epidérmicas e em inclusões nas células epidérmicas. Também foram identificados nos feixes vasculares (Figura 27). Lipídios ácidos ou neutros foram demonstrados nas células do escudo das células epidérmicas e nos feixes vasculares e fibras circundantes (Figuras 28 e 29).

A presença de mucopolissacarídeos ácidos foi demonstrada nos feixes vasculares e nas células do parênquima armazenador de água, através do uso do reagente azul de Alcian (Figuras 30 e 31).

O reagente azul de Coomassie não é específico, portanto se liga a todas as proteínas da célula. Nas folhas de *T. stricta* foi evidente a presença de proteínas nas células epidérmicas e nas células do pedículo das escamas epidérmicas (Figura 32). Os resultados dos reagentes utilizados nas análises histoquímicas da folha de *T. stricta* foram sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Resultados dos testes histoquímicos

Reagente	Grupo químico	Resultado
Cloreto férrico/ Dicromato de potássio	Compostos fenólicos	+
Floroglucina ácida	Lignina	-
Azul de Coomassie	Proteínas totais	+
Azul de Alcian	Mucopolissacarídeos ácidos	+
Vanilina clorídrica	Taninos	+
Tetróxido de ósmio 0,1%	Lipídios insaturados	+
Lugol	Amido	+
Sudan IV	Substâncias lipídicas	+
Vermelho de rutênio	Pectina/mucilagem	+
Tricloreto de antimônio	Esteroides	+
Reagente de Dragendorff	Alcaloides	+
Sulfato azul do Nilo 1%	Lipídios ácidos e neutros	+

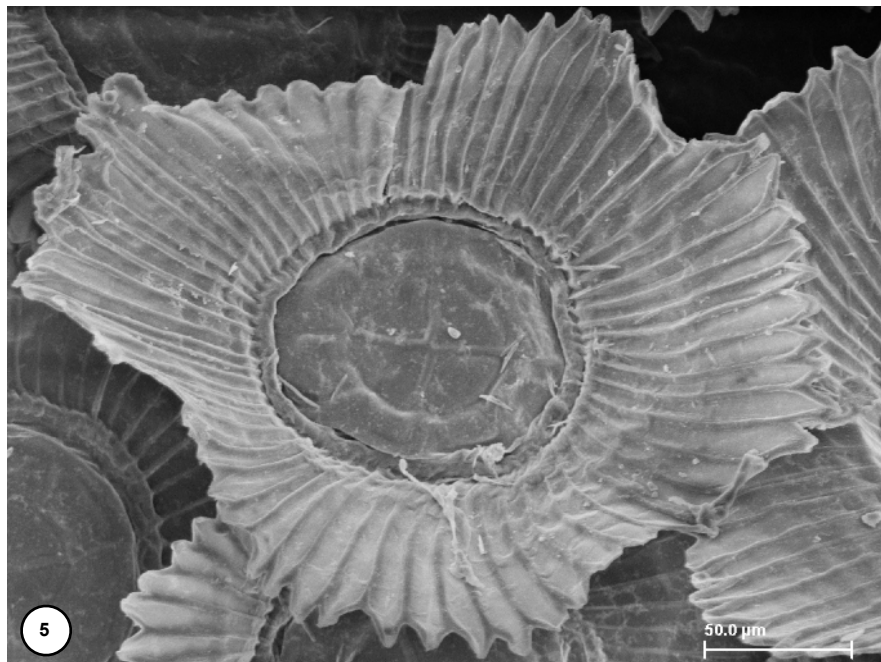
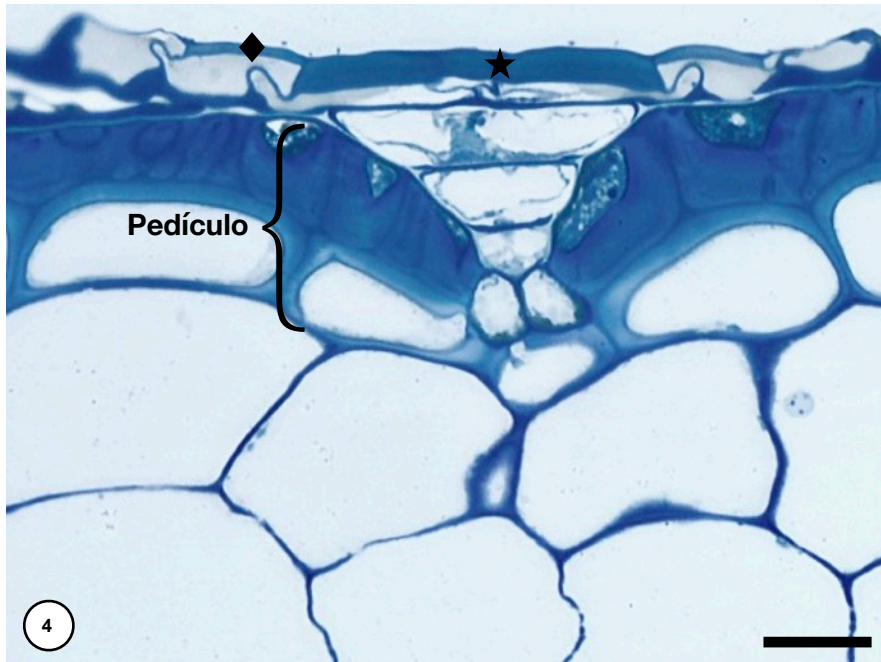


Figura 4. Corte transversal da folha de *T. stricta* corado com azul de toluidina. As escamas epidérmicas são formadas pelo escudo e pelo pedículo. A estrela indica as células centrais do escudo e o losango indica as células da asa. (Barra = 20 μm)

Figura 5. Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando as células da asa das escamas epidérmicas, que têm capacidade de contração, o que promove a formação de um microecossistema abaixo das escamas epidérmicas.

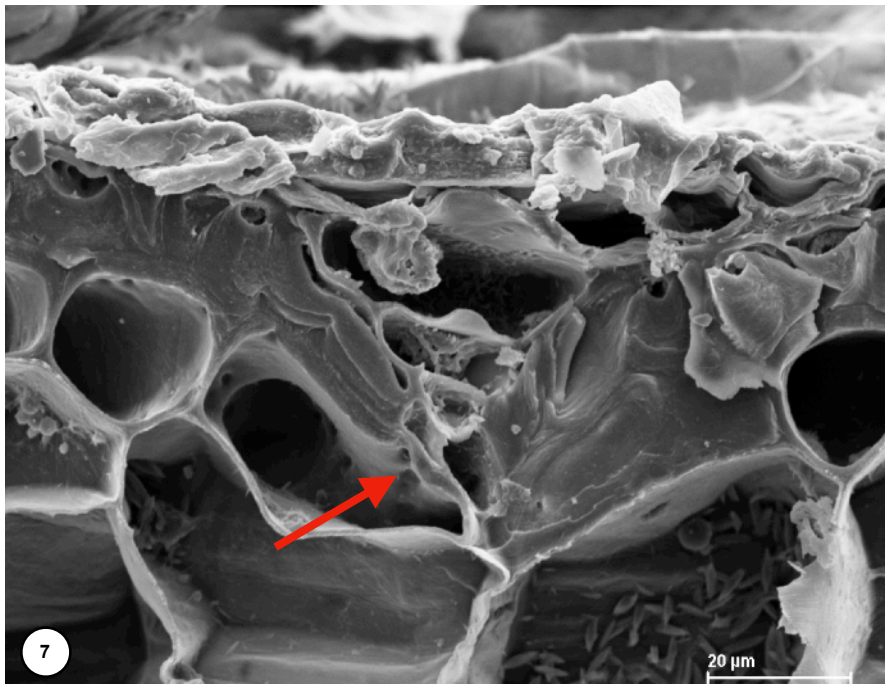
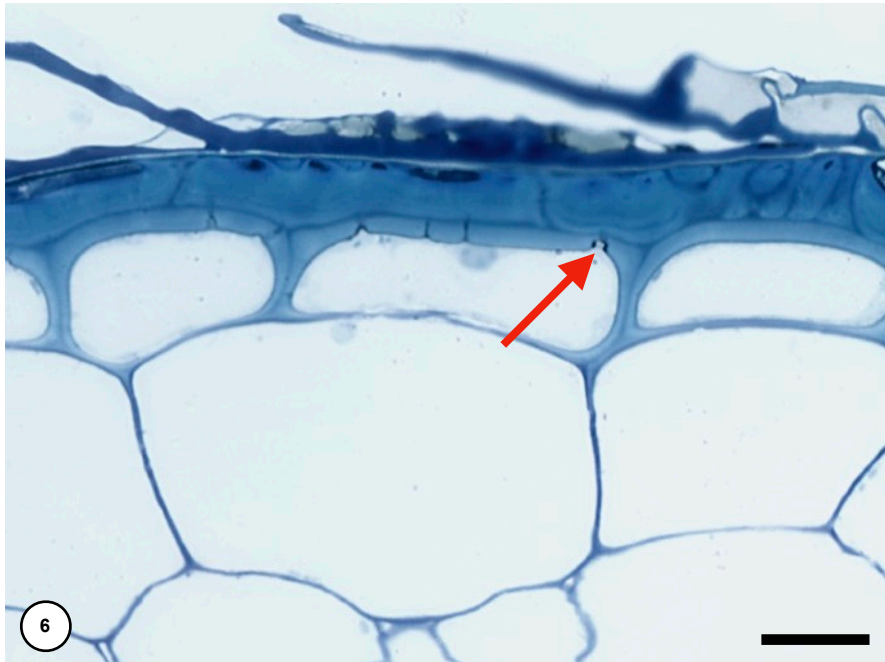


Figura 6. Corte transversal da folha de *T. stricta* corado com azul de toluidina. Nesta imagem, a epiderme unisseriada está evidenciada. A seta mostra os chamados *pit aperture*. (Barra = 20 μm)

Figura 7. Imagem de microscopia eletrônica de varredura. A seta indica a abertura do pit conectando uma célula a outra. Através destas aberturas, a água e os nutrientes dissolvidos passam da superfície foliar para os tecidos internos.

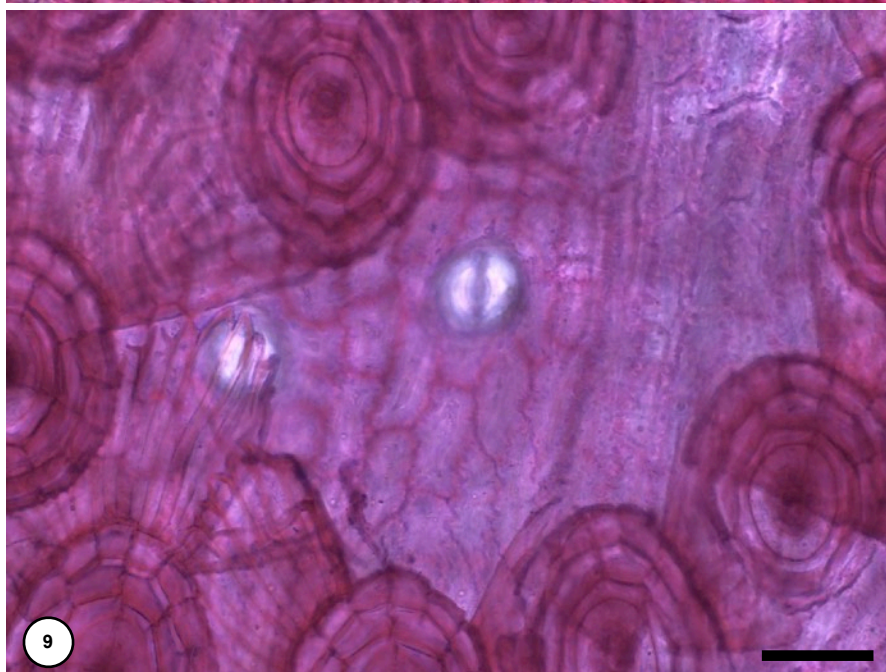
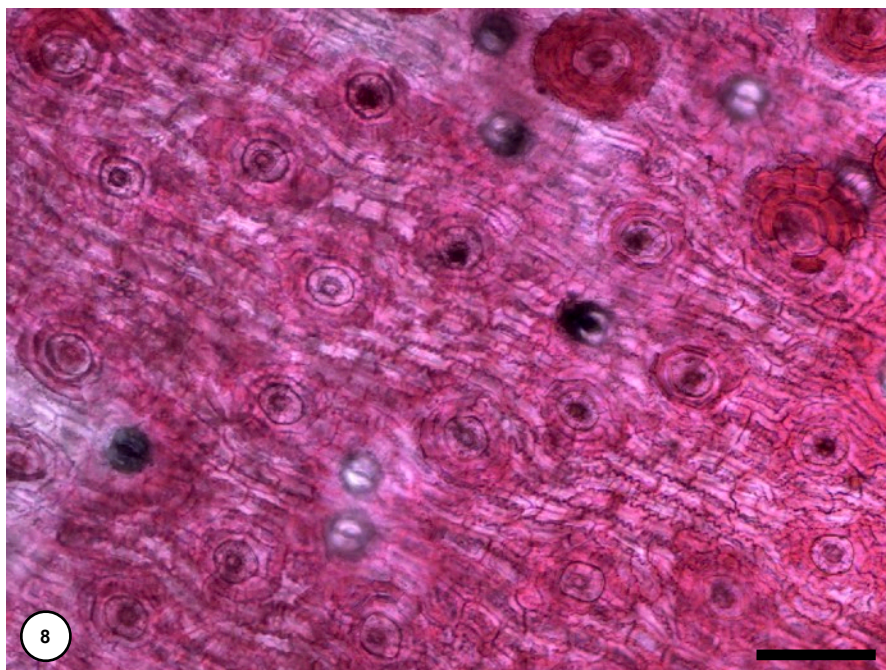


Figura 8. Epiderme de *T. stricta* corada com fucsina básica. Na imagem é possível observar a sinuosidade das células epidérmicas. O corante utilizado evidencia parede secundária. (Barra = 70 μm)

Figura 9. Epiderme de *T. stricta* corada com fucsina básica mostra os estômatos anomocíticos. (Barra = 30 μm)

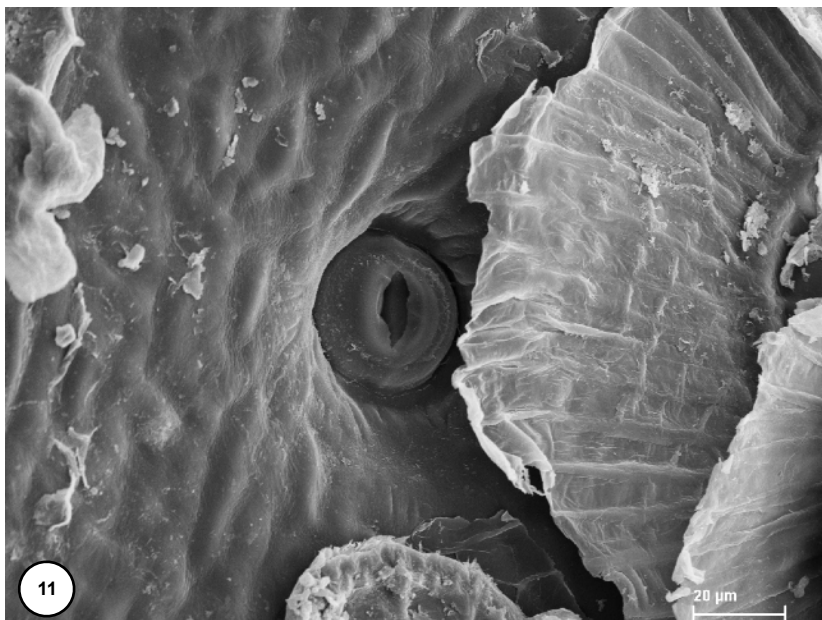
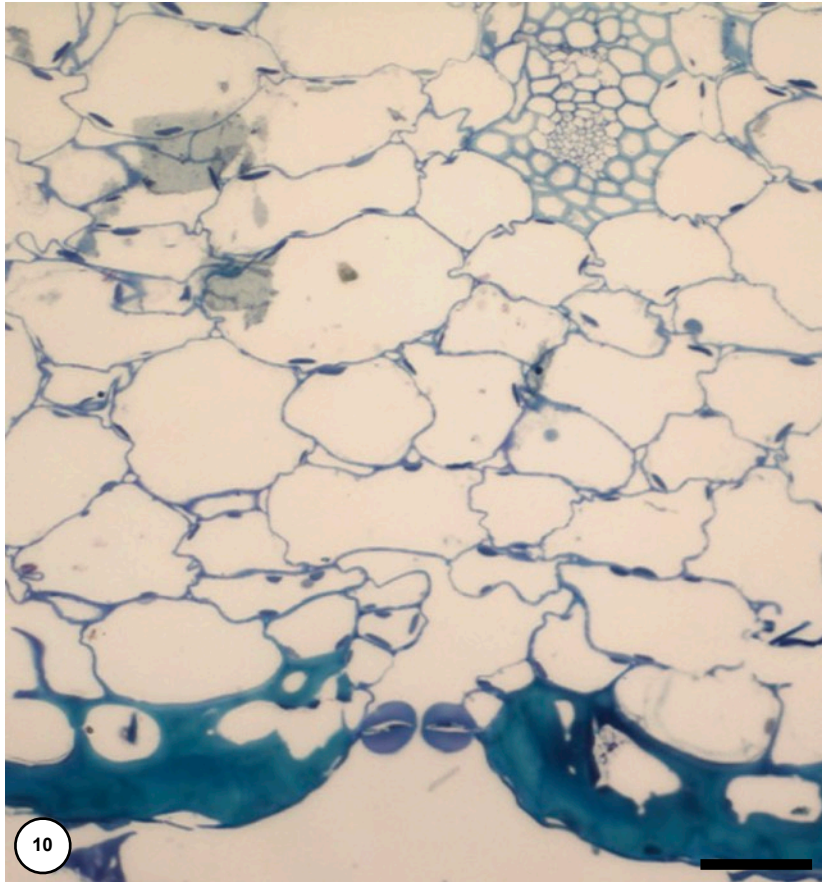


Figura 10. Corte transversal de *T. stricta* corado com azul de toluidina. A estrela indica um estômato, que estão abaixo do nível da epiderme. (Barra = 30 μm)

Figura 11. A imagem de microscopia eletrônica de varredura mostra um estômato em cripta e parcialmente coberto pela asa de uma escama epidérmica.

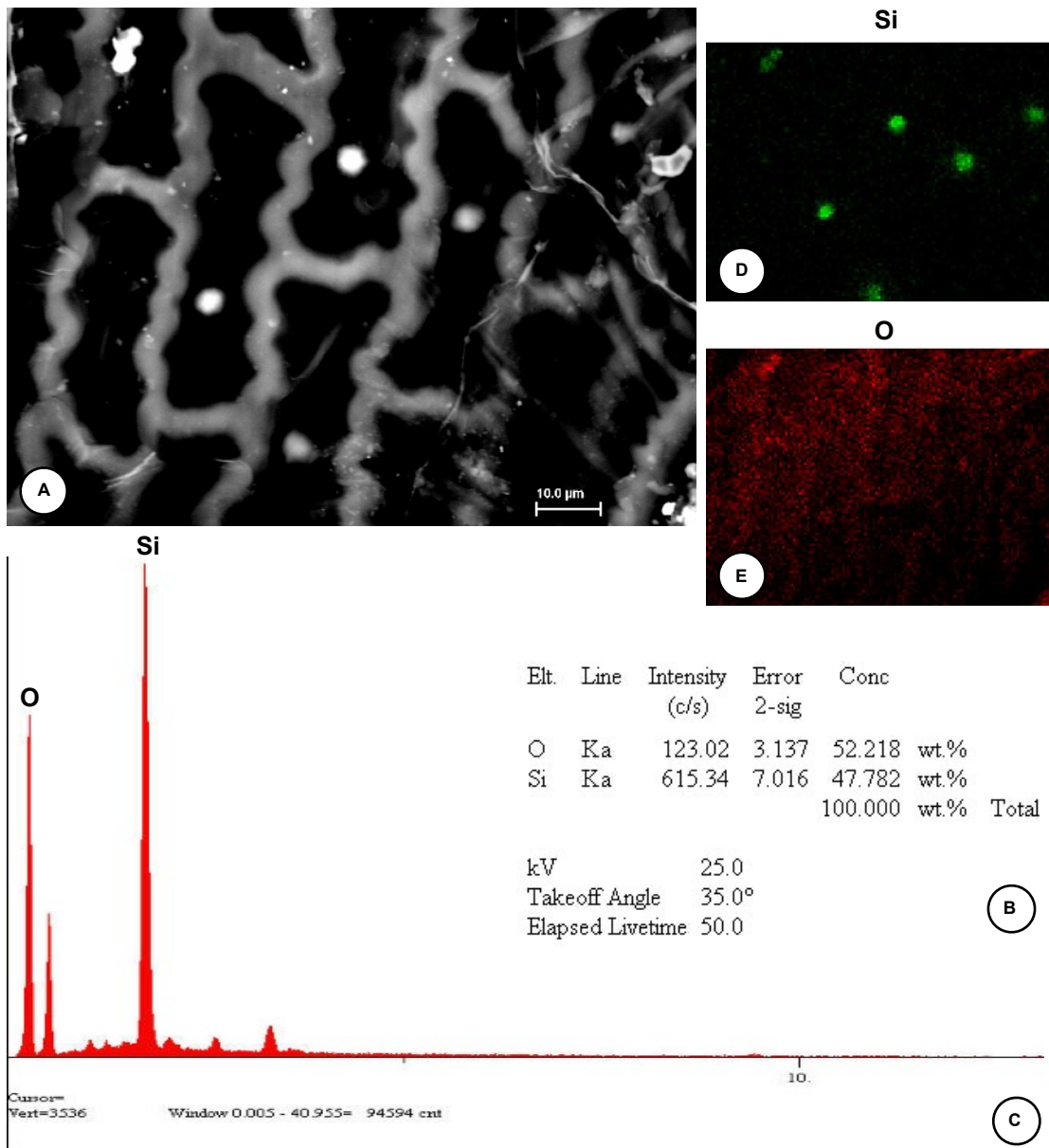
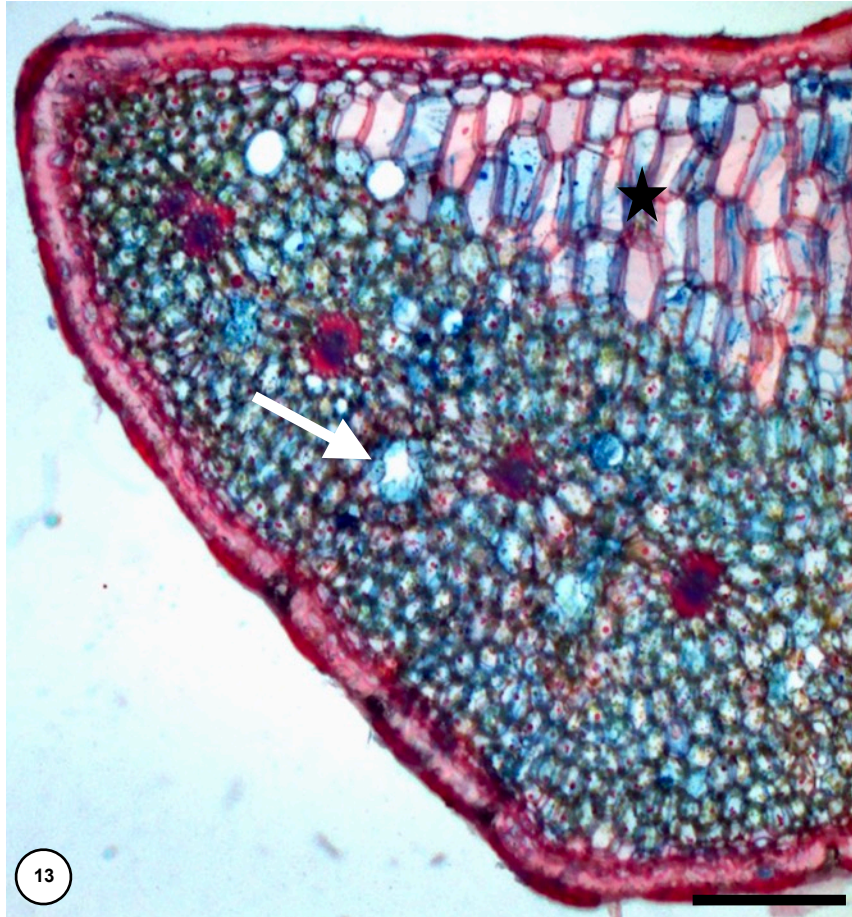
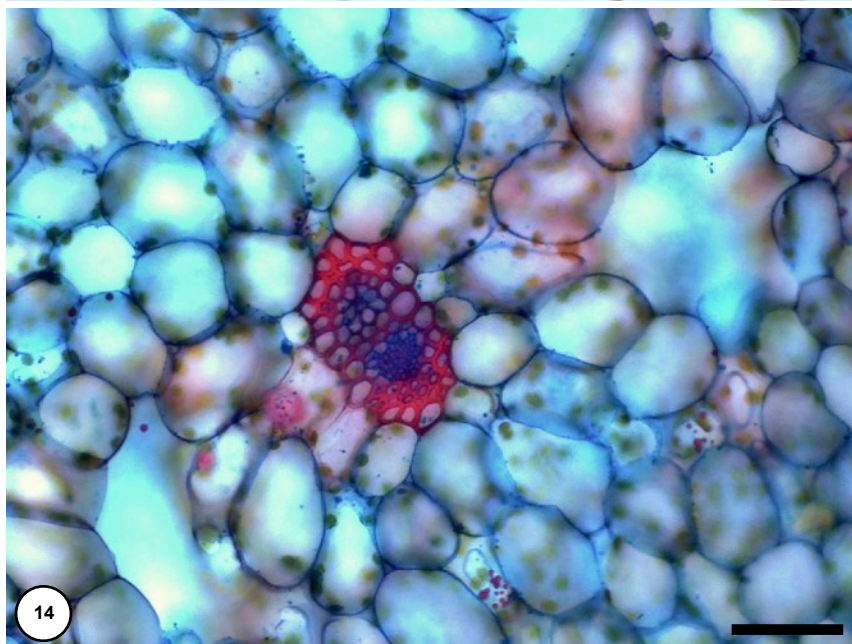


Figura 12. (A) Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrando uma esfera de sílica por célula epidérmica em *T. stricta*. **(B)** Análise quantitativa da esfera mostra que a proporção de silício e oxigênio na esfera. **(C)** Espectro pontual da esfera mostrando que é formada pelos elementos silício e oxigênio. **(D), (E)**. Mapas de espectroscopia por energia dispersiva de raio X (EDS). A sobreposição das imagens leva a concluir que a esfera é composta pelos elementos silício e oxigênio. Consequentemente, é possível inferir que a substância é sílica (SiO_2).



13



14

Figura 13. Corte de material fresco corado com safranina e azul de Astra. A estrela indica as células alongadas, que formam o parênquima armazenador de água. A seta indica os canais de ar que se alternam com os feixes vasculares colaterais. (Barra = 200 μm)

Figura 14. Corte de material fresco corado com safranina e azul de Astra. O feixe vascular é parcialmente circundado por fibras. (Barra = 30 μm)

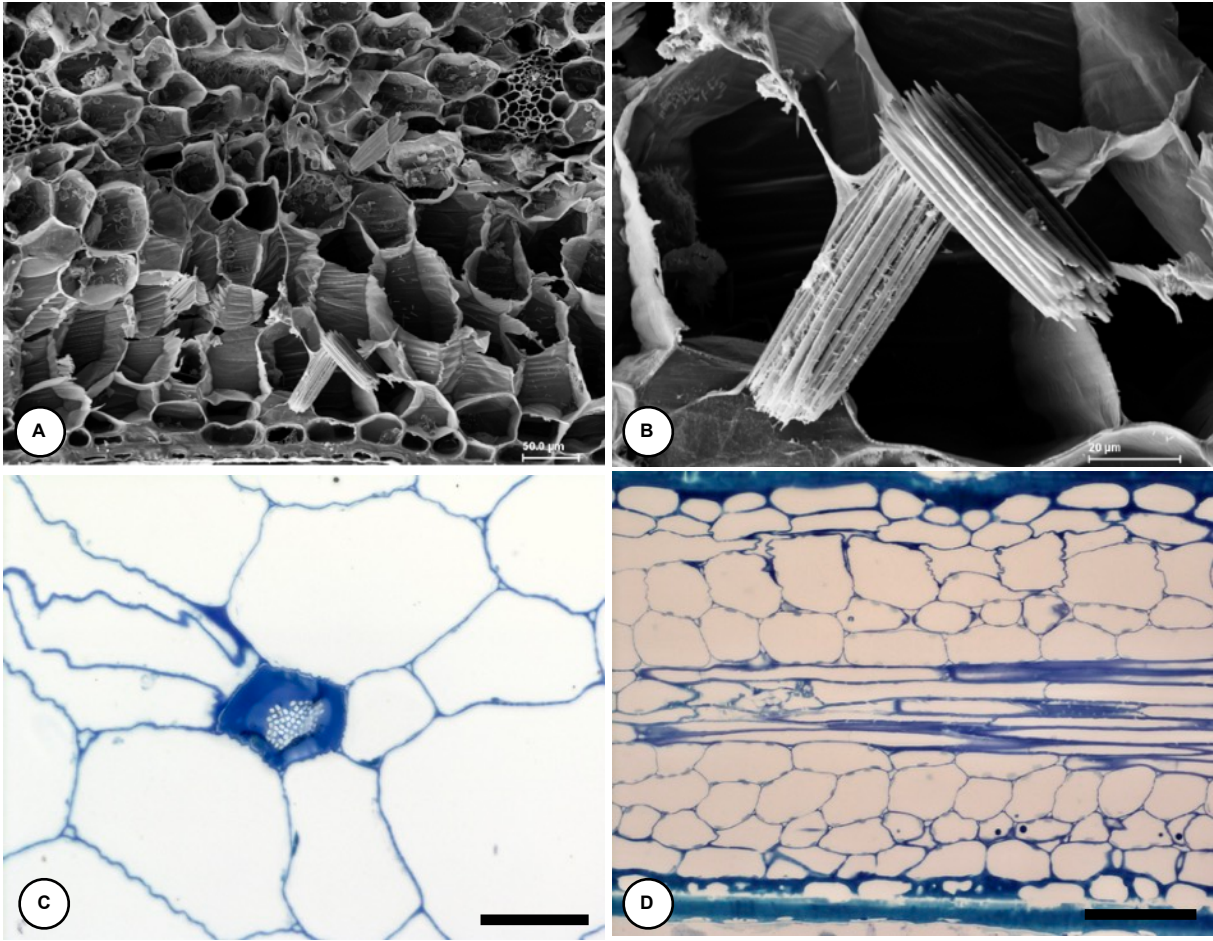


Figura 15. (A) Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostra uma ráfide no mesófilo foliar. (B) Aparentemente, as ráfides são envolvidas por uma substância que forma uma liga que as une. (C) Corte transversal da folha de *T. stricta* corado com azul de toluidina mostra um idioblasto com ráfide. (Barra = 20 μm) (D) Corte longitudinal da folha de *T. stricta* mostrando os feixes vasculares. (Barra = 30 μm)

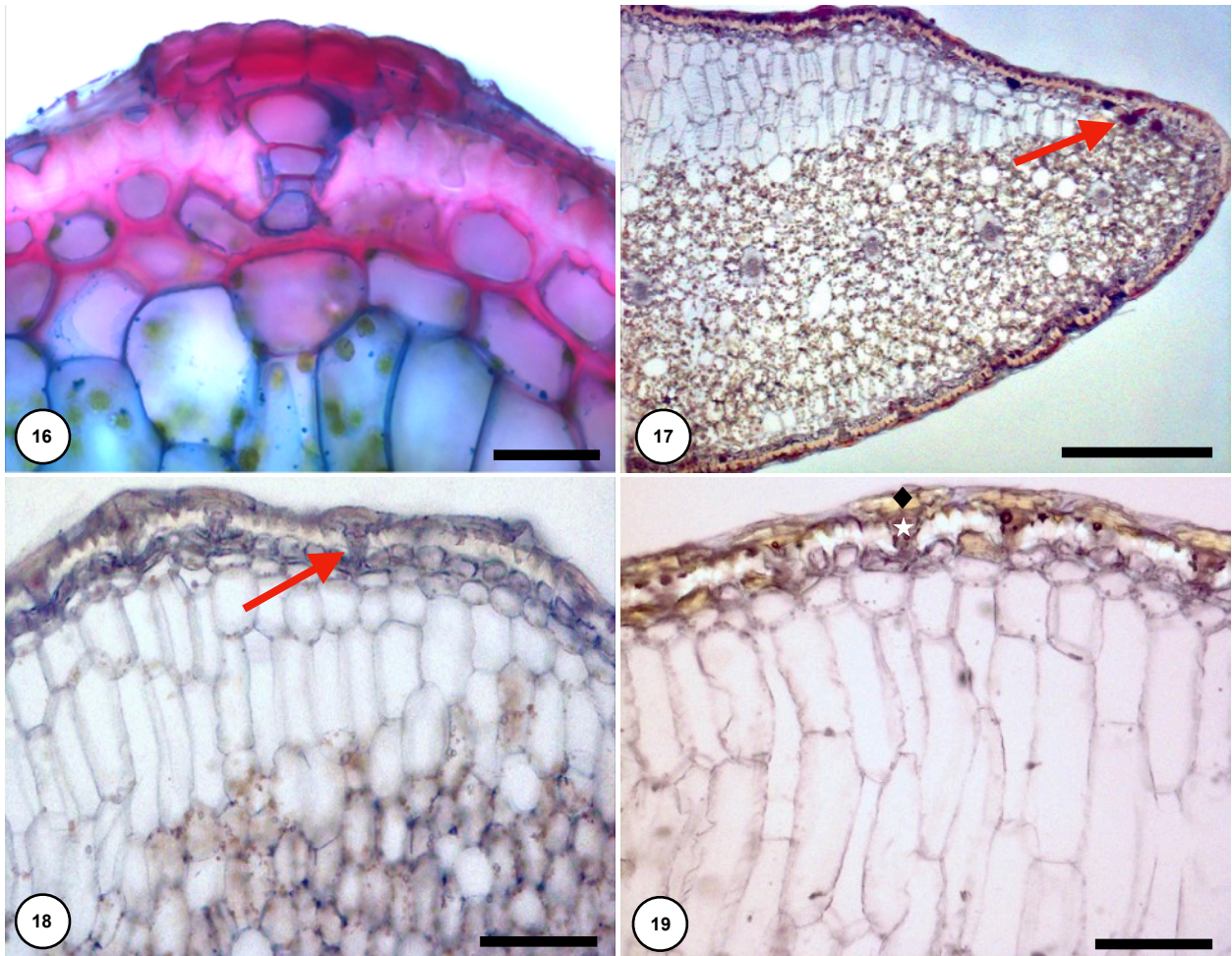


Figura 16. Corte de material fresco corado com safranina e azul de Astra. A parede das células epidérmicas são lignificadas, bem como as que constituem o pedículo e o escudo das escamas epidérmicas (rosa). (Barra = 20 μm)

Figura 17. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com cloreto férrico. O teste histoquímico revelou que há compostos fenólicos nas escamas epidérmicas e nas células epidérmicas em forma de inclusões (seta). (Barra = 200 μm)

Figura 18. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com vanilina clorídrica. Os taninos são compostos fenólicos que pertencem à classe dos triterpenos e foram detectados nas escamas epidérmicas (seta). (Barra = 70 μm)

Figura 19. Corte transversal de material fresco submetidos ao teste histoquímico com tricloreto de antimônio. Os esteroides foram identificados, principalmente, nas células do pedículo das escamas epidérmicas (estrela), contudo, também foram identificados em células do escudo das escamas epidérmicas (losango). (Barra = 70 μm)

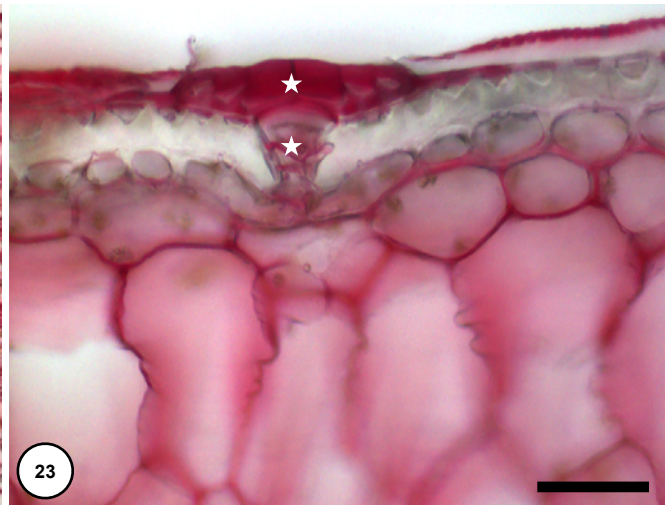
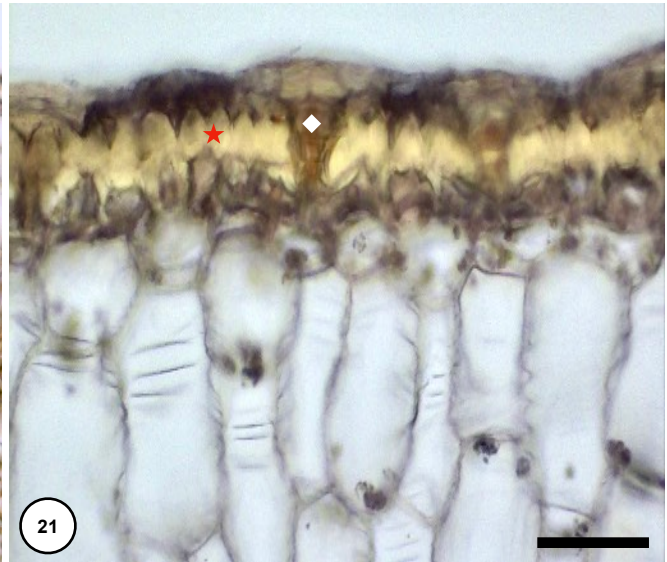


Figura 20. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com reagente de Dragendorff. Alcaloides foram identificados nas células do pedículo das escamas epidérmicas (seta). (Barra = 70 μm)

Figura 21. Corte transversal de material fresco submetidos ao teste histoquímico com lugol. O amido foi identificado pedículo das escamas epidérmicas (losango) e nas células epidérmicas (estrela). (Barra = 30 μm)

Figura 22. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com vermelho de rutênio. (Barra = 200 μm)

Figura 23. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com vermelho de rutênio. Há pectina/mucilagem nas escamas epidérmicas (estrela), mas não está presente nas células epidérmicas. (Barra = 30 μm)

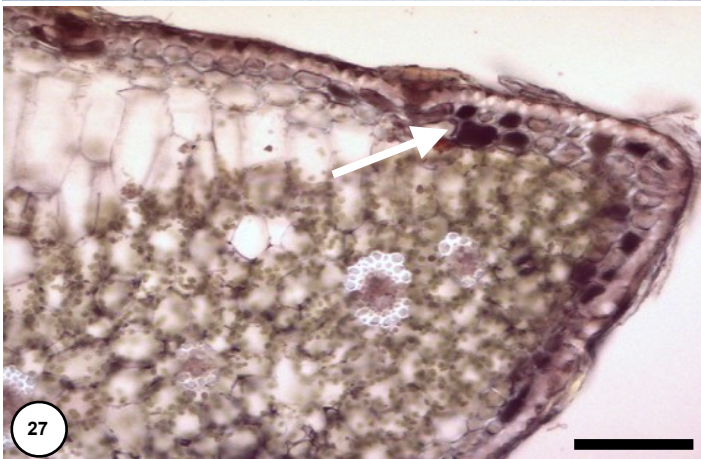
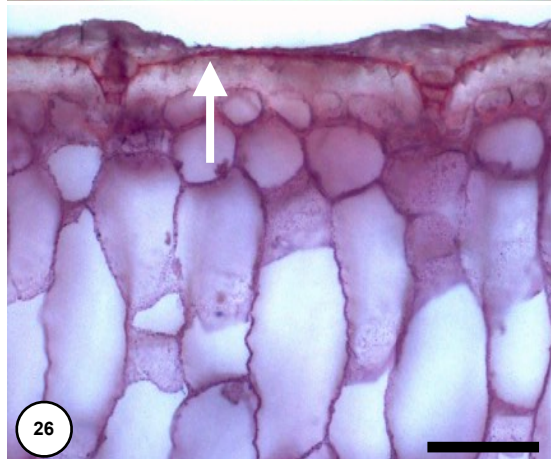
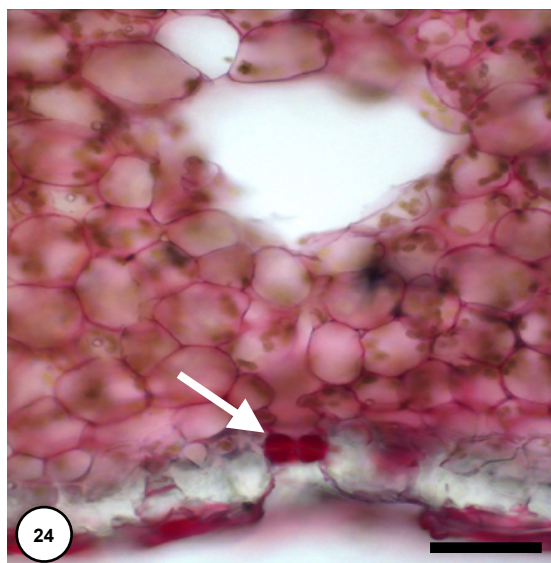


Figura 24. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com vermelho de rutênio. As células estomáticas secretam mucilagem (seta). (Barra = 30 μm)

Figura 25. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com Sudan IV. Substâncias lipídicas foram identificadas por todo o mesofilo foliar e nas escamas epidérmicas. (Barra = 200 μm)

Figura 26. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com Sudan IV. A cutícula de natureza lipofílica foi revelada pelo reagente e está indicada pela seta. (Barra = 30 μm)

Figura 27. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com tetróxido de ósmio. A seta indica uma inclusão lipídica nas células do mesofilo. (Barra = 70 μm)

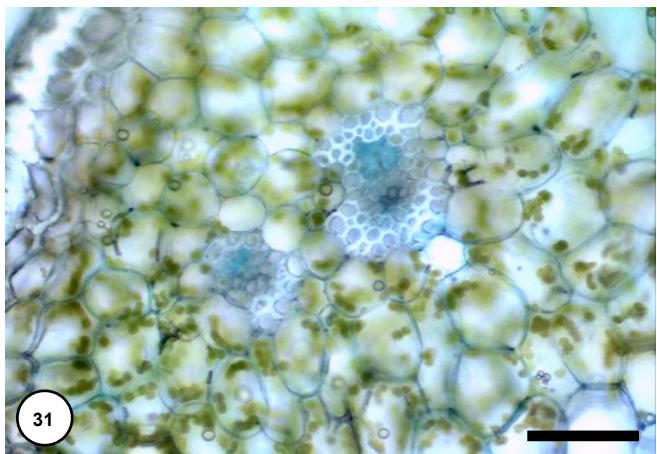
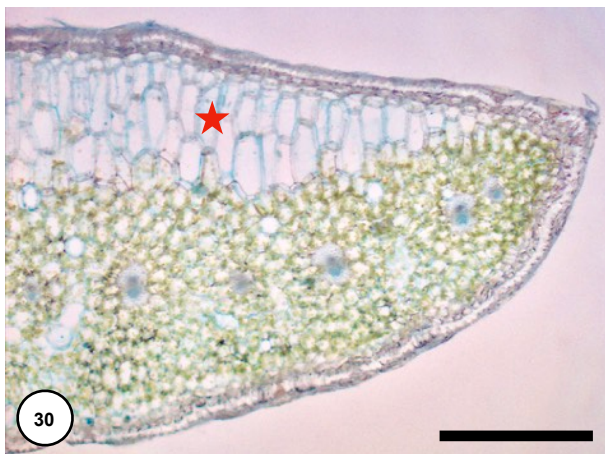
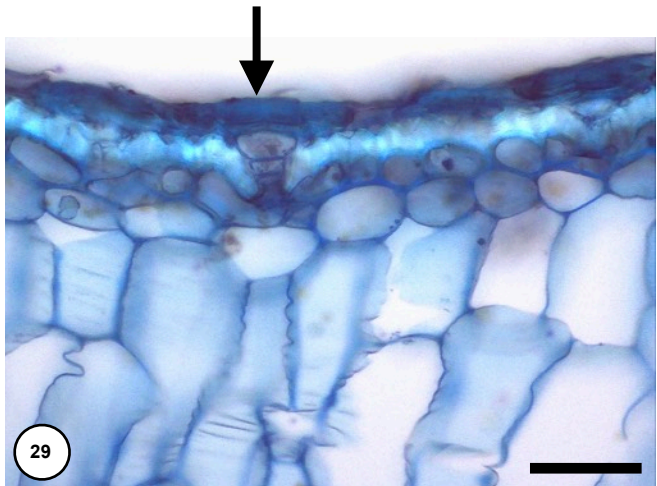
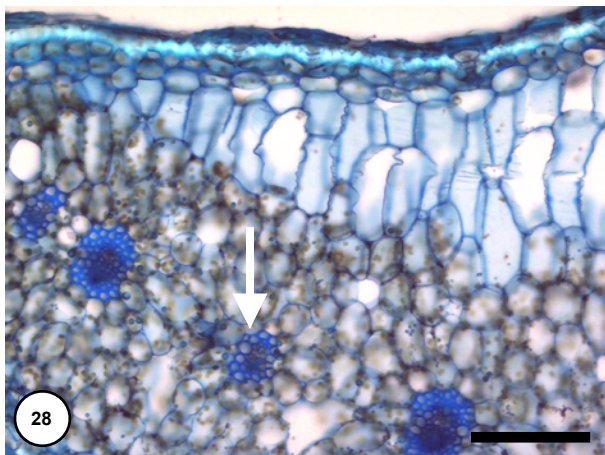


Figura 28. Corte transversal de material fresco submetidos ao teste histoquímico com sulfato azul do Nilo. A imagem indica que há lipídios ácidos e neutros nos feixes vasculares (seta). (Barra = 70 μm)

Figura 29. Material fresco submetido ao teste histoquímico com sulfato azul do Nilo. Lipídios ácidos e neutros foram identificados nas células epidérmicas (seta). (Barra = 30 μm)

Figura 30. Corte transversal de material fresco submetido ao teste histoquímico com azul de Alcian. Mucopolissacarídeos foram identificados nas células do parênquima armazenador de água (estrela). (Barra = 200 μm)

Figura 31. Mucopolissacarídeos foram revelados nos feixes vasculares da folha de *T. stricta*. (Barra = 30 μm)

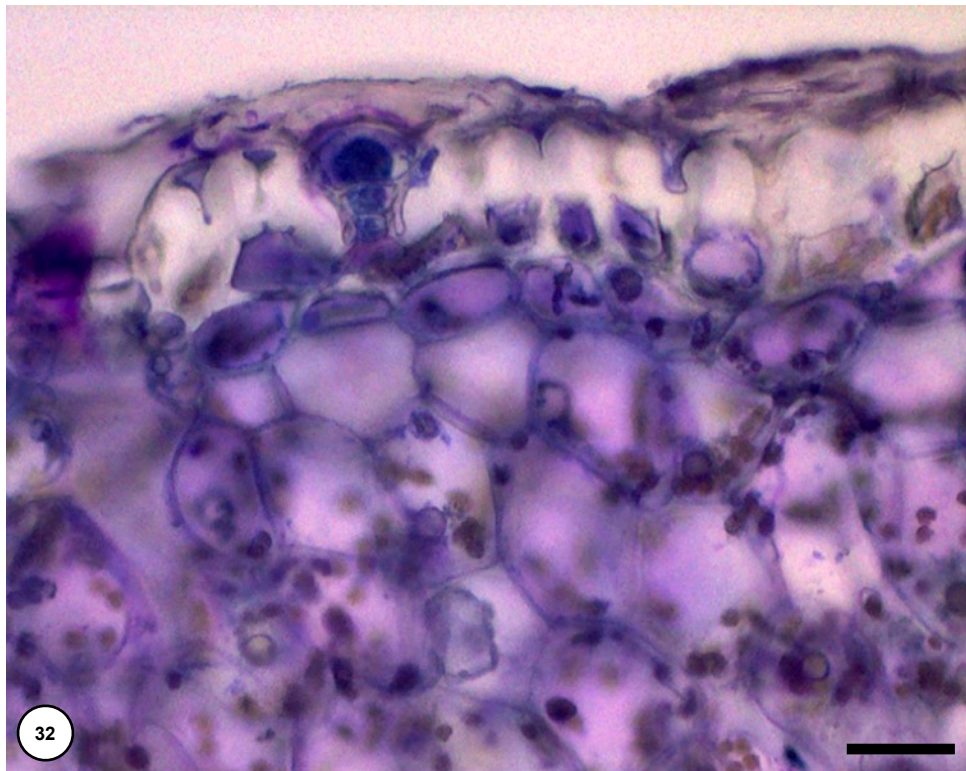


Figura 32. Corte transversal de material fresco submetidos ao teste histoquímico com azul de Coomassie. Proteínas não foram identificadas na parede das células epidérmicas. (Barra = 20 μm)

5. Discussão

O tamanho reduzido de plantas do gênero *Tillandsia*, a suculência de suas folhas bem como a superfície foliar coberta por escamas epidérmicas são características adaptativas que permitem a essas plantas sobreviver em locais com pouca disponibilidade de água e alta temperatura. Portanto, *Tillandsia stricta* pode ser considerada uma planta suculenta, ou seja, é uma planta que evita a perda de água, que é dotada de aparatos anatômicos que possibilitam que o mínimo de água seja perdido. A água armazenada permite que a planta mantenha algumas atividades fisiológicas sem depender de suprimento externo de água (Eggli & Nyffeler, 2009).

Características anatômicas são fatores importantes para compreender a fisiologia do uso da água por plantas suculentas e a compartimentalização hidráulica no mesófilo foliar é uma delas, entendida como a separação entre tecido armazenador de água e tecido fotossintético, que é observada em *T. stricta*, propicia a translocação da água do parênquima armazenador de água para o clorênquima durante períodos de pouca chuva. A presença de depressões nas paredes celulares (*pit aperture*) é fundamental para que a água seja transportada pelos tecidos. Em *T. stricta*, essas cavidades estão presentes nas células epidérmicas, o que sugere que essas aberturas contribuem para que a água absorvida nas escamas epidérmicas seja conduzida até o tecido armazenador de água. A morfologia da folha também influencia a forma como o calor é dissipado, gerando um gradiente de temperatura que afeta o fluxo de vapor dentro da folha, principalmente nos estômatos (Buckley *et al.*, 2017; Buckley *et al.*, 2015; Rockwell *et al.*, 2014; Zwieniecki *et al.*, 2007; Choat *et al.*, 2008; Nobel, 2006).

As escamas epidérmicas são apontadas em diversos estudos como estruturas cujo papel é fundamental para plantas como *Pleopeltis polypodioides*, devido a sua composição química que facilita a absorção de água. O formato do escudo das escamas epidérmicas favorece que a superfície foliar tenha uma alta superfície de contato com a água líquida ou em estado de vapor haja vista que, a retirada das células do escudo não somente

diminui a absorção de água, mas também facilita a desidratação (Benz & Martin, 2006; Papini *et al.*, 2010; John & Hasenstein, 2017).

Os resultados das análises histológicas mostraram que as escamas epidérmicas são compostas por substâncias tanto de natureza hidrofóbica como lipídios, quanto hidrofílica, tais como mucilagem e pectina. A mucilagem fica entremeada nas *dome cells*, que estão situadas no pedículo das escamas epidérmicas e facilita a absorção de água, bem como representa uma fonte de energia em períodos de seca juntamente com o amido. A cutícula sobre a epiderme é lipofílica, porém é permeável à água devido à existência de canais polares e à sua composição química heterogênea, que contém grupos e/ou substâncias polares, como carboidratos, em sua estrutura. Estudos sugerem que a permeabilidade cuticular de plantas epífitas à água é influenciada por condições ambientais (Schreiber & Schönherr, 1990; Clifford *et al.*, 2002; Schreiber, 2005; Papini *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2017).

Compostos fenólicos, de forma geral, estão envolvidos em mecanismos de defesa do vegetal contra herbívoros, radiação solar, geração de espécies reativas de oxigênio e quelação de íons metálicos que possam causar algum dano à planta. Os compostos fenólicos melhoram a refletância dos raios ultravioleta (Bachereau *et al.*, 1998; Agati & Tattini, 2010).

Em razão da natureza inespecífica do reagente azul de Coomassie não é possível afirmar quais proteínas estão presentes na folha de *T. stricta*. Porém, é possível inferir, devido ao hábitat destas plantas, que ocorra a síntese de proteínas envolvidas na resposta ao estresse hídrico e alta temperatura. Assim, estudos futuros de proteômica e genômica são de grande valia para determinar as classes de proteínas e os genes expressos na produção de tais proteínas (Bowles, 1990; Leung & Sharp, 2010).

A análise das proteínas envolvidas nos processos celulares e dos genes que determinam a expressão destas moléculas são ferramentas que agregam conhecimento à compreensão dos mecanismos de proteção utilizados pela planta para se defender de danos externos. Diversas proteínas, tais como *heat shock* (HSP), chaperonas, chaperoninas e LEA (*late embryogenesis abundant*) são expressas para proteger a planta contra possíveis danos causados por

fatores abióticos. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas como resultado das mudanças celulares induzidas pelo estresse e a produção destas proteínas e de enzimas como catalases, malondialdeído, glutathione transferase, superóxido dismutase desempenham uma função de proteção contra ROS, que pode promover sérios danos celulares (Timperio *et al.*, 2008).

Cristais de oxalato de cálcio são comuns em plantas e são encontrados em vários formatos, contudo, os mais comuns são ráfides, drusas e estiloides. Embora, estes formatos sejam encontrados em monocotiledôneas, isoladamente ou associados, as drusas são mais freqüentemente observadas em dicotiledôneas. A formação e a morfologia dos cristais é regulado geneticamente, mas a concentração também é um fator determinante. Em *T. stricta*, o formato identificado foi a ráfide e estudos sugerem que os cristais de oxalato de cálcio são utilizados como reservas de cálcio, proteção contra animais herbívoros e detoxificação de metais, os quais são incorporados aos cristais. No entanto, o oxalato como reserva de cálcio, em muitos casos, não é funcional porque várias espécies de plantas perdem exatamente células, tecidos ou órgãos nos quais os cristais de oxalato de cálcio estão armazenados. Isto indica que o oxalato de cálcio também pode ser usado pelas plantas como uma forma de eliminar o excesso de cálcio e possíveis elementos tóxicos quelados pelas ráfides. O cálcio, primeiramente, torna-se indisponível na forma de cristais para, posteriormente, eliminar as células ou os tecidos onde estão armazenados (Prychid & Rudall, 1999; Franceschi & Nakata, 2005; Paiva, 2019).

O silício é um elemento químico importante para as plantas porque está envolvido em mecanismos de defesa contra estresse causado por fatores bióticos e abióticos, como salinidade, seca e metais tóxicos. Em *T. stricta*, o silício foi identificado sob a forma de esferas de sílica, que funcionam como uma barreira física contra insetos e nematóides (Epstein, 1999; Currie & Perry, 2007; Hunt *et al.*, 2008).

Muitos metabólitos secundários, que são compostos comumente produzidos pelas plantas em situações de estresse, tem afinidade química pelo silício, evidenciando que este elemento atua como um ligante destes

compostos, uma vez que o silício não pode estar envolvido na síntese de metabólitos secundários porque não está biodisponível na forma de sílica. Além disso, o silício afeta a regulação *up* e *down* de genes ligados à resposta a estresses. O aumento de temperatura diminui a absorção de silício em *Phalaris aquatica*, o que pode ser revertido com a suplementação de silício. No entanto, a formação de sílica pode não ser totalmente restabelecida (Epstein, 2009; Johnson *et al.*, 2019).

Oliveira e colaboradores (2016) utilizaram folhas de *Tillandsia stricta* como monitores de material particulado atmosférico da cidade de Campos dos Goytacazes. Neste artigo, os autores também destacam o método *air drying* associado com fixação em atmosfera de formaldeído associado com microscopia eletrônica de varredura e espectrometria de raio-X como o mais adequado para análise de material particulado por extrair menor quantidade de partículas durante o preparo da amostra¹.

O material particulado atmosférico encontrado sobre as folhas de *T. stricta* teve composição diversa incluindo minerais tectossilicato, sulfatos, fosfatos, cloretos, ligas metálicas e ainda partículas biológicas como hifas e grãos de pólen. As partículas, além de serem compostas por elementos comuns na crosta terrestre como Si, Fe, O, Ca, Mg e Al, K, Ti também continham Ni, Mn, Ba, Cr, Ag, Cd, Zn, Pb e Cu, Zr cuja ocorrência foi mais comum em partículas de origem antrópica (Oliveira *et al.*, 2016).

As partículas identificadas por Oliveira e colaboradores (2016) foram encontradas sobre as escamas epidérmicas das folhas de *T. stricta*, que são estruturas de natureza predominantemente hidrofílica. Portanto, é provável que estes elementos sejam absorvidos pelas células das escamas epidérmicas e células epidérmicas, como mostrado por Amado Filho e colaboradores (2002), ao analisar folhas de *Tillandsia usneoides* submetidas, durante 15 dias, ao ar contaminado por mercúrio. Logo, é necessário não somente utilizar as folhas

¹Além dos resultados disponíveis no artigo, também são apresentados alguns resultados obtidos pela D.Sc. Martha Lima de Oliveira e pelo Professor Flávio Costa Miguens (*in memoriam*), mas que não foram divulgados. A divulgação destes resultados foi autorizada pela D. Sc. Martha Lima de Oliveira. As imagens de resultados não divulgados estarão no material suplementar desta dissertação.

de plantas do gênero *Tillandsia* como uma superfície de deposição de partículas, mas como ser vivo que interage com as partículas que sobre elas se depositam. Neste ponto, o estudo das características anatômicas, histológicas e fisiológicas do gênero *Tillandsia* torna-se fundamental a fim de estabelecer conhecimentos básicos sobre estas espécies e contribuir para a elucidação de como os elementos químicos que compõem o material particulado atmosférico pode afetar a planta.

A construção do conhecimento básico sobre a espécie *Tillandsia stricta* conduz a outros questionamentos, como os mecanismos utilizados pela planta para armazenar água no hidrênquima, como a água armazenada é utilizada, a composição da microfauna e microrganismos na superfície foliar, a possível contribuição de microrganismos presentes na superfície foliar ou endofíticos para a fixação de nitrogênio, uso eficiente da água e resistência à poluição atmosférica. Segundo Oliveira e colaboradores (2016), partículas compostas por metais pesados como cobre, chumbo, cádmio e manganês foram identificadas sobre folhas de *Tillandsia stricta* coletadas em locais de tráfego intenso de veículos. As plantas não apresentaram alterações na superfície das folhas, como foi mostrado em imagens de microscopia eletrônica de varredura, e isto leva a questionar como essa espécie sobrevive em locais poluídos: os microrganismos tem algum papel em relação a isso ou a planta desenvolve mecanismos para indisponibilizar os elementos tóxicos?. Por conseguinte, espera-se que a partir deste trabalho, novos estudos sejam conduzidos para responder novas perguntas que serão geradas.

6. Conclusões

A partir deste trabalho é possível concluir que:

- A maioria dos grupos identificados pelos testes histoquímicos estão presentes nas escamas epidérmicas. Isto corrobora a importância destas estruturas para a sobrevivência de *Tillandsia stricta*, não apenas como estruturas que absorvem os nutrientes do ar, mas também como estruturas que auxiliam a planta a fazer o uso eficiente da água armazenada no hidrênquima.

- As escamas epidérmicas desempenham um papel de proteção contra os raios UV devido aos compostos fenólicos, alcaloides e esteroides produzidos por *Tillandsia stricta*. Consequentemente, estes grupos químicos também contribuem para reduzir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio, que são geradas não somente pelo excesso de luz, mas também pelo estresse hídrico e absorção de metais tóxicos provenientes do material particulado e gases presentes na atmosfera.

- As esferas de sílica detectadas em cada célula epidérmica, juntamente com as escamas epidérmicas, protegem a planta contra animais herbívoros e refletem a luz.

- As escamas epidérmicas são compostas por moléculas hidrofílicas e lipofílicas propiciando à planta evitar a perda de água e permitir que a água seja absorvida.

- O reagente utilizado para identificar proteínas não é específico, portanto, a partir destes resultados se pode afirmar apenas que não foi possível detectar proteínas com o reagente escolhido nas células epidérmicas e nas células do escudo das escamas epidérmicas.

- Estudos posteriores são necessários no intuito de identificar quais proteínas estão presentes nas escamas epidérmicas, como, por exemplo, proteínas *heat shock*, que estão envolvidos na resposta das células ao estresse causado pelos raios solares e ao estresse hídrico. A proteômica pode ser combinada com a genômica a fim de determinar quais genes codificam a expressão das proteínas que protegem a planta contra danos externos, haja

vista que já é sabido que *Tillandsia stricta* consegue sobreviver em locais poluídos.

- Estudos mais avançados também são necessários para identificar as moléculas pertencentes às classes dos alcaloides e esteroides estão presentes na folha de *Tillandsia stricta*, bem como quais são os compostos fenólicos produzidos pela planta.

- As esferas de sílica e as ráfides de oxalato de cálcio podem exercer uma função de quelante de íons metálicos fazendo com que a planta consiga sobreviver em locais poluídos.

7. Referências

- AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytologist*, 186: 786–793, 2010.
- ALVES, E. S.; MOURA, B. B.; DOMINGOS, M. Structural analysis of *Tillandsia usneoides* L. exposed to air pollutants in São Paulo City–Brazil. *Water, Air & Soil Pollution*, 189: 61-68, 2008.
- AMADO FILHO, G. M.; ANDRADE, L. R.; FARINA, M.; Malm, O. Hg localisation in *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae), an atmospheric biomonitor. *Atmospheric Environment*, 36: 881-887, 2002.
- BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effect of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. *Physiologia Plantarum*, 104: 203-210, 1998.
- BENZ, B. W.; MARTIN, C. E. Foliar trichomes, boundary layers, and gas exchange in 12 species of epiphytic *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Journal of Plant Physiology*, 163: 648-656, 2006.
- BENZING, D. H. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.
- BILLINGS, F. H. A study of *Tillandsia usneoides*. *Botanical Gazette*, 38: 99-121, 1904.
- BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry*, 59: 873-907, 1990.
- BRIGHIGNA, L.; PALANDRI, M. R.; GIUFFRIDA, M.; MACCHI, C.; TANI, G. Ultrastructural Features of the *Tillandsia usneoides* L. absorbing trichome during conditions moisture and aridity, *Caryologia*, 41 (2): 111-129, 1988.
- BRIGHIGNA, L.; PAPINI, A.; MOSTI, S.; CORNIA, A.; BOCCHINI, P.; GALLETTI, G. The use of tropical bromeliads (*Tillandsia* spp) for monitoring atmospheric pollution in the town of Florence, Italy. *Revista de Biologia Tropical*, 50 (2): 577-584, 2002.

Bromeliaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB66>>. Acesso em: 08 Abr. 2019.

BUCKLEY, T. N.; JOHN, G. P.; SCOFFONI, C.; SACK, L. How does leaf anatomy influence water transport outside the xylem? *Plant Physiology*, 168: 1616–1635, Agosto, 2015.

BUCKLEY, T. N.; JOHN, G. P.; SCOFFONI, C.; SACK, L. The sites of evaporation within leaves. *Plant Physiology*, 173: 1763–1782, Março, 2017.

CAIN, A. J. The use of Nile Blue in the examination of lipoids. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 88: 383-392, 1947.

CALASANS, C. F.; MALM, O. Elemental Mercury contamination survey in a chlor-alkali plant by the use of transplanted Spanish Moss *Tillandsia usneoides* (L.). *The Science of Total Environment*, 208: 165-177, 1997.

CHAMBERLAIN, C. J. *Methods in plant histology*. The University of Chicago, Chicago, 416 p., 1932.

CHASE, M. W. Monocot relationships: an overview. *American Journal of Botany*, 91: 1645-1655, 2004.

CHOAT, B.; COBB, A. R.; JANSEN, S. Structure and function of bordered pits: new discoveries and impacts on whole-plant hydraulic function. *New Phytologist*, 177: 608-626, 2008.

CHRISTENHUSZ, J. M. M.; BYNG, J. W. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261 (3): 201-217, 2016.

CLIFFORD, S. C.; ARNDT, S. K.; POPP, M.; JONES, H. G. Mucilages and polysaccharides in *Ziziphus* species (Rhamnaceae): localization, composition and physiological roles during drought-stress. *Journal of Experimental Botany*, 53 (366): 131-138, Janeiro, 2002.

CURRIE, H. A.; PERRY, C. C. Silica in plants: Biological, biochemical and chemical studies. *Annals of Botany*, 100: 1383-1389, 2007.

DAHLGREN, R.; CLIFFORD, T. H.; YEO, P. F. The families of the monocotyledons: Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin. 100, 1985.

EGGLI, U.; NYFFELER, R. Living under temporarily arid conditions – succulence as an adaptive strategy. *Bradleya*, 27: 13 – 36, 2009.

EPSTEIN, E. Silicon. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 641–664, 1999.

EPSTEIN, E. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals of Applied Biology*, 155: 155-160, 2009.

FIORATO, L. O gênero *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) no Estado da Bahia, Brasil. Dissertação de mestrado. São Paulo, 2009.

FISHER, D. B. Protein staining of ribboned Epon sections for light microscopy. *Histochemie* 16: 92-96, 1968.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 41-71, 2005.

FREEDMAN, B. Environmental ecology. The ecological effects of pollution, disturbance and other stresses. 2nd. Academic Press Inc. San Diego, 1995.

GANTER, P.; JOLLÈS, G. Histologie normale et pathologique. Vols. 1, 2 Gauthier-Villars, Paris, (1969, 1970).

GARDNER, C. S. Preliminary classification of *Tillandsia* based on floral characters. *Selbyana*. 9: 130-146, 1986.

GARDNER, R. O. (1975) Vanillin-Hydrochloric acid as a histochemical test for tannin. *Stain Technology*, 50: 315-317.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E. A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. *Stain Technology*, 47: 205-208, 1972.

HUNT, J. W.; DEAN, A. P.; Webster, R. E.; JOHNSON, G. N.; ENNOS, A. R. (2008) A Novel mechanism by which silica defends grasses against herbivory. *Annals of Botany*, 102: 653-656, 1972.

JACQUES-FÉLIX, H. The discovery of a bromeliad in Africa: *Pitcairnia feliciana*. *Selbyana* 21: 118-124, 2000.

JENSEN, W. A. Botanical histochemistry. WH Freeman and Co, San Francisco, 1962.

JOHANSEN, D. A. Plant Microtechnique. New York: Mcgraw-Hill Book, 1940.

JOHN, S. P.; HASENSTEIN, K. H. The role of peltate scales in desiccation tolerance of *Pleopeltis polypodioides*. *Planta*, 245: 207–220, 2017.

JOHNSON, S. N.; RYALLS, J. M. W.; BARTON, C. V. M.; TJOELKER, M. G.; WRIGHT, I. J.; MOORE, B. D. Climate warming and plant biomechanical defences: Silicon addition contributes to herbivore suppression in a pasture grass. *Functional Ecology*, 33: 587- 596, 2019.

KOVÁČIK, J.; KLEJDUS, B.; STORK, F.; HEDBAVNY, J. Physiological responses of *Tillandsia albida* (Bromeliaceae) to long-term foliar metal application. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240: 175–182, 2012.

LEUNG, A. K. L.; SHARP, P. A. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular Cell*, 40: 205-215, Outubro, 2010.

MACE, M. E.; HOWELL, C. R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany*, 52: 2423-2426, 1974.

MACE, M. E.; BELL, A. A.; STIPANOVIC, R. D. Histochemistry and isolation of gossypol and related terpenoids in roots of cotton seedlings. *Phytopathology*, 64: 1297-1302, 1974.

MALES, J. Think tank: water relations of Bromeliaceae in their evolutionary context. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181 (3): 415-440, 2016.

MALES, J. Secrets of succulence. *Journal of Experimental Botany*, 68 (9): 2121-2134, 2017.

MALES, J.; GRIFFITHS, H. Functional types in the Bromeliaceae: relationships with drought-resistance traits and bioclimatic distributions. *Functional Ecology*, 31: 1868–188, 2017.

NOBEL, P. S. Parenchyma–chlorenchyma water movement during drought for the hemiepiphytic cactus *Hylocereus undatus*. *Annals of Botany*, 97: 469–474, 2006.

OLIVEIRA, M. L.; MELO, E. J. T.; MIGUENS, F. C. *Tillandsia stricta* Sol (Bromeliaceae) leaves as monitors of airborne particulate matter - A comparative SEM methods evaluation: Unveiling an accurate and odd HP-SEM method. *Microscopy Research and Technique*, 79 (9): 869-879, 2016.

PAIVA, E. A. S. Are calcium oxalate crystals a dynamic calcium store in plants? *New Phytologist*, 2019.

PAPINI, A.; TANI, G.; DI FALCO, P.; BRIGHIGNA, L. The ultrastructure of the development of *Tillandsia* (Bromeliaceae) trichome. *Flora*, 205: 94-100, 2010.

PEARCE, R. S.; SAMAD, A. Changes in fatty acid content of popular lipids during ageing of seeds of peanuts (*Arachis hypogea* L.). *Journal of Experimental Botany*, 31: 1283-1290, 1980.

PEARSE, A. G. E. *Histochemistry: Theoretical and applied*. 4th ed. Longman Group Limited, 1980.

PIERCE, S.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H.; WINTER, K. Hydrophobic trichome layers and epicuticular wax powders in Bromeliaceae. *American Journal of Botany*, 88(8): 1371–1389, 2001.

PIERCE, S. The Jeweled Armor of *Tillandsia* - Multifaceted or Elongated Trichomes Provide Photoprotection. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 23 (1), Artigo 6, 2007.

PIREDA, S.; MIGUEL, E. C.; XAVIER, V.; CUNHA, M. Morpho-anatomical and ultrastructural analysis of extrafloral nectaries in *Inga edulis* (Vell.) Mart. (Leguminosae). *Nordic Journal of Botany*, 36 (7), (e01665), 2018.

PROENÇA, S. L.; SAJO, M. G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*. 21(3): 657-673, 2007.

PRYCHID, C. J.; RUDALL, P. J. Calcium oxalate crystals in monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany*, 84: 725-739, 1999.

ROCKWELL, E.; HOLBROOK, N. M.; STROOCK, A. D. The competition between liquid and vapor transport in transpiring leaves. *Plant Physiology*, 164 (4): 1741-1758, Abril, 2014.

SCATENA, V. L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, 28 (3), 635-649, jul.-set, 2005.

SCHRECK, E.; SARRET, G.; OLIVA, P.; CALAS, A.; SOBANSKA, S.; GUÉDRON, S.; BARRAZA, F.; POINT, D.; HUAYTA, C.; COUTURE, R. M.; PRUNIER, J.; HENRY, M.; TISSERAND, D.; GOIX, S.; CHINCHEROS, J.; UZU, G. Is *Tillandsia capillaris* an efficient bioindicator of atmospheric metal and metalloid deposition? Insights from five months of monitoring in an urban mining area. *Ecological Indicators*, 67: 227 - 237, 2016.

SCHREIBER, L.; SCHÖNHERR, J. Phase transitions and thermal expansion coefficients of plant cuticles: The effects of temperature on structure and function. *Planta*, 182: 186-193, 1990.

SCHREIBER, L. Polar paths of diffusion across plant cuticles: New evidence for an old hypothesis. *Annals of Botany*, 95: 1069–1073, 2005.

SCHUSTER, A. C.; BURGHARDT, M.; RIEDERER, M. The ecophysiology of leaf cuticular transpiration: are cuticular water permeabilities adapted to ecological conditions? *Journal of Experimental Botany*, 68 (19), 5271–5279, 2017.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica Monograph 14* (1), Hafner Press. p.1-658, 1974.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Tillandsioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*. 14: 663-1492. New York, 1977.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. Bromelioideae (Bromeliaceae). *Flora Neotropica*, 14: 1493- 2141. New York, 1979.

STEFANO, M.; PAPINI, A.; BRIGHIGNA, L. A new quantitative classification of ecological types in the bromeliad genus *Tillandsia* (Bromeliaceae) based on trichomes. *Revista de Biología Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation)*, 56 (1): 191-203, Março, 2008.

SVENDSEN, A. B.; VERPOORTE, R. Chromatography of alkaloids. Elsevier Scientific Publishing Company, New York, 1983.

TIMPERIO, A.M.; EGIDI, M. G.; ZOLLA, L. Proteomics applied on plant abiotic stresses: Role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics, 71: 391–411, 2008.

VASCONCELOS, A. L.; VASCONCELOS, A. L.; XIMENES, E. A.; RANDAU, K. P. *Tillandsia recurvata* L. (Bromeliaceae): Aspectos farmacognósticos. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada (Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences), 34(2): 151-159, 2013.

VERSIEUX, L. M.; VASCONCELLOS, N.; MARTINELLI, G. *Tillandsia bonita* (Bromeliaceae), a new species from Mato Grosso do Sul, Brazil, with notes on leaf anatomy. Systematic Botany, 38(1): 75-81, 2013.

VITE-POSADAS, J. A.; BRECHÚ-FRANCO, A. E.; LAGUNA-HERNÁNDEZ, G.; ROJAS-BRIBIESCA, M. G.; OSUNA-FERNÁNDEZ, H. R. Morphoanatomical characterization and antimicrobial activity of *Tillandsia imperialis* (Bromeliaceae). Polibotánica, 31: 21-29, 2011.

VOLTOLINI, C. H.; REIS, A.; SANTOS, M. Leaf morphoanatomy of the rheophyte *Dyckia distachya* Hassler (Bromeliaceae). Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, 7 (4): 335-343, out./dez, 2009.

WANNAZ, E. D.; CARRERAS, H. A.; ABRIL, G. A.; Pignata, M. L. Maximum values of Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ in the biomonitor *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae): Relationship with cell membrane damage. Environmental and Experimental Botany 74: 296–301, 2011.

ZWIENIECKI, M. A.; BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N. M. Hydraulic design of leaves: insights from rehydration kinetics. Plant, Cell and Environment, 30: 910–921, 2007.

Material Suplementar

**Resultados não divulgados pela D. Sc. Martha Lima de Oliveira e
Professor Flávio Costa Miguens (*in memoriam*)**

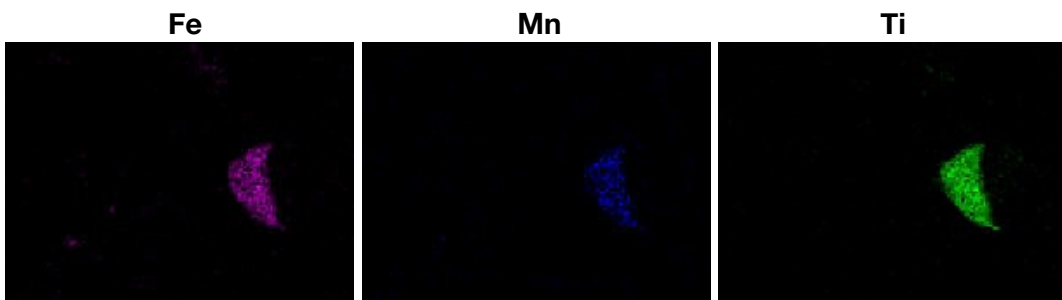
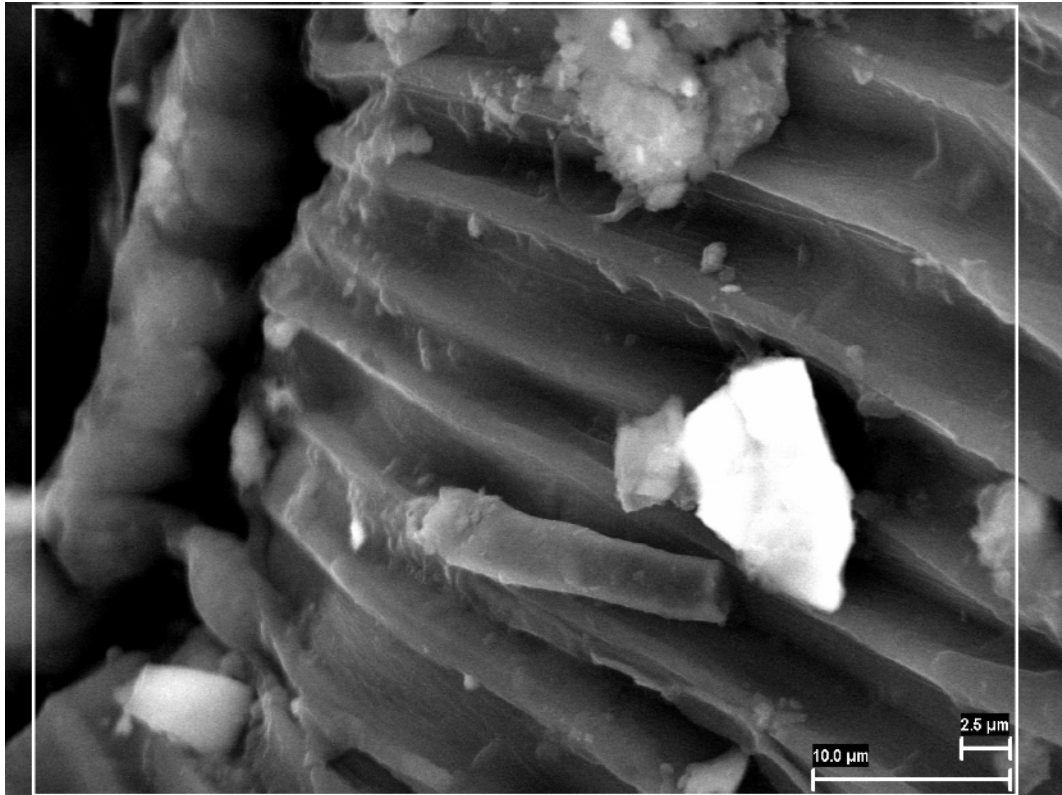
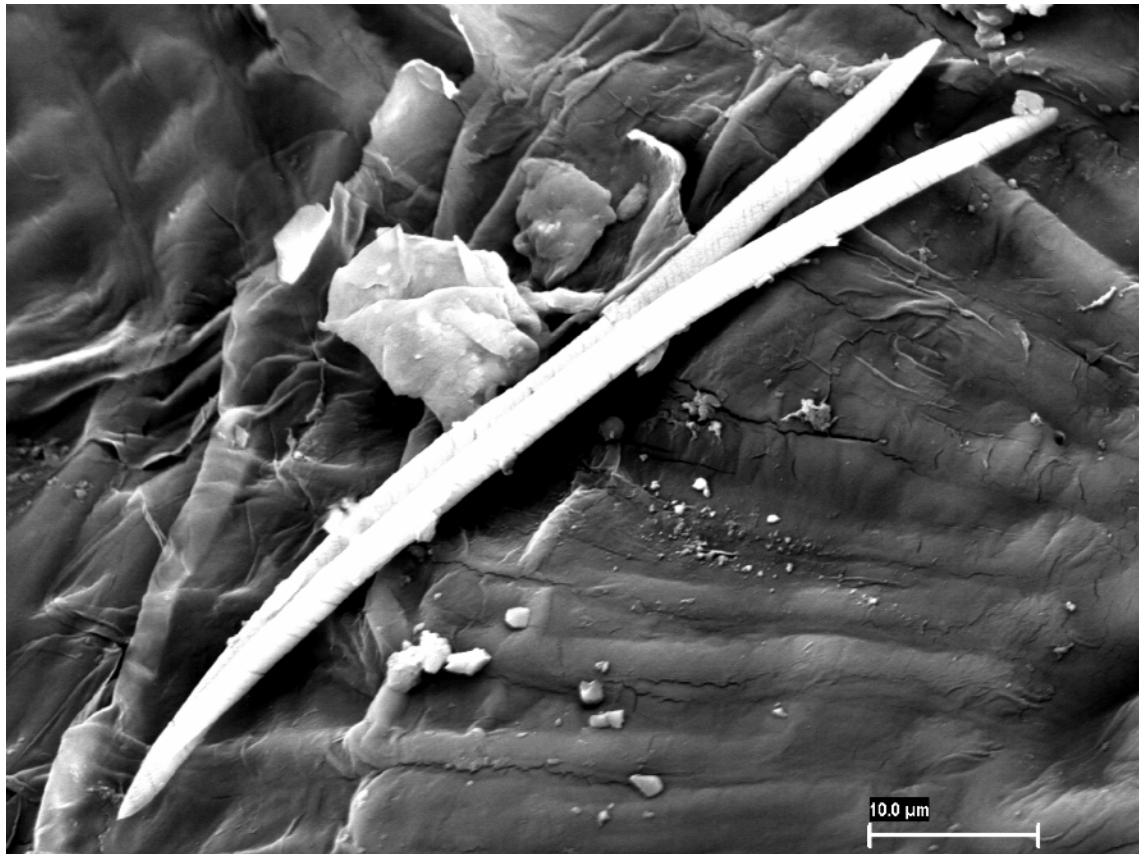


Figura 1. A sobreposição dos mapas de espectrometria de energia dispersiva de raio-X mostra que a partícula sobre a folha de *Tillandsia stricta* é uma liga metálica de ferro, manganês e titânio.



Ca

C

O

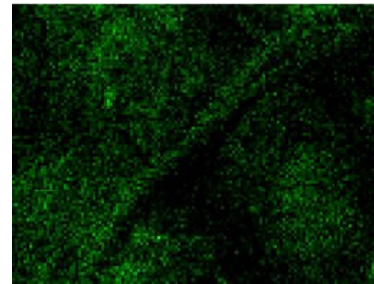
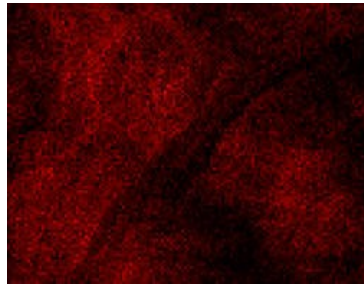
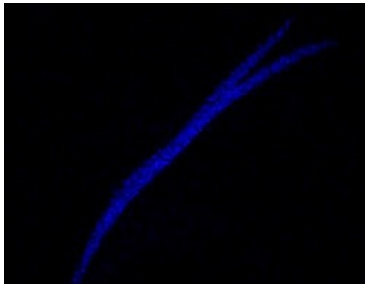
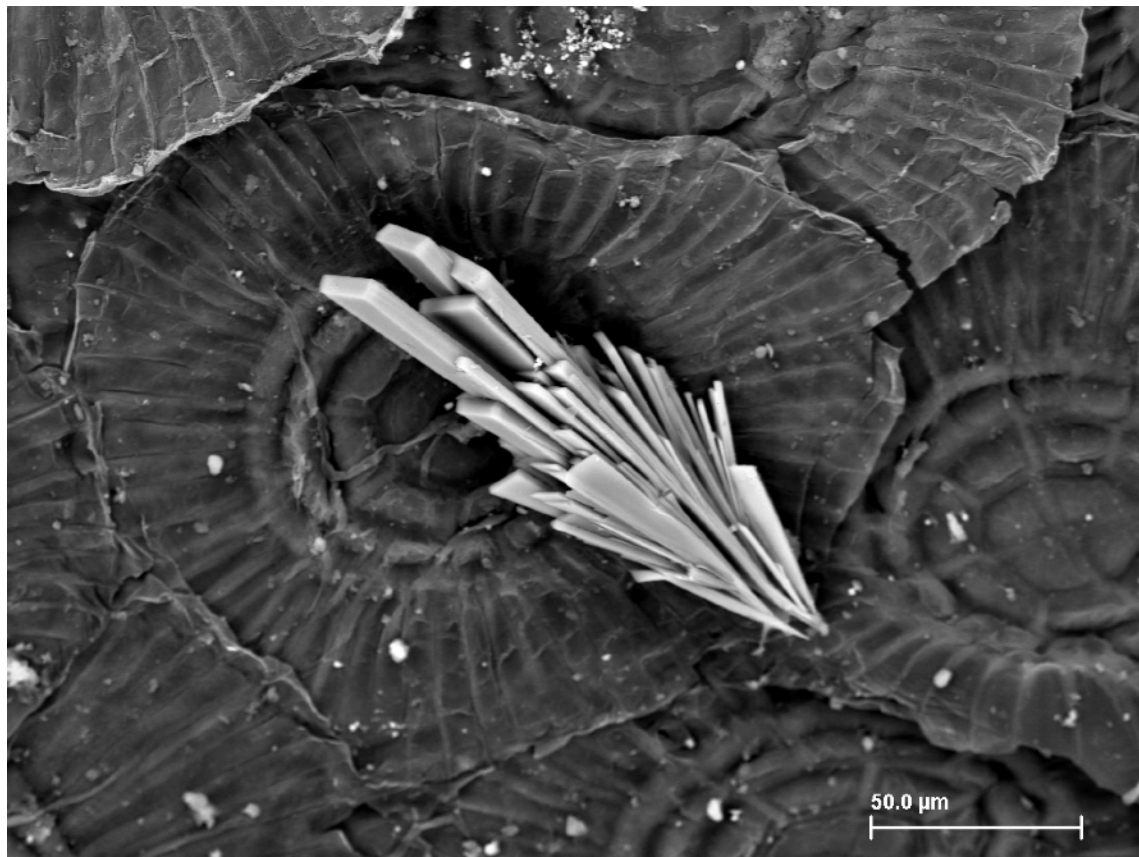


Figura 2. A sobreposição dos mapas de espectrometria de energia dispersiva de raio-X mostra que a partícula sobre a folha de *Tillandsia stricta* é composta por cálcio, carbono e oxigênio.



Ca

P

O

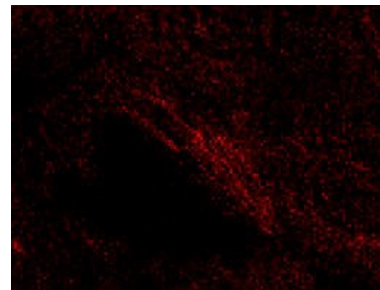
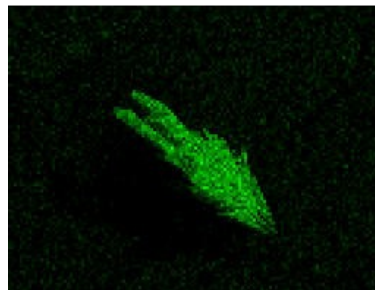
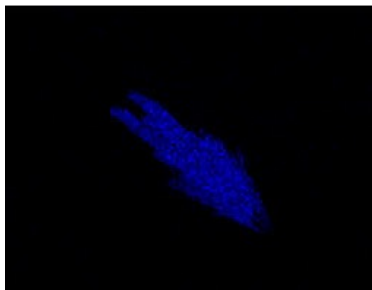


Figura 3. Os mapas de espectrometria de raio-X mostram que esta partícula depositada sobre a folha de *Tillandsia stricta* provavelmente é fosfato de cálcio.

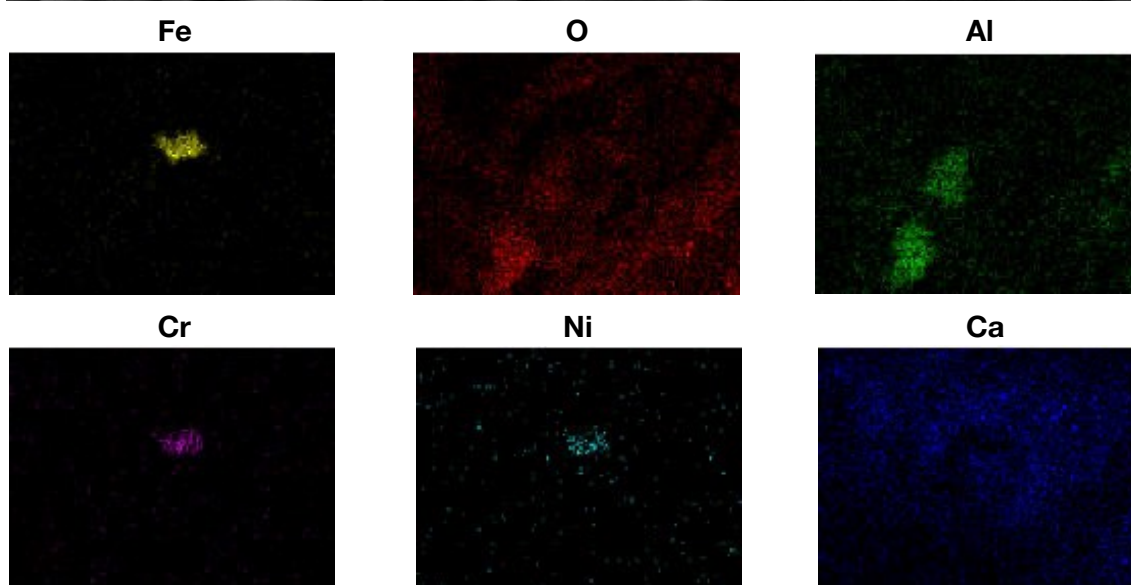
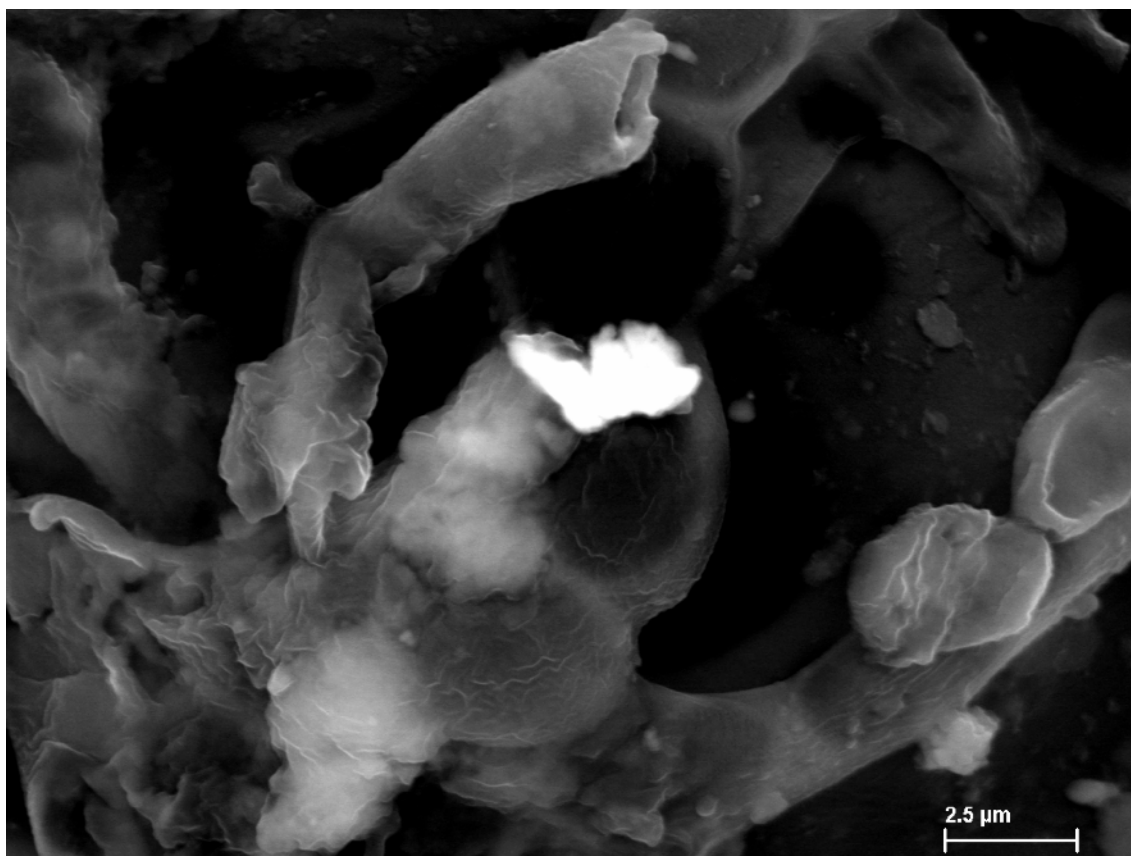


Figura 4. A sobreposição dos mapas permite inferir que o agregado sobre a folha de *Tillandsia stricta* é formado por óxido de ferro enriquecido com alumínio, cromo, níquel e cálcio.